UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANDRESSA ADAME

Sistema de análises em fluxo empregando multicomutação para avaliação de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Piracicaba
2014

ANDRESSA ADAME

Sistema de análises em fluxo empregando multicomutação para avaliação de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Adame, Andressa

Sistema de análises em fluxo empregando multicomutação para avaliação de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* / Andressa Adame; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

77 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise por injeção em fluxo 2. Bactérias gram-negativas 3. Bioensaios 4. Ecotoxicologia 5. Química ambiental 6. Química analítica I. Título

CDU 543.068.3 : 574.64

Aos meus pais, Edna e Adimilson, que sempre me incentivaram e apoiaram. Sem o seu amor e dedicação, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Aos meus queridos pais, por acreditarem nos meus sonhos e sempre me apoiarem;

À minha irmã, Larissa, pela paciência, compreensão e apoio nos momentos difíceis;

Ao Bruno, por estar ao meu lado, sempre me incentivando e apoiando, pelo companheirismo, amizade e paciência em todos os momentos. Agradeço também aos seus pais, Vaine e Benedito, pelo carinho, paciência e apoio nos momentos difíceis;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, pela infra-estrutura e apoio institucional oferecidos, para o desenvolvimento das atividades de pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos auxílios e bolsa;

Ao Prof. Fábio, pela orientação, paciência e amizade;

Aos amigos e companheiros de laboratório, Alex, Andréia, Carina, Diogo, Márcia, Rejane, pela amizade e convivência agradável. Da mesma forma, agradeço aos companheiros de departamento pelos ótimos momentos juntos;

Aos professores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamim Filho”, por compartilhar suas experiências e conhecimentos, pela amizade e discussões científicas;

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Química Analítica, em especial à Sheila Wenzel, pela atenção e auxílios prestados diariamente e pela amizade.

Agradeço também aos funcionários da Pós-Graduação e da Biblioteca, Daiane, Fábio, Neuda, Marília, pela atenção, presteza e apoio;

Ao Santander, pelo auxílio financeiro concedido para a realização do estágio na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto;

À Faculdade de Farmácia e à Universidade do Porto, pela infra-estrutura e apoio institucional oferecidos e aos professores José Luís Fontes da Costa Lima, Maria Lúcia Marques Ferreira de Sousa Saraiva e João Luis Machado dos Santos pela atenção, orientação e apoio durante o período em que realizei o estágio;

Aos colegas de laboratório da Faculdade de Farmácia, Susana, Marieta, Sofia, David, Cláudia, e à Dra. Paula Cristina de Azevedo Gomes Pinto, pela convivência agradável e pelas discussões sobre o trabalho realizado;

Aos amigos da Residência Universitária da Universidade do Porto Unidade Campo Alegre), Cintia, Mário, Nicolle, Miriam, Lorena, Sérgio, Eko, Aline, pelas risadas e pelo fantástico período em que convivemos diariamente;

Ao Dr. Diogo Librandi da Rocha pelos comentários e sugestões durante a revisão desta dissertação;

À Prof. Wanessa Melchert Mattos (ESALQ/USP), pelas discussões científicas e pela amizade;

Aos amigos de longa data que estiveram presentes ou, mesmo distantes, acompanharam todos os momentos (Ana Carolina, Bruna Batagin, Bruna Possato, Carla, Ivan, Henrique, Renata), agradeço pela amizade, compreensão, paciência e apoio;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização e na conclusão deste trabalho.

"A vitória está reservada para aqueles que estão dispostos a pagar o preço."

Sun Tzu, A arte da guerra.

RESUMO

ADAME, A. **Sistema de análises em fluxo empregando multicomutação para avaliação de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Um sistema de análises em fluxo com multicomutação foi desenvolvido para a mecanização do bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri*, o qual é baseado na diminuição da luminescência bacteriana causada por espécies tóxicas. Microbombas solenoide foram utilizadas para melhorar as condições de mistura, permitindo também que diluições fossem realizadas em linha com a alteração do volume de amostra e a sobreposição parcial entre a zona da amostra e a suspensão bacteriana. Uma cela de fluxo em espiral, posicionada na janela de emissão de um espectrofluorímetro, foi empregada para as medidas de luminescência e um banho de água construído em laboratório, baseado no efeito Peltier, foi utilizado para manter a temperatura do bioensaio em (13,0±0,1) °C. Um pequeno volume da suspensão bacteriana (120 µL) foi selecionado visando minimizar o consumo e, consequentemente, os custos do ensaio. O tempo de contato entre a suspensão bacteriana e a amostra foi reduzido para 5 min para aumentar a frequência de amostragem e evitar a atenuação da luminescência devido ao tempo de vida curto das bactérias. Os valores de CE_{50} para os controles positivos foram estimados em 2,5 ± 0,7, 2,0 ± 0,5 e 10 ± 4 mg L^{-1} para o Zn(II), Cu(II), e Cr(VI), respectivamente, sendo concordantes com os valores da literatura. Os valores de CE_{50} para alguns poluentes emergentes (parabenos, cafeína, acetaminofeno, diclofenaco e ácido salicílico) concordaram com os obtidos utilizando o kit comercial BioTox™, realizado em micro placa, a nível de confiança de 95 %. Os coeficientes de variação foram estimados em 2,4 e 2 % (n = 10), na ausência e na presença de 0,6 mg L^{-1} de Zn(II), respectivamente. O sistema de análises em fluxo proposto é, então, uma alternativa simples, rápida, robusta e precisa para a determinação da toxicidade aguda utilizando pequenos volumes de amostra e suspensão bacteriana. Além disso, o sistema apresenta vantagens em comparação com os bioensaios em batelada e em fluxo, tais como ajuste de salinidade e diluições das amostras em linha e a determinação da cinética de toxicidade das espécies químicas.

Palavras-chave: Análises em fluxo. Multicomutação. Multi-impulsão. Diluições em linha. Ecotoxicidade. Poluentes emergentes.

ABSTRACT

Adame, A. **A multicommuted flow-based system for acute toxicity evaluation with *Vibrio fischeri***. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A multicommuted flow system was developed for automation of the acute toxicity bioassay using *Vibrio fischeri* bacteria, which exploits the decrease of the bacterial luminescence caused by toxic species. Solenoid micro-pumps were employed to improve mixing conditions and to perform on-line dilutions of the tested compounds by changing the sample volume and exploiting the partial overlap between sample zone and the bacterial suspension. A spiral flow cell, placed at the emission window of a spectrofluorimeter, was employed for signal measurement and a lab-made water bath based on the Peltier effect was used for maintain the temperature of the bioassay at (13.0±0.1) ºC. A low volume of the bacterial suspension (120 µL) was selected in order to minimize its consumption and, consequently, the costs of the assay. The contact time between bacterial suspension and sample was reduced to 5 min to increase the sampling rate and to avoid luminescence fading due to the bacteria short lifetime. EC_{50} values for positive controls were estimated as 2.5 ± 0.7, 2.0 ± 0.5 and 10 ± 4 for Zn(II), Cu(II), and Cr(VI), respectively, being in agreement with literature values. The EC_{50} values for some emerging pollutants (parabens, caffeine, acetaminophen, diclofenac and salicylic acid) agreed with those obtained from commercial BioTox™ kit performed in micro plate at the 95% confidence level. The coefficients of variation were estimated as 2.4 and 2 % (n=10), in the absence and presence of 0.6 mg L^{-1} Zn(II), respectively. The proposed flow system is then a simple, fast, robust and accurate alternative for acute toxicity determination, using low sample and bacterial suspension volumes. Furthermore, the system presents advantages in comparison to batch and previous flow-based bioassays, such as the achievement of in-line salinity adjustment and sample dilutions, and the determination of toxicity kinetic for every assayed chemical species.

Keywords: Flow analysis. Multicommutation. Multi-pumping. In-line dilutions. Ecotoxicity. Emerging pollutants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma microbomba solenoide. 30
Figura 2. Representação das celas de fluxo avaliadas para medidas de luminescência 35
Figura 3. Esquema do banho de água empregado no controle de temperatura do bioensaio 36
Figura 4. Diagrama do módulo de análises utilizado na avaliação dos sistemas de detecção 38
Figura 5. Diagrama do módulo de análises para o estudo das diluições em linha e bioensaio com *Vibrio fischeri* 40
Figura 6. Sinais transientes e curvas de calibração obtidas com soluções de H_2O_2 sem adição de sílica 47
Figura 7. Sinais transientes e curvas de calibração obtidas com suspensões de sílica em meio de H_2O_2 48
Figura 8. Representação da estratégia de sobreposição parcial do reagente em diferentes porções da zona de amostra dispersa 52
Figura 9. Representação da estratégia empregada para maiores diluições 53
Figura 10. Intensidade de bioluminescência em função do tempo com diferentes concentrações de Zn(II) e gráfico ln C *versus* ln r 57
Figura 11. Curvas concentração-resposta obtidas para os parabenos 64
Figura 12. Perfis de toxicidade observados para Zn(II), metilparabeno e diclofenaco 66
Figura 13. Representação da relação concentração-resposta para Zn(II), metilparabeno e diclofenaco 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos organismos-teste utilizados para avaliações de toxicidade 24
Tabela 2 – Identificadores e propriedades físico-químicas dos parabenos utilizados nos ensaios de toxicidade 32
Tabela 3 - Identificadores e propriedades físico-químicas dos fármacos utilizados nos ensaios de toxicidade 33
Tabela 4 - Sequência de acionamento das microbombas solenoide para a investigação das diluições em linha ou para o bioensaio 41
Tabela 5 - Fatores de diluição de amostras e controles positivos empregados no teste de toxicidade com o kit comercial BioTox™ 44
Tabela 6 - Características analíticas estimadas com os diferentes sistemas de detecção avaliados para a detecção de H_2O_2 por quimiluminescência 46
Tabela 7 - Características analíticas avaliadas na medida de H_2O_2 utilizando as celas de fluxo comercial e em espiral 49
Tabela 8 – Volumes aferidos das microbombas solenoide 51
Tabela 9 - Fatores de dispersão alcançados com as estratégias de diluição em linha 54
Tabela 10 - Curvas de calibração obtidas com as diluições em linha e em batelada 54
Tabela 11 - Concentrações avaliadas de cada composto 56
Tabela 12 - Equações de linearização e coeficientes de correlação dos compostos avaliados 58
Tabela 13 - Valores estimados de CE_{50} para os poluentes emergentes e controle positivos 60
Tabela 14 - Valores de CE_{50} relatados na literatura para os compostos avaliados ... 61

Tabela 15 - Valores de log K_{ow} dos compostos avaliados 62
Tabela 16 – Classificação dos compostos avaliados em níveis de toxicidade 63
Tabela 17 - Parâmetros de regressão linear obtidos na avaliação de toxicidade dos parabenos através da relação concentração-resposta 64
Tabela 18 - Parâmetros de regressão linear obtidos na avaliação de toxicidade de Zn(II), metilparabeno e diclofenaco através da relação concentração-resposta 68
Tabela 19 - Parâmetros experimentais utilizados nos diferentes bioensaios em fluxo 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATP – Adenosina trifosfato

CE – Concentração efetiva

d.i. – Diâmetro interno

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

FIA – Análise por injeção em fluxo (do inglês, *Flow injection analysis*)

FMN – Flavina mononucleotídeo

$FMNH_2$ – Flavina mononucleotídeo reduzida

IC – Intervalo de confiança

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

OD – Oxigênio dissolvido

PVC – Cloreto de polivinila

SIA – Análise por injeção sequencial (do inglês, *Sequential Injection Analysis*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. Avaliação de risco ambiental e testes de toxicidade 21

1.2. Bioensaio com *Vibrio fischeri* 27

1.3. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação e multi-impulsão 28

1.4. Poluentes emergentes 31

2. PARTE EXPERIMENTAL 34

2.1. Equipamentos e acessórios 34

2.1.1. Sistemas de análises em fluxo 34

2.1.1.1. Avaliação dos sistemas de detecção 34

2.1.1.2. Estudos de diluição em linha e bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* 35

2.2. Reagentes e soluções 36

2.2.1. Avaliação dos sistemas de detecção e estudos de diluição em linha 36

2.2.2. Bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* 37

2.2.3. Reconstituição da bactéria *Vibrio fischeri* 37

2.3. Procedimentos 38

2.3.1. Avaliação dos sistemas de detecção 38

2.3.2. Sistema de análises em fluxo para avaliação das diluições em linha 39

2.3.3. Sistema de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* 42

2.3.4. Teste de toxicidade aguda com o kit BioTox ™ 43

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

3.1. Avaliação dos sistemas de detecção 45

3.2. Sistema de análises em fluxo para o estudo das diluições em linha 50

3.3. Sistema de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* 55

3.3.1. Estudos preliminares 55

3.3.2. Avaliação da toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* 56

3.3.3. Comparação dos sistemas de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri*.....68

4. CONCLUSÕES 70

REFERÊNCIAS 72

1. INTRODUÇÃO

Os ensaios ecotoxicológicos têm como objetivo avaliar o impacto dos contaminantes sobre os organismos vivos. Um dos ensaios mais utilizados emprega a fotobactéria marinha *Vibrio fischeri* e baseia-se no decréscimo de luminescência bacteriana causado pelas espécies tóxicas sob condições controladas. Embora seja simples, rápido, sensível e apresente boa relação custo-benefício quando comparado a outros ensaios, é um procedimento trabalhoso, requer analistas qualificados e apresenta baixa precisão. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide (MPFS, do inglês *Multi-pumping flow system*) para automatizar o bioensaio com a bactéria *Vibrio fischeri*. O sistema foi desenvolvido visando contornar os inconvenientes anteriormente mencionados e implementar as etapas do bioensaio em linha. Dentre essas etapas estão o ajuste de salinidade da amostra e a série de diluições empregada para a avaliação de toxicidade.

1.1. Avaliação de risco ambiental e testes de toxicidade

A avaliação de risco ambiental permite ponderar sobre a probabilidade de um resultado ou evento adverso ocorrer devido às mudanças nas condições ambientais causadas pela atividade humana, isto é, um procedimento formal para estimar o risco de danos ambientais antrópicos. Esse procedimento é realizado de forma sistemática e pode ser dividido em três partes: (i) preparação, onde é estabelecido o foco da avaliação e realizada a coleta e análise de informações relevantes; (ii) realização da avaliação e (iii) interpretação dos dados, elaboração de relatórios e aplicação dos resultados da avaliação [1].

Até recentemente, as avaliações de risco ambiental eram baseadas em informações obtidas através de métodos químicos e físico-químicos [2], incluindo o nível de oxigênio dissolvido (OD), as demandas química (DQO) e bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos e concentração de espécies orgânicas e inorgânicas que apresentassem limites estabelecidos nas legislações ambientais. Alternativamente aos ensaios químicos, técnicas bioanalíticas têm sido desenvolvidas para detectar e quantificar traços de contaminantes em amostras

ambientais. Essas técnicas são altamente seletivas, pois se baseiam na capacidade que determinadas moléculas biológicas (*e.g.* anticorpos, receptores, enzimas) ou células, têm de reconhecer propriedades estruturais específicas do analito [3]. Entretanto, o potencial de risco ambiental e os efeitos (aditivos, sinérgicos ou antagônicos) na toxicidade ocasionados pela mistura de substâncias não podem ser determinados com base nessas técnicas, já que não fornecem quaisquer informações sobre os efeitos biológicos [4].

Ensaios ecotoxicológicos[a] (testes de toxicidade) têm sido utilizados para avaliar o impacto dos contaminantes sobre os organismos vivos. Além disso, é possível avaliar a biodisponibilidade dos contaminantes e os efeitos causados por mistura de espécies químicas sobre determinado organismos. Desse modo, pode-se concluir que as análises químicas e físico-químicas, as técnicas bioanalíticas e os testes de toxicidade são complementares em avaliações de risco ambiental [5,6].

Os testes de toxicidade[b] são ensaios laboratoriais em que organismos-teste[c] são expostos a diferentes concentrações de poluentes para que os efeitos tóxicos produzidos sejam observados e quantificados. Esses ensaios são realizados sob condições experimentais específicas determinadas por normas e com procedimentos padronizados, utilizando controles negativo e positivo para avaliar a validade dos resultados. O controle negativo é realizado com o organismo-teste na ausência do poluente para avaliar se os efeitos observados são causados por outros fatores. Por outro lado, o controle positivo é realizado com uma substância química de referência com efeito tóxico conhecido para assegurar que o organismo-teste responda adequadamente.

Testes de toxicidade têm sido aplicados a efluentes industriais [6,7], sedimentos [8-11], substâncias lixiviadas de aterros sanitários [12,13], águas superficiais [14] e residuais [15], lodos de esgotos [16,17], solos contaminados por metais [18,19] e hidrocarbonetos [20], entre outros. O monitoramento da toxicidade

[a] A ecotoxicologia centra seus estudos nos efeitos causados por diferentes agentes físicos e químicos sobre a dinâmica de populações e ou comunidades integrantes de ecossistemas definidos. É considerada uma área especializada da toxicologia ambiental,

[b] A toxicidade reflete o potencial de uma substância em provocar efeitos adversos que sejam danosos aos organismos vivos. É uma propriedade dependente das características físico-químicas e da concentração da substância e do tempo de exposição do organismo à esta.

[c] Organismos-teste são espécies que devem apresentar biologia, fisiologia e hábitos alimentares conhecidos, facilidade de cultivo em laboratório, representação ecológica significativa, relativa sensibilidade aos contaminantes de interesse, entre outras características, para que possam ser utilizados nos testes de toxicidade. A forma de cultivo e as metodologias de ensaio para estes organismos são definidas em normas técnicas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados.

de poluentes ambientais [21] e a eficiência de degradação de fármacos [22], pesticidas [23] e inseticidas [24] também são realizadas com esse tipo de ensaio.

Para a avaliação de toxicidade, geralmente são utilizados organismos aquáticos, tais como algas, crustáceos e peixes, pois os ecossistemas aquáticos são os principais receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes ou indiretamente, através da atmosfera ou da lixiviação de espécies depositadas no solo. Entretanto, os ensaios baseados nesses organismos usualmente requerem grande volume de amostra e elevado tempo de exposição (contato entre amostra e organismo-teste).

Outras desvantagens são associadas aos ensaios com animais e plantas, tais como problemas com a manutenção dos organismos, a necessidade de equipamentos especiais e de operadores qualificados, além da baixa reprodutibilidade e dos aspectos éticos envolvidos [25]. Por esses motivos, os ensaios baseados em microorganismos vêm se tornando usuais, apresentando rapidez, alta reprodutibilidade e baixo custo.

Os ensaios de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos, de acordo com o tempo de exposição e as respostas específicas medidas nos ensaios. Os ensaios de toxicidade aguda têm como objetivo avaliar a capacidade do agente tóxico de causar danos (morte ou imobilidade) aos organismos-teste após um curto período de exposição, inferior a 96 horas [6-8,26,27]. Por outro lado, nos ensaios de toxicidade crônica, os organismos são expostos a concentrações sub-letais do agente tóxico por um intervalo de tempo mais significativo em relação ao seu ciclo de vida. Nesses ensaios, são avaliados os efeitos do agente na reprodução e no desenvolvimento, no crescimento e na maturação dos ovos [4,5,27]. Os microorganismos comumente utilizados para ambos os ensaios são microalgas, microcrustáceos e bactérias. Na Tabela 1 são apresentadas informações sobre o tipo de teste, o tempo de duração e a resposta específica destes microorganismos [28].

Tabela 1 - Características de organismos-teste utilizados para avaliações de toxicidade

Nível trófico	Organismos-teste	Tipo	Duração	Ponto final	Nome comercial
Produtores	Microalga				
	Pseudokirchneriella subcapitata	Crônico	72 h	Inibição do crescimento	Algaltoxkit ®
	Lentilha d'água				
	Lemna minor	Crônico	168 h	Inibição do crescimento	-
Consumidores	Rotíferos				
	Brachionus calyciflorus	Agudo	24 h	Mortalidade	Rotoxkit F Acute®
		Crônico	48 h	Reprodução	Rotoxkit F Chronic®
	Crustáceos				
	Daphnia magna	Agudo	48 h	Imobilização	Daphtoxkit F magna®
	Thamnocephalus platyurus	Agudo	60 min	Inibição do metabolismo	Rapidtoxkit®
		Agudo	24 h	Mortalidade	Thamnotoxkit F®
Decompositores	Bactéria				
	Vibrio fischeri	Agudo	15 min	Inibição da luminescência	Microtox®, BioTox™, Biolux® Lyo
	Protozoários				
	Spirostomum ambiguum	Agudo	24 h	Deformações morfológicas	Spirotox
	Tetrahymena thermophila	Agudo	24 h	Inibição do crescimento	Protoxkit F®

Apesar de existirem diferentes mecanismos de toxicidade para as diferentes espécies, uma substância tóxica para um organismo pode apresentar efeitos similares em outros. Por exemplo, o decréscimo de luminescência (inibição) de uma população bacteriana, causado por determinada substância, pode indicar também efeitos tóxicos em microcrustáceos [25,29].

Os ensaios de toxicidade que utilizam bactérias como organismo-teste (bioensaios bacterianos) têm sido muito utilizados por serem simples, rápidos e apresentarem boa correlação com aqueles que utilizam outros organismos-teste [29]. Esses bioensaios podem ser divididos em cinco categorias, explorando: (i) crescimento populacional, (ii) consumo de substrato, (iii) respiração, (iv) luminescência do ATP[d] e (v) inibição de luminescência [25].

Atualmente, o bioensaio bacteriano mais utilizado para avaliações de toxicidade de poluentes ambientais é baseado na inibição de luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Este ensaio é baseado no contato da suspensão bacteriana com soluções contendo diferentes fatores de diluição (série de diluições) do poluente (amostra). As medidas de luminescência são obtidas após o período de exposição (5, 15 ou 30 min) à amostra ou amostra diluída (diluições-teste). O decréscimo de luminescência é medido em relação ao controle negativo. Assim, o efeito inibitório pode ser determinado como CE_{20} e ou CE_{50}, que são concentrações efetivas que causam diminuição de 20 e 50% na bioluminescência, respectivamente, mediante a série de diluições.

A luminescência da suspensão bacteriana representa a resposta de milhões de células e o decréscimo da intensidade reflete uma diminuição na taxa de atividade biológica que, indiretamente, quantifica os organismos afetados [30]. No entanto, a intensidade de luminescência da suspensão empregada no bioensaio apresenta uma tendência a diminuir gradualmente, pois as células liofilizadas são reativadas e suspensas em meio salino sem os nutrientes adequados para sua manutenção metabólica e crescimento. Outro efeito que pode ser observado é o aumento acentuado na intensidade de luminescência seguido da estabilização quando a aclimatação à temperatura controlada não é realizada. Sendo assim, a luminescência do controle negativo (I_0) deve ser corrigida utilizando o fator de correção (f_{ct}, equação 1), para o tempo de contato pré-estabelecido

[d] Adenosina trifosfato (ATP) é um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas.

(usualmente 5, 15 ou 30 min). Na equação 1, $\mathbf{I_{ct}}$ é a intensidade de luminescência do controle negativo após o período de exposição. Esta correção é necessária para que as alterações na luminescência da suspensão sem o poluente (inibidor) estejam dentro da faixa de 0,6 a 1,8 estabelecida pela norma técnica ABNT NBR 15411-3:2006 [31]. Esse fator de correção deve ser aplicado aos valores iniciais de I_0 para cada diluição-teste antes que os mesmos sejam utilizados nos cálculos de diminuição de luminescência causada pela amostra.

$$f_{ct} = I_{ct} / I_0 \qquad (1)$$

Após estimativa de $\mathbf{f_{ct}}$, calcula-se o valor de gamma (Γ), de acordo com a equação 2, na qual os efeitos tóxicos são expressos em termos de razão de atividade biológica perdida pela atividade remanescente. $\mathbf{I_0}$ e $\mathbf{I_t}$ são as intensidades de luminescência inicial corrigida para o tempo de contato estabelecido e após o tempo de contato, respectivamente.

$$\Gamma = (I_0 / I_t) - 1 \qquad (2)$$

O parâmetro **Γ** é usado para avaliar a relação concentração-efeito, para cada nível de diluição. Quando a perda de atividade iguala-se à atividade remanescente (Γ = 1), significa que houve um decréscimo de 50% na luminescência, correspondendo ao valor de CE_{50}.

Embora seja possível medir o decréscimo de luminescência de forma simples e direta, uma relação linear é obtida graficamente com ln C função de ln Γ. A equação da reta (equação 3) descreve a relação concentração-efeito da amostra com determinado tempo de exposição, em que **C** é a concentração percentual da amostra em cada diluição-teste, **Γ** é o valor associado à relação concentração-efeito para cada diluição e **a** e **b** são os coeficientes linear e angular da reta.

$$\ln C = a + b \ln \Gamma \qquad (3)$$

A partir da linearização, os valores de CE_{20} ou CE_{50} são calculados com seus respectivos limites de confiança, considerando Γ = 0,25 ou Γ = 1,00, respectivamente.

1.2. Bioensaios com *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri é uma espécie de bactéria marinha luminescente, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Em condições ambientais favoráveis, essas bactérias emitem luz naturalmente e a intensidade de emissão é diretamente proporcional à atividade metabólica e à integridade celular da população bacteriana. Sendo assim, qualquer efeito de inibição de atividade enzimática resulta em diminuição da bioluminescência [27].

Na reação de luminescência da *Vibrio fischeri*, a flavina mononucleotídeo reduzida ($FMNH_2$) [e] é um componente essencial que pode ser fornecido pelo NAD(P)H e flavina mononucleotídeo (FMN), através da reação enzimática (equação 4) [32]. A enzima que catalisa essa reação é conhecida como NAD(P)H:FMN óxido-redutase (EC 1.6.8.1), a qual também é chamada de FMN redutase, NADH dehidrogenase/oxidase ou flavina redutase.

Em organismos aeróbios, a $FMNH_2$ é rapidamente oxidada pelo oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio e FMN (equação 5). Entretanto, na *Vibrio fischeri*, uma $FMNH_2$ livre é utilizada para gerar bioluminescência. A enzima luciferase bacteriana, que tem um sítio de ligação para $FMNH_2$, catalisa a reação de produção de luz utilizando $FMNH_2$, oxigênio molecular e um aldeído alifático (R-CHO) (equação 6).

$$NAD(P)H + H^+ + FMN \rightarrow NAD(P)^+ + FMNH_2 \qquad (4)$$

$$FMNH_2 + O_2 \rightarrow FMN + H_2O_2 \qquad (5)$$

$$FMNH_2 + O_2 + R\text{-}CHO \rightarrow FMN + H_2O + R\text{-}COOH + h\nu\ (490\ nm) \qquad (6)$$

Como a reação (equação 6) só ocorre se as condições ambientais para a sobrevivência da bactéria forem satisfeitas, a luminescência reflete a sua atividade metabólica e integridade celular. Parâmetros como salinidade e temperatura [33], pH e composição iônica [34] devem ser controlados tanto na suspensão bacteriana

[e] Flavina mononucleotídeo (FMN ou riboflavina fosfato) é uma das duas coenzimas derivadas da riboflavina (vitamina B2), sendo a outra a flavina adenina dinucleotídeo (FAD).

quanto nas amostras. Além disso, quando estas não atendem às condições ótimas, devem ser realizados ajustes antes da execução do bioensaio, visando à obtenção de resultados confiáveis.

Os ensaios realizados em batelada utilizam os reagentes e a suspensão bacteriana adquiridos na forma de kits comerciais (Microtox®, BioTox™ ou Biolux® Lyo). Os parâmetros experimentais e o tempo de exposição são difíceis de serem controlados com precisão. Além disso, o tempo de análise é elevado, são necessários analistas qualificados e a reprodutibilidade é baixa. A automação do bioensaio através do emprego de sistemas de análise em fluxo permite contornar essas desvantagens.

Na literatura, alguns sistemas para mecanização do bioensaio de toxicidade têm sido propostos, utilizando os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) [35] e por injeção sequencial (SIA) [36] para melhorar a reprodutibilidade através do controle preciso do tempo de contato entre a amostra e a suspensão bacteriana. Entretanto, esses sistemas apresentam algumas desvantagens: (i) o ajuste de salinidade e as diluições-teste são feitos em batelada, o que eleva o tempo total das análises e aumenta a susceptibilidade a erros, (ii) fluxo laminar, que proporciona condições de mistura limitadas, e (iii) elevados volumes de suspensão bacteriana e de amostra, no caso do sistema FIA, o que aumenta os custos do ensaio e a geração de efluentes.

1.3. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação e multi-impulsão

Os sistemas de análises em fluxo são baseados na inserção de soluções em um fluxo transportador e no processamento da amostra sob condições altamente reprodutíveis. Durante o transporte através do percurso analítico, a amostra recebe os reagentes necessários e pode passar por etapas de separação e concentração do analito. A zona de amostra formada passa por uma bobina de reação, em que ocorre a mistura entre as soluções de modo reprodutível e sem que as reações atinjam necessariamente o equilíbrio químico, o que favorece a exploração de aspectos cinéticos e do gradiente de concentração do analito. Medidas fora do estado de equilíbrio também garantem uma redução significativa do tempo de análise e, consequentemente, um aumento na frequência de amostragem. Todo o

processo é realizado em um sistema fechado, minimizando contaminações da amostra e perdas do analito [37].

Inicialmente, sistemas de análises em fluxo foram empregados na automação das etapas de processamento de amostra, incluindo modificações na matriz e diluições, visando reduzir o tempo de processamento [38]. Seringas hipodérmicas eram utilizadas para inserir a amostra no transportador sendo, posteriormente, substituídas pelo injetor proporcional, válvulas e microbombas solenoide, válvulas rotatórias, entre outros [39,40].

A utilização de dispositivos eletrônicos controlados independentemente deu origem aos sistemas de análises em fluxo com multicomutação, nos quais são empregados dispositivos discretos (válvulas e microbombas solenoide) controlados por computador. Esses sistemas podem ser reconfigurados pelo *software* de controle, apresentando maior versatilidade. Além disso, são características inerentes a esses sistemas o potencial para automação, a redução no consumo de reagentes e geração de efluentes devido ao consumo de microlitros de solução e o gerenciamento das soluções e implementação das etapas envolvidas no processo analítico de forma independente. Essas características permitem a exploração de diversas estratégias, entre elas a parada de fluxo [41], diluições em linha [42] e determinações simultâneas [43], com desempenho analítico superior ao observado em sistemas de análises em fluxo convencionais [37,44].

As válvulas e microbombas solenoide são dispositivos eletromecânicos. As válvulas permitem a comutação de soluções em momentos pré-estabelecidos e requerem um sistema de propulsão (*e.g.* bomba peristáltica ou seringas) ou a ação da força da gravidade. Por outro lado, as microbombas dispensam com precisão volumes de soluções da ordem de microlitros [45] e podem ser empregadas tanto como comutadores, quanto para a propulsão das soluções e amostragem [46].

O esquema de funcionamento de uma microbomba solenoide é apresentado na Figura 1. As microbombas solenoide são constituídas basicamente de uma barra ferromagnética (A) com um solenoide (B) ao seu redor, conectada a uma mola (E) na parte superior e a um diafragma flexível (F) na parte inferior, envoltos em material metálico, válvulas de entrada e saída de soluções (D e G) e um canal (C) por onde passam as soluções. Um material polimérico, resistente aos choques mecânicos, ao calor e à passagem de corrente, recobre os componentes inferiores.

Quando corrente elétrica (*ca.* 100 mA) é aplicada ao solenoide (Figura 1.2), um campo magnético é gerado, movimentando a barra metálica de forma a comprimir a mola da parte superior. Esse movimento resulta na expansão do diafragma, que diminui a pressão interna da câmara, permitindo a entrada de solução no canal (C). Quando a corrente é interrompida (Figura 1.3), o campo magnético é desativado, o diafragma é fechado e a solução que preenchia a câmara interna da microbomba é expelida, devido à ação da mola sobre a barra ferromagnética. As válvulas de entrada e saída de soluções (D e G) são abertas e fechadas conforme a atuação da microbomba. O tempo de atuação da microbomba é da ordem de milissegundos e a frequência de acionamento e o volume dispensado determinam a vazão das soluções.

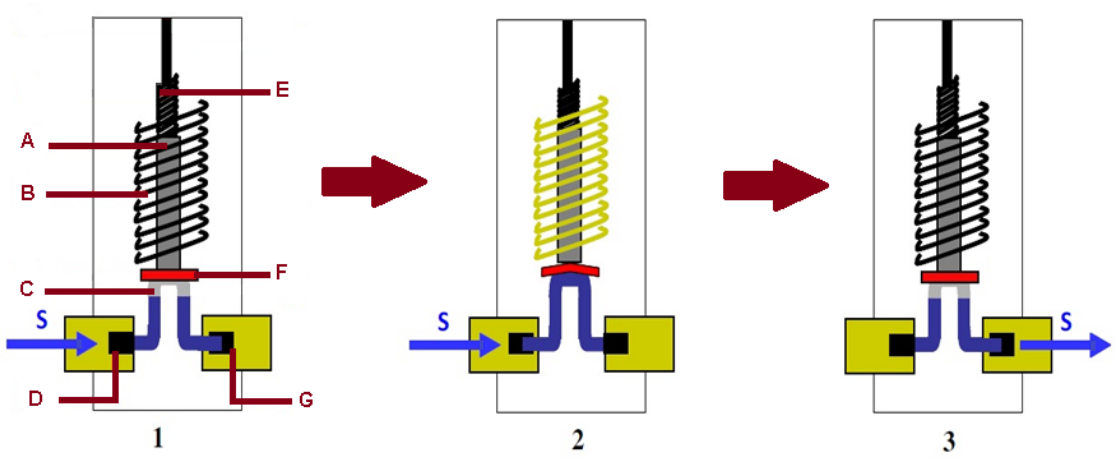


Figura 1 - Representação esquemática de uma microbomba solenoide. A – barra ferromagnética, B – solenoide, C – canal para passagem de soluções D – válvula de entrada, E – mola compressível, F – diafragma flexível, G – válvula de saída, S – soluções. Microbomba desligada (1 e 3) ou acionada (2). Adaptada da referência 47

As condições de mistura entre amostra e reagente são favorecidas pelo fluxo pulsado inerente às microbombas solenoide, que melhora o transporte de massa radial [48] em comparação aos sistemas convencionais [45].

1.4. Poluentes emergentes

Os poluentes emergentes são novas substâncias ou produtos químicos sem legislação apropriada, cujos efeitos no ambiente e na saúde humana ainda são pouco conhecidos [49].

Alguns fármacos e compostos utilizados como desinfetantes, conservantes, repelentes de insetos e fragrâncias em produtos de higiene pessoal (*e.g.* sabonetes, cremes dentais, loções, perfumes, protetores solares) são os poluentes emergentes mais encontrados nas águas residuais. Os compostos geralmente não sofrem alterações metabólicas, sendo encontrados em grandes quantidades em suas formas inalteradas. Além disso, muitos desses compostos são bioativos, persistentes e apresentam potencial para bioacumulação [50,51].

Parabenos são alquil ésteres do ácido *para*-hidroxibenzóico empregados como conservantes em fármacos, produtos alimentícios e de higiene pessoal. Esses ésteres apresentam atividade antimicrobiana, estabilidade numa ampla faixa de pH e solubilidade em água. Por esse motivo, os parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) são incluídos nas formulações para a estabilização química e biológica. O metil e o propilparabeno são pouco tóxicos aos animais por ambas as vias oral e parentérica [52].

Cafeína, paracetamol (acetaminofeno), diclofenaco e os ácido salicílico e acetilsalicílico são fármacos de ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória amplamente utilizados. Esses fármacos estão entre os principais poluentes em águas residuais, não sendo eliminados através do tratamento com lodo ativado, permitindo-lhes alcançar os cursos d'água superficiais e, assim, distribuir-se no ambiente [53].

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas dos poluentes emergentes citados acima, além dos nomes usuais, nomenclaturas recomendadas pela IUPAC e números CAS utilizados como identificadores.

Tabela 2 – Identificadores e algumas propriedades físico-químicas dos parabenos utilizados nos ensaios de toxicidade

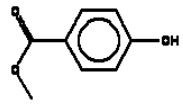
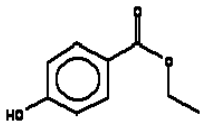
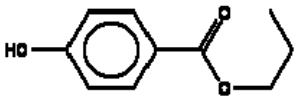
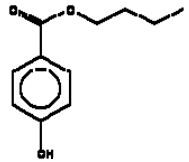
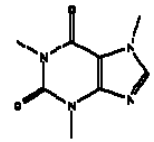
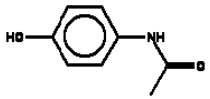
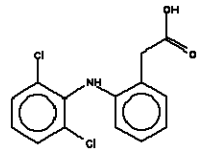
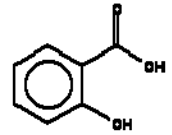
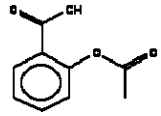
Nome comum	**Número CAS**	**Nome IUPAC**	**Fórmula Molecular**	**Massa molar (g mol^{-1})**	**Solubilidade em água (g L^{-1}), 25 °C**	**Estrutura Molecular**
Metilparabeno	99-76-3	4-hidroxibenzoato de metila	$C_8H_8O_3$	152,15	2,50	
Etilparabeno	120-47-8	4-hidroxibenzoato de etila	$C_9H_{10}O_3$	166,17	1,70	
Propilparabeno	94-13-3	4-hidroxibenzoato de propila	$C_{10}H_{12}O_3$	180,20	0,40	
Butilparabeno	94-26-8	4-hidroxibenzoato de butila	$C_{11}H_{14}O_3$	194,23	0,20	

Tabela 3 – Identificadores e algumas propriedades físico-químicas dos compostos utilizados nos ensaios de toxicidade

Nome comum	**Número CAS**	**Nome IUPAC**	**Fórmula Molecular**	**Massa molar (g mol^{-1})**	**Solubilidade em água (g L^{-1}), 20 °C**	**Estrutura Molecular**
Cafeína	58-08-2	1,3,7-trimetil-1*H*-purino-2,6(3*H*,7*H*)-diona	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,19	20,00	
Paracetamol	103-90-2	*N*-(4-hidroxifenil)etanamida	$C_8H_9NO_2$	151,16	12,75	
Diclofenaco	15307-86-5	Ácido 2-[2-(2,6-diclorofenil)amino] benzoacético	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296,15	4,70[a]	
Ácido salicílico	69-72-7	Ácido 2-hidroxibenzóico	$C_7H_6O_3$	138,12	2,17	
Ácido acetilsalicílico	50-78-2	Ácido 2-acetoxibenzóico	$C_9H_8O_4$	180,16	3,00	

[a] Solubilidade do diclofenaco de potássio.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipamentos e acessórios

2.1.1. Sistemas de análises em fluxo

2.1.1.1. Avaliação dos sistemas de detecção

O módulo de análises para a avaliação dos sistemas de detecção foi construído com tubos de polietileno (0,8 mm d.i.), confluências de acrílico, uma bomba peristáltica (Ismatec) equipada com tubos de Tygon® com diferentes diâmetros internos e um injetor proporcional com barra deslizante.

Os sistemas de detecção avaliados foram constituídos por uma cela de medida e um fotossensor, sendo: (i) um luminômetro construído em laboratório, equipado com cela de fluxo de polietileno em espiral (0,8 mm d.i. e 500 µL de volume interno) e fotodiodo com 50 mm^2 de área sensível (OSD50-E, RS 846-711), ambos no interior de um compartimento fechado com superfície interna côncava e revestida com material espelhado [54] e (ii) um espectrofluorímetro (Agilent) operando no modo de quimiluminescência/bioluminescência, equipado com cela de fluxo de quartzo com 40 µL de volume interno (Figura 2A) ou cela de polietileno em espiral (0,8 mm d.i. e 500 µL de volume interno, Figura 2B), que foi posicionada em frente à janela de emissão. A fenda de emissão foi ajustada para se obter resolução de 20 nm. O tempo de integração e voltagem empregados foram 5 ms e 600 V, respectivamente.

A aquisição dos dados do luminômetro e espectrofluorímetro foi realizada com um programa desenvolvido em linguagem Visual Basic 3.0 (Microsoft) ou pelo software fornecido pelo fabricante, respectivamente.

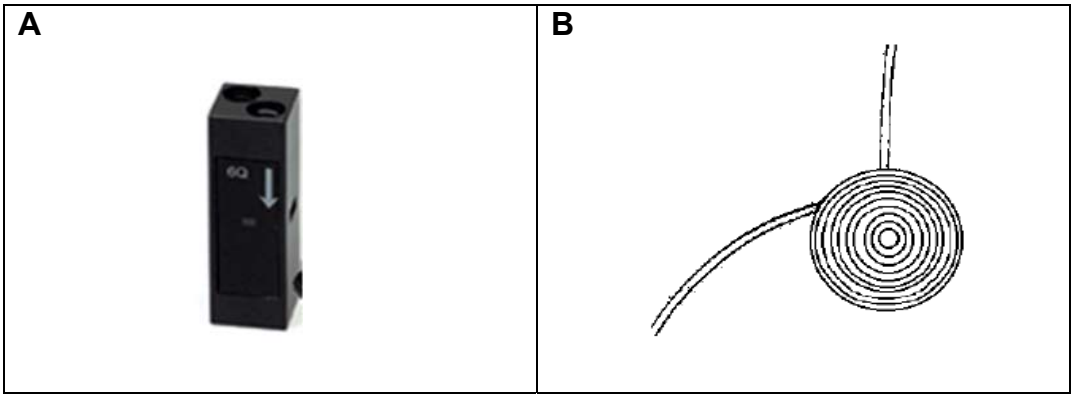


Figura 2 - Representação das celas de fluxo avaliadas para medidas de luminescência: (A) cela de quartzo e (B) cela de polietileno

2.1.1.2. Estudos de diluição em linha e bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria Vibrio fischeri

O módulo de análises para os estudos de diluição em linha e para o bioensaio de toxicidade foi construído com microbombas solenoide (Bio-Chem Valve), com volumes nominais de 10 e 20 µL, válvula solenoide de três vias (NResearch), tubos de polietileno (0,8 mm d.i.) e confluências de acrílico. As microbombas e válvulas solenoide foram controladas por microcomputador (Pentium 4), através de uma porta paralela disponível, utilizando um circuito eletrônico baseado em circuito integrado ULN2803. O programa utilizado para controlar os dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft).

As medidas de bio e quimiluminescência foram efetuadas em espectrofluorímetro (Agilent) equipado com cela de polietileno em espiral, posicionada em frente à janela de emissão. A fenda de emissão foi ajustada para se obter resolução espectral de 20 nm. O tempo de integração e a diferença de potencial aplicados na fotomultiplicadora foram: (i) 5 ms e 600 V para os estudos de diluição em linha e (ii) 100 ms e 800 V para o bioensaio. A aquisição de dados foi realizada utilizando o software fornecido pelo fabricante.

A temperatura do bioensaio foi controlada em (13,0±0,1) °C por imersão da suspensão bacteriana e da bobina de dispersão em um banho de água portátil (Figura 3) construído em laboratório, baseado no efeito Peltier [55]. A temperatura ambiente foi controlada em (17±1) °C.

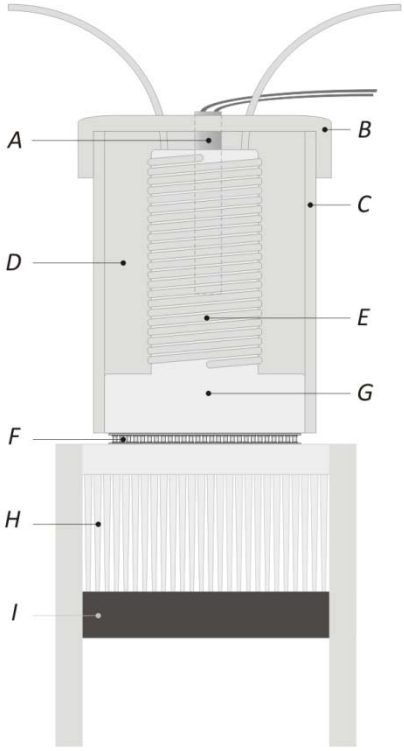


Figura 3 - Esquema do banho de água empregado no controle de temperatura do bioensaio. A – sensor de temperatura, B – tampa de Nylon®, C – luva de PVC, D – água, E – bobina de polietileno, F – célula Peltier, G – núcleo de alumínio, H – dissipador de calor de alumínio, I – mini ventilador

2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada (18,0 MΩ cm).

2.2.1. Avaliação dos sistemas de detecção e estudos de diluição em linha

Soluções estoque de peróxido de hidrogênio 0,975 mmol L^{-1} foram preparadas a partir de uma solução 30,0 %(m/m), previamente padronizada com permanganato de potássio [56]. Soluções de referência foram preparadas diariamente por diluições da solução estoque. A solução de luminol 4,50 mmol L^{-1} foi preparada dissolvendo-se 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinadiona em K_2CO_3

0,2 mol L^{-1} com pH previamente ajustado a 10,5. As soluções de hexacianoferrato(III) de potássio 12,5 e 25,0 mmol L^{-1} foram preparadas em água, dissolvendo-se quantidades apropriadas do sal.

2.2.2. Bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria Vibrio fischeri

Soluções de NaCl 4,0 e 2,0 %(m/v) foram utilizadas para o ajuste de salinidade e como diluente/transportador, respectivamente. Bactérias liofilizadas (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177) e solução de reativação (0,009% NaCl) foram adquiridas com o kit comercial Biolux® Lyo05[f]. A solução para reconstituição das bactérias liofilizadas foi preparada de acordo com a norma técnica ABNT NBR 15411-3 [31] contendo 20,000 g de NaCl, 2,035 g de $MgCl_2.6H_2O$ e 0,300 g de KCl em 1,00 L de água. $ZnSO_4.7H_2O$, $K_2Cr_2O_7$ e $CuSO_4.5H_2O$ foram usados para preparar soluções utilizadas como controle positivo para o bioensaio de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

Soluções de 0,05 – 6,00 g L^{-1} de poluentes emergentes (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cafeína, paracetamol, diclofenaco de potássio, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico) foram preparadas em água e em 2,0 %(m/v) de NaCl, para o ensaio com o sistema proposto e kit comercial, respectivamente.

Soluções 1,0 mol L^{-1} de HCl e NaOH foram utilizadas para ajuste de pH das soluções, quando necessário, de forma que o mesmo estivesse sempre dentro da faixa estabelecida para os ensaios com *Vibrio fischeri*, *i.e.* entre 6,0 e 8,5 [31].

2.2.3. Reconstituição da bactéria Vibrio fischeri

A bactéria liofilizada foi misturada com 1 mL de solução de reativação, imediatamente antes do ensaio. Essa solução foi transferida de uma vez para o recipiente (ampola) contendo as bactérias, visando minimizar possíveis danos aos organismos durante a reidratação. A suspensão foi mantida a 5 °C por 5 min e, em

[f] O kit é composto por 10 ampolas (1mL), contendo *ca.* 10^8 células mL^{-1}, e um frasco de solução de reativação (30 mL).

seguida, foram adicionados 10 mL de solução para reconstituição de bactérias liofilizadas, também mantida a 5 °C. Após essa adição, a suspensão bacteriana foi mantida por 15 min a (13,0±0,1) °C, sendo essa temperatura mantida durante o ensaio. A suspensão foi periodicamente agitada para evitar a decantação das células.

2.3. Procedimentos

2.3.1. Avaliação dos sistemas de detecção

Para avaliar os dois sistemas de detecção quanto à detectabilidade foi explorado um sistema modelo que emprega a reação de oxidação do luminol a aminoftalato pelo peróxido de hidrogênio, utilizando hexacianoferrato(III) de potássio como catalisador, produzindo luminescência com máximo de intensidade em 460 nm. O módulo de análises empregado (Figura 4) foi proposto para a determinação de peróxido de hidrogênio [57].

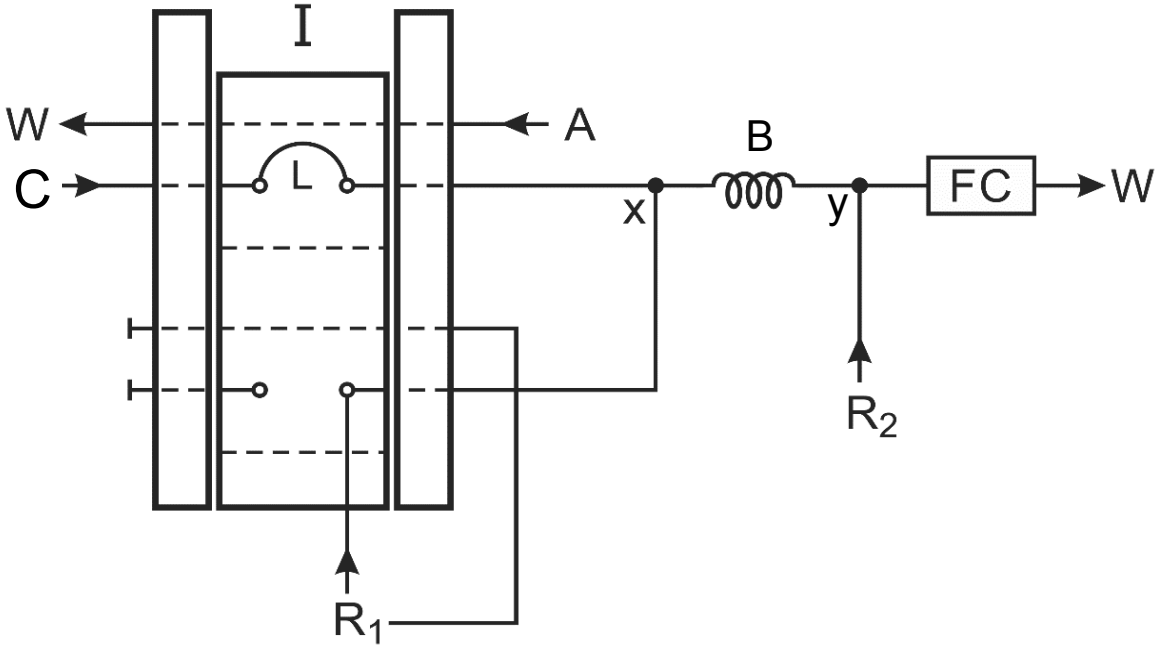


Figura 4 - Diagrama do módulo de análises utilizado na avaliação dos sistemas de detecção. I: injetor; L: alça de amostragem (150 µL); B: reator helicoidal (20 cm); FC: cela de medida; x e y: pontos de confluência; C: transportador (H_2O), 4,5 mL min^{-1}; A: amostra (H_2O_2); R_1: solução de luminol 4,5 mmol L^{-1}, 1,5 mL min^{-1}; R_2: solução de hexacianoferrato(III) de potássio 25,0 mmol L^{-1}, 1,5 mL min^{-1}; W: recipiente de descarte.

Na Figura 4, o injetor está na posição de injeção, em que uma alíquota de amostra com volume definido pela alça de amostragem é inserida no percurso analítico e, durante o seu transporte até o detector, recebe, por confluência, a solução de luminol no ponto x e a solução de hexacianoferrato(III) de potássio no ponto y. Com o injetor na posição alternativa, a alça de amostragem é preenchida com uma nova alíquota de peróxido de hidrogênio e a solução de luminol (R_1) é desviada para o seu frasco de origem com o objetivo de minimizar o seu consumo. As celas de medidas foram conectadas ao módulo de análises no ponto de confluência y. As medidas dos sinais foram baseadas na altura dos picos e realizadas em triplicata.

Os limites de detecção foram utilizados como parâmetro de comparação para avaliar os sistemas de detecção quanto à detectabilidade, uma vez que no luminômetro o sinal é medido como diferença de potencial e no espectrofluorímetro é medido como unidade arbitrária de intensidade. O injetor foi mantido na posição de injeção para a estimativa do ruído da linha de base. Para confirmar os limites de detecção, as soluções de referência de peróxido de hidrogênio foram diluídas sucessivamente até a menor concentração que apresentasse intensidade do sinal significativamente diferente do branco (99,7 % de confiança). Para aumentar a confiabilidade dos resultados foram realizadas 20 replicatas dessa concentração mínima.

O efeito do espalhamento de radiação por partículas em suspensão foi avaliado com as celas de fluxo comercial de quartzo (Figura 2A) e em espiral [54] (Figura 2B), utilizando a fotomultiplicadora do espectrofluorímetro como detector. Para simular a suspensão, foram utilizadas pequenas quantidades de sílica (SiO_2), na razão de 20 mg L^{-1}, na presença de diferentes quantidades de peróxido de hidrogênio.

2.3.2. Sistema de análises em fluxo para avaliação das diluições em linha

Para definir as condições experimentais para as diluições em linha foi utilizada a reação de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio, empregada anteriormente na avaliação dos sistemas de detecção [57]. As condições experimentais foram definidas para simular aquelas adotadas no bioensaio em fluxo.

O módulo de análises foi construído com quatro microbombas solenoide, sendo três com volumes nominais de 20 µL (P_1, P_2 e P_3) e uma com volume nominal de 10 µL dispensado por pulso (P_4), uma válvula solenoide de três vias e duas confluências de acrílico (Figura 5). Os volumes dispensados por pulso pelas microbombas foram aferidos por pesagem da massa de água dispensada em 100 pulsos. Os dispositivos ativos foram operados de acordo com a sequência de acionamento descrita na Tabela 4. Foi utilizado o sistema de detecção que emprega a cela de fluxo em espiral e o espectrofluorímetro.

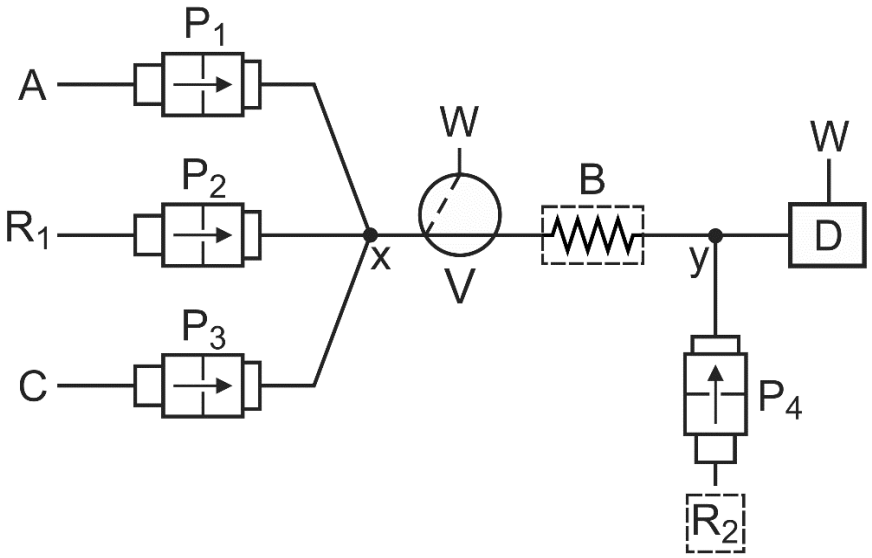


Figura 5. Diagrama do módulo de análises para o estudo das diluições em linha e bioensaio com *Vibrio fischeri*. P_1 – P_4: microbombas solenoide; V: válvula solenoide de três vias; x e y: pontos de confluência; B: bobina de dispersão (100 cm); D: cela de fluxo em espiral posicionada em frente à janela de emissão do espectrofluorímetro. W: recipientes de descarte. *Diluições em linha*: A: amostra (H_2O_2); C: transportador (solução de hexacianoferrato(III) de potássio 12,5 mmol L^{-1}); R_1: solução de hexacianoferrato(III) de potássio 25,0 mmol L^{-1} e R_2: solução de luminol 4,5 mmol L^{-1}. *Bioensaio*: A: amostra (soluções das espécies poluentes); C: transportador (NaCl 2,0 %(m/v)); R_1: NaCl 4,0 %(m/v) e R_2: suspensão bacteriana. As linhas pontilhadas indicam que a temperatura foi controlada (13,0±0,1 °C) em banho de água.

Tabela 4 - Sequência de acionamento das microbombas solenoide para a investigação das diluições em linha ou bioensaio com *Vibrio fischeri*

Etapa	Descrição	Microbomba[a]	Pulsos ou tempo	Volume total (µL)[b]
1	Inserção de A e R_1	P_1 e P_2	0 – 12	v_1[c]
2	Diluição em linha	P_3	0 –24	v_2[c]
3	Transporte da zona de amostra até o ponto de confluência y	P_3	0 – 57	0 – 1203
4	Inserção de R_2	P_4	12	124
5	Transporte para o sistema de detecção	P_3	30	633
6[d]	Parada de fluxo		300 s	—
7	Limpeza	P_3	75	1582
8[e]	Substituição da amostra	P_1	25	522
		P_3	10	211

[a]a frequência de acionamento das microbombas foi de 5 Hz; [b]estimado a partir dos volumes aferidos (Tabela 8); [c]$v_1 + v_2$ = 502 µL; [d]parada de fluxo realizada apenas no bioensaio; [e]válvula V acionada.

Alíquotas de peróxido de hidrogênio (A) e de hexacianoferrato(III) de potássio (R_1) foram inseridas simultaneamente no percurso analítico pelas microbombas P_1 e P_2 (etapa 1). A zona de amostra foi dispersa no transportador (C) na bobina de reação B (etapa 2). A extensão da diluição da amostra foi definida pela fração volumétrica estabelecida nas etapas 1 e 2. A zona de amostra foi transportada até o ponto de confluência y pela atuação da microbomba P_3 (etapa 3). Nessa etapa, o gradiente de concentração de H_2O_2 foi explorado inserindo uma única alíquota de luminol (R_2) (etapa 4) em diferentes pontos da zona de amostra. Em seguida, a zona de amostra foi transportada até a cela de fluxo (etapa 5) e depois para o descarte (etapa 7), pela atuação da microbomba P_3. A luminescência foi monitorada em 460 nm. Os sinais analíticos foram baseados nas alturas dos picos e medidos em triplicata.

Um estudo realizado em condições de volume infinito (ausência de dispersão da amostra) foi empregado para o cálculo dos fatores de dispersão. Para isso, peróxido de hidrogênio e hexacianoferrato(III) de potássio foram inseridos simultaneamente, de forma a manter as condições experimentais, para que todo o

percurso analítico fosse preenchido com a zona de amostra. Em seguida, a alíquota de luminol foi inserida e a zona de amostra transportada até o sistema de detecção para a medida do sinal.

2.3.3. Sistema de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria Vibrio fischeri

O módulo de análises (Figura 5) e a sequência de acionamento dos dispositivos (Tabela 4) foram os mesmos utilizados para o estudo das diluições em linha (descrito no item *2.3.2*), exceto pelo controle de temperatura da bobina de dispersão B e do reagente (R_2) e pela parada de fluxo. Nesse estudo, o luminol foi substituído pela suspensão bacteriana (R_2), e o hexacianoferrato(III) de potássio, o peróxido de hidrogênio e o transportador foram substituídos pelas soluções de ajuste de salinidade, NaCl 4,0 %(m/v) (R_1), soluções dos poluentes (A) e NaCl 2,0 %(m/v) (C), respectivamente.

Alíquotas de amostra e da solução de ajuste de salinidade foram simultaneamente inseridas no percurso analítico (etapa 1) e a zona de amostra foi dispersa no transportador (NaCl 2,0 %(m/v)) na bobina de reação B (etapa 2). A extensão da diluição das amostras foi definida pela fração volumétrica estabelecida nas etapas 1 e 2. A zona de amostra foi transportada até o ponto de confluência y, pela atuação da microbomba P_3 (etapa 3). Uma alíquota de suspensão bacteriana foi inserida em diferentes pontos da zona de amostra, explorando o gradiente de concentração para a diluição em linha, do mesmo modo descrito no item *2.3.2* (etapa 4). Então, a zona de amostra foi transportada até a cela de fluxo (etapa 5) e o fluxo foi interrompido (etapa 6) a fim de aumentar o tempo de contato entre a amostra e a suspensão bacteriana. Em seguida, a zona de amostra foi transportada para o descarte pela atuação da microbomba P_3 (etapa 7).

O decréscimo de luminescência bacteriana foi monitorado em 490 nm. Essas medidas foram baseadas nas alturas dos picos e realizadas em triplicata, para um tempo de contato de 5 min entre a amostra e a suspensão bacteriana.

A substituição da amostra (etapa 8) foi realizada acionando simultaneamente a microbomba P_1 e a válvula solenoide V, sendo esta utilizada para evitar a passagem da amostra por todo o percurso analítico, minimizando riscos de contaminação. Em seguida, foram acionadas a microbomba P_3 e a válvula V para limpeza do percurso do ponto de confluência até a válvula, sendo direcionado o volume dispensado pela microbomba para o descarte.

2.3.4. Teste de toxicidade aguda com o kit BioTox ™

O teste de toxicidade aguda utilizado como procedimento de referência foi realizado com o kit[g] BioTox™ utilizando leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Synergy HT). O teste foi executado de acordo com as instruções do fornecedor, com algumas modificações. Foram realizadas diluições das amostras, sendo 100 µL das soluções diluídas mantidas a (15,0±0,5) °C nos poços da microplaca por 15 min. A suspensão bacteriana foi mantida a (15,0±0,5) °C pelo mesmo período e, em seguida, 100 µL dessa suspensão foi adicionado nos poços da placa contendo os controles positivo e negativo e as amostras diluídas. Após o tempo de contato pré-estabelecido, a bioluminescência bacteriana foi medida com tempo de contato de 5 min. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Os fatores de diluição das soluções dos poluentes (amostras) e dos controles positivos, assim como a concentração da solução estoque de cada um deles estão apresentados na Tabela 5. Os fatores empregados foram estabelecidos a partir de um *screening* de toxicidade dos compostos realizado com um sistema de análises por injeção sequencial (SIA), que foi proposto para avaliação de toxicidade de líquidos iônicos [36].

[g] O kit é composto por 6 ampolas (1mL) contendo *ca.* 10^8 células mL^{-1}, 6 frascos de diluente (12 mL) e uma pastilha de NaCl (9,0 g).

Tabela 5 - Fatores de diluição de amostras e controles positivos empregados no teste de toxicidade com o kit comercial BioTox™

Composto	**Fatores de diluição**								**Concentração da solução estoque (g L^{-1})**
Metilparabeno	4,44	5,93	7,41	8,89	11,11	17,78	24,69	44,44	0,10
Etilparabeno	8,89	11,11	14,81	22,22	40,00	80,00	160,00	317,46	0,10
Propilparabeno	2,22	4,44	8,89	10,10	12,35	18,52	44,44	55,56	0,10
Butilparabeno	3,70	7,41	9,88	14,81	18,52	24,69	74,07	148,15	0,10
Cafeína	2,78	3,70	5,56	7,14	11,11	20,00	50,00	100,00	1,00
Ácido acetilsalicílico	11,11	12,70	14,81	16,22	17,78	22,22	29,63	44,44	0,10
Paracetamol	1,11	1,48	2,22	2,54	3,70	4,44	5,93	8,89	1,00
Diclofenaco	1,48	2,22	4,44	11,11	22,22	61,73	296,30	-	0,10
Ácido salicílico	4,44	8,89	11,11	14,81	17,09	22,22	31,75	44,44	0,10
Cu(II)	2,88	3,72	8,02	15,88	37,10	60,74	128,56	239,24	0,10
Cr(VI)	2,88	3,72	8,02	15,88	37,10	60,74	128,56	239,24	0,10
Zn(II)	2,88	3,72	8,02	15,88	37,10	60,74	128,56	239,24	0,10

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos sistemas de detecção

Dois sistemas de detecção foram avaliados quanto à detectabilidade e à susceptibilidade ao espalhamento de radiação por partículas em suspensão, a fim de escolher o mais adequado para o bioensaio de toxicidade. Essa avaliação foi necessária porque os sistemas apresentam diferenças tanto nas configurações físicas quanto nos fotossensores empregados, além do custo e da portabilidade.

O luminômetro apresenta um compartimento internamente espelhado, com a cela de medida posicionada em frente ao fotodiodo, sem qualquer barreira física entre eles, o que favorece a captação da luminescência. Além disso, esse sistema é portátil e de baixo custo, o que favorece o seu emprego em análises *in-situ*. O sistema que emprega o espectrofluorímetro apresenta algumas diferenças, tais como: (i) cela de medida fixada na janela de emissão, fazendo com que a radiação emitida nas direções que não à do detector seja perdida; (ii) há um monocromador entre a cela de medida e a fotomultiplicadora que limita a quantidade de radiação que chega até o fotossensor. Esse é um sistema de maior custo, mas emprega um detector mais sensível (fotomultiplicadora). Em ambos, celas de fluxo de polietileno em espiral foram utilizadas.Tendo em vista esses aspectos, algumas características analíticas para a determinação de H_2O_2 em sistemas de análises em fluxo foram estimadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Características analíticas estimadas com os diferentes sistemas de detecção avaliados para a detecção de H_2O_2 por quimiluminescência

Característica analítica	Luminômetro	Espectrofluorímetro
Faixa linear (nmol L^{-1})	20 –100	20 – 60
Coeficiente de correlação (R)	0,999	0,999
Coeficiente de variação (n = 20)	2,94[b]	2,22[c]
Limite de detecção[a] (nmol L^{-1})	0,3	0,2

[a]limite de detecção estimado a nível de confiança de 99,7% (k=3), [b]estimado para a concentração 20 nmol L^{-1} de H_2O_2; [c]estimado para a concentração 20 nmol L^{-1} de H_2O_2.

O sistema que emprega o espectrofluorímetro apresentou o menor coeficiente de variação, indicando maior precisão das medidas. Embora a faixa linear obtida com esse sistema seja mais estreita, ele apresenta maior sensibilidade. Os limites de detecção foram também estimados pela diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio até que a intensidade do sinal não fosse significativamente diferente do branco, confirmando os valores de 0,2 e 0,3 nmol L^{-1} para o espectrofluorímetro e para o luminômetro, respectivamente. Desta forma, os limites de detecção estimados pelos dois sistemas não são significativamente diferentes.

O sistema proposto para o bioensaio de toxicidade utiliza uma suspensão bacteriana como reagente. Desse modo, o sistema de detecção empregado deve minimizar os efeitos de espalhamento de radiação, que foram avaliados através da obtenção de curvas de calibração (Figuras 6 e 7) com suspensões de sílica contendo peróxido de hidrogênio e utilizando a cela comercial e em espiral no sistema de detecção do espectrofluorímetro. Neste experimento, a detectabilidade estimada em ambos os sistemas foram comparadas. A sílica utilizada apresentava diâmetro de partícula ≤ 60 μm, cerca de 20 vezes maior que as células bacterianas que medem *ca.* 3 μm. Ainda que essa diferença entre os diâmetros de partícula seja considerável, a superestimação é necessária porque as células bacterianas podem se manter em suspensão na forma de aglomerados, que podem apresentar tamanhos bem maiores que as células individualmente suspensas.

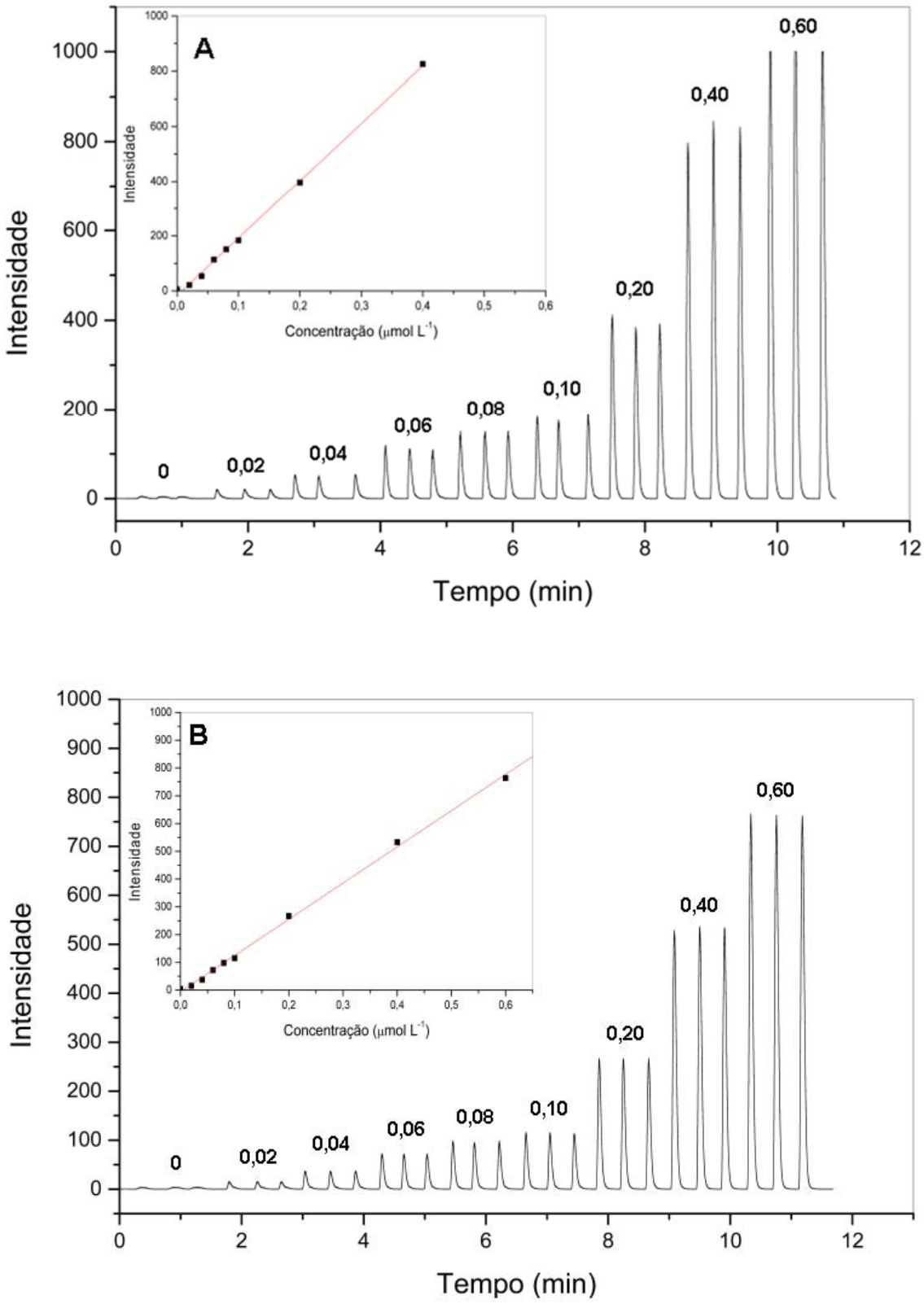


Figura 6 - Sinais transientes e curvas de calibração obtidas com soluções de H_2O_2 sem adição de sílica e celas de fluxo (A) comercial e (B) em espiral. Os números sobre os sinais transientes indicam as concentrações de H_2O_2 em μmol L^{-1}.

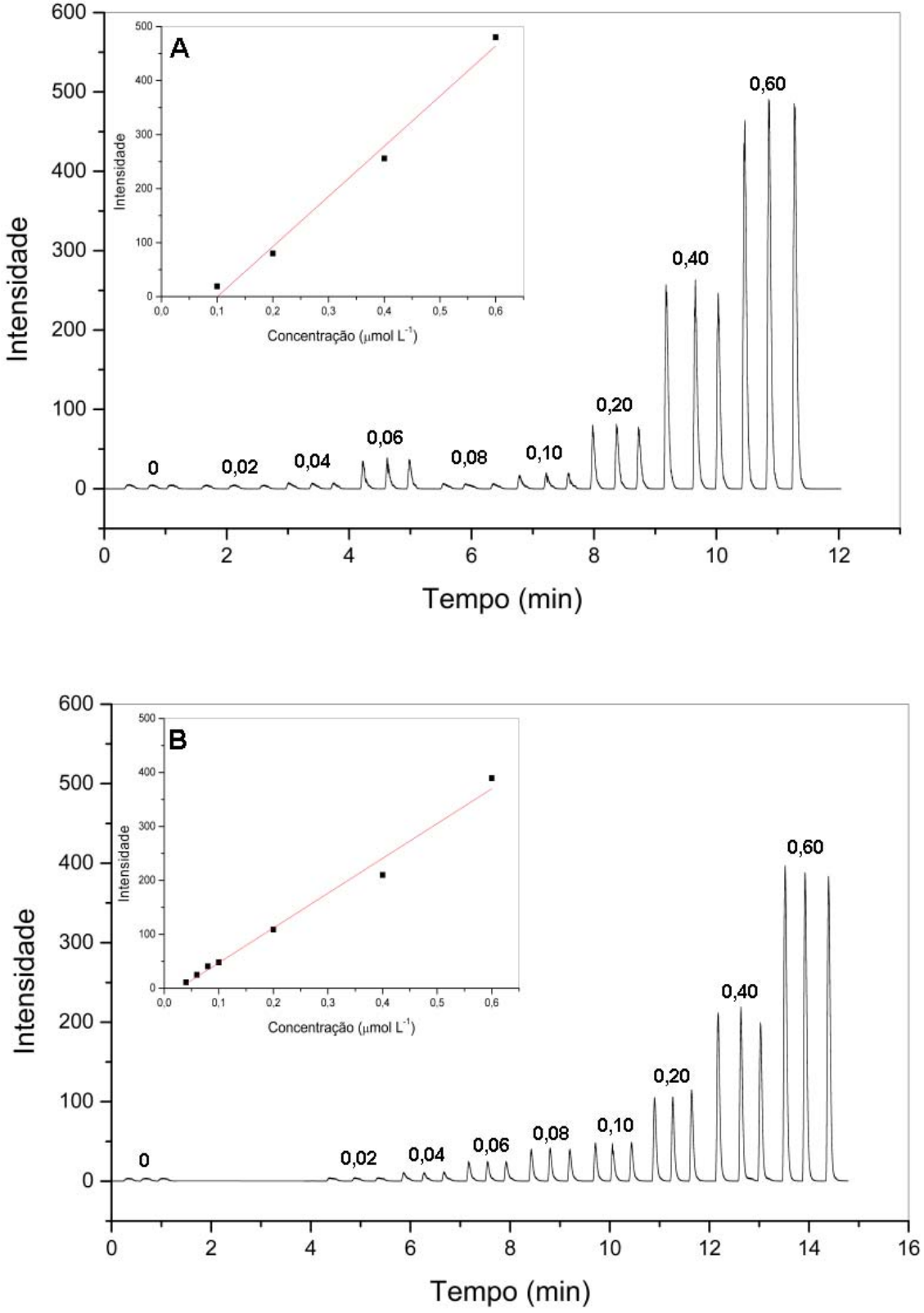


Figura 7 - Sinais transientes e curvas de calibração obtidas com suspensões de sílica em meio de H_2O_2 e celas de fluxo (A) comercial e (B) em espiral. Os números sobre os sinais transientes indicam as concentrações de H_2O_2 em μmol L^{-1}.

Os parâmetros de regressão das diferentes curvas de calibração são apresentados na Tabela 7. Os sinais transientes obtidos com as celas de fluxo comercial (Figura 6A) e em espiral (Figura 6B) sem adição de sílica mostram que a cela comercial propicia maior sensibilidade. Isso se deve ao material da cela comercial (quartzo) ser mais transparente do que o polietileno da cela em espiral. Por outro lado, os sinais transientes obtidos com a cela de fluxo comercial com adição de sílica às soluções de H_2O_2 (Figura 7A) mostram uma maior susceptibilidade ao espalhamento de radiação por partículas em suspensão, principalmente em baixas concentrações de peróxido, o que não ocorreu significativamente com a cela em espiral (Figura 7B). Isso pode ser verificado pela diminuição na faixa linear das curvas construídas com as soluções que continham sílica (Tabela 7), sendo mais pronunciada quando a cela comercial foi empregada. Além disso, com a adição de sílica houve diminuição de sensibilidade de 55 % para a cela comercial e 50% para a cela em espiral e perda de linearidade, que pode ser verificada pelos valores de coeficiente de correlação. De acordo com os coeficientes de variação, a cela em espiral propiciou maior precisão.

Tabela 7 - Características analíticas avaliadas na medida de H_2O_2 utilizando as celas de fluxo comercial e em espiral

Cela	**Faixa linear (nmol L^{-1})**	**Equação da reta**[a]	**R**	**Coeficiente de variação (n=20)**[b]
Comercial	20 – 400	I = 2090 C – 16	0,999	3,47
Comercial (com sílica)	100 – 600	I = 928 C – 92	0,995	
Espiral	20 – 600	I = 1303 C – 5	0,999	2,22
Espiral (com sílica)	40 – 600	I = 645 C – 17	0,994	

[a]I – intensidade do sinal analítico; C – concentração de H_2O_2 (μmol L^{-1}). [b]estimado para a concentração 20 nmol L^{-1} de H_2O_2.

A partir dos resultados obtidos, a cela de fluxo em espiral foi escolhida por permitir maior faixa de resposta linear, melhor precisão e, principalmente, menor susceptibilidade ao espalhamento de radiação.

A avaliação dos sistemas de detecção mostrou que estes foram equivalentes em termos de detectabilidade. Entretanto, o espectrofluorímetro (fotomultiplicadora) apresentou melhores resultados em termos de sensibilidade e precisão e, além disso, há possibilidade de aumentar a resposta analítica por meio de ajuste de diferença de potencial aplicada na fotomultiplicadora e do tempo de integração. Alterações nesses parâmetros foram essenciais para alcançar a sensibilidade necessária para medir a luminescência bacteriana.

3.2. Sistema de análises em fluxo para o estudo das diluições em linha

Os sistemas em fluxo propostos para automação do bioensaio com *Vibrio fischeri* empregam a análise por injeção em fluxo (FIA) [35] ou a análise por injeção sequencial (SIA) [36] para melhorar a reprodutibilidade, através do controle preciso do tempo de contato entre amostra e suspensão bacteriana. Entretanto, etapas essenciais como ajuste de salinidade e diluições das amostras são realizadas manualmente, aumentando a susceptibilidade a erros. Por esse motivo, buscou-se implementar essas etapas em linha, de forma a automatizar o bioensaio e, assim, melhorar a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos com o sistema proposto.

Para avaliar a potencialidade das diluições em linha foi utilizado um sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide, também empregando como modelo a reação de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio. As microbombas solenoide foram utilizadas para propulsão e gerenciamento das diferentes soluções, conferindo ao sistema características desejáveis como baixo custo e menor consumo de energia, maior versatilidade, portabilidade e robustez [46]. O módulo de análises empregado e o volume dispensado por pulso por cada microbomba são apresentados na Figura 5 (item 2.3.2) e na Tabela 8, respectivamente.

Tabela 8 - Aferição dos volumes dispensados pelas microbombas solenoide empregadas no sistema de análises em fluxo

	Volume (µL)	
Microbomba	**Nominal**	**Aferido [a]**
P_1	20,0	20,9±0,9
P_2	20,0	20,9±0,7
P_3	20,0	21,1±0,8
P_4	10,0	10 ±2

[a]média e estimativa de desvio padrão referentes a 100 pulsos.

Quando o comprimento do reator foi fixado em 100 cm, variando a fração volumétrica de amostra/transportador, foi possível obter condição equivalente à diluição da amostra de até 25 vezes. O efeito do volume de amostra sobre o sinal analítico foi avaliado aumentando o número de pulsos dispensados pela microbomba. A intensidade do sinal aumentou linearmente, sendo essa relação descrita pela equação I = 4,72 v + 31,0 (R = 0,993), em que **I** é a intensidade do sinal analítico e **v** o volume de amostra. Nesse estudo, o luminol (R_2) foi inserido no centro da zona de amostra.

A sobreposição parcial entre o reagente (luminol) e as diferentes concentrações do analito na zona de amostra dispersa foi explorada para se alcançar maiores diluições. Esta estratégia é ilustrada na Figura 8. O perfil da zona de amostra foi avaliado para definir os pontos em que seria inserida a solução de luminol que, neste caso, simula a suspensão bacteriana. Esse estudo foi realizado através do preenchimento total do reator B (Figura 5) com peróxido e hexacianoferrato(III) de potássio, seguido da inserção do luminol em diferentes pontos da zona de amostra, definidos pelo número de pulsos de transportador. Com o perfil delineado foram escolhidos três pontos a serem explorados (Figura 9A), sendo um de mínima dispersão do analito (D_1), um intermediário (D_2) e um de alta dispersão do analito (D_3). Nesses pontos, foi realizada também a variação da fração volumétrica amostra/transportador (Figura 9B). Obteve-se uma diluição de até 235 vezes da amostra com esta estratégia.

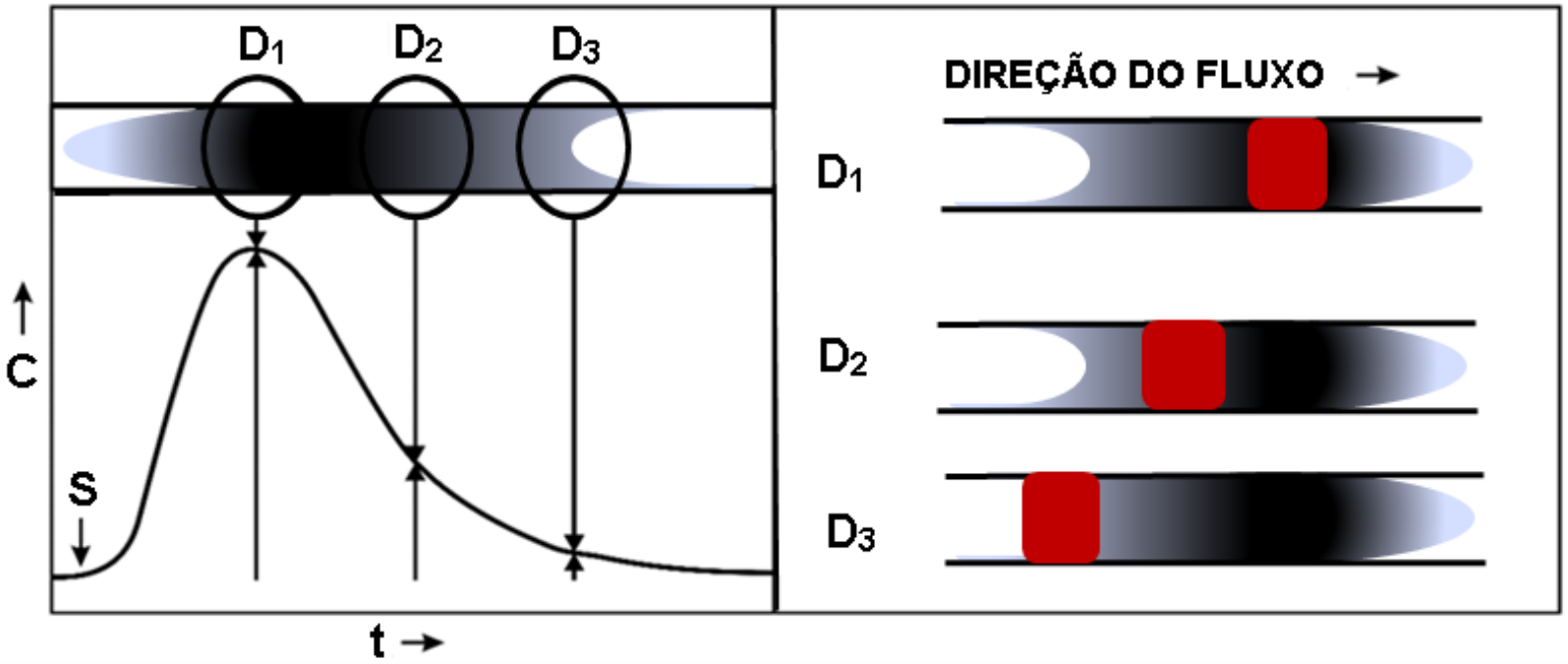


Figura 8 - Representação da estratégia de sobreposição parcial do reagente em diferentes porções da zona de amostra dispersa. Pontos a serem explorados: D_1 – baixa dispersão do analito, D_2 – intermediário e D_3 – alta dispersão do analito

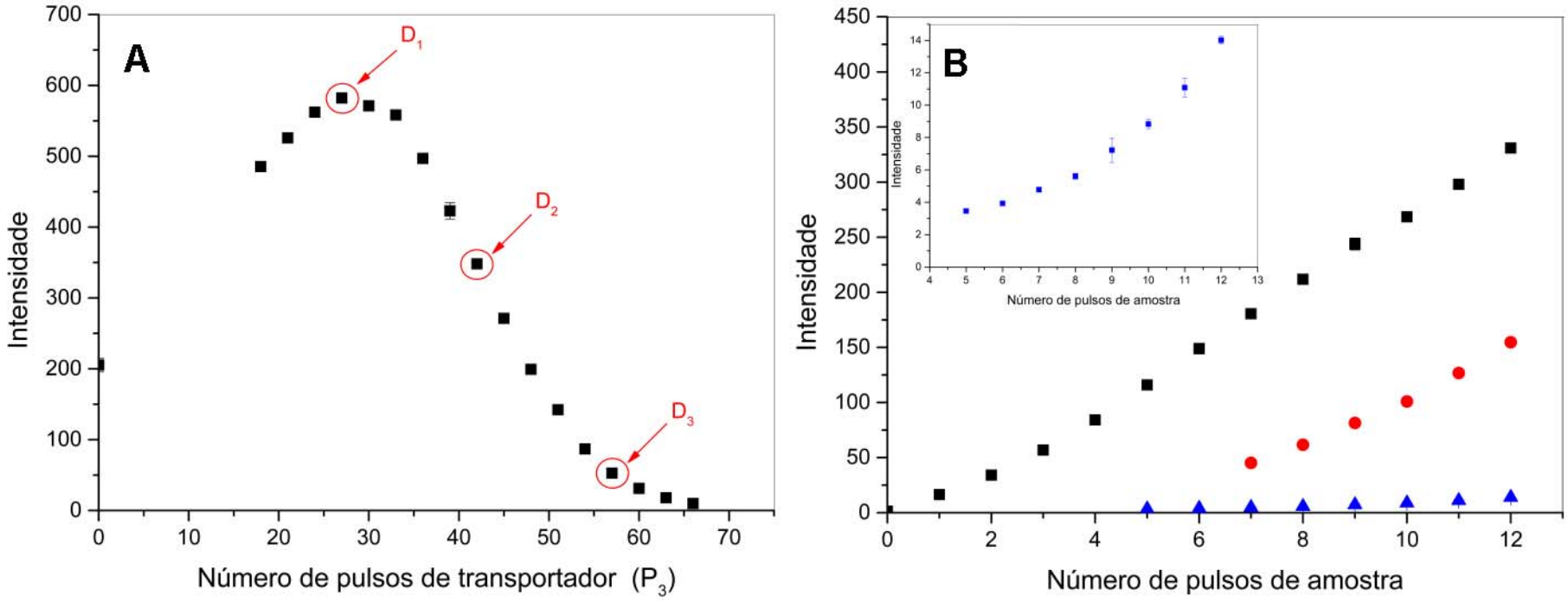


Figura 9 - Representação da estratégia empregada para se alcançar maiores diluições. (A) Avaliação do perfil da zona de amostra e definição dos pontos a serem explorados: (- ■ -) D_1 – concentração máxima do analito, 100,0 % (baixa dispersão); (- ● -) D_2 –concentração intermediária, 59,8 % do analito (dispersão intermediária); (-▲-) D_3 – baixa concentração do analito, 9,0 % (alta dispersão). (B) Variação da fração volumétrica amostra/transportador nos pontos definidos, em que (a) D_1, (b) D_2 e (c) D_3. Em destaque, a variação da fração volumétrica no ponto D_3

Uma vez estimados os fatores de dispersão, foi possível selecionar as condições a serem empregadas no bioensaio em fluxo (Tabela 9), de forma que as diluições em linha fossem compatíveis com aquelas requeridas em batelada. O número de pulsos de amostra utilizados na etapa 1 (Tabela 4) estão apresentados na Tabela 9 e o número de pulsos de carregador definidos para a etapa 3 (Tabela 4) foram: 27,42 e 57. Os outros parâmetros foram mantidos como da Tabela 4. As equações das curvas de calibração obtidas em dias diferentes (i e ii) com as diluições em linha e em batelada estão apresentadas na Tabela 10. Os coeficientes angulares apresentam variação de (3,6±0,5) % indicando a viabilidade da diluição em linha.

Tabela 9 - Fatores de dispersão alcançados com as estratégias de diluição em linha nas condições empregadas no bioensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Fração volumétrica (Np amostra)	**Ponto explorado[b]**	**Concentração equivalente da amostra (%)**	**Fator de dispersão**
12	D_1	31,0	3,22
9	D_1	25,8	3,88
5	D_1	12,6	7,90
3	D_1	5,95	16,8
5	D_2	2,54	39,4
12	D_3	3,46	28,9
9	D_3	1,08	92,8
6	D_3	0,42	235

[a]Np amostra= número de pulsos de amostra; [b] D_1, D_2 e D_3 referem-se a 27, 42 e 57 pulsos de transportador, respectivamente.

Tabela 10 - Curvas de calibração obtidas com as diluições em linha e em batelada

		Diluição em linha	**Diluição em batelada**
i	Equação da reta[a]	I = 1138 C + 16	I = 1093 C + 11
	R	0,995	0,998
ii	Equação da reta[a]	I = 1896 C + 9	I = 1840 C - 5
	R	0,994	0,999

[a]I – intensidade do sinal analítico; C – concentração de H_2O_2 ($\mu mol\ L^{-1}$).

As concentrações finais da amostra após as diluições (%), apresentadas na Tabela 9, foram calculadas levando-se em consideração a diluição (1:1) que ocorre durante a amostragem, em que o hexacianoferrato(III) de potássio (R_1) e o peróxido de hidrogênio (A) são inseridos simultaneamente, simulando o ajuste de salinidade da amostra. Os fatores de dispersão e diluição foram calculados considerando o valor obtido em condições de volume infinito, isto é, na ausência de dispersão.

3.3. Sistema de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade aguda com a bactéria Vibrio fischeri

3.3.1. Estudos preliminares

Foram realizados estudos com a suspensão bacteriana visando à otimização de parâmetros importantes para a execução do bioensaio em fluxo, tais como o volume de suspensão empregado e tempo de exposição das bactérias à amostra. O módulo de análises empregado (Figura 5) e a sequência de acionamento dos dispositivos (Tabela 4) estão descritos nos itens *2.3.2* e *2.3.3*, respectivamente.

A estabilidade da bioluminescência bacteriana foi avaliada em função do tempo durante 40 min de parada de fluxo da zona de amostra no reator B, que define o tempo de contato com a solução do poluente. Foi observada variação de luminescência inferior a 1,0 %. O efeito do volume de suspensão bacteriana foi avaliado com 10 min de parada de fluxo, utilizando NaCl 2,0 %(m/v) como transportador. O sinal de luminescência (**I**) aumentou linearmente com o volume de suspensão bacteriana (**v**, µL) até 250 µL devido à minimização da dispersão, de acordo com a equação I = -12,1 + 3,90 v, (R = 0,995). No entanto, o volume selecionado foi de 120 µL, que corresponde a *ca.* 50 % da resposta máxima, para minimizar o consumo de suspensão bacteriana e, consequentemente, os custos do ensaio. O tempo de contato foi reduzido de 10 para 5 min, a fim de aumentar a frequência de amostragem. Os coeficientes de variação foram estimados em 2,4 e

2,0 % (n=10), utilizando um controle negativo e um positivo (0,60 mg L^{-1} Zn(II)), respectivamente.

3.3.2. Avaliação da toxicidade aguda com Vibrio fischeri

Com os parâmetros essenciais definidos (série de diluições com ajuste de salinidade, volume de suspensão bacteriana e tempo de contato), o sistema de análises em fluxo desenvolvido foi utilizado para avaliar a toxicidade de alguns poluentes emergentes, tais como parabenos (metil, etil, propil e butil), cafeína, paracetamol, diclofenaco, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico. Zn(II), Cu(II) e Cr(VI) foram utilizados como controles positivos. Essa avaliação foi realizada empregando o módulo de análises (Figura 5) e a sequência de acionamento dos dispositivos (Tabela 4), que estão descritos nos itens *2.3.2* e *2.3.3*.

Para avaliar cada composto quanto à toxicidade aguda foram utilizados: o controle negativo, a série de diluições em linha, definida pelos fatores de dispersão (Tabela 9) no estudo das diluições (*item 3.2*) e um controle positivo, que foi avaliado a cada re-suspensão das bactérias liofilizadas. Na Tabela 11 estão apresentadas as concentrações de cada composto avaliado, após a diluição de 1:1 pelo ajuste de salinidade. Na Figura 10 são apresentados os perfis dos sinais obtidos na avaliação de toxicidade do Zn(II) e a relação linear obtida a partir da construção do gráfico de ln C em função de ln r [31], como exemplo. As relações lineares (equações da reta) e os coeficientes de correlação (R) para os demais compostos avaliados, tanto pelo procedimento proposto, quanto pelo kit comercial, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 11 - Concentrações avaliadas de cada composto

Composto	**Concentração inicial (g L^{-1})**	**Composto**	**Concentração inicial (g L^{-1})**
Metilparabeno	0,12	Paracetamol	2,00
Etilparabeno	0,08	Diclofenaco	0,05
Propilparabeno	0,05	Ácido salicílico	0,05
Butilparabeno	0,02	Cu(II)	0,05
Cafeína	3,00	Cr(VI)	0,10
Ácido acetilsalicílico	0,15	Zn(II)	0,05

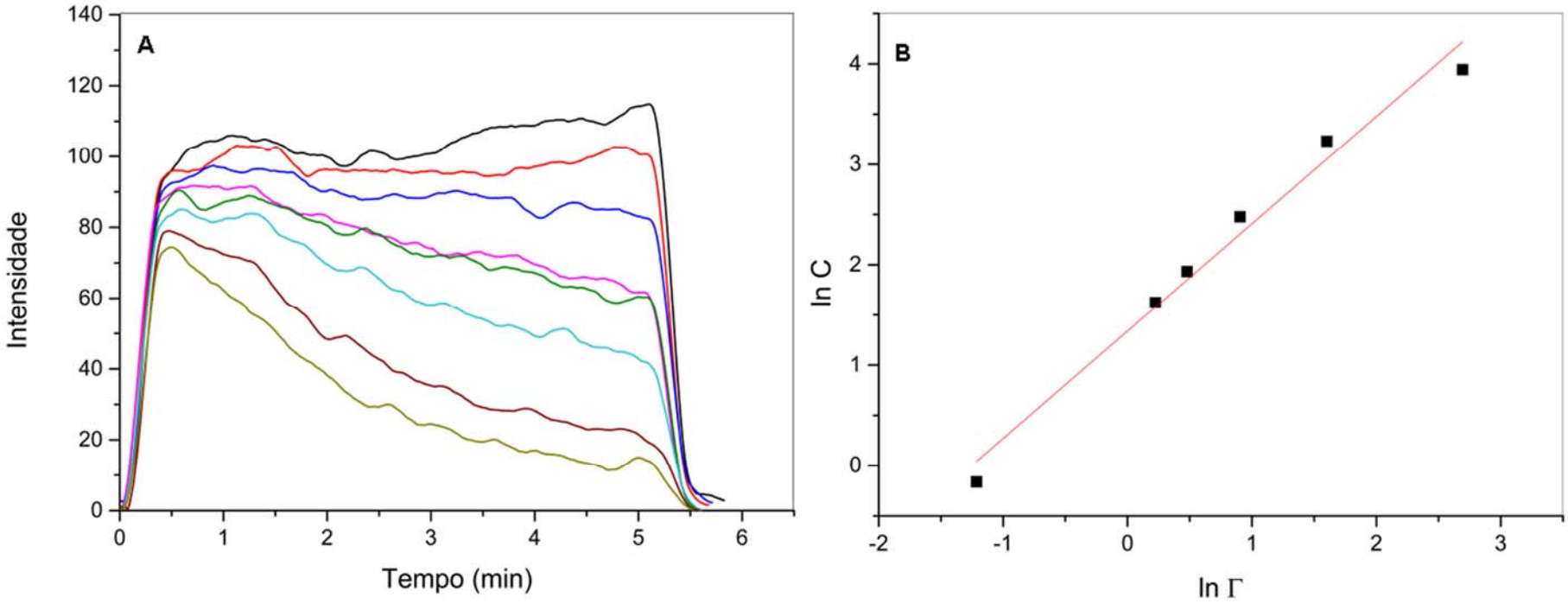


Figura 10 – (A) Intensidade de bioluminescência em função do tempo com: (—) Controle negativo; (—) 0,42; (—) 1,08; (—) 3,46; (—) 5,95; (—) 12,65; (—) 25,77 e (—) 31,05 mg L^{-1} de Zn(II) e (B) relação linear obtida a partir da construção do gráfico ln C em função de ln r. Concentrações obtidas por diluição em linha a partir de 100 mg L^{-1}.

Tabela 12 - Equações de linearização e coeficientes de correlação dos compostos avaliados pelos pelo procedimento proposto e kit comercial

Composto	SISTEMA MPFS		Kit BioTox™		Composto	SISTEMA MPFS		Kit BioTox™	
	Equação da reta	R	Equação da reta	R		Equação da reta	R	Equação da reta	R
Metilparabeno	ln C = 1,08 ln r + 1,82	0,984	ln C = 0,97 ln r + 1,84	0,993	**Paracetamol**	ln C = 1,89 ln r + 2,19	0,988	ln C = 1,26 ln r + 2,99	0,998
	ln C = 1,06 ln r + 1,67	0,982	ln C = 1,02 ln r + 1,80	0,996		ln C = 2,51 ln r + 2,33	0,992	ln C = 1,15 ln r + 3,05	0,996
	ln C = 1,00 ln r + 1,55	0,974	ln C = 1,00 ln r + 1,83	0,999		ln C = 1,18 ln r + 2,58	0,996	ln C = 1,08 ln r + 3,09	0,993
Etilparabeno	ln C = 1,16 ln r + 1,50	0,989	ln C = 1,05 ln r + 0,94	0,990	**Diclofenaco**	ln C = 3,00 ln r + 2,09	0,994	ln C = 0,82 ln r + 1,22	0,982
	ln C = 1,02 ln r + 1,06	0,996	ln C = 1,06 ln r + 0,94	0,997		ln C = 2,76 ln r + 2,37	0,983	ln C = 0,80 ln r + 1,22	0,992
	ln C = 1,16 ln r + 1,03	0,989	ln C = 1,07 ln r + 1,05	0,996		ln C = 2,72 ln r + 1,36	0,999	—[b]	—
Propilparabeno	ln C = 1,47 ln r + 1,81	0,990	ln C = 1,15 ln r + 1,28	0,997	**Ácido salicílico**	ln C = 0,55 ln r + 3,75	0,999	ln C = 0,48 ln r + 1,79	0,984
	ln C = 1,05 ln r + 1,97	0,982	ln C = 1,07 ln r + 1,32	0,997		ln C = 1,46 ln r + 2,12	0,999	ln C = 0,59 ln r + 1,75	0,980
	ln C = 1,78 ln r + 1,54	0,983	ln C = 1,09 ln r + 1,32	0,998		ln C = 1,59 ln r + 2,48	0,995	ln C = 0,31 ln r + 2,00	0,983
Butilparabeno	ln C = 0,92 ln r + 2,52	0,989	ln C = 1,07 ln r + 0,77	0,996	**Cu(II)**	ln C = 1,13 ln r + 1,52	0,992	ln C = 1,81 ln r + 1,49	0,994
	ln C = 0,98 ln r + 2,31	0,977	ln C = 1,10 ln r + 0,79	0,995		ln C = 0,71 ln r + 1,06	0,995	ln C = 1,68 ln r + 1,65	0,996
	ln C = 0,86 ln r + 2,51	0,978	—[a]	—		ln C = 1,30 ln r + 1,55	0,991	ln C = 1,65 ln r + 1,70	0,993
Cafeína	ln C = 2,65 ln r + 2,03	0,998	ln C = 1,47 ln r + 2,78	0,994	**Cr(VI)**	ln C = 3,09 ln r + 2,31	0,991	ln C = 1,02 ln r + 2,42	0,997
	ln C = 2,73 ln r + 1,93	0,999	ln C = 1,94 ln r + 2,60	0,991		ln C = 2,17 ln r + 1,73	0,984	ln C = 1,00 ln r + 2,37	0,997
	ln C = 2,99 ln r + 1,29	0,995	ln C = 2,19 ln r + 2,39	0,998		ln C = 1,57 ln r + 2,61	0,997	ln C = 1,01 ln r + 2,33	0,996
Ácido acetilsalicílico	ln C = 1,36 ln r + 2,10	0,991	ln C = 0,60 ln r + 1,75	0,988	**Zn(II)**	ln C = 1,07 ln r + 1,34	0,991	—[a]	—
	ln C = 0,53 ln r + 2,25	0,990	ln C = 0,69 ln r + 1,73	0,990		ln C = 1,48 ln r + 1,88	0,979	—[a]	—
	ln C = 1,24ln r + 2,08	0,987	ln C = 0,82 ln r + 1,79	0,995		ln C = 1,38 ln r + 1,49	0,981	—[a]	—

[a]não houve linearidade nos dados obtidos; [b]os dados obtidos foram estatisticamente rejeitados com 95 % de confiança.

Para o exemplo do Zn(II), Figura 10, a equação da reta foi ln C = 1,07 ln r + 1,34 (R = 0,991). A partir dos dados obtidos foi estimado o valor de CE_{50} em 1,90 mg L^{-1} Zn(II). Como este valor é estimado a partir dos dados obtidos com uma única amostra e para um determinado organismo-teste, é possível que não seja coincidente com a CE_{50} verdadeira. Por esse motivo, um intervalo de confiança é calculado em torno desse valor em que o valor verdadeiro deve estar inserido com uma dada probabilidade. Quanto mais estreito o intervalo, maior a precisão. Os extremos desse intervalo e a probabilidade de que ele contenha esse valor verdadeiro são chamados de limite de confiança e nível de confiança, respectivamente [58]. Os valores de CE_{50} com os seus respectivos intervalos de confiança estão apresentados na Tabela 13. Esse valores foram comparados com aqueles obtidos a partir do ensaio com o kit BioTox™, realizado em microplaca, com tempo de contato de 5 min e os resultados foram concordantes, exceto para ácido acetilsalicílico e Cu(II), a um nível de confiança de 95 %. As diferenças nos valores de CE_{50} estimados para estas espécies são causadas por variações na sensibilidade dos diferentes lotes de bactérias empregados, uma vez que no ensaio realizado com o sistema MPFS foram utilizadas bactérias do kit Biolux® Lyo05 e, no ensaio em microplaca, bactérias do kit BioTox™.

Tabela 13 - Valores estimados de CE_{50} para os poluentes emergentes e controle positivos avaliados pelo procedimento proposto e kit comercial

Composto	**SISTEMA MPFS [a]**	**KIT BioTox™ [a]**
	CE_{50}, mg L^{-1} (IC 95% [b])	**CE_{50}, mg L^{-1} (IC 95% [b])**
Metilparabeno	7 ± 2	6,2 ± 0,3
Etilparabeno	3 ± 2	2,7 ± 0,4
Propilparabeno	3 ± 2	3,7 ± 0,3
Butilparabeno	2,9 ± 0,8	2,2 ± 0,3
Cafeína	181± 58	135 ± 64
Ácido acetilsalicílico	13 ± 3	5,8 ± 0,4
Paracetamol	216 ± 106	209 ± 24
Diclofenaco	4 ± 4	3,40 ± 0,06
Ácido salicílico	5 ± 11	6 ± 2
Cu(II)	2 ± 1	5 ± 1
Cr(VI)	10 ± 10	10,8 ± 1,2
Zn(II)	2 ± 2	—

[a]dados obtidos com tempo de contato de 5 min; [b]intervalo de confiança de 95%.

O valor de CE_{50} estimado para o Zn(II) foi coerente com os valores fornecidos pelo fabricante para o lote de bactérias utilizado (BLX-109 Lyo 5), cujo controle de sensibilidade resultou em: 0,71 mg L^{-1} para 15 min e 0,38 mg L^{-1} para 30 min de contato. Como pode ser visto na Figura 10, concentrações menores de Zn(II) causam maiores efeitos em tempos de exposição maiores. Assim, com a redução do tempo de contato, é esperado que haja um aumento nos valores de CE_{50} nesse caso. A partir disso, pode-se concluir que os resultados obtidos para o Zn(II) estão de acordo com o esperado.

Os valores de CE_{50} relatados na literatura para os compostos avaliados estão apresentados na Tabela 14. Esses valores não podem ser comparados diretamente com o ensaio em fluxo e o comercial, pois os tempos de contato destes (5 min) são diferentes dos empregados para as avaliações de toxicidade empregando o procedimento de referência (15 ou 30 min). Entretanto, a partir deles pode-se concluir que o sistema MPFS é adequado para avaliação de toxicidade e que, mesmo com a redução do tempo de contato, os valores obtidos se correlacionam com aqueles obtidos com o procedimento de referência.

Tabela 14 - Valores de CE_{50} para os compostos avaliados

Composto	**CE_{50}, mg L^{-1} (IC 95%)**	**Referência**
Metilparabeno	5,9 ± 0,6[a]	52
Etilparabeno	4,6 ± 2,6[a]	52
Propilparabeno	0,26 ± 0,02[a]	52
Butilparabeno	1,2 ± 0,1[a]	52
Paracetamol	567 ± 330 [a]	59
Diclofenaco	11,50[b]	60
Ácido salicílico	90,00[b]	61

[a]tempo de contato = 15 min; [b]tempo de contato = 30 min.

Os altos valores dos desvios estimados para a cafeína e para o paracetamol podem estar associados aos mecanismos de toxicidade, que envolvem absorção do composto pela bactéria. Na Tabela 15 são apresentados os valores de log K_{ow}[h] dos

[h] K_{ow} é o coeficiente de partição octanol-água que corresponde à razão de equilíbrio do soluto nos dois solventes, em que K_{ow} = $[soluto]_{octanol}$ / $[soluto]_{água}$. Assim, o log de K_{ow} pode correlacionar-se com a toxicidade de um composto, pois é uma medida de hidrofobicidade (lipofilicidade).

compostos avaliados. A partir desses, pode-se destacar que a cafeína e o paracetamol apresentam os menores valores e, por isso, podem não apresentar hidrofobicidade (lipofilicidade) suficiente para sofrer bioacumulação pela bactéria ou, até mesmo, para atravessar a membrana celular. Isso pode ser confirmado pelos altos valores de CE_{50}, que indicam uma menor absorção desses compostos pela bactéria e, assim, menor toxicidade.

Tabela 15 - Valores de log K_{ow} dos compostos avaliados

Composto	**log K_{ow}**	**Referência**
Metilparabeno	1,96	62
Etilparabeno	2,47	63
Propilparabeno	3,04	62
Butilparabeno	3,57	62
Cafeína	-0,01	64
Ácido acetilsalicílico	1,19	65
Paracetamol	0,34	64
Diclofenaco	4,4	66
Ácido salicílico	2,26	67

A partir dos valores de CE_{50} estimados com o sistema MPFS foi possível classificar os compostos avaliados em níveis de toxicidade (Tabela 16): (i) muito tóxico, para CE_{50} < 1 mg L^{-1}; (ii) tóxico, para CE_{50} 1 - 10 mg L^{-1}; (iii) nocivo, para CE_{50} 10 - 100 mg L^{-1} e (iv) não tóxico, para CE_{50} > 100 mg L^{-1}. Tal classificação é feita em relação aos organismos aquáticos [52].

Tabela 16 - Classificação dos compostos avaliados em níveis de toxicidade

Composto	CE_{50}, mg L^{-1} [a]	Nível de toxicidade
Metilparabeno	7 ± 2	Tóxico
Etilparabeno	3 ± 2	Tóxico
Propilparabeno	3 ± 2	Tóxico
Butilparabeno	2,9 ± 0,8	Tóxico
Cafeína	181± 58	Não tóxico
Ácido acetilsalicílico	13 ± 3 [b]	Nocivo
Paracetamol	216 ± 106	Não tóxico
Diclofenaco	4 ± 4	Tóxico
Ácido salicílico	5 ± 11	Tóxico
Cu(II)	2 ± 1	Nocivo
Cr(VI)	10 ± 10	Tóxico
Zn(II)	2 ± 2	Tóxico

[a]Intervalo de confiança de 95%; [b]resultados que não foram concordantes com os obtidos com o kit BioTox™.

Outros aspectos podem ser explorados a partir dos resultados obtidos como, por exemplo, a inclinação da reta que pode ser utilizada para identificar a faixa de sensibilidade ao composto e o seu mecanismo de ação [58]. Na Figura 11, estão representadas as inclinações das retas (relação concentração-resposta) obtidas na avaliação de toxicidade dos parabenos. As retas obtidas para metilparabeno e etilparabeno apresentam inclinações semelhantes, indicando que o mecanismo de ação pode ser o mesmo, embora o etilparabeno apresente maior toxicidade em concentrações mais baixas. Já aquelas obtidas para propilparabeno e butilparabeno apresentam inclinações menores, refletindo um mecanismo diferente. Essas diferenças nas inclinações sugerem mecanismos de ação distintos, sendo que inclinações maiores indicam uma rápida absorção, com rápida manifestação dos efeitos tóxicos sobre os organismos-teste. Por outro lado, inclinações menores podem representar substâncias que têm absorção deficiente, rápida excreção ou ainda que manifestem seus efeitos tóxicos após um período de exposição maior [5]. As equações das retas e os coeficientes de correlação (R) obtidos estão apresentados na Tabela 17.

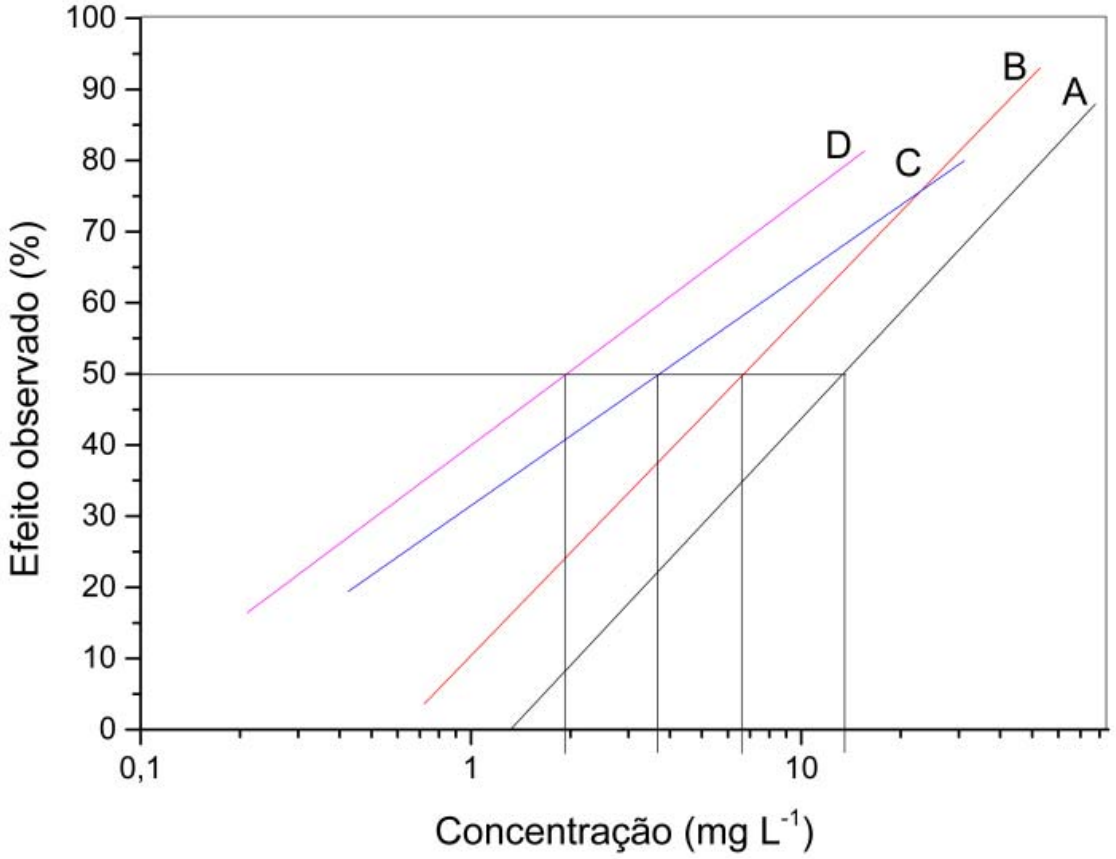


Figura 11 - Curvas concentração-resposta obtidas para os parabenos. A - metilparabeno; B - etilparabeno; C - propilparabeno e D - butilparabeno

Tabela 17 – Parâmetros de regressão linear obtidos na avaliação de toxicidade dos parabenos através da relação concentração-resposta

Composto	Equação da reta[a]	R
Metilparabeno	E = 49,66 C – 5,92	0,991
Etilparabeno	E = 47,96 C + 10,40	0,997
Propilparabeno	E = 32,47 C + 31,49	0,974
Butilparabeno	E = 34,73 C + 39,93	0,972

[a]E – efeito observado (%); C – concentração dos poluentes (mg L^{-1})

Os mecanismos de ação (toxicidade) podem ser avaliados monitorando o efeito em função do tempo, gerando assim um perfil cinético de toxicidade. Diferentemente daqueles previamente descritos na literatura [35,36], o sistema

desenvolvido pode ser empregado nesse tipo de estudo, uma vez que a luminescência bacteriana é monitorada durante todo o tempo de contato com a amostra (parada de fluxo com a zona de amostra na cela de fluxos).

Entre os compostos analisados, foram observados três tipos de perfis cinéticos de toxicidade: (i) Zn(II) - a intensidade de luminescência bacteriana diminui gradualmente em função do tempo (Figura 12A); (ii) metilparabeno - diminuição na intensidade de luminescência desde o primeiro contato entre a suspensão bacteriana e a amostra; essa diminuição se mantém por todo o período avaliado (Figura 12B); (iii) diclofenaco - diminuição expressiva na intensidade de luminescência bacteriana no primeiro minuto e, em seguida, a intensidade de luminescência se mantém constante (Figura 12C). Os demais compostos avaliados apresentaram perfis semelhantes aos descritos acima: cobre(II) e cromo(VI) apresentaram perfis semelhantes aos do Zn(II); etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cafeína, paracetamol e ácido salicílico apresentaram perfis semelhantes ao do metilparabeno e o ácido acetilsalicílico apresentou perfil semelhante ao do diclofenaco.

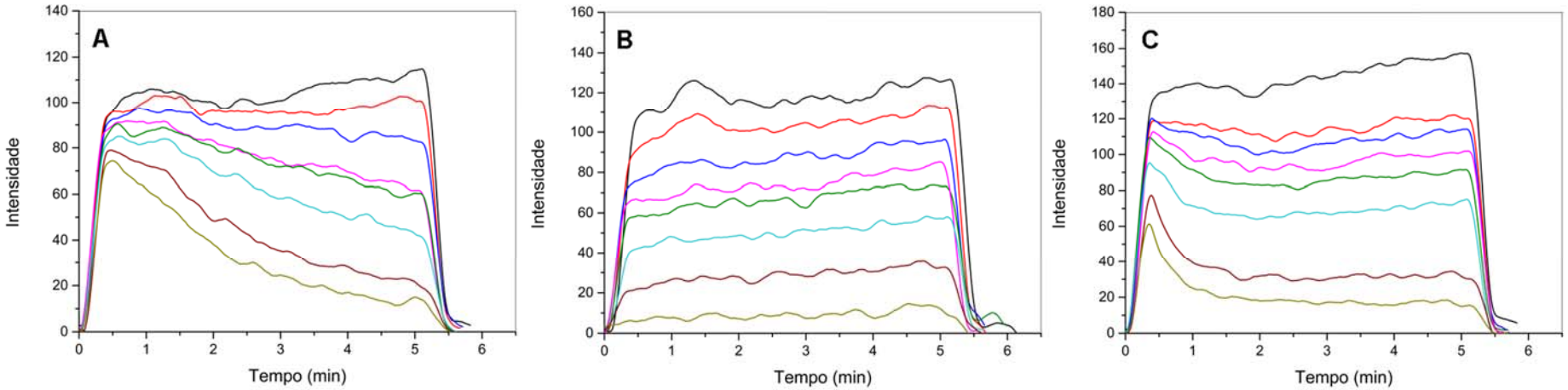


Figura 12 - Perfis de toxicidade observados nos compostos avaliados. Sinais obtidos em função do tempo com: (—) Controle negativo; (—) 0,42; (—) 1,08; (—) 3,46; (—) 5,95; (—) 12,65; (—) 25,77 e (—) 31,05 % de (A) Zn(II), (B) metilparabeno e (C) diclofenaco. Concentração inicial dos compostos avaliados: 100 mg L^{-1} de Zn(II) e diclofenaco, 250 mg L^{-1} de metilparabeno

Embora os valores de CE_{50} estimados para os três compostos sejam relativamente próximos, especialmente para o Zn(II) e para o diclofenaco, é possível observar diferentes mecanismos de toxicidade através das relações concentração-resposta. Essas relações estão apresentadas na Figura 13 e as equações das retas, com seus respectivos coeficientes de correlação (R), estão apresentados na Tabela 18. A reta obtida para o metilparabeno apresenta maior inclinação, indicando uma rápida absorção e manifestação dos efeitos tóxicos, o que pode ser observado no perfil cinético correspondente. Já as retas obtidas para Zn(II) e diclofenaco, apesar da menor inclinação, apresentam efeitos tóxicos em concentrações mais baixas. Essa maior toxicidade pode ser confirmada pelos valores de CE_{50} estimados em $2,5 \pm 0,7$; 4 ± 2 e $6,7 \pm 0,9$ para o Zn(II), o diclofenaco e o metilparabeno, respectivamente. Desse modo, os valores estimados de CE_{50}, os perfis cinéticos de toxicidade e as retas obtidas com a relação concentração-resposta podem ser utilizados na elucidação do mecanismo de ação (toxicidade) dos compostos de interesse. Nesse sentido, pode-se determinar também a cinética de toxicidade de poluentes orgânicos submetidos a tratamentos oxidativos. Esses tratamentos podem gerar subprodutos mais tóxicos que a molécula inicial. Assim, os intermediários formados durante o tratamento devem ser monitorados [68,69].

A partir disso, pode-se concluir que o sistema MPFS, além de ser adequado para a avaliação de toxicidade aguda, pode ser empregado em estudos cinéticos de toxicidade, conferindo-lhe mais uma vantagem frente aos sistemas anteriormente propostos.

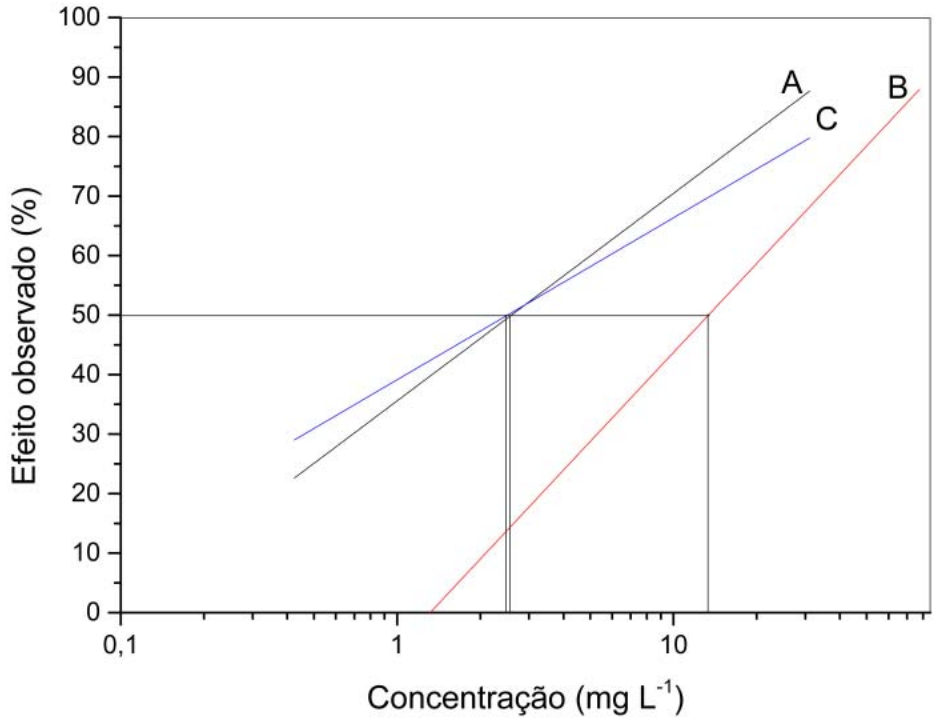


Figura 13 - Representação da relação concentração-resposta dos compostos: A – Zn(II); B – metilparabeno e C – diclofenaco

Tabela 18 - Parâmetros de regressão linear obtidos na avaliação de toxicidade de Zn(II), metilparabeno e diclofenaco através da relação concentração-resposta

Composto	**Equação da reta[a]**	**R**
Zn(II)	E = 34,88 C + 35,59	0,981
Metilparabeno	E = 49,66 C – 5,92	0.991
Diclofenaco	E = 27,22 C + 39,14	0,939

[a]E – efeito observado (%); C – concentração dos poluentes (mg L^{-1})

3.3.3. Comparação dos sistemas de análises em fluxo para o bioensaio de toxicidade com a bactéria Vibrio fischeri

Os parâmetros utilizados no sistema desenvolvido (MPFS) e nos sistemas: (i) de análise por injeção em fluxo (FIA) [35], (ii) de análise por injeção seqüencial (SIA) [36] e (iii) Kit BioTox™ estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Parâmetros experimentais utilizados nos diferentes bioensaios em fluxo

Variável	MPFS	FIA[35]	SIA[36]	Kit BioTox™
Volume de amostra (µL)	21 - 252	> 1000	50	500
Volume de suspensão bacteriana (µL)	120[a]	500	50[b]	500[b]
Tempo de contato (min)	5	< 1	3	30
Coeficiente de variação (%), n=10	2,0	0,7	< 1,1	> 10

[a]kit Biolux® Lyo; [b]kit BioTox™.

O volume é um parâmetro importante quando a quantidade de amostra é limitada. O volume de amostra empregado para cada diluição no sistema MPFS é da ordem de microlitros e *ca.* 1,3 mL para o bioensaio (série de diluições). Os outros sistemas também empregam pequenos volumes, porém necessitam de diluições prévias da amostra, o que requer maiores volumes.

O volume de suspensão bacteriana, além de estar relacionado ao sinal analítico, reflete no custo do ensaio. Assim, quanto menor o volume empregado, menor o custo do ensaio por amostra. Nesse aspecto, o sistema SIA apresentou-se como o mais vantajoso, empregando 50 µL de suspensão.

Os tempos de contato devem ser avaliados cuidadosamente e os menores não devem ser vistos como vantajosos, pois, ainda que a sua diminuição eleve a frequência de amostragem nos sistemas em fluxo, o bioensaio é dependente do tempo e das condições de mistura entre amostra e suspensão. Sendo assim, sistemas com melhores condições de mistura podem ser eficientes mesmo com tempo de contato reduzido. Por outro lado, sistemas com condições de mistura limitadas podem gerar avaliações de toxicidade inexatas.

O coeficiente de variação indica a precisão do método e, nesse aspecto, os três sistemas em fluxo apresentaram uma melhora significativa em relação à obtida em batelada. O coeficiente de variação estimado para o sistema MPFS contém os erros associados às etapas de ajuste de salinidade e diluições em linha da amostra, ao contrário dos sistemas FIA e SIA, em que esses erros não estão contidos nessa estimativa de precisão.

A partir desses parâmetros, pode-se concluir que o sistema desenvolvido é vantajoso e competitivo, ainda que não apresente o menor custo. O emprego de pequenos volumes de amostra, que minimiza a geração de efluentes, a boa relação custo-benefício e boa precisão são vantagens associadas a esse sistema. Além disso, a série de diluições e o ajuste de salinidade da amostra são realizados em linha, o que o caracteriza como um sistema totalmente automatizado.

É importante ressaltar também que, embora o sistema SIA apresente o menor consumo de suspensão bacteriana (50 μL) e alta precisão, os valores de CE_{50} estimados para os líquidos iônicos, empregando esse sistema, não foram concordantes com aqueles obtidos no procedimento de referência (BioTox™, realizado em microplaca). Foi observado apenas que os valores estimados para um tempo de contato de 3 min mudaram relativa e proporcionalmente aos valores estimados para o Cu(II), utilizado como controle positivo, para ambos os sistemas [36]. Para o sistema FIA a comparação com o procedimento de referência não foi realizada. Em consequência disso, os sistemas propostos que empregam SIA e FIA podem ser utilizados apenas para fins de triagem (*screening*), ao contrário do sistema MPFS desenvolvido.

4. CONCLUSÕES

O sistema de análises em fluxo desenvolvido mostrou ser uma alternativa simples, rápida e robusta para a avaliação de toxicidade aguda, utilizando pequenos volumes de amostra e de suspensão bacteriana. Todas as etapas do bioensaio foram implementadas em linha, incluindo o ajuste de salinidade e as diluições das amostras, diminuindo os riscos de contaminação e a susceptibilidade a erros sistemáticos. O fluxo pulsado inerente às microbombas solenoide proporcionou a mistura eficiente entre amostra e reagente e a parada de fluxo foi explorada para aumentar o tempo de contato entre a amostra e a suspensão bacteriana, de forma a aumentar a sensibilidade do bioensaio.

Os ajustes no tempo de integração e na diferença de potencial aplicados na fotomultiplicadora foram essenciais para medir a luminescência bacteriana e a cela em espiral apresentou menor susceptibilidade ao espalhamento de radiação por

partículas em suspensão. A variação da fração volumétrica da amostra e a sobreposição parcial do reagente em diferentes porções da zona de amostra dispersa propiciaram diluições em linha de até 235 vezes das soluções dos poluentes. Os resultados foram concordantes com os obtidos por diluição em batelada, com variação inferior a 4% para medidas em diferentes dias.

Os valores de CE_{50} estimados para os poluentes emergentes foram concordantes com aqueles obtidos no procedimento de referência a um nível de confiança de 95%. Desta forma, diferentemente dos procedimentos em fluxo anteriormente apresentados, o sistema proposto não se limita ao *screening* de poluentes. Os valores estimados foram coerentes com os valores relatados na literatura que, embora não possam ser comparados diretamente por apresentarem tempos de contato diferentes, indicam que o sistema MPFS é adequado para avaliação de toxicidade.

O monitoramento contínuo da bioluminescência na presença do poluente permite a determinação da cinética de toxicidade, conferindo ao procedimento proposto uma vantagem adicional em relação aos outros ensaios..

REFERÊNCIAS

1 **ENVIRONMENTAL risk assessment (ERA)**: an approach for assessing and reporting environmental conditions. British Columbia: Ministry of Environment, Lands and Parks, Habitat Branch, 2000.

2 WOLSKA, L. et al. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 332-344, 2007.

3 SHERRY, J. Environmental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update. **Chemosphere,** Oxford, v. 34, n. 5–7, p. 1011-1025, 1997.

4 COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

5 RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. 2. ed. Washington, DC: Taylor & Francis, 1995.

6 COSTAN, G. et al. Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP) - A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Environmental Toxicology and Water Quality,** New York, v. 8, n. 2, p. 115-140, 1993.

7 MANTIS, I.; VOUTSA, D.; SAMARA, C. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** New York, v. 62, n. 3, p. 397-407, 2005.

8 CALACE, N. et al. Influence of chemical parameters (heavy metals, organic matter, sulphur and nitrogen) on toxicity of sediments from the Mar Piccolo (Taranto, Ionian Sea, Italy). **Microchemical Journal,** New York, v. 79, n. 1-2, p. 243-248, 2005.

9 LOSSO, C. et al. Integration of biological responses from a suite of bioassays for the Venice Lagoon (Italy) through sediment toxicity index - Part A: Development and comparison of two methodological approaches. **Environmental Pollution,** London, v. 158, n. 12, p. 3655-3662, 2010.

10 ZABETOGLOU, K.; VOUTSA, D.; SAMARA, C. Toxicity and heavy metal contamination of surficial sediments from the Bay of Thessaloniki (Northwestern Aegean Sea) Greece. **Chemosphere,** Oxford, v. 49, n. 1, p. 17-26, 2002.

11 VAN BEELEN, P. A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. **Chemosphere,** Oxford, v. 53, n. 8, p. 795-808, 2003.

12 JEMEC, A.; TISLER, T.; ZGAJNAR-GOTVAJN, A. Assessment of Landfill Leachate Toxicity Reduction After Biological Treatment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** New York, v. 62, n. 2, p. 210-221, 2012.

13 LEI, L.; AOYAMA, I. Effect-directed investigation and interactive effect of organic toxicants in landfill leachates combining Microtox test with RP-HPLC fractionation and GC/MS analysis. **Ecotoxicology,** Heidelberg, v. 19, n. 7, p. 1268-1276, 2010.

14 PALMA, P. et al. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). **Environmental Science and Pollution Research,** Heidelberg, v. 17, n. 3, p. 703-716, 2010.

15 BAYO, J.; ANGOSTO, J. M.; DOLORES GOMEZ-LOPEZ, M. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by Vibrio fischeri bioassay after a chlorination-dechlorination process. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 166-171, 2009.

16 DALZELL, D. J. B. et al. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. **Chemosphere**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 535-545, 2002.

17 FARRE, M.; BARCELO, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 299-310, 2003.

18 MAISTO, G. et al. Assessment of the effects of Cr, Cu, Ni and Pb soil contamination by ecotoxicological tests. **Journal of Environmental Monitoring,** London, v. 13, n. 11, p. 3049-3056, 2011.

19 CALACE, N. et al. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition: chemical and ecotoxicological evaluation. **Environmental Pollution,** London, v. 136, n. 3, p. 485-492, 2005.

20 SHEPPARD, P. J. et al. Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon-contaminated soil. **Soil Research,** Collingwood, v. 49, n. 3, p. 261-269, 2011.

21 GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 608, n. 1, p. 2-29, 2008.

22 CALZA, P. et al. Photocatalytic degradation study of diclofenac over aqueous TiO2 suspensions. **Applied Catalysis Series B-Environmental,** Amsterdam, v. 67, n. 3-4, p. 197-205, 2006.

23 DRZEWICZ, P. et al. Monitoring of toxicity during degradation of selected pesticides using ionizing radiation. **Chemosphere,** Oxford, v. 57, n. 2, p. 135-145, 2004.

24 KRALJ, A. B.; FRANKO, M.; TREBSE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides - Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. **Chemosphere,** Oxford, v. 67, n. 1, p. 99-107, 2007.

25 PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International,** New York, v. 32, n. 2, p. 265-268, 2006.

26 JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. General principles of toxicology. In: WILLIAMS, P. L. et al. (Ed.). **Principles of Toxicology**: environmental and industrial applications. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. cap.1, p. 3-34.

27 GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.

28 KAZA, M. et al. Toxicity assessment of water samples from rivers in Central Poland using a battery of microbiotests - a pilot study. **Polish Journal of Environmental Studies,** Olsztyn, Poland v. 16, n. 1, p. 81-89, 2007.

29 KAISER, K. L. E. Correlations of Vibrio fischeri bacteria test data with bioassay data for other organisms. **Environmental Health Perspectives,** Research Triangle Park, v. 106, p. 583-591, 1998.

30 BLAISE, C.; FERARD, J.-F. Effluent assessment with the PEEP (potential ecotoxic effects probe) index. In: _____. (Ed.). **Small scale freshwater toxicity investigations.** v. 2: Hazard assessment schemes. Dordrecht: Springer, 2005. p. 69-87.

31 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente). Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Ecotoxicológicas, A. C.-A. Rio de Janeiro, 2006.

32 INOUYE, S. NAD(P)H-Flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, vibrio-fischeri ATCC-7744, IS A flavoprotein. **FEBS Letters,** Amsterdam, v. 347, n. 2-3, p. 163-168, 1994.

33 SOTO, W. et al. Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. **Microbial Ecology,** New York, v. 57, n. 1, p. 140-150, Jan 2009.

34 BERGLIND, R.; LEFFLER, P.; SJOSTROM, M. Interactions between pH, potassium, calcium, bromide, and phenol and their effects on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A-Current Issues,** London, v. 73, n. 16, p. 1102-1112, 2010.

35 KOMAITIS, E. et al. Development of a fully automated flow injection analyzer implementing bioluminescent biosensors for water toxicity assessment. **Sensors,** Basel, v. 10, n. 8, p. 7089-7098, 2010.

36 PINTO, P. C. A. G. et al. Automated high-throughput Vibrio fischeri assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 80, p. 97-102, 2012..

37 ROCHA, F. R. P. et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 468, n. 1, p. 119-131, 2002.

38 FRANCIS, P. S. et al. Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. **Talanta,** London, v. 58, n. 6, p. 1029-1042, 2002.

39 BERGAMIN FILHO, H.; REIS, B. F. D. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análises química por injeção em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 6, p.570-573, 1993.

40 REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1995.

41 ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

42 ROCHA, F. R. P.; INFANTE, C. M. C.; MELCHERT, W. R. A multi-purpose flow system based on multi-commutation. **Spectroscopy Letters,** New York, v. 39, n. 6, p. 651-668, 2006.

43 GERVASIO, A. P. G. et al. An improved flow-injection system for spectrophotometric determination of molybdenum and tungsten in tool steels. **Talanta,** London, v. 69, n. 4, p. 927-931, 2006.

44 FERES, M. A. et al. Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 618, n. 1, p. 1-17, 2008.

45 LIMA, J. et al. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta,** London, v. 64, n. 5, p. 1091-1098, 2004.

46 LAPA, R. A. S. et al. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 466, n. 1, p. 125-132, 2002.

47 ROCHA, D. L. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo com multicomutação e foto-oxidação em linha para a determinação espectrofotométrica de espécies de interesse ambiental, alimentício e clínico.** 2013. 167 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

48 FORTES, P. R. et al. Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. **Talanta,** London, v. 79, n. 4, p. 978-983, 2009.

49 DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** Amsterdam, v. 214, n. 6, p. 442-448, 2011.

50 TERNES, T. A.; JOSS, A.; SIEGRIST, H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 38, n. 20, p. 392A-399A, 2004.

51 BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere,** Oxford, v. 82, n. 11, p. 1518-1532, 2011.

52 TERASAKI, M.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with Daphnia magna and Vibrio fischeri bioassays. **Journal of Applied Toxicology,** Chichester, v. 29, n. 3, p. 242-247, 2009.

53 ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research,** New York, v. 44, n. 2, p. 578-588, 2010.

54 ROCHA, F. R. P. et al. A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements. **Talanta,** London, v. 67, n. 4, p. 673-677, 2005.

55 RIFFAT, S. B.; MA, X. Thermoelectrics: a review of present and potential applications. **Applied Thermal Engineering,** Oxford, v. 23, n. 8, p. 913-935, 2003.

56 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2005.

57 LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova,** São Paulo, v. 27, n. 2, p. 337-341, 2004.

58 ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática** - princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2008. 486 p.

59 KIM, Y. et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International,** New York, v. 33, n. 3, p. 370-375, 2007.

60 FERRARI, B. T. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** New York, v. 55, n. 3, p. 359-370, 2003.

61 HENSCHEL, K. P. et al. Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** Orlando, v. 25, n. 3, p. 220-225, 1997.

62 YALKOWSKY, S. H.; VALVANI, S. C.; ROSEMAN, T. J. Solubility and partitioning. VI. Octanol solubility and octanol-water partition coefficients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 72, p. 866-870, 1983.

63 HAYWARD, D. S.; KENLEY, R. A.; JENKE, D. R. Interactions between polymer containers and parenteral solutions: the correlation of equilibrium constants for polymer-water partitioning with octanol-water partition coefficients. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 59, p. 245-253, 1990.

64 PFEGEL, P. et al. Solubility of drug substances in lipophilic solvents. **Archiv der Pharmazie**, v. 48, p. 741-744, 1993.

65 KORENMAN, Y. I.; DANILOV, V. N. Extraction of alkyl salicylates from aqueous media. **Zhurnal Prikladnoi Khimii**, Leningrad, v. 63, p. 125-129, 1990.

66 LAROTONDA, M. I. et al. Relationships between octanol-water partition data, chromatographic indexes and their dependence on pH in a set of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Quantitative Structure - Activity Relationships: Pharmacology, Chemistry, Biology**, Heidelberg, v. 2, p. 168-173, 1983.

67 KUBAN, V. Determination of 1-octanol/water partition coefficients by flow-injection extraction without phase separation. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 248, p. 493-499, 1991.

68 DIRANY, A. et al. Electrochemical treatment of the antibiotic sulfachloropyridazine: kinetics, reaction pathways, and toxicity evolution. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 46, n. 7, p. 4074-4082, 2012.

69 RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water Research,** New York, v. 45, n. 15, p. 4311-4340, 2011.