

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FLÁVIA MAGGIONI BERNARDI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM
BIOMASSA DE CÉLULAS DE *Escherichia coli* POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE**

Porto Alegre
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FLÁVIA MAGGIONI BERNARDI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO EM
BIOMASSA DE CÉLULAS DE *Escherichia coli* POR ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de
Curso - QUI” do Curso de Química, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

Prof^a. Dr^a. Emilene Mendes Becker
Orientadora

Porto Alegre
2019

RESUMO

O selênio (Se) é um dos elementos traço essenciais para a saúde humana uma vez que atua em muitos processos fisiológicos importantes. Sua relevância está associada a sua participação como componente essencial de várias proteínas, entre elas a enzima glutathione peroxidase, que desempenha funções antioxidantes no organismo. Dessa forma, seus benefícios estão associados tanto a espécie química como a faixa de concentração que esse elemento se encontra no organismo. Estudos prévios do grupo de pesquisas demonstraram que células da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) são capazes de remover Se do meio a que estão expostas, concordando com o que é reportado na literatura. A avaliação da resposta celular, que expressa a influência do Se no crescimento da bactéria e, possivelmente, no estresse oxidativo, mostrou que diferentes espécies de Se, tanto inorgânicas quanto orgânicas, não afetam significativamente o crescimento celular. Contudo, a diminuição do teor de Se no meio não pode ser diretamente relacionada à incorporação desse elemento pela bactéria sem que seja avaliado o teor de Se na biomassa. Sendo assim, este trabalho avaliou o teor de Se na biomassa obtida pela exposição da bactéria *E. coli* ao Se(IV) através de métodos de análise para determinação de Se por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS). O estudo sobre a viabilidade celular da *E. coli* mostrou que as concentrações de Se(IV) estudadas são tóxicas, porém a bactéria mostrou ser resistente ao Se nessas concentrações. Os resultados obtidos mostraram que, exceto para a biomassa dos ensaios de 540 μM , a análise direta da amostra se mostra uma técnica mais adequada, com maior recuperação do Se.

Palavras-chave: selênio; *Escherichia coli* (*E. coli*); espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS); análise direta.

ABSTRACT

Selenium (Se) is one of the essential trace elements for human health since it acts in many important physiological processes. Its relevance is associated with its participation as an essential component of several proteins, among them the enzyme glutathione peroxidase, which plays antioxidant functions in the body. In this way, its benefits are associated with both the chemical species and the concentration range that this element is in the organism. Previous studies by the research group have demonstrated that *Escherichia coli* (*E. coli*) cells are able to remove Se from the medium to which they are exposed, in agreement with what is reported in the literature. The evaluation of the cellular response, which expresses the influence of Se on bacterial growth and possibly on oxidative stress, has shown that different species of Se, both inorganic and organic, do not significantly affect cell growth. However, the decrease in the content of Se in the medium can not be directly related to the incorporation of this element by the bacteria without evaluating the content of Se in the biomass. Thus, this work evaluated the content of Se in the biomass obtained by the exposure of *E. coli* bacteria to Se(IV) by means of analysis methods for determination of by Atomic Absorption Spectrometry with Graphite Furnace (GF AAS). The study on the cellular viability of *E. coli* showed that the concentrations of Se(IV) studied are toxic, but the bacterium showed to be resistant to Se at these concentrations. The results showed that, except for the biomass of the 540 μM , the direct analysis shows a more adequate technique, with a higher recovery of Se.

Keywords: selenium; *Escherichia coli* (*E. coli*); atomic absorption spectrometry with graphite furnace (GF AAS); direct analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 GERAL.....	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 SELÊNIO	12
3.2 INTERAÇÃO Se- <i>E. coli</i>	14
3.3 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO.....	15
3.3.2 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	15
3.3.2.1 Modificadores Químicos	16
3.4 PREPARO DE AMOSTRA.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	19
4.2 LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL.....	20
4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	20
4.4 ESTUDO DA INTERAÇÃO DO Se COM CÉLULAS DE <i>Escherichia coli</i>	21
4.5 RESPOSTA CELULAR	22
4.6 PREPARO DA AMOSTRA.....	23
4.6.1 Suspensão (<i>Slurry</i>) da biomassa de <i>E. coli</i>	23
4.6.2 Decomposição Ácida	24
4.6.2.1 Sobrenadante	24
4.6.2.1 Biomassa de <i>E. coli</i>	24
4.7 DETERMINAÇÃO DE Se POR GF AAS	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 RESPOSTA CELULAR	26
5.2 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR GF AAS	29

5.2.1 Otimização das condições instrumentais	29
5.2.2 Determinação de Se.....	32
6 CONCLUSÕES	37
7 REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos dois principais compostos de Se orgânicos: (a) selenometionina e (b) selenocisteína.....12
- Figura 2.** Cultivo celular para estudo da interação *E. coli*-Se(IV): controle positivo (a), ensaios 30 μ M (b), 60 μ M (c), 120 μ M(d) e 540 μ M (e) após 16 horas de incubação.....26
- Figura 3.** Densidade ótica dos controles positivos e dos ensaios após 16 horas de interação *E. coli*-Se(IV).....27
- Figura 4.** Concentração de células viáveis do controle positivo e dos ensaios (30, 60, 120 e 540 μ M) após 16 horas de interação *E. coli*-Se(IV), expressa em CFU mL⁻¹. Barras de erro representam o desvio padrão entre as replicatas de cada ensaio (n=3).....28
- Figura 5.** Curvas de pirólise (a) e atomização (b) para 4 ng de Se preparado em (■) água e em (●) LB 1,5 g L⁻¹. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n =3). Condições experimentais: volume injetado 20 μ L de 200 μ g L⁻¹ Se; Ta 1900 °C; Tp 1200 °C; modificador químico 5 μ g Pd e 3 μ g Mg.....30
- Figura 6.** Perfil do sinal analítico de uma solução padrão de 4 ng Se preparado em meio LB 1,5 g L⁻¹ (AA: absorção atômica; BG: background). Condições experimentais: volume injetado 20 μ L de 200 μ g L⁻¹ Se; Ta 1900 °C; Tp 1200 °C; modificador químico 5 μ g Pg e 3 μ g Mg.....31
- Figura 7.** Balanço de massas do Se recuperado após o estudo de interação Se-*E. coli*.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Programa de temperatura para a determinação de Se por GFAAS.....	25
Tabela II. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman.....	32
Tabela III. Recuperação de Se nos controles negativos.....	32
Tabela IV. Teor de Se residual e na biomassa após a interação <i>E. coli</i> – Se(IV) por análise direta e decomposição ácida.....	34
Tabela V. Balanço de massas do Se por análise direta após a interação com a <i>E.coli</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês, "*Atomic Absorption Spectrometry*".

ATCC: Coleção de culturas Americana, do inglês "*American Type Culture Collection*".

CFU: Unidade Formadora de Colônia, do inglês, "*Colony Forming Unit*".

E. coli: *Eschericia coli*.

EDL: Lâmpada de Descarga sem Eletrodo, do inglês, "*Electrodeless Discharge Lamp*".

FIAS: Sistema de Análise por Injeção em Fluxo, do inglês, "*FlowInjection Analysis System*".

GF AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês "*Furnace Grafite Atomic Absorption Spectrometry*".

LB: meio de cultura celular Luria Bertani.

LD: Limite de Detecção.

LQ: Limite de Quantificação.

m_0 : Massa Característica.

OD: densidade ótica, do inglês "*Optical Density*".

Se (IV): Selenito.

Se: Selênio.

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês "*World Health Organization*"

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um dos elementos traço essenciais para a saúde humana uma vez que atua em muitos processos fisiológicos importantes. Esse elemento participa como componente essencial de várias proteínas, entre elas a enzima glutathiona peroxidase, que desempenha funções antioxidantes no organismo. Sendo assim, seus benefícios estão associados tanto a espécie química como a faixa de concentração que esse elemento se encontra nos organismos.

Estudos reportados da literatura demonstram que as células da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) são capazes de crescer em meios contendo diferentes concentrações de Se e também remover esse elemento do meio ao qual estão expostas. Estudos prévios do grupo de pesquisa avaliaram a resposta celular, que expressa a influência de diferentes espécies de Se no crescimento da bactéria. Os resultados mostraram que, tanto as espécies inorgânicas de Se, quanto orgânicas, não afetam significativamente o crescimento celular com relação a medida do número total de células. Entretanto, visto que o teor de Se no meio diminuiu, não se pode atribuir essa diminuição diretamente à incorporação desse elemento pela bactéria sem que seja avaliado o teor de Se na biomassa da *E. coli*.

Dessa forma, este trabalho avaliou a possível incorporação de Se pela *E. coli*, estimando o teor de Se presente na biomassa dessa bactéria. Para isso, foram investigados métodos de análise direta na forma de suspensão para a determinação de Se por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS). Os resultados foram comparados com técnica de preparo de amostra utilizando irradiação por micro-ondas. Além disso, foi determinado o teor de Se residual presente nos sobrenadantes dos ensaios, bem como o Se adsorvido, avaliado pela solução utilizada para a lavagem da biomassa, afim de se obter ao final um balanço de massas e adequada estimativa do Se incorporado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um método analítico para determinação de selênio na biomassa de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) usando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) e amostragem direta na forma de suspensão.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realização de ensaios de cultura celular para obtenção da biomassa a partir de ensaios de incubação Se-*E.coli*.
- Otimização do programa de temperatura para determinação de Se por GF AAS.
- Otimização dos métodos de preparo de amostras de biomassa com amostragem direta de suspensão.
- Comparação dos resultados de análise direta na forma de suspensão com método de preparo de amostra com aquecimento induzido por micro-ondas.
- Balanço de massa do Se após os estudos de interação Se-*E. coli*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SELÊNIO

O selênio (Se) é um dos elementos traço essenciais para a saúde humana uma vez que atua em muitos processos fisiológicos importantes (RAYMAN, 2012). O seu comportamento como micronutriente essencial é conhecido por estar presente em proteínas, bem como a sua atividade anticarcinogênica e seus efeitos frente a toxicidade de metais pesados. Os elementos podem ser chamados de essenciais somente se a ausência total deles no organismo prejudica seu funcionamento causando danos irreversíveis.

Na natureza e nos organismos, o Se está presente nas formas orgânicas e inorgânicas, sendo geralmente os compostos orgânicos de Se mais biodisponíveis do que as formas inorgânicas (YAO et al., 2015). Na forma inorgânica, o Se pode estar presente em vários estados de oxidação, como selenato (SeO_4^{2-} , Se(VI)), selenito (SeO_3^{2-} , Se(IV)), seleneto (Se^{2-}) e elementar (Se^0). Na forma orgânica, os principais compostos são a selenocisteína ($\text{SC}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$) e a selenometionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$) (LEMLY, 1993).

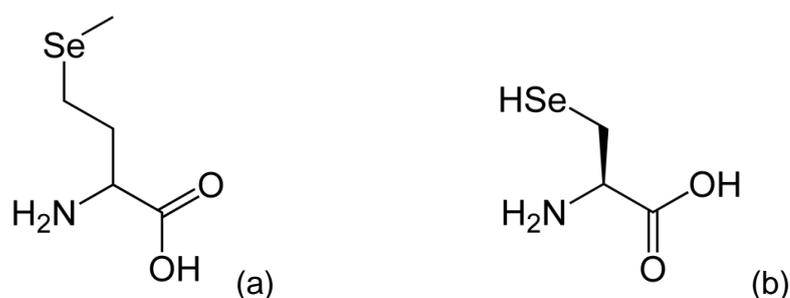


Figura 1. Estrutura dos dois principais compostos de Se orgânicos: (a) selenometionina e (b) selenocisteína.

O selenato e o selenito são altamente solúveis em água e são conhecidos por serem tóxicos em sistemas biológicos, mesmo em concentrações baixas. Em contraste, o Se elementar é essencialmente não tóxico, porém insolúvel em água. O seleneto é altamente tóxico, porém é rapidamente oxidado a Se elementar. Assim, o Se se comporta de maneira antagonista em sistemas biológicos, havendo uma linha

tênue entre as concentrações que são fisiologicamente essenciais e aquelas que são tóxicas (TURNER; WEINER; TAYLOR, 1998).

O Se também pode ser incorporado em proteínas como parte dos aminoácidos selenocisteína ou selenometionina. A reação do selenito com a glutathione produz a selenodiglutathione que, por sua vez, leva a subsequente reação de redução ao glutathioselenol e esses são provavelmente os principais intermediários para os possíveis destinos metabólicos do Se (GERRARD; TELFORD; WILLIAMS, 1974).

A quantidade diária de Se(IV) recomendada para seres humanos depende do sexo e da idade, mas é próxima de 75 µg de Se para homens e 55 µg de Se para mulheres (ROSA et al., 2002), enquanto o limite máximo diário estabelecido pela WHO é de 400 µg (WHO /FAO, 2004).

A primeira função atribuída ao selênio na biologia foi como uma toxina. A investigação feita por Kurt Franke sobre as causas da selenose mostrou que essa doença é causada pela ingestão de altas doses de selênio encontradas em cereais, forragem animal e plantas acumuladoras cultivadas em solos com alto teor de selênio (MANVILLE, 1939).

Entretanto, assim como o excesso, a deficiência em Se está associada a várias doenças em animais e humanos. Em humanos, a Doença de Keshan, um tipo de cardiomiopatia (PROGRESS IN THE STUDY OF KESHAN DISEASE, 1978) e a Doença de Kashin-Beck, uma desordem osteoarticular (Sokoloff, 1988), são as mais conhecidas.

Níveis insuficientes de Se estão associados também ao aumento do estresse oxidativo e neurodegeneração, pois o Se é cofactor de uma grande quantidade de enzimas, tais como glutathione peroxidase, tioredoxina reductase, desiodinasesiodotironina, seleno phosphate synthetase, selenoproteína P, e outros selenoproteínas envolvidas na proteção celular contra a oxidação grave por radicais livres (CRAVEDI et al., 2015).

Alguns estudos indicam que o Se atua como agente de desintoxicação de metais pesados e pode prevenir ou minimizar efeitos tóxicos do arsênio, do cádmio e do mercúrio. No entanto, esta relação é complexa e envolve uma variedade de processos bioquímicos e toxicológicos que ainda não estão bem esclarecidos (KHAN; WANG, 2009).

Nesse contexto, estudos mostraram que essas interações são geralmente antagonistas, mas também efeitos ainda mais tóxicos e sinérgicos foram relatados. Para compreender o antagonismo, em geral, os estudos levam em consideração as espécies químicas envolvidas, os modelos experimentais e rotas de administração dessas espécies. Assim, é especialmente relevante o estudo da exposição de bactérias como a *E. coli* a diferentes concentrações de Se para avaliar tanto o efeito do Se no crescimento celular como a incorporação deste elemento pelo microorganismo (KHAN; WANG, 2009).

3.2 INTERAÇÃO Se-*E. coli*

Existe um interesse considerável na função bioquímica do Se, quanto ao seu papel na relação com o metabolismo da vitamina E, como um nutriente essencial para o sistema da enzima formiato desidrogenase em células da bactéria *E. coli*, que requer selênio para a síntese. Esta enzima está relacionada com sua capacidade de neutralizar o envenenamento por mercúrio e como um possível inibidor do crescimento neoplásico (GERRARD; TELFORD; WILLIAMS, 1974).

Estudos com a bactéria *E. coli* tem sido reportados (ALLER; ROBLES, 1998a; ROBLES et al., 1999), pela sua utilização do ponto de vista analítico, para a especificação de compostos inorgânicos e orgânicos, pelo desenvolvimento de um método de bioensaio. Nestes estudos, os sistemas celulares foram capazes de incorporar algumas espécies de Se.

A *E. coli* é uma bactéria que se encontra no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue endotérmicos, como humanos, e é capaz de reduzir o selenito (SeO_3^{2-}) e o selenato (SeO_4^{2-}) em o Se elementar (Se^0) (TURNER; WEINER; TAYLOR, 1998).

Estudos relatam que células de *E. coli* podem crescer na presença de concentrações maiores que $32\ 000\ \text{mg mL}^{-1}$ de selenato e em concentrações menores que $1600\ \text{mg mL}^{-1}$ de selenito. Além disso, estudos reportam que o Se se distribui nas células com as seguintes percentagens: 28% na parede celular e membrana, 18% na fração ribossômica e 40% no citoplasma (GERRARD; TELFORD; WILLIAMS, 1974).

3.3 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO

Para avaliar o efeito do Se em células expostas a este elemento e sua incorporação na biomassa, técnicas analíticas sensíveis são necessárias. A Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) é uma ferramenta importante que tem sido grandemente empregada para avaliar a acumulação de Se em diferentes tecidos e fluidos biológicos animais. As limitações relacionadas à esta técnica como perdas por volatilização em etapas prévias à atomização tem sido contornadas pelo uso adequado de modificadores químicos (QUINÁIA; NÓBREGA, 2000).

3.3.2 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) tem sido bastante usada por ser uma ferramenta analítica sensível e que tem os problemas relacionados a perdas por volatilização em etapas prévias à atomização contornados pelo uso adequado de modificadores químicos. Além disso, usando correção do sinal de fundo pode se executar com sucesso a determinação direta de selênio por GF AAS (ZANÃO et al., 2002).

A GF AAS também apresenta características que a elegem como uma das técnicas mais adequadas para análise direta de sólidos, seja na forma de suspensão (SiS GF AAS) ou de sólido direto (SS GF AAS) (SCHWEIZER et al., 2004). Dentre as suas principais características, destacam-se: o programa de aquecimento que permite o pré-tratamento térmico da amostra, sobretudo durante a etapa de pirólise, o que facilita a remoção de parte dos concomitantes que podem provocar interferências durante a atomização; as pequenas quantidades de amostras que podem ser analisadas; apresenta boa seletividade e sensibilidade; os problemas relacionados ao sistema de transporte são praticamente inexistentes, uma vez que o transporte das suspensões é feito por amostragem discreta (não depende de nebulizadores), e são, posteriormente, introduzidas no atomizador eletrotérmico; a adequada otimização do programa de aquecimento, aliada ao uso de modificadores químicos, possibilita, na maioria das vezes, a calibração do equipamento com soluções aquosas (SOARES et al., 2008); (Welz, 1999); (WELZ; VALE, 2005).

3.3.2.1 Modificadores Químicos

Modificadores químicos são reagentes que são adicionados em excesso à solução a ser medida em GF AAS para converter o analito a uma fase de maior termoestabilidade e/ou aumentar a volatilidade dos contaminantes. O objetivo da modificação do analito e da matriz em GF AAS é permitir temperaturas de pirólise suficientemente altas para remover o volume de contaminantes durante o pré-tratamento térmico da amostra sem perder qualquer elemento analítico antes do estágio de atomização (SCHLEMMER, 1986).

O paládio, por não ser um elemento frequentemente determinado, pode ser obtido em alta pureza, não reduz a vida útil do tubo e não produz qualquer atenuação de fundo excessiva. Portanto, cumpre todas as expectativas se a estabilização para temperaturas de pirólise suficientemente altas puder ser obtida. A estabilização térmica do Se no atomizador de grafite vem apresentando uma boa aceitação através do uso de modificadores baseados principalmente em paládio (ALLER; ROBLES, 1998).

Estudos reportados da literatura mostram que modificadores mistos com nitratos de paládio e magnésio são superiores aos sem magnésio, pelo menos quando se trata da análise de materiais biológicos (CORPORATION, 1988). A estabilização térmica do Se no atomizador de grafite também vem apresentando uma boa aceitação através do uso de modificadores baseados principalmente em paládio (SCHLEMMER, 1986).

3.4 PREPARO DE AMOSTRA

A maioria das amostras submetidas para determinação elementar por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) encontra-se na forma sólida (QUINÁIA; NÓBREGA, 2000). Materiais biológicos preparados por técnicas de preparo de amostra convencionais, como a decomposição ácida, envolvem a completa solubilização do analito e da matriz através da mineralização oxidativa da matéria orgânica e da solubilização dos resíduos em um solvente adequado.

A decomposição ácida é uma alternativa amplamente utilizada, podendo conduzir processos de extração, dissolução e decomposição quando aplicadas a amostras sólidas em pó, que se encontram dispersas em um meio líquido apropriado (ORESTE E. Q. et al., 2017).

O uso de ondas de ultrassom em processos de preparo de amostra também podem ser utilizados, pois são responsáveis pela desagregação e ruptura do material pela ação de microjatos aumentando a superfície de reação, o aumento da atividade química a partir de espécies presentes no solvente, a renovação do solvente na interface solvente-sólido e, até mesmo, a fusão do sólido devido às temperaturas extremas atingidas no momento do colapso das bolhas de cavitação (KRUG, 2010).

O procedimento de decomposição pode ser muito trabalhoso, consumir bastante tempo e promover erros por contaminação (CHEN; MARSHALL, 1999). Erros sistemáticos devido à contaminação ou perdas por volatilização estão entre os mais frequentes, podendo afetar diretamente a exatidão e precisão dos resultados analíticos. Além disso, esses procedimentos requerem elevado volume ou massa de amostra (SOARES et al., 2008).

Considerando que a GF AAS é uma técnica destinada à determinação de traços e ultratraços de elementos, os cuidados no preparo das amostras tornam-se cruciais para o sucesso do método empregado (SCHWEIZER et al., 2004). Por isso, há um interesse contínuo no desenvolvimento de técnicas simples de preparo de amostra bem como pela análise direta das amostras, com mínima manipulação.

A análise direta de amostras, que pode ser efetuada por meio de suspensões ou por meio da amostragem direta de uma amostra pulverizada, com tamanho de partícula controlado, apresenta algumas vantagens quando comparada aos procedimentos convencionais (CRAVEDI et al., 2015): simplificação no pré-tratamento da amostra, possibilitando reduzir o tempo gasto nessa etapa, aumentando, assim, a frequência analítica; minimização dos riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes, pouca manipulação ou baixa exposição ao ambiente; minimização das perdas do analito de interesse; menor periculosidade devido a não utilização de reagentes tóxicos ou corrosivos; minimização de geração de resíduos, o que permite classificar os métodos como “limpos”; maior detectabilidade, uma vez que as amostras não são diluídas e,

possibilidade de analisar uma pequena quantidade de amostra, permitindo estudos de micro homogeneidade (SOARES et al., 2008).

A preparação de amostras em suspensão contínua para análise direta vem atraindo considerável atenção pelo seu preparo fácil e sua compatibilidade de manipulação com técnicas líquidas. O uso de amostras em suspensão tem se tornado uma das mais populares abordagens para a determinação direta de elementos traços (CHEN; MARSHALL, 1999), uma vez que essa técnica combina as vantagens da amostragem sólida e líquida (MILLER-IHLI, 1990).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho, a quantificação do Se foi realizada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Para tanto, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Pin AACle 900T equipado com autosampler AS900 (ambos Perkin Elmer) e sistema de corretor de fundo baseado no efeito Zeeman. Foram utilizados fornos de grafite com aquecimento transversal com plataforma integrada (THGA) e lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL) de selênio como fonte de radiação, operada sob uma corrente de 290,0 mA. A avaliação do sinal foi feita pela absorvância integrada (área do pico) na linha analítica de 196,03 nm, com fenda espectral de 2,0 nm.

A manipulação de qualquer material contendo o microrganismo *E. coli*, bem como de vidrarias esterilizadas foi realizada em capela de fluxo laminar vertical, dotada de filtro de alta eficiência HEPA (do inglês, High Efficiency Particulate Arrestance) e lâmpada germicida com radiação UV (Pachane, Brasil). A incubação foi feita e mantida em um agitador orbital com banho termostaticado para tubos de ensaio (New Brunswick Scientific, USA) e a incubação da *E. coli* cultivada em placas foi feita em estufa (Thermoelectron Corporation, Alemanha).

Para a avaliação do crescimento celular da *E. coli* nos experimentos, a contagem de células totais (viáveis e não viáveis) foi feita em um espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific, USA). O número de células totais é dado pela densidade ótica (OD) da suspensão de células que é a turbidez causada quando ocorre o crescimento celular. A medida da OD foi obtida pela leitura da absorvância em 600 nm.

Para a pesagem dos reagentes, foi utilizada uma balança analítica Europe modelo EU60 (Gibertini Elettronica, Itália).

Para auxiliar na decomposição ácida das amostras, utilizou-se um digestor de micro-ondas Mars6 (CEM, USA).

4.2 LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL

A vidraria e os recipientes utilizados no trabalho foram previamente descontaminados e secos para posterior uso. Uma solução de HNO_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ foi introduzida nestes recipientes, ficando em contato com o ácido por um período de 24 horas para a completa descontaminação. Após retirar a solução ácida, os frascos foram lavados com água ultrapura.

Para os ensaios de cultivo celular, todo material utilizado após descontaminação foi esterilizado em autoclave vertical (Phoenix, São Paulo) durante 30 minutos, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,2 \text{ Kgf cm}^2$. Após o término do experimento, todo material passou pelo processo de desinfecção feito por imersão completa do material em hipoclorito de sódio 1,0% ou álcool etílico 70% por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a limpeza com água e sabão com auxílio de uma escova, o enxágue em água corrente e secagem.

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

Água ultrapura, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA), foi utilizada para o preparo de todas as soluções padrão e amostras.

Todos os reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico. Ácido nítrico (Synth, Diadema, Brasil) foram destilados abaixo do seu respectivo ponto de ebulição em um sistema de destilação de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil).

As soluções padrão de Se(IV) foram preparadas por diluição a partir de uma solução de 1 g L^{-1} de selenito de sódio (Na_2SeO_3), preparada pela diluição em água de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} de Se(IV) (SpecSol, Jacareí, Brasil). Soluções padrão de 250, 500, 1000 e 4000 mg L^{-1} de selenito (Se(IV)) foram preparadas por diluição a partir de uma solução de 1 g L^{-1} de Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha) em água. As soluções de Se(IV) utilizadas nos experimentos de cultivo celular foram previamente esterilizadas em autoclave.

O meio de cultura utilizado nos experimentos de interação com a *E. coli* foi o Luria Bertani (LB) cuja composição consiste em 10 g L^{-1} de triptona, 5 g L^{-1} de extrato de levedura e 5 g L^{-1} de NaCl. Ambos os meios LB, líquido ou sólido

(contendo 2% de Agar), foram preparados diariamente e imediatamente esterilizados em autoclave.

Foi, ainda, utilizado nos experimentos com a *E. coli* o cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, para lavagem do *pellet* contendo a biomassa bacteriana.

Uma solução de $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de paládio (Pd) em 15% (v/v) HNO₃ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e uma solução de $10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de magnésio (Mg) em 15% (v/v) HNO₃ foram utilizadas como modificador químico para determinação de Se por GF AAS.

Argônio de elevada pureza (99,999%) foi usado como gás de purga e proteção em GF AAS.

4.4 ESTUDO DA INTERAÇÃO DO Se COM CÉLULAS DE *Escherichia coli*

As células de *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 11775 foram primeiramente cultivadas em meio LB sólido (previamente preparado em placas de Petri) a 37 °C por 24 horas. A cultura foi estocada a 4 °C até o uso.

A partir deste cultivo em meio sólido, a *E. coli* foi inoculada em meio LB 20 g L⁻¹ previamente esterilizado. Este cultivo em meio líquido foi mantido sob agitação por 20 horas a 37 °C, originando um inóculo com alta concentração de células de *E. coli*, com densidade óptica em torno de 1,79, denominada de pré-inóculo.

Deste pré-inóculo, uma suspensão de células de *E. coli* foi preparada em meio LB 15 g L⁻¹ previamente esterilizado. O preparo desta suspensão se deu pela necessidade de se controlar a concentração de células usada nos ensaios de interação, deste modo a concentração de células da suspensão foi padronizada em uma densidade óptica de 0,33.

Para o estudo de interação, dois tipos de inóculos em triplicata foram preparados com esta a suspensão de células padronizada, o controle positivo (referência de desenvolvimento celular basal da *E. coli*) e os ensaios de interação. Também foram preparadas soluções em meio LB 15 g L⁻¹ na ausência de células bacterianas, denominados controles negativos e brancos. Para a interação *E.coli*-Se(IV), os ensaios e controles negativos foram suplementados com 30, 60, 120 ou 540 μM Se(IV) , pois essas concentrações compreendem limites abaixo, entre e

acima da quantidade diária de Se recomendada. Todos os inóculos e soluções foram incubados sob agitação por 16 horas a 37 °C.

Após o término da incubação, os controles negativos e o branco foram coletados em frascos tipo Falcon e armazenados a 4 °C e dos ensaios e dos controles positivos foram retiradas alíquotas de cada replicata para a avaliação da resposta celular, conforme descrito a seguir no item 4.5 e, então, o restante da suspensão foi transferido para frascos tipo Falcon e centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos. Esse processo separou o sobrenadante (meio LB) das células. Esses sobrenadantes foram separados e armazenados a 4 °C juntamente com os controles negativos e o branco para posterior determinação de Se por GF AAS.

As células foram ressuspensas em 10 mL de solução salina, NaCl 0,85%, e centrifugadas. O sobrenadante salino foi armazenado para posterior análise. Esse processo de lavagem das células foi repetido por mais uma vez e resultou em um *pellet* de células chamado de biomassa. A biomassa foi liofilizada e armazenada a 4 °C para posterior determinação de Se por GF AAS.

4.5 RESPOSTA CELULAR

A resposta celular foi avaliada por dois métodos indiretos de contagem de microrganismos. O método de contagem pela densidade ótica (OD) estima a concentração de células totais (viáveis e não viáveis) e o método de contagem de unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony forming unit*) estima a viabilidade celular, ou seja, a concentração de células viáveis. Célula viável é aquela que mantém as atividades metabólicas mínimas para possibilitar o seu crescimento.

A avaliação da resposta celular da *E. coli* nos estudos de interação foi realizada logo após o término do tempo de incubação.

Para a medida da OD foi coletado 1,0 mL de cada replicata dos controles positivos e dos ensaios e feita leitura da absorvância em 600 nm.

Para a contagem de CFU foi coletado 100 µL de cada replicata do controle positivo e dos ensaios e esta alíquota foi transferida para frascos tipo Eppendorf e diluições em séries de 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 vezes foram feitas em PBS os ensaios com concentração de Se(IV) igual a 30 e 60 µM. Para os controles

positivos e os ensaios com concentração de Se(IV) igual a 120 e 540 μM foi necessário uma diluição maior, de 1.000.000 de vezes. Uma alíquota de 50 μL da série mais diluída foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski em meio LB sólido, previamente preparado em placas de Petri. As placas foram mantidas à 37 °C, *overnight* e em seguida foi feita a contagem das colônias crescidas nas placas. O resultado é dado em CFU mL^{-1} .

4.6 PREPARO DA AMOSTRA

Neste trabalho o Se total foi determinado como i) Se residual, ou seja, no sobrenadante dos ensaios obtidos após a interação Se-*E. coli* e centrifugação; ii) Se adsorvido, pela avaliação da solução para lavagem da biomassa e iii) Se incorporado na biomassa.

As amostras dos sobrenadantes e a solução salina de lavagem da biomassa foram diluídas e analisadas diretamente por GF AAS, sem nenhum preparo prévio. A determinação de Se na biomassa foi feita por análise direta por suspensão. Para comparação dos resultados obtidos, as amostras sofreram decomposição via úmida com aquecimento induzido por micro-ondas.

4.6.1 Suspensão da biomassa de *E. coli*

Para o preparo das suspensões da biomassa de *E. coli* para a análise direta por GF AAS foram medidas massas de aproximadamente 5 mg de biomassa de *E. coli*, previamente liofilizada, em Falcons de 50 mL. Foram adicionados, em todas as suspensões, ácido nítrico e Triton X-100, a fim de que a concentração final de cada um fosse 0,5 e 0,005% (v/v), respectivamente. Para as biomassas provenientes dos controles positivos e dos ensaios de 30 μM , completou-se com água ultrapura até o volume de 20 mL. Para as biomassas provenientes dos ensaios de 60 e 120 μM , completou-se com água ultrapura até o volume de 40 mL. Para as biomassas provenientes dos ensaios de 540 μM , completou-se com água ultrapura até o volume de 50 mL.

As suspensões das amostras foram então agitadas por 30 segundos em um vortex (Phoenix AP56) e, após, mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos.

Para a análise por GF AAS, cada amostra foi agitada novamente por 30 segundos em vortex, imediatamente antes da pipetagem pelo amostrador automático do GF AAS.

4.6.2 Decomposição Ácida

4.6.2.1 Sobrenadante

Para decompor os sobrenadantes dos controles positivos e dos ensaios, uma alíquota de 1 mL foi pipetada em frascos de teflon do digestor de micro-ondas (tipo *easyprep*), juntamente com 2,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%. Após, as amostras foram levadas ao digestor e submetidas a um programa de aquecimento que consistiu de uma rampa de temperatura até 160 °C por 15 minutos, mantidas nessa temperatura por mais 10 minutos e, após, resfriadas à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram diluídas até 40 mL e armazenadas a 4 °C até a análise por GF AAS.

4.6.2.2 Biomassa de *E. coli*

Para decompor a biomassa das células de *E. coli* dos controles positivos e dos ensaios, aproximadamente 10 mg de biomassa foram medidos em frascos de teflon do digestor de micro-ondas (do tipo *easyprep*), juntamente com 2,5 mL de HNO₃ concentrado e 0,5 mL de H₂O₂30%. Após, as amostras foram levadas ao digestor e submetidas a um programa de aquecimento como descrito no item 4.6.2.1. Por fim, as amostras foram também diluídas até 40 mL com água ultra pura e armazenadas a 4 °C até a análise por GF AAS.

4.7 DETERMINAÇÃO DE Se POR GF AAS

Neste trabalho o Se foi determinado por GF AAS como Se total após o estudo de interação *E. coli*-Se, avaliando-se os controles negativos, o teor residual nos sobrenadantes dos controles positivos e dos ensaios, na biomassa de *E. coli* e na solução utilizada para a lavagem da biomassa.

As amostras foram diluídas com água ultrapura de forma que a concentração ficasse dentro da faixa da curva de calibração (no mínimo dez vezes e no máximo 150 vezes). O volume de amostra injetada no atomizador foi 20 μL juntamente com 3 μL de 1,0 g L^{-1} de Mg e 5 μL de 1,0 g L^{-1} de Pd. O Argônio foi utilizado em uma vazão de 2,5 mL min^{-1} em todas as etapas do programa de temperatura, exceto na etapa de atomização. Todas as medidas foram feitas em triplicata e o programa de temperatura otimizado utilizado para todas as determinações está representado na Tabela I.

Tabela I. Programa de temperatura para a determinação de Se por GFAAS.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	Permanência (s)
Secagem 1	110	10	30
Secagem 2	180	15	50
Pirólise	1200	10	20
Atomização	1900	0	5
Limpeza	2300	1	3

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESPOSTA CELULAR

A resposta celular foi avaliada por dois métodos indiretos de contagem de microrganismos. O método de contagem pela densidade ótica (OD) e método de contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) que determina a concentração de células viáveis, ou seja, a viabilidade celular.

Após a definição do tempo de incubação pela curva de crescimento, estudos de interação *E. coli*-Se foram realizados e a resposta celular da *E. coli* a esta interação foi avaliada nas amostras coletadas após 16 horas de incubação.

Na Figura 2, que exhibe os ensaios após a interação, é possível observar a formação da coloração alaranjada nos ensaios de Se(IV) de 120 μM e 540 μM da interação *E. coli*-Se. O surgimento da coloração alaranjada pode ser explicado pelos mecanismos envolvidos na interação Se-bactéria que descrevem a redução do selenito a selênio elementar, o qual possui essa cor característica, evidenciando essa reação. A intensidade da cor aumenta com o aumento da concentração de selenito no meio de cultivo, pois quanto maior a concentração de selenito, maior a produção de selênio elementar.

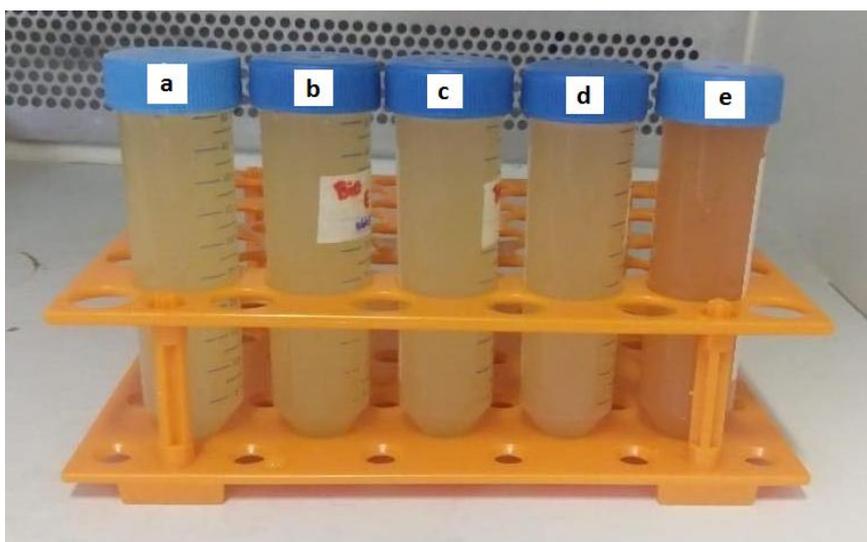


Figura 2. Cultivo celular para estudo da interação *E. coli*-Se(IV): controle positivo (a), ensaios 30 μM (b), 60 μM (c), 120 μM (d) e 540 μM (e) após 16 horas de incubação.

Para a avaliação da resposta celular da *E. coli* na presença de Se(IV), a concentração de células totais foi determinada pela OD após a interação e está representada pela Figura 3.

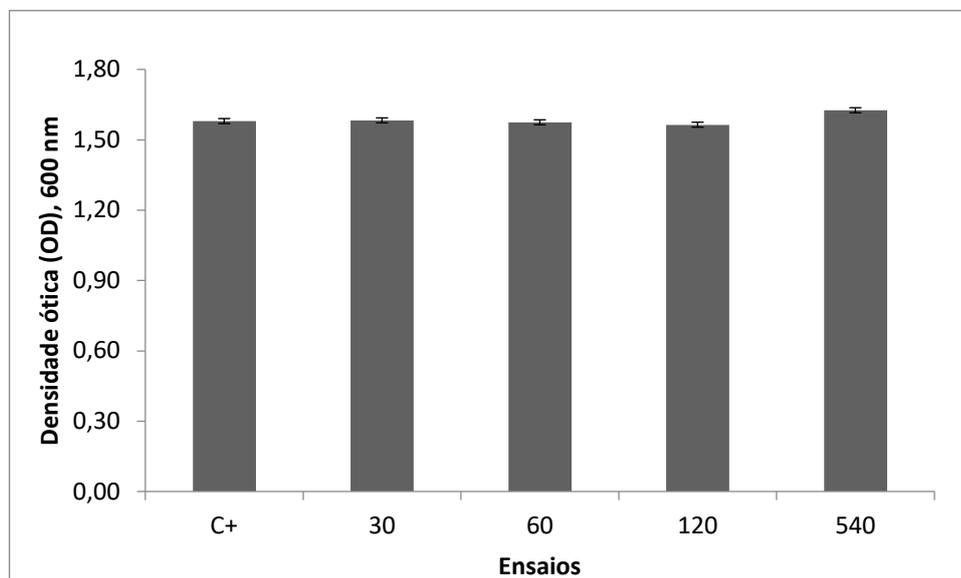


Figura 3. Densidade ótica dos controles positivos e dos ensaios após 16 horas de interação *E. coli*-Se (n=3).

Considerando que a medida da OD do controle positivo é a referência de desenvolvimento celular da *E. coli* na ausência de Se(IV), pelos resultados obtidos para todas as concentrações de Se avaliadas, pode-se dizer que não houve inibição do crescimento celular.

Os ensaios de 30 e 60 μM apresentaram um desenvolvimento similar ao dos controles positivos, os ensaios de 120 μM apresentaram um desenvolvimento médio um pouco abaixo dos controles positivos e os ensaios de 540 μM exibiram uma OD superior ao controle.

Nesse caso, entretanto, é difícil relacionar a densidade ótica exclusivamente ao crescimento celular, pois a turbidez da suspensão pode, também, ser consequência da presença de selênio elementar.

A resposta celular da *E. coli* na presença de Se(IV) também foi investigada em termos de viabilidade celular através do método de CFU. Nesse método, além de mostrar o efeito tóxico do Se no crescimento celular, não há a interferência do Se elementar nos resultados. Os resultados da viabilidade celular estão apresentados na Figura 4 e expressados em CFU mL^{-1} .

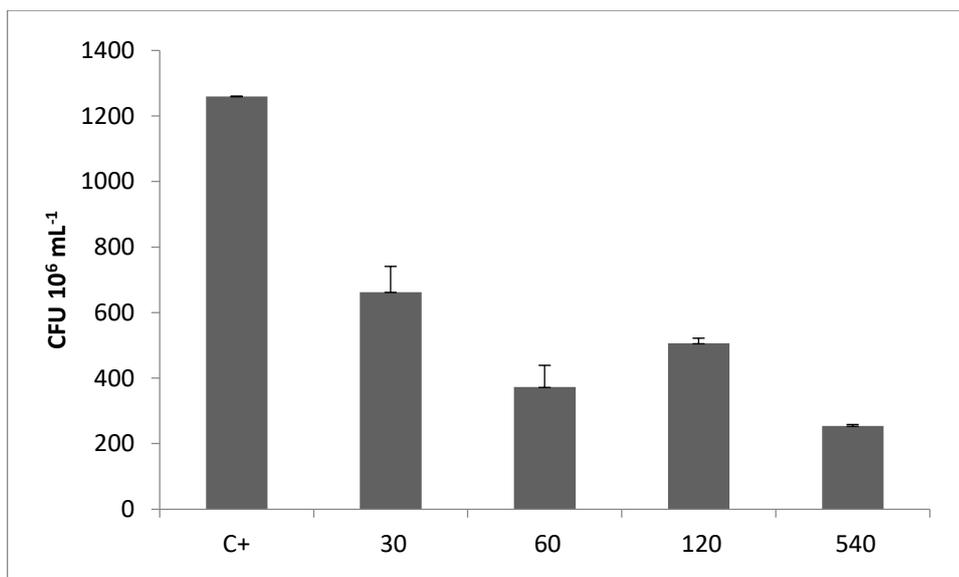


Figura 4. Concentração de células viáveis do controle positivo e dos ensaios (30, 60, 120 e 540 μM) após 16 horas de interação *E. coli*-Se, expressa em CFU mL⁻¹. Barras de erro representam o desvio padrão entre as replicatas de cada ensaio (n=3).

O resultados de viabilidade celular para o ensaio de 30 μM ($6,63 \cdot 10^8$ CFU mL⁻¹), de 60 μM ($3,73 \cdot 10^8$ CFU mL⁻¹), de 120 μM ($5,06 \cdot 10^8$ CFU mL⁻¹) e de 540 μM ($2,54 \cdot 10^8$ CFU mL⁻¹) foram inferiores a viabilidade apresentada pelo controle positivo ($1,94 \cdot 10^9$ CFU mL⁻¹). O ensaio de 540 μM foi o ensaio no qual a concentração de Se apresentou maior efeito negativo sobre a viabilidade celular.

Uma vez que a viabilidade celular do ensaio 540 μM foi inferior à viabilidade apresentada pelo controle positivo, é possível afirmar que a OD do ensaio de 540 μM não é consequência somente do crescimento celular e, sim, tem contribuição da turbidez causada pelo selênio elementar. Portanto, embora esta avaliação evidencie o número total de células, para estabelecer efeito tóxico, ela não é a mais indicada.

O efeito do Se na viabilidade celular da *E. coli* neste trabalho concorda com o que já foi reportado na literatura, onde concentrações de selenito de sódio acima de 2 μM causaram efeito tóxico (NODA; TAKANO; SAKURAI, 1979). Estudos prévios relataram que a redução de Se(IV) para uma forma menos tóxica, como o selênio elementar, feita por algumas espécies de bactérias, incluindo a *E. coli*, pode ser explicado como um processo de desintoxicação de Se pelas bactérias, o qual as

torna tolerantes/resistentes a altas concentração de Se (KRAMER; AMES, 1988); (TETTEH et al., 2014).

5.2 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO POR GF AAS

5.2.1 Otimização das condições instrumentais

Neste trabalho, a determinação de Se foi feita por GF AAS. É conhecido que a determinação de espécies voláteis como Se requerem o uso de modificadores químicos para estabilização até a etapa de atomização. Além disso, a determinação pode sofrer interferência dos constituintes da matriz.

Para tornar as propriedades físico-químicas do analito nas soluções padrão e na amostra o mais semelhantes possível, são empregados modificadores químicos. Estes podem atuar como modificadores de matriz quando auxiliam na volatilização da matriz. Entretanto, o emprego mais comum é na estabilização do analito através da formação de um composto ou fase do analito mais estável, o que permite utilizar temperaturas mais altas durante a pirólise para a remoção dos constituintes indesejados da matriz, sem perda do analito. A mistura de Pd e Mg na forma de nitrato, utilizada para estabilizar um grande número de elementos, é conhecida como modificador universal (ALLER; ROBLES, 1998b).

A otimização das temperaturas de pirólise e de atomização adequadas para as determinações de Se foi investigada através de curvas de absorvância integrada *versus* temperatura, utilizando-se uma massa de Se (total) de 4 ng (em solução preparada em meio LB $1,5 \text{ g L}^{-1}$) e Pd-Mg como modificador químico (5 e 3 μg respectivamente). Para estimar a temperatura de pirólise (T_p) foi estabelecido $1900 \text{ }^\circ\text{C}$ como temperatura de atomização e para estimar a temperatura de atomização (T_a) usou-se $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ como temperatura de pirólise. Os resultados foram avaliados em relação à sensibilidade através da absorvância integrada. As curvas de pirólise e atomização estão apresentadas na Figura 4.

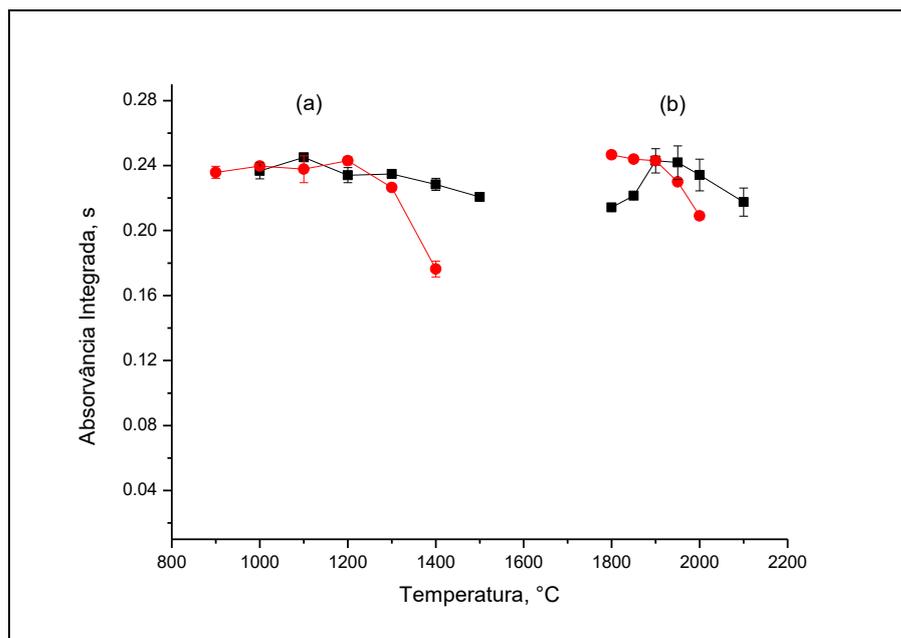


Figura 4. Curvas de pirólise (a) e atomização (b) para 4 ng de Se preparado em (■) água e em (●) LB 1,5 g L⁻¹. Barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas (n=3). Condições experimentais: volume injetado 20 µL de 200 µg L⁻¹ Se; Ta 1900 °C; Tp 1200 °C; modificador químico 5 µg Pd e 3 µg Mg.

A temperatura de pirólise mais alta possível é requerida para separar efetivamente o analito dos concomitantes/matriz. Neste trabalho, foi comparado o comportamento do sinal analítico de Se em água e em LB. Os resultados obtidos tanto em água como em LB mostraram que temperaturas de pirólise entre 1000 e 1300 °C produziram maior sensibilidade, não havendo diferença maior que 5% entre elas. Contudo, o sinal analítico do Se em meio LB diminuiu significativamente para temperaturas maiores que 1300 °C. Sendo assim, a temperatura de pirólise usada para todas as determinações de Se foi 1200 °C.

Para estabelecer a temperatura de atomização devem-se evitar perdas do analito por difusão que ocorrem em altas temperaturas. O uso do modificador químico Pd-Mg ajuda a tornar o analito mais estável e favorece o uso de temperaturas de atomização mais altas que as requeridas quando na ausência de modificador químico. Os resultados, avaliados tanto com relação à sensibilidade quanto ao perfil do sinal analítico, mostraram que, em meio LB, a maior sensibilidade foi obtida em 1800 °C, enquanto que em água foi em 1900 °C. Contudo, como a maioria das amostras tem uma diluição em que a concentração de LB é menor que

1,5 g L⁻¹, optou-se por usar 1900 °C como condição compromisso para as todas as determinações. O perfil do sinal analítico após a otimização das condições experimentais está representado na Figura 6. Assim, as temperaturas de pirólise e de atomização usadas no decorrer do trabalho foram 1200 °C e 1900 °C, respectivamente.

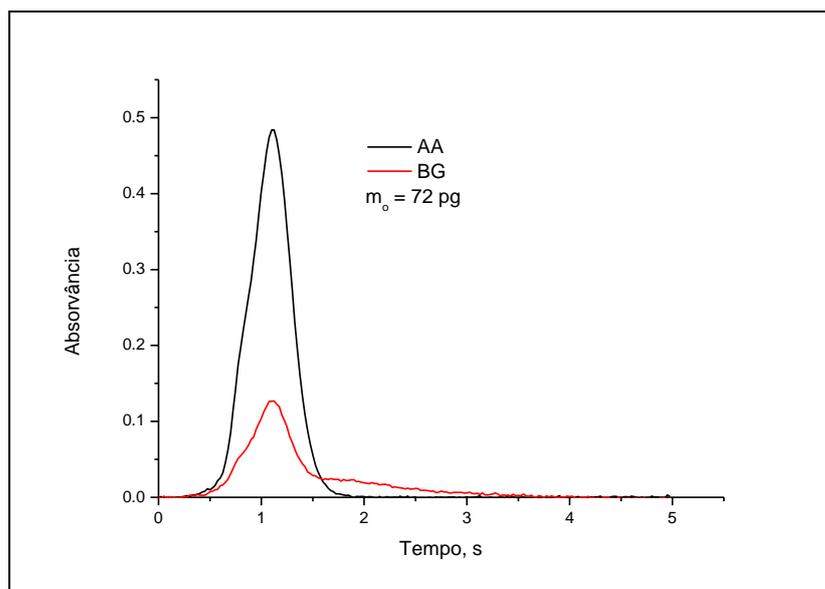


Figura 6. Perfil do sinal analítico de uma solução padrão de 4 ng Se preparado em meio LB 1,5 g L⁻¹ (AA: absorção atômica; BG: background). Condições experimentais: volume injetado 20 µL de 200 µg L⁻¹ Se; Ta 1900 °C; Tp 1200 °C; modificador químico 5 µg Pg e 3 µg Mg.

Após a otimização das condições experimentais, foram estabelecidos os parâmetros de mérito faixa de concentração, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais e massa característica (m_0). Para isso, foi construída uma curva de calibração utilizando cinco soluções padrão na faixa de 50-300 µg L⁻¹ de Se (equivalente a uma faixa de 1,0 – 6,0 ng). Os resultados estão apresentados na Tabela II. A massa característica obtida está acima da que é reportada pelo fabricante do equipamento (45 pg).

Tabela II. Parâmetros de mérito para a determinação de Se por GF AAS com sistema de correção de fundo baseado em efeito Zeeman.

Parâmetro	Resultado
Regressão Linear	$A_{int}=0,0036+0009m$
R	0,9962
LD (ng)	1,4
LQ (ng)	4,7
m_0 (pg)	89

5.2.2 Determinação de Se

Primeiramente, para avaliar o teor de Se residual dos ensaios, foi feita a determinação de Se por GF AAS nos controles negativos de 30, 60, 120 e 540 μM . Os resultados obtidos estão expressos em termos de recuperação (%) de Se calculada em relação à quantidade de Se adicionada nos respectivos controles como mostrado na Tabela III.

Tabela III. Recuperação de Se nos controles negativos.

Ensaio (μM)	Se adicionado (mg/L)	Se encontrado (mg/L)	Recuperação (%)
30	2,5	1,9	77
60	5,0	4,1	82
120	10,0	8,7	87
540	45,0	36,4	81

Os resultados da recuperação de Se dos controles negativos ficaram entre 77 e 87% quando calculados em relação à curva de calibração. É importante destacar que a solução de Se utilizada para os ensaios de interação foi preparada a partir do sal selenito de sódio. Apesar dos valores de recuperação estarem abaixo do esperado, o valor de Se encontrado foi a referência para a estimativa percentual de Se residual, bem como o Se adsorvido e Se incorporado na biomassa.

Para avaliar o teor de incorporação do Se pela *E. coli*, fez-se a determinação desse elemento na biomassa da bactéria. Para isso, mediu-se a massa da biomassa obtida a partir de cada ensaio e assim estimou-se a massa média de biomassa para cada replicata com a mesma concentração inicial de Se. O teor de Se encontrado a

partir da determinação, tanto por análise direta, como via decomposição ácida, foi relacionado com a massa média total de biomassa. As massas de Se em cada etapa estão expressas na Tabela IV.

A interação da *E. coli* com o Se presente no meio foi avaliada pela determinação de Se residual nos sobrenadantes dos ensaios através da análise direta e também após a decomposição ácida dos mesmos. Os resultados das replicatas desse experimento estão expressos em termos de concentração de Se no sobrenadante ($\mu\text{g/L}$) e em percentagem de Se residual também na Tabela IV.

Como já mencionado, o teor de Se no meio foi avaliado e comparado com os valores encontrados nos respectivos controles negativos, que serviram de referência (100% de Se) para avaliar a capacidade da *E. coli* em remover o Se presente no meio. Os resultados obtidos mostraram que, em geral, a concentração de Se nos sobrenadantes diminuiu com o aumento da concentração de Se no ensaio, ou seja, quanto maior o suplemento de Se, mais a bactéria o remove do meio.

Tabela IV. Teor de Se residual e na biomassa após a interação *E. coli* – Se(IV) por análise direta e decomposição ácida.

Ensaio (μM)	Se residual ($\mu\text{g/L}$)		Biomassa ($\mu\text{g/g}$)	
	Análise direta	Decomposição	Análise direta	Decomposição
30	580	425	252	128
	501	356	312	138
	557	484	369	178
Média \pm sd	546 \pm 41	422 \pm 64	311 \pm 58	148 \pm 26
% Residual	28	-	-	-
60	1022	548	710	358
	946	497	828	202
	1076	594	682	250
Média \pm sd	1015 \pm 65	546 \pm 48	740 \pm 77	270 \pm 80
% Residual	25	-	-	-
120	1907	1149	1501	995
	2141	1413	1193	1007
	1891	1120	1128	1067
Média \pm sd	2980 \pm 140	1227 \pm 161	1274 \pm 199	1023 \pm 39
% Residual	23	-	-	-
540	9990	6237	2015	2398
	8145	4909	2826	3196
	8139	5207	2894	3529
Média \pm sd	8758 \pm 1067	5451 \pm 697	2578 \pm 489	3041 \pm 581
% Residual	24	-	-	-

Como os resultados obtidos por análise direta apresentaram maior recuperação de Se, com exceção dos valores encontrados para biomassa dos ensaios de 540 μM , fez-se o balanço de massas desse elemento em cada ensaio, a partir da determinação da quantidade total de Se residual no sobrenadante, na solução utilizada para a lavagem da biomassa e na própria biomassa, como está mostrado na Tabela V.

Tabela V. Balanço de massas do Se por análise direta após a interação com a *E.coli*.

Ensaio (μM)	Total de Se (referência) (μg)	Se residual (μg)	Lavagem (μg)	Biomassa (μg)	Total de Se encontrado (μg)	Recuperação (%)
30	96,5	27,3	1,0	14,2	42,6	44
60	206	50,7	1,9	33,8	86,4	42
120	434	99,0	0,8	56,4	156	36
540	1820	437	2,3	112	552	30

A avaliação do balanço de massas mostrou recuperações variando entre 30 e 44% comparando-se com o valor total da referência (controle negativo). Pode-se notar, também, que a maior parte do Se recuperado encontra-se no sobrenadante (Se residual), seguido pela biomassa (Se incorporado) e, por último, na solução utilizada para a lavagem da biomassa (Se adsorvido).

Com relação ao total de Se recuperado, cerca de 30% desse elemento é incorporado pela biomassa de *E. coli* para os ensaios com concentração de Se adicionado de até 120 μM , como pode ser visto na Figura 7. No ensaio de 540 μM , como a produção de Se elementar é mais evidente, o teor de Se encontrado na biomassa foi de 20%.

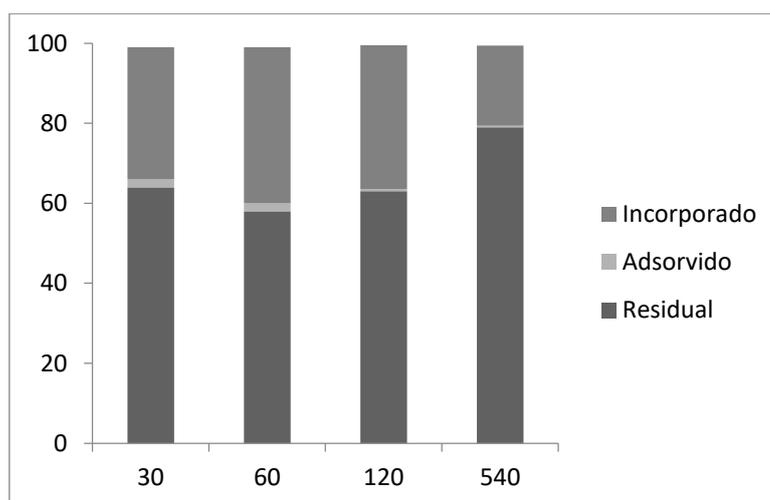


Figura 7. Balanço de massas do Se recuperado após o estudo de interação Se-*E. coli*.

É possível ressaltar que, quando se avalia a recuperação de Se residual individualmente, os resultados mostraram que a maior parte não estava no sobrenadante, uma vez que a percentagem de Se residual variou de 23 a 28% quando comparada somente em relação ao controle negativo. Isso corresponde a uma diminuição de até 77% de Se do meio.

A fim de identificar se o Se ficou apenas adsorvido nas paredes das células, fez-se a determinação de Se na solução utilizada para a lavagem da biomassa. Pode-se notar que a fração de Se encontrada nessa solução é relativamente baixa quando comparada à referência, o que pode indicar que a maioria do Se é incorporado pela bactéria, e não apenas adsorvido por ela.

Além disso, é possível perceber que, quanto maior a concentração de Se no meio, maior é a incorporação do mesmo pela bactéria. Entretanto, não se pode dizer que essa relação é proporcional, visto que a percentagem de incorporação de Se não é a mesma entre os ensaios.

Pela avaliação dos resultados obtidos, é possível estabelecer uma relação entre a remoção de Se do meio e a viabilidade celular (CFU). Quanto maior a concentração de Se no ensaio, maior é a remoção de Se do meio e menor é a viabilidade celular. No entanto, o ensaio de 60 μM teve um comportamento distinto, uma vez este ensaio teve o maior efeito sobre viabilidade celular, porém não foi o ensaio que apresentou a maior remoção.

É importante ressaltar que provavelmente parte da remoção de Se do meio pela *E. coli* ocorreu através da produção de selênio elementar, como mencionado anteriormente, pois observou-se a formação de um sólido alaranjado (Figura 1-e) que ficou parcialmente aderido às paredes do frasco e parte ficou depositada sobre o pellet da biomassa.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que um método simples de preparo de amostra pode ser empregado para determinação de Se em biomassa de células de *E. coli*.

Os resultados obtidos a partir da determinação de Se mostraram que, exceto para a biomassa dos ensaios de 540 μM , a análise direta da amostra se mostra uma técnica mais adequada, uma vez que apresenta uma maior recuperação de Se em relação ao que foi adicionado quando comparado ao preparo da amostra por decomposição ácida.

Os resultados de viabilidade celular da *E. coli* mostraram que as concentrações de Se estudadas são tóxicas, porém a bactéria mostrou ser resistente ao Se nessas concentrações. A toxicidade do Se também foi evidenciada pela necessidade da *E. coli* em realizar um processo de desintoxicação, através da redução do Se(IV) para uma forma menos tóxica, como o Se elementar.

Para estabelecer uma recuperação próxima a 100% com relação ao balanço de massas, outros estudos acerca do preparo de amostra de biomassa de *E. coli* se fazem necessários. Isto ficou mais pronunciado em relação ao Se elementar produzido nos ensaios de interação Se-*E. coli* de maior concentração, uma vez que ficou visualmente retido tanto na parede dos frascos como também sobre o pellet de biomassa.

7 REFERÊNCIAS

ALLER, A. J.; ROBLES, L. C. Speciation of selenomethionine and selenourea using living bacterial cells. **Analyst**, v. 123, n. 5, p. 919–927, 1998.

ALLER, A. J.; ROBLES, L. C. Determination of selenocystamine by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry after a selective preconcentration by living *Pseudomonas putida*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. 5, p. 469–476, 1998. b.

BÉBIEN, M. et al. Involvement of Superoxide Dismutases in the Response of *Escherichia coli* to Selenium Oxides, v. 184, n. 6, p. 1556–1564, 2002.

CHEN, X.; MARSHALL, W. D. Enzymatic digestion high-pressure homogenization prior to slurry introduction graphite furnace atomic absorption spectrometry for selenium determination in plant and animal tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3727–3732, 1999.

CORPORATION, P. Graphite furnace aas for biological materials, v. 71, p. 17–35, 1988.

CRAVEDI, P. et al. Evolution of the selenoproteome in *helicobacter pylori* and epsilonproteobacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 9, p. 2692–2704, 2015.

GERRARD, T. L.; TELFORD, J. N.; WILLIAMS, H. H. Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 3, p. 1057–1060, 1974.

KRAMER, G. F.; AMES, B. N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 201, n. 1, p. 169–180, 1988.

KRUG, F. J.; Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1ª ed., Piracicaba, 2010.

LEMLY, A. D. Guidelines for evaluating selenium data from aquatic monitoring and assessment studies. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 28, n. 1, p. 83–100, 1993.

MANVILLE, I. A. The Selenium Problem and Its Relationship to Public Health. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 29, n. 7, p. 709–719, 1939.

MILLER-IHLI, N. J. Slurry sampling for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 3, p. 271–274, 1990.

ORESTE, E. Q et al., Decomposição ácida assistida por ultrassom para a determinação de Cu, Fe, Mg e Zn por F AAS em cerâmicas de uso doméstico **Química Nova**, v. 40, 310-316, 2017.

Progress in the study of Keshan disease, 1978.

QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Determinação direta de cromo em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 185–190, 2000.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.

ROBLES, L. C. et al. Speciation of selenite and selenate using living bacteria. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 307–325, 1999.

ROSA, C. R. et al. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 517–523, 2002.

SCHLEMMER, G. Palladium and magnesium nitrates , a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry, v. 41, n. I, p. 1157–1165, 1986.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: A poorly recognized liaison. **Brain Research Reviews**, v. 45, n. 3, p. 164–178, 2004.

SOARES, C. et al. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão, v. 31, n. 1, p. 104–113, 2008.

TETTEH, A. Y. et al. Transcriptional response of selenopolypeptide genes and selenocysteine biosynthesis machinery genes in escherichia coli during selenite reduction. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.

TURNER, R. J.; WEINER, J. H.; TAYLOR, D. E. Selenium metabolism in Escherichia coli. **BioMetals**, v. 11, n. 3, p. 223–227, 1998.

U, B. W. Atomic absorption spectrometry - pregnant again after 45 years. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, p. 2081–2094, 1999.

WELZ, B.; VALE, M. G. R. **Ewing's Analytical Instrumentation Handbook**.

WHO /FAO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition. **World Health Organization**, p. 1–20, 2004.

WILLIAMS, H. of Selenium by Escherichia Biosynthesis of Selenomethionine, v. 236, n. 2, 1961.

YAO, Z. et al. Synergistic effect of Se-methylselenocysteine and vitamin E in ameliorating the acute ethanol-induced oxidative damage in rat. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 182–187, 2015.

ZANÃO, R. A. et al. Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W-Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer. **Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 291–301, 2002.