CAROLINA ANGÉLICA DA SILVA PARADA

**Construção e caracterização de linhagens
bacterianas Gram-negativas recombinantes
com capacidade aumentada para biorremediar
efluentes contaminados com mercúrio e arsênio.**

Tese apresentada ao Programa de
Pós - Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT para obtenção do título Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

CAROLINA ANGÉLICA DA SILVA PARADA

**Construção e caracterização de linhagens
bacterianas Gram-negativas recombinantes
com capacidade aumentada para biorremediar
efluentes contaminados com mercúrio e arsênio.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente

Versão Original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Parada, Carolina Angélica da Silva.

Construção e caracterização de linhagens bacterianas Gram-Negativas recombinantes com capacidade aumentada para biorremediar efluentes contaminados com mercúrio e arsênio / Carolina Angélica da Silva Parada. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof^a. Dra. Elisabete José Vicente.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biotecnologia ambiental e engenharia genética

Versão do título para o inglês: Construction and characterization of recombinant Gram-Negative strains with enhanced capacity for bioremediation of mercury and arsenic contaminated wastewater.

Descritores: 1. Mercúrio (elemento químico) 2. Arsênio 3. Bactérias Gram-Negativas 4. Biorremediação 5. Biotecnologia 6. *Cupriavidus metallidurans* CH34 I. Vicente, Prof^a Dra. Elisabete José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB08/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Angélica da Silva Parada.

Título da Tese: Construção e caracterização de linhagens bacterianas Gram-Negativas recombinantes com capacidade aumentada para biorremediar efluentes contaminados com mercúrio e arsênio.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Elisabete Jose Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 400/10 referente ao projeto intitulado: *“Engenharia Genética da bactéria Cupriavidus metallidurans CH34 para a biorremediação de ambientes contaminados com mercúrio e arsênio”* sob a responsabilidade de **Carolina Angélica da Silva Parada**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de junho de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao meu mentor individual pelos conselhos;

Aos meus pais Américo Parada e Zelinda da Silva pelo orgulho e incentivo;

A Profa. Dra. Elisabete José Vicente pela orientação e oportunidade;

A Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg pela oportunidade e atenção;

Ao Prof. Dr. Alexandre Pereira pela colaboração nos ensaios de Microscopia de Fluorescência;

Aos Profs. Drs. Jorge Sarkis e Marcos Hortelani pela colaboração nos ensaios de Espectrometria de Absorção Atômica a Vapor Frio;

Ao meu pai, a companhia Vale e ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro;

Aos colegas de trabalho pela companhia, convívio, amizade e assessoria;

Ao alprazolam pela paciência;

Ao escitalopram pela coragem.

“N’importe, nous nous scrons bien aimés”
Flaubert

RESUMO

PARADA C. A. **Construção e caracterização de linhagens bacterianas Gram-negativas recombinantes com capacidade aumentada para biorremediar efluentes contaminados com mercúrio ou arsênio.** 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

Este trabalho descreve a construção de linhagens recombinantes *Escherichia coli* UT5600 e *Cupriavidus metallidurans* CH34 carregando informações genéticas para expressão e ancoragem de MerR ou ArsR, proteínas de maior especificidade e afinidade a íons Hg^{2+} e As^{5+} , respectivamente. Os genes *merR* e *arsR* foram isolados do DNA total de *C. metallidurans*, inseridos no vetor que contém o sistema para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas, originando os plasmídeos pCM-Hg e pCM-As. MerR e ArsR foram produzidas sob comando do promotor *pan* que promoveu expressão das proteínas constitutivamente. As linhagens recombinantes demonstraram a expressão de MerR ou ArsR na superfície da membrana externa e maior acúmulo de Hg^{2+} ou As^{5+} em cada sistema específico. Células de *E. coli* recombinantes apresentaram resistência 100 % superior a Hg^{2+} e As^{5+} quando comparadas à linhagem controle. *C. metallidurans* CH34/pCM-As apresentou MIC > Na_3AsO_2 1000 mM podendo ser considerada a bactéria Gram-negativa com maior capacidade de sobrevivência em meio a íons As^{5+} já descrita. Os plasmídeos construídos foram capazes de elevar a capacidade de sobrevivência das bactérias Gram-negativas estudadas, podendo ser utilizados em outras Gram-negativas para elevar os índices de sobrevivência e fornecer viabilidade a outras linhagens. As linhagens recombinantes apresentaram capacidade aumentada de adsorver Hg^{2+} ou As^{5+} do meio externo, em níveis superiores aos apresentados pelas linhagens selvagens. As bactérias aqui descritas tornam-se excelentes candidatas para processos de biorremediação. Em adição, este trabalho apresenta pela primeira vez a ancoragem da proteína ArsR na superfície celular.

Palavras-chave: MerR. ArsR. *Cupriavidus metallidurans* CH34.

ABSTRACT

PARADA C. A. **Constrution and characterization of recombinant Gram-negative strains with enhanced capacity for bioremediation of mercury or arsenic contaminated wastewater.** 2012. 168 p. Doctorade thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

This work describes the construction of recombinant *Escherichia coli* UT5600 and *Cupriavidus metallidurans* CH34 strains, carrying genetic informations for MerR or ArsR cell surface display, the most high affinity and specificity proteins to uptake Hg^{2+} or As^{5+} ions, respectively. The *merR* and *arsR* genes were isolated from the total *C. metallidurans* DNA, inserted into the vector which contains the system for expression and anchoring of heterologous proteins on Gram-negative bacterias cell surface, originating the plasmids pCM-Hg and pCM-As. MerR and ArsR were produced under control of *pan* promoter which allowed the protein expression constitutively. The recombinant strains showed the expression of MeR or ArsR proteins displayed onto the cell surface and enhanced accumulation of Hg^{2+} or As^{5+} in each anchoring specific system. Cells of recombinants *E. coli* strain showed resistance 100 % higher to Hg^{2+} and As^{5+} when compared with the control strain. *C. metallidurans* CH34/pCM-As showed MIC > Na_3AsO_2 1000 mM being considered the most resistance Gram-negative bacteria that is able to survive in As^{5+} sites ever described. The contructed plasmids were able to increase the studied Gram-negatives bacterial ability of surviving and they can be utilized in other Gram-negative in order to increase the surviving levels and supply viability to other strains. Recombinant strains presented ability for adsorption of Hg^{2+} or As^{5+} from the external media in enhaced levels as compared to the wild type. The bacterias here described become excellent candidates for bioremediation process. In addition, this work presents for the first time the cell surface display of ArsR protein.

Key words: MerR. ArsR. *Cupriavidus metallidurans* CH34.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Arsênio utilizado como fonte medicamentosa.....	33
Figura 2 - Representação esquemática dos primeiros focos de contaminação de águas com arsênio descritas no mundo.....	36
Figura 3 - Interferências celulares frequentes causados pelo influxo de íons de mercúrio e arsênio.....	51
Figura 4 - Representação esquemática do operon <i>mer</i> RTPADE de baixo espectro.....	53
Figura 5 - Representação esquemática do operon <i>mer</i> RTPAGBDE de amplo espectro.....	53
Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo bacteriano para a detoxicação de mercúrio pela ativação dos operons <i>mer</i> de baixo e amplo espectro.....	55
Figura 7 - Esquema da disposição do operon <i>ars</i> RDABC do plasmídeo R773 isolado de <i>Escherichia coli</i>	57
Figura 8 - Esquema ilustrativo do mecanismo do operon <i>ars</i> em bactérias.....	58
Figura 9 - Representação do sistema de secreção da IgA protease de <i>N. gonorrhoeae</i>	61
Figura 10 - Estrutura química da fitoquelatina sintética EC20.....	62
Figura 11 – Representação da utilização do mecanismo natural de secreção da IGA protease de <i>N. gonorrhoeae</i> para ancoragem das proteínas MerR ou ArsR no presente trabalho.....	63
Figura 12 - Esquema representativo do vetor pGEM-T e múltiplo sítio de clonagem....	69
Figura 13 - Figura esquemática do plasmídeo pBBR1MCS.....	70
Figura 14 - Figura esquemática do plasmídeo pHE β	71
Figura 15 - Figura esquemática da origem e características do plasmídeo pCM2.....	72
Figura 16 – Representação da clonagem do gene <i>mer</i> R de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor pGEMT (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-Hg.....	83
Figura 17 – Representação da clonagem do gene <i>ars</i> R de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor	
Figura 18 – Representação da obtenção do plasmídeo pCM2, que contém o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas.....	86
Figura 19 – Esquema da construção do plasmídeo pCM-Hg.....	88
Figura 20 – Esquema da construção do plasmídeo pCM-As.....	90
Figura 21 – Obtenção do gene <i>mer</i> R, sem o códon de terminação <i>tag</i> , de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	98
Figura 22 - Obtenção do gene <i>ars</i> R, sem o códon de terminação <i>tga</i> , de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	92

Figura 23 - Clonagem dos genes <i>merR</i> e <i>arsR</i>	101
Figura 24 - Obtenção do vetor pCM.....	102
Figura 25 - Análise de restrição do plasmídeo pCM-Hg.....	104
Figura 26 - Análise de Restrição do plasmídeo pCM-As.....	106
Figura 27 - Análise da expressão da proteína de fusão MerR/E-tag/ β -domínio nas bactérias recombinantes <i>E. coli</i> e <i>C. metallidurans</i>	107
Figura 28 - Fracionamento protéico de <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg em SDS-PAGE 15 % e ensaio de “Western Blotting”.....	108
Figura 29 - Fracionamento protéico em SDS-PAGE de proteínas de <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg e ensaio de “Western Blotting”.....	110
Figura 30 - Análise da expressão da proteína de fusão ArsR/E-tag/ β -domínio nas bactérias recombinantes <i>E. coli</i> e <i>C. metallidurans</i>	111
Figura 31 - Análise do fracionamento protéico de <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34 /pCM-As.....	113
Figura 32 - Análise do fracionamento protéico de <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600 /pCM-As.	114
Figura 33 - Microscopia de Fluorescência de células bacterianas selvagens e recombinantes (aumento de 1.000 X).....	115
Figura 34 - MET de cortes histológicos de células de <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg cultivadas na presença de 500 μ M de HgCl ₂ . Aumento de 40.000 X sem contrastação.....	116
Figura 35 - MET de cortes histológicos de células de <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg cultivadas na presença de 500 μ M de HgCl ₂ . Aumento de 40.000 X sem contrastação.....	117
Figura 36 - MET de cortes histológicos de células de <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600/pCM-As cultivadas na presença de 500 mM de Na ₃ AsO ₄ . Aumento de 40.000 X sem contrastação.....	119
Figura 37 - MET de cortes histológicos de células de <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34 /pCM-Hg cultivadas na presença de 500 mM de Na ₃ AsO ₄ . Aumento de 40.000 X sem contrastação.....	120
Figura 38 - MIC das linhagens <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg na presença de HgCl ₂	121
Figura 39 - MIC das linhagens <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg na presença de HgCl ₂	122

Figura 40 - MIC das linhagens <i>E. coli</i> UT5600 e <i>E. coli</i> UT5600/pCM-As na presença de Na_3AsO_4	123
Figura 41 - MIC das linhagens <i>C. metallidurans</i> CH34 e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-As na presença de Na_3AsO_4	124
Figura 42 - Adsorção de mercúrio pelas linhagens selvagem e recombinante de <i>E. coli</i> em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).....	126
Figura 43 - Adsorção de arsênio pentavalente pelas linhagens selvagens e recombinantes de <i>C. metallidurans</i> em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).....	128
Figura 44 – Comparação entre <i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg em relação à capacidade em adsorver íons Hg^{2+} do meio externo.....	129
Figura 45 – Adsorção de arsênio pentavalente pelas linhagens selvagem e recombinante de <i>E. coli</i> UT5600 em diferentes tempo de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).....	131
Figura 46 – Adsorção de arsênio pentavalente pelas linhagens selvagem e recombinante de <i>C. metallidurans</i> CH34 em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).....	133
Figura 47 – Comparação entre <i>E. coli</i> UT5600/pCM-As e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-As em relação à capacidade conferida em adsorver íons As^{5+} do meio externo.....	134
Figura 48 - Predição da estrutura tridimensional da proteína MerR.....	137
Figura 49 - Sítio de ligação com íons As^{5+} e As^{3+} na proteína ArsR.....	139
Figura 50 - Bactérias <i>E. coli</i> e <i>C. metallidurans</i> hospedando plasmídeos com diferentes promotores para a expressão da proteína EGFP e comparação da intensidade de fluorescência relativa por citometria de fluxo.....	143
Figura 51 - Comparação da sequência de promotores diversos com a sequência do promotor <i>pan</i>	144
Figura 52 - Sequência gênica e estrutura primária do Epitopo E-tag.....	145
Figura 53 - Esquema da construção do MDB e predição de sua estrutura cristalográfica.....	156
Figura 54 - Esquema ilustrativo da possível utilização das bactérias construídas neste trabalho em processos de biorremediação.....	160
Quadro 1 - Sequência da proteína MerR de <i>C. metallidurans</i> CH34, codificada pelo gene <i>merR</i> , localizado no plasmídeo pMOL28.....	138

Quadro 2 - Sequência da proteína ArsR de <i>C. metallidurans</i> CH34, codificada pelo gene <i>arsR</i>, localizado no cromossomo 1.....	139
Quadro 3 - Resistência a íons As⁵⁺ de <i>C. metallidurans</i> CH34 selvagem e recombinante comparada à de outras bactérias descritas na literatura.....	152
Quadro 4 - Comparação da capacidade biorremediadora de mercúrio das linhagens recombinantes descritas na literatura com as linhagens construídas no presente trabalho.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Capacidade de imobilizar Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} do meio externo por <i>C. metallidurans</i> recombinante, expressando a fitoquelatina sintética EC20 na superfície celular.....	24
Tabela 2 - Valores máximos de mercúrio e arsênio total permitidos em águas doces de classe 1 e classe 3; em águas salinas de classe 1 e 2; em águas salobras de classe 1 e 2; e nos efluentes industriais, de acordo com a Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de Março de 2005.....	40
Tabela 3 - Valores ou cargas limite de emissão de mercúrio mensal, segundo as normas estabelecidas pelo Decreto-Lei nº 52/99/CEE.....	44
Tabela 4 - Valores máximos de arsênio e mercúrio em águas de superfície, estabelecidos pela Regulação Nacional da União Europeia, de 1 de Dezembro de 1989.....	45
Tabela 5 - Comparação entre as principais tecnologias de remoção de mercúrio em águas contaminadas.....	48
Tabela 6 - Comparação entre as principais tecnologias de remoção de arsênio em águas contaminadas.....	49
Tabela 7 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.....	66
Tabela 8 - Iniciadores de PCR utilizados neste trabalho.....	67
Tabela 9 - Anticorpos comerciais utilizados neste trabalho.....	68

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

ATCC - American Type Culture Collection

ATP – adenosina trifosfato

ATSDR - “Agency for Toxic Substances and Disease Registry”

BSA – Albumina Soro Bovina

CCA - compostos inorgânicos do tipo cobre, cromo ou arsênio

CEE - Comunidade Econômica Europeia

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

ctxB - domínio B da toxina do cólera

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMA - íon dimetilarsínico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EC20 – Fitoquelatina sintética com 20 resíduos de ácido glutâmico e cisteína

EC20sp – Gene da fitoquelatina sintética com 20 resíduos de cisteína

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EPA - “Environmental Protection Agency”

E-tag – epitopo

FDA - “Unites States Food and Drug Administration”

FMN - mononucleotídeo de flavina

IgA – Imunoglobulina A

IgA protease - protease da imunoglobulina A

IPTG - isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo

kb - quilobases

kDa – quilodaltons

kg – quilogramas

L - litro

LB – Luria-Bertani

MCL - “Maximum Contaminant Level”

MDB – “Metal Binding Domain”

mer - operon de resistência a mercúrio

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFS - “the major facilitator family”

mg – miligramas

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MIT - sistema de incorporação de magnésio

MMA - íon monometilarsônico

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

NCBI – “National Center of Biotechnology Information”

ng – nanogramas

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

pb – pares de bases

PIT - bomba de influxo de fosfato

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

ppt – partes por trilhão

RNAse: ribonuclease A

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEG – polietilenoglicol

PS – Peptídeo sinal

ps – peso seco

SDS – sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato

Sec - maquinaria de secreção

µg – microgramas

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo

WHO – “World Health Organization”

LISTA DE SÍMBOLOS

ELEMENTOS QUÍMICOS

-SH – grupo sulfidríla

Ag⁺ - prata

As – arsênio

As⁰ – arsênio elementar

As³⁺ – arsênio trivalente ou arsenito

As⁵⁺ – arsênio pentavalente ou arsenato

As (III) – arsênico trivalente ou arsenito

As(V) – arsênio pentavalente ou arsenato

AsH₃ – arsina

As₂O₃ - trióxido de arsênio

AsO₄O³⁻ - arsenato

Au³⁺ - ouro

Bi³⁺ - bismuto

Cd²⁺ - cádmio

Co²⁺ - cobalto

CrO₄²⁻ - cromato

Cu²⁺ - cobre

FeAsS – arsenopirita

Gd³⁺ – gadolínio

Hg - mercúrio

Hg⁰ – mercúrio metálico ou elementar

Hg²⁺ - mercúrio

Hg(II) - mercúrio

HgCl₂ – cloreto de mercúrio

Mg²⁺ - magnésio

Mn²⁺ - manganês

Mo²⁺ - molibdênio

Na₃AsO₂ – arsenato de sódio

Ni²⁺ - níquel

Pb²⁺ - chumbo

PO_4^{3-} - fosfato

SeO_3^{2-} - selenito

Tl^{1+} - tálio

U^{2+} - urânio

Zn^{2+} - zinco

AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala.....	A
Asparagina ou ácido aspártico.....	Asx.....	B
Cisteína.....	Cys.....	C
Ácido aspártico.....	Asp.....	D
Ácido glutâmico.....	Glu.....	E
Fenilalanina.....	Phe.....	F
Glicina.....	Gly.....	G
Histidina.....	His.....	H
Isoleucina.....	Ile.....	I
Lisina.....	Lys.....	K
Leucina.....	Leu.....	L
Asparagina.....	Asn.....	N
Prolina.....	Pro.....	P
Glutamina.....	Gln.....	Q
Arginina.....	Arg.....	R
Serina.....	Ser.....	S
Treonina.....	Thr.....	T
Valina.....	Val.....	V
Triptofano.....	Trp.....	W
Tirosina.....	Tyr.....	Y
Glutamina ou ácido glutâmico.....	Glx.....	Z

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Relevância do projeto.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 A importância da água.....	25
2.2 O mercúrio.....	26
2.2.1 Poluição das águas por mercúrio.....	27
2.2.2 Toxicidade do mercúrio: efeitos da contaminação ambiental na saúde pública.....	29
2.3 O arsênio.....	31
2.3.1 Poluição das águas por arsênio.....	34
2.3.2 Toxicidade do arsênio: efeitos da contaminação ambiental na saúde pública.....	36
2.4 A Legislação Ambiental.....	38
2.4.1 Legislação Ambiental no Brasil.....	39
2.4.2 Legislação Ambiental na União Europeia.....	43
2.4.3 Legislação Ambiental nos Estados Unidos da América.....	46
2.5 Métodos Físico-Químicos utilizados para a recuperação de áreas degradadas.....	47
2.5.1 Métodos Físico-Químicos utilizados para a remediação de sítios contaminados com mercúrio.....	47
2.5.2 Métodos Físico-Químicos utilizados para a remediação de sítios contaminados com arsênio.....	48
2.6 Biorremediação de mercúrio e arsênio com bactérias.....	50
2.6.1. Mecanismo de resistência bacteriana ao mercúrio.....	52
2.6.2 Mecanismo de resistência bacteriana ao arsênio.....	56
2.7 Engenharia genética de microrganismos para a biorremediação de mercúrio e arsênio.....	59
3. OBJETIVO GERAL.....	64
3.1 Objetivos específicos.....	65
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	66
4.1 Reagentes e Soluções.....	66
4.2 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados nesse trabalho.....	66
4.3 Iniciadores de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados neste trabalho....	67
4.4 Anticorpos comerciais utilizados neste trabalho.....	68
4.5 Descrição dos plasmídeos.....	68
4.5.1 pGEM®-T System.....	68

4.5.2 pCM2.....	69
4.6 Condições de cultivo de bactérias.....	72
4.7 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de <i>E. coli</i> UT5600 a íons Hg^{2+}	73
4.8 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de <i>C. metallidurans</i> CH34 a íons Hg^{2+}	74
4.9 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de <i>E. coli</i> UT5600 a íons As^{5+}	75
4.10 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de <i>C. metallidurans</i> CH34 a íons As^{5+}	75
4.11 Extração de DNA total de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	76
4.12 Extração e purificação de plasmídeos.....	77
4.12.1 Preparação de DNA plasmidial em grande escala - 200 mL de cultura (Maxi-preparação).....	77
4.12.2 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala - 5 mL (mini-preparação).....	78
4.13 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose 0,8 % e purificação de fragmentos.....	79
4.14 Clivagem dos plasmídeos e fragmentos de DNA com enzimas de restrição.....	79
4.15 Preparação de células eletrocompetentes.....	79
4.16 Transformação genética de bactérias por eletroporação.....	80
4.17 Obtenção dos genes <i>merR</i> e <i>arsR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34, destituído do códon de terminação de síntese proteica.....	81
4.18 Clonagem do gene <i>merR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-Hg.....	82
4.19 Clonagem do gene <i>arsR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-As.....	83
4.20 Ligação entre fragmentos de DNA.....	85
4.21 Obtenção do plasmídeo pCM2, que contém o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas.....	85
4.22 Subclonagem do gene <i>merR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor pCM: construção do plasmídeo recombinante pCM-Hg.....	86
4.23 Subclonagem do gene <i>arsR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34 no vetor pCM: construção do plasmídeo recombinante pCM-As.....	88

4.24 Expressão de proteínas recombinantes sob reulação do promotor constitutivo <i>pan</i>	90
4.25 Fracionamento de proteínas.....	91
4.26 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Sódio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE)....	91
4.27 “Western Blotting”	92
4.28 Microscopia de fluorescência.....	93
4.29 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	93
4.30 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}	94
4.31 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}	95
5. RESULTADOS.....	97
5.1 Obtenção do gene <i>merR</i> do plasmídeo pMOL30 de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	97
5.2 Obtenção do gene <i>arsR</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	98
5.3 Clonagem dos genes <i>merR</i> e <i>arsR</i>	99
5.4 Obtenção do vetor de expressão (pCM) contendo o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas.....	101
5.5 Construção do plasmídeo pCM-Hg.....	102
5.6 Construção do plasmídeo pCM-As.....	104
5.7 Expressão e fracionamento das proteínas recombinantes.....	106
5.8 Caracterização das linhagens recombinantes por Microscopia de Fluorescência....	114
5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das bactérias <i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg na presença de íons Hg^{2+}	115
5.10 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das bactérias <i>E. coli</i> UT5600/pCM-As e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-As na presença de íons As^{5+}	117
5.11 Análise da resistência bacteriana das linhagens selvagem e recombinante em meio a íons Hg^{2+}	120
5.12 Análise da resistência bacteriana das linhagens selvagem e recombinante em meio a íons As^{5+}	122
5.13 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}	124
5.14 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}	129
6. DISCUSSÃO.....	135
6.1 A bactéria <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	135
6.2 Engenharia genética de bactérias para utilização na biorremediação de mercúrio e arsênio.....	136
6.3 Obtenção dos genes de interesse.....	140

6.4 Obtenção do cassete de expressão e ancoragem.....	140
6.5 Construção do plasmídeo pCM-Hg.....	141
6.6 Construção do plasmídeo pCM-As.....	142
6.7 Análise da expressão e ancoragem das proteínas recombinantes.....	142
6.8 Avaliação da capacidade das bactérias recombinantes <i>E. coli</i>/pCM-Hg e <i>C. metallidurans</i>/pCM-Hg em bioacumular mercúrio na membrana celular, comparadas às linhagens selvagens.....	147
6.9 Avaliação da capacidade das bactérias recombinantes <i>E. coli</i> UT5600/pCM-As e <i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-As em acumular arsênio na membrana celular, comparadas às linhagens selvagens.....	149
6.10 Análise do crescimento bacteriano em meio contendo cloreto de mercúrio.....	149
6.11 Análise do crescimento bacteriano em meio contendo arsenato de sódio.....	150
6.12 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}.....	152
6.13 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}.....	157
7. CONCLUSÕES.....	160
REFERÊNCIAS.....	162

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte de um projeto maior, que visa o desenvolvimento de novas estratégias microbiológicas para tratamento de efluentes contendo metais pesados, objeto de um convênio firmado entre a Vale (anteriormente denominada Companhia Vale do Rio Doce) e o Centro de Pesquisas em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

O presente subprojeto intitulado “Construção e caracterização de linhagens bacterianas Gram-negativas recombinantes para a biorremediação de efluentes contaminados com mercúrio e arsênio” tiveram como principal objetivo a construção de bactérias recombinantes com capacidade aumentada para biorremediar de íons de mercúrio Hg^{2+} e arsênio As^{5+} , para serem possivelmente utilizadas em processos de tratamento de efluentes contaminados com estes agentes potencialmente tóxicos.

1.1 Relevância do Projeto

Sabe-se que a ocorrência natural do mercúrio e do arsênio é decorrente de processos tais como, atividade vulcânica, movimento de águas, sedimentação, presença nas camadas profundas do solo (FADINI; JARDIM, 2001; MIRETZKY et al., 2005) e do metabolismo microbiano (GAO; BURAU, 1997). Contudo, a concentração natural destes elementos encontra-se drasticamente elevada no meio ambiente como resultado de atividades antropogênicas variadas, as quais podem ser citadas a produção de cloretos; combustão de combustíveis fósseis; atividade de hidrelétricas; subproduto do refino de chumbo, cobre e prata; mineração de ouro, devido à sua propriedade de formar amálgama para a extração do ouro granulométrico disperso nos sedimentos de fundo; manufatura de cimento; uso de pesticidas; incineração de termômetros, barômetros e monitores de pressão sanguínea; incineração de equipamentos médicos e odontológicos; despejo de efluentes industriais; descarte inadequado de lâmpadas fluorescentes e do “lixo tecnológico”, tais como, televisores, celulares, baterias, pilhas e componentes de informática (KANNAN; KRISHNAMOORTHY, 2006; MORENO et al., 2008). Com o uso do mercúrio e arsênio aplicados ao desenvolvimento, ocorrem elevados índices de contaminação em rios, lagoas, oceanos, solos, ar, trazendo prejuízos aos organismos vivos e tornando-se um sério problema ambiental como também de saúde pública (DUKER; CARRANZA; HALE, 2005; HOPENHAYN, 2006).

Assim sendo, o desenvolvimento de metodologias para tratar efluentes contaminados é uma iniciativa indispensável para o desenvolvimento aliado à sustentabilidade. A busca por processos remediadores que sejam economicamente viáveis e, ecologicamente corretos, tem-se intensificado nos últimos anos. Entretanto, o uso de micro-organismos para biorremediação mostra-se vantajoso, principalmente pelos baixos custos, quando comparado às técnicas físico-químicas atualmente empregadas no tratamento de efluentes contendo metais.

Sítios poluídos com mercúrio e arsênio, geralmente, apresentam contaminações com outros metais pesados (BALDRIAN et al., 2000). Portanto, bactérias com resistência a vários íons de metais pesados podem ser úteis quando utilizadas na biorremediação e, por isso, as bactérias Gram-negativas *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34, por apresentarem operons de resistência a uma grande diversidade de íons metálicos (SILVER et al, 1981; DIELS; MERGEAY; NIES, 1985; CHEN et al., 1986; LUND; BROWN, 1989; GADD, 1992; CARLIN et al., 1995; FRANKE; GRASS; NIES, 2001; MURTAZA; DUTT; ALI, 2002; JUHNKE et al., 2002; DJOKO; XIAO; WEDD, 2008; MERGEAY et al., 2003; MONCHY et al., 2006; TAGHAVI et al., 1997), foram os micro-organismos de escolha para o desenvolvimento deste trabalho, que visa a utilização destes para a biorremediação de águas e efluentes industriais contaminados com mercúrio e arsênio. Falando-se sucintamente neste ponto de partida, é importante ressaltar que, os mecanismos de resistência de *E. coli* e *C. metallidurans* consistem em sistemas de efluxo dos cátions, que detoxifica o citoplasma das bactérias e não o ambiente e, portanto, para que estes micro-organismos pudessem desenvolver os seus potenciais biotecnológicos, torna-se necessário submetê-los a manipulações genéticas para lhes conferir a capacidade de imobilizar íons de mercúrio e arsênio, fato este, que nos motivou a desenvolver a presente invenção.

O uso de proteínas naturais de superfície como ferramenta para ancoragem de proteínas heterólogas, “cell surface display”, vem apresentando ampla aplicação nas diferentes áreas da ciência e na biorremediação (HENDERSON; NAVARRO-GARCIA; NATARO, 1998; WERNÉRUS; STÅHL, 2004). Micro-organismos recombinantes, cuja superfície celular foi enriquecida com proteínas de alta afinidade a metais poluentes, como por exemplo a fitoquelatina sintética EC20 (BAE et al., 2000), apresentaram capacidade superior de adsorção de íons metálicos tóxicos, quando comparados às linhagens não recombinantes, constituindo, portanto, uma estratégia biotecnológica para desenvolvimento de novos agentes biorremediadores (BAE et al., 2000;. BAE et al, 2002).

Em recente trabalho desenvolvido por nosso grupo, o mecanismo de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* (VEIGA; LORENZO; FERNANDEZ, 1999; VEIGA et al., 2002)

foi utilizado para ancorar a fitoquelatina sintética EC20 (BAE et al., 2002) na membrana externa de *C. metallidurans* CH34. Devido ao elevado número de cisteínas na cadeia polipeptídica da proteína EC20, a bactéria recombinante expressando a EC20 na superfície celular, apresentou capacidade de imobilizar Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} do meio externo, em níveis superiores aos apresentados pela linhagem selvagem, (BIONDO, 2008 - PI 0.801.282-2), porém sem apresentar especificidade a um único íon metálico. Além disso, os resultados não demonstraram a mesma eficiência para a imobilização de íons Hg^{2+} (Tabela 1).

Tabela 1 - Capacidade de imobilizar Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} do meio externo por *C. metallidurans* recombinante, expressando a fitoquelatina sintética EC20 na superfície celular.

	$\frac{\mu\text{M de } \text{Cd}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Co}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Cu}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Hg}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Mn}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Ni}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Pb}^{2+}}{\text{mg ps}}$	$\frac{\mu\text{M de } \text{Zn}^{2+}}{\text{mg ps}}$
<i>C. metallidurans</i> CH34	11,10	4,50	24,29	0,05	4,73	5,84	16,00	17,62
<i>C. metallidurans</i> CH34/pCM2	12,60	5,00	25,72	0,10	5,06	6,46	18,82	25,14
<i>C. metallidurans</i> CH34/pCM2 induzido	17,60 (40 %)	5,10 (13 %)	42,65 (76 %)	0,05 -	6,20 (31 %)	8,46 (45 %)	51,07 (219 %)	54,75 (210 %)

ps = peso seco

Fonte: Biondo (2008). Com permissão.

Sabendo-se que o mercúrio e o arsênio são os íons potencialmente tóxicos ainda lançados em grande quantidade na natureza, e que a fitoquelatina sintética EC20 não possui seletividade para a captação desses íons, a proposta do presente trabalho foi utilizar o mecanismo de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* para a ancoragem de proteínas capazes de acumular com especificidade e seletividade íons Hg^{2+} ou As^{5+} na membrana externa das bactérias Gram-negativas *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34, visando a utilização destes micro-organismos para a biorremediação de águas e efluentes industriais contaminados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância da água

A preocupação com o meio ambiente e a sustentabilidade das atividades, neles desenvolvidos, têm sido discutidas com maior ênfase nessas últimas décadas.

Até recentemente, a expectativa da falta de água não era considerada um problema para a sociedade em geral. Sua abundância e pronta disponibilidade pareciam tratar-se de um recurso natural infinito e, durante muito tempo, foi considerada um recurso renovável, devido à sua capacidade de se recompor em grande quantidade, principalmente, pelas chuvas (PINHEIRO; LIMA, 2002). Realmente, há muita água no planeta, mas apenas 3% dessa água é doce, dos quais 2% consistem de água congelada nas regiões polares e 1% distribuída desigualmente pela terra (MORAIS; JORDÃO, 2002).

As surpreendentes transformações do mundo atual globalizado têm levado a uma persistente discussão sobre a possibilidade concreta de colapso no abastecimento de água potável em muitos lugares do planeta, afinal, a água é indispensável às atividades humanas, dentre as quais, o abastecimento doméstico e público, o uso agrícola e industrial e a produção de energia elétrica.

Uma questão de sobrevivência da espécie humana está sendo ameaçada e pouco se tem feito para evitar uma crise num futuro próximo. A questão da água, ou seja, mais especificamente a falta de água, a falta de chuvas, a contaminação das fontes hídricas naturais e o desperdício, são fatores preocupantes que estão comprometendo o abastecimento em diversos países. Devido ao seu tipo de uso, ao aumento da demanda e degradação hídrica, além de sua capacidade de dissolver poluentes, o recurso tornou-se limitado, (SETTI, 1994) e, portanto, a água potável para a população mundial se torna escassa a cada dia que passa.

Prevê-se que em 2025, a população mundial alcance 9,1 bilhões de pessoas, aumentando exponencialmente as projeções de demanda dos recursos hídricos. Além disso, o aquecimento global – consequência do efeito estufa – provocado pela emissão de gases, está contribuindo para o aumento do nível do mar, o que pode comprometer os aquíferos costeiros (SELBORNE, 2001).

Aproximadamente 74% da água doce é consumida pelo setor agrícola, 20% pela indústria e 6% pelo consumo doméstico. Com o aumento da população e das atividades de interesse econômico, muitos países atingem rapidamente condições de escassez de água ou se defrontam com limites para o desenvolvimento. Ao mesmo tempo, crescem também os focos

de deteriorização das águas pelo lançamento de esgotos, efluentes industriais e insumos agrícolas, causando prejuízos ambientais e à saúde humana. (MORAIS; JORDÃO, 2002).

Estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU) mostram que mais de 5 milhões de pessoas morrem anualmente com doenças causadas por água contaminada, incluindo 6.000 crianças por dia. Tal fato leva à ocupação de metade dos leitos hospitalares em todo o mundo (SELBORNE, 2001). Neste cenário, a necessidade de se tratar a água é premente e constitui uma grave questão de saúde pública, devido principalmente, à toxicidade dos compostos descartados, risco de acúmulo na cadeia alimentar e persistência na natureza (GAVRILESCU, 2004).

2.2 O mercúrio

O mercúrio (Hg) é o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura e pressão normais, formando vapores incolores e inodoros. Existe em várias formas: elementar ou metálica (Hg^0), inorgânica, quando se combina com elementos tais como cloro, enxofre e oxigênio, (ex. sais de mercúrio) e orgânica ao ligar-se covalentemente a pelo menos um átomo de carbono, (ex. metil e etil-mercúrio). Pode ser encontrado em três estados de oxidação (0, 1^+ , 2^+) (BOENING, 2000).

Na natureza, o Hg existe em pequenas concentrações, numa ampla variedade de meios geológicos e, por ser volátil, é permanentemente liberado para a atmosfera. O mercúrio elementar é encontrado no ar, podendo ser transportado globalmente e sedimentado no solo e em corpos d'água. Sob determinadas condições físico-químicas, ou pela ação do metabolismo microbiano, os íons de mercúrio dos compostos inorgânicos podem se transformar em compostos orgânicos de mercúrio. Parte do mercúrio depositado no solo e na água é transformada lentamente em espécies voláteis sendo reemitido para a atmosfera (STEINNES, 1995; MICARONI et al., 2000).

Em tempos remotos, o mercúrio metálico ou elementar, foi utilizado como tratamento de constipação intestinal e sífilis. Na forma inorgânica, sais foram utilizados com frequência como agente anti-helmíntico e solução de Hg^{2+} , na conservação de lentes gelatinosas, susceptíveis ao ataque fúngico (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2003).

De forma interessante, o Imperador chinês Qin Shihuangdi foi descrito por antigos historiadores como um tirano brutal, supersticioso e, principalmente obcecado pela imortalidade, não poupando esforços para atingi-la. Qin Shihuangdi faleceu por intoxicação

pelo mercúrio contido em "poções" que ingeria para prolongar a vida (WRIGHT, D.C., 2001). Atualmente, o metal ainda é empregado na fabricação de amálgama para uso odontológico.

Atualmente, sabe-se que as formas orgânicas, inorgânicas e elementar do Hg têm diferentes toxicidades. A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de mercúrio é a seguinte: mercúrio orgânico > mercúrio inorgânico > mercúrio elementar. As formas inorgânicas são comprovadamente menos tóxicas. A forma orgânica é a de maior toxicidade por apresentar elevada solubilidade e resistência à degradação ambiental, sendo inclusive capaz de atravessar as barreiras membranosas, com rápido acúmulo celular e distribuição nos tecidos (GARREL; MACKENZIE; HUNT, 1975; PFEIFFER, 2007).

2.2.1 Poluição das águas por mercúrio

A poluição ambiental ao nível mundial é um subproduto indesejável do aumento pela demanda por recursos naturais da civilização moderna. Entretanto, desde o surgimento das sociedades humanas, focos localizados de contaminação ambiental ocorreram ao longo dos séculos. Porém, nunca na escala global que testemunhamos hoje como consequência do desenvolvimento. Praticamente, todos os ambientes do planeta encontram-se sob graus variados de contaminação. Mesmo áreas remotas, como o continente antártico, apresentam concentrações de contaminantes de Hg (NRIAGU; PACYNA, 1988; MALM; LACERDA, 2008).

Os países mais pobres ou em desenvolvimento, tanto quanto os mais populosos, são provavelmente os principais agentes deste tipo de poluição, cuja causa possa estar diretamente relacionada à baixa condição de vida da população, industrialização exacerbada e deficiência ou insuficiência de saneamento básico e tratamento de esgotos sanitários (NRIAGU, et al., 1992).

A queima de combustíveis fósseis é considerada uma significativa fonte de mercúrio, além do mais, as indústrias de cloro-soda, equipamentos eletrônicos, fabricação de tintas e mineradoras de ouro e prata são consideradas as maiores consumidoras de metal perfazendo 55% do total consumido (LACERDA; SALOMONS, 1998; PFEIFFER, 2007). Alguns compostos de mercúrio têm sido utilizados na agricultura, principalmente como fungicidas. O mercúrio é utilizado em uma variedade de aplicações como na fabricação de pilhas, matérias médicos e odontológicos e, desinfetantes. Embora o uso industrial do mercúrio tenha sofrido reduções, recentemente, devido a um controle mais efetivo, altas concentrações ainda estão

presentes nos sedimentos associados a aplicações industriais deste metal (WAGNER-DOBLER, 2003; FATTA et al., 2007).

Metais geralmente estão presente em efluentes como resultado de atividades antrópicas. A maior parte destes metais, entretanto, apresenta compostos com pouca solubilidade em água, o que resulta em baixas concentrações mesmo quando da emissão pontual de efluentes. Entretanto, o mercúrio (Hg) e o arsênio (As), em particular, são capazes de apresentar espécies químicas estáveis em solução, resultando na acumulação na coluna d'água, atingindo concentrações relativamente elevadas e tóxicas (MALM; LACERDA, 2008).

O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta a maior toxicidade, além de ser o único capaz de sofrer biomagnificação em quase todas as cadeias alimentares, isto é, sua concentração aumenta conforme aumenta o nível trófico da espécie (AMORIM et al., 2000; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM - UNEP, 2002). Como consequência, tem-se a exposição ambiental via cadeia alimentar de forma significativamente relevante para consumidores tróficos elevados, incluindo o homem (LIN; PEHKONEN, 1999; AMORIM et al., 2000; MIRETZKY; BISINOTI; JARDIM, 2005; LEFEBVRE; KELLY; BUDD, 2007; MORENO et al., 2008).

O mercúrio, por apresentar espécie química volátil e estável na atmosfera, pode ser transportado em escala global, afetando áreas remotas naturais distantes de fontes pontuais de contaminação (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003; DOREA et al., 2003).

A preocupação com a poluição das águas por mercúrio está associada especialmente à possibilidade de metilação no meio ambiente de sua forma Hg^{2+} por bactérias. O mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio pela ação de bactérias, particularmente nos sedimentos. A biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio representa um sério risco ambiental, pois o metilmercúrio, por ser lipossolúvel, é muito bem absorvido pelas membranas biológicas, possui capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos dos organismos, assim como pelos tratos digestivos de praticamente todas as cadeias alimentares, acelerando a bioacumulação, aumentando as concentrações do metal à medida que avança nos níveis tróficos e, portanto, maximizando seus efeitos sobre a saúde humana (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS, 1990; PORCELLA, 1994; ROULERT et al., 1998a; LIN; PEHKONEN, 1999; BOENING, 2000; AMORIM et al., 2000).

2.2.2 Toxicidade do mercúrio: efeitos da contaminação ambiental na saúde pública

O Hg é o único metal que reconhecidamente causou óbitos em humanos em razão de contaminação pela via ambiental, particularmente pela ingestão de organismos aquáticos.

O primeiro maior impacto humano causado pela presença de Hg^{2+} foi relatado no Japão, em 1956. Este episódio foi conhecido como o Desastre de Minamata, região onde 2.955 pessoas sofreram o envenenamento. Cerca de 900 pessoas morreram com doses severas de contaminação. Somente em 1968 o governo japonês reconheceu a fonte química de contaminação (KINJO, 1993; FUKUDA, 1999).

O potencial tóxico do mercúrio ao organismo humano é diverso e depende da concentração, tempo e espécie a qual a exposição foi submetida. Por isso, é considerado um poluente de alto risco, sendo regulado pela “Environmental Protection Agency” (EPA). A preocupação a respeito da poluição do mercúrio, surge dos efeitos à saúde decorrentes da exposição, em especial, por mercúrio metilado encontrado na água e alimentos aquáticos.

O mercúrio sob forma líquida é muito pouco absorvido pelo trato gastro-intestinal. Por outro lado, seus vapores quando inalados, podem facilmente atravessar a membrana alveolar até atingir a circulação sanguínea. No sangue, fígado e rins o mercúrio é oxidado à forma divalente. Este tipo de mercúrio representa a maior fonte de intoxicação verificada em laboratórios industriais e de pesquisa (IPCS, 1991). Esta forma é também liberada por evaporação na boca de pacientes que possuem amálgamas dentários preparados com mercúrio, o que pode resultar em uma intoxicação dependendo da quantidade presente (LORSCHIEDER;VIMY;SUMMERS, 1995) Dentistas e pessoas ligadas à odontologia podem também se contaminar quando a amálgama de mercúrio é preparada sem proteção adequada (ROULET et al., 1998b).

De acordo com o Ministério da Saúde – Portaria nº 518 de 2005, 3-30 gramas de mercúrio é a dose letal considerada. Nas primeiras horas, a exposição acima de 1-2 mg/L de vapor de mercúrio elementar causa bronquiolite química aguda e pneumonite. Duas horas após a exposição, observa-se danos ao pulmão através da formação de uma membrana hialina e, finalmente, a ocorrência de fibrose pulmonar (SIGEYUKI et al., 2000), além de enfermidades cutâneas (BOYD et al., 2000).

Dentre os compostos de mercúrio, o metilmercúrio é o mais tóxico, sendo responsável pelos danos mais importantes à saúde observados em humanos, devido, provavelmente, à sua lenta eliminação e facilidade em atravessar barreiras membranosas. No cérebro e rins, esta eliminação pode levar anos (FARO, 2000). O sistema nervoso central é o alvo principal do

metilmercúrio. Afeta, principalmente, áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. A intoxicação se caracteriza por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), a disartria (problemas nas articulações das palavras), a parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Os primeiros sintomas afetam também a região perianal e aparecem alguns dias após a exposição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia, freqüentemente, de 16 a 38 dias (BAKIR et al., 1973). Um exemplo dos efeitos neurotóxicos do metilmercúrio em populações expostas a este contaminante é o caso das populações ribeirinhas da Bacia Amazônica, região onde há mineração, pouco saneamento básico e presença de intensa concentração pluvial que auxilia na dispersão do elemento metálico (LEBEL et al., 1996; IPCS, 1990).

Estudos também têm demonstrado uma relação do mercúrio inorgânico com sintomas neurológicos, como a insônia, irritabilidade, dificuldade na concentração, perda de memória, apatia e baixa estima acentuada. Acredita-se que estas alterações no ciclo de sono possam ser explicadas por um severo prejuízo neuropatológico, incluindo múltiplos circuitos neurais, associados com a absorção e a ação do mercúrio pelo sistema nervoso central (ROSSINI et al., 2000).

Evidências indicam que a exposição crônica a baixas concentrações de Hg resulta em disfunções imunológicas (POLLARD; HULTMAN, 1997), podendo gerar deficiências imunoregulatórias, como doenças imunológicas e auto-imune (SILBERGELD et al., 1998). Há a possibilidade de que a disfunção imune possa influenciar no desenvolvimento e progressão do câncer. O mecanismo pelo qual os compostos de mercúrio atuam no sistema imune não está bem esclarecido, no entanto, estudos recentes apontam a apoptose de linfócitos e monócitos induzida por mercúrio, como tendo um papel importante na disfunção imune causada por este metal (SHENKER; GUO; SHAPIRO, 2000).

O metilmercúrio da mãe pode ser transferido para a placenta e transportada para o feto, sendo encontrado em maior quantidade no líquido amniótico. O mercúrio inorgânico é transportado pelo leite materno. Estes compostos de mercúrio, principalmente os orgânicos, causam sérios danos ao feto em desenvolvimento, principalmente a nível neurológico (SCHUURS, 1999).

Efeitos do mercúrio e seus compostos a nível celular demonstraram que linfócitos e linhagens linfoblásticas celulares humanas, tratados tanto com mercúrio orgânico e inorgânico, apresentaram um decréscimo significativo em termos de capacidade proliferativa, produção de citocinas e secreção de imunoglobulinas. (BAHIA et al., 1999).

A redução de função das células linfóides é resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio. Linfócitos e monócitos tratados com mercúrio (tanto orgânico como inorgânico) exibem sinais funcionais e morfológicos de morte celular, como por exemplo: um profundo decréscimo na produção de adenina, alteração na síntese de fosfolípidos, e um aumento de íons cálcio. Como estas células evidenciam mudanças nucleares e de membrana que são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, pode-se concluir que células linfóides tratadas com mercúrio são levadas a apoptose (GUO et al., 1998).

Testes genotóxicos detectam mutações, tanto a nível cromossômico quanto a nível gênico. Tais mutações são responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças hereditárias (AMORIM et al., 2000).

O mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e poliploidia. Esta ação resultaria da forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso e é considerada como a ação mais típica, a nível genético, dos compostos de mercúrio (DE FLORA; BENICCELLI; BAGNASCO, 1994).

A exposição de humanos ao mercúrio pode ser medida em amostras de sangue, cabelo, devido à sua capacidade de se ligar fortemente aos grupos sulfidrilas ($-SH$), (GARREL; MACKENZIE; HUNT, 1975; PFEIFFER, 2007), urina, cordão umbilical, leite materno e unhas que são os biomarcadores comumente utilizados (ABE et al., 1995; CRUMP et al., 1998; ALVAREZ-LEITE et al., 2002; MOHAN et al., 2005).

2.3 O arsênio

O arsênio (As) é um metalóide que possui os estados de oxidação 3^- (gás arsina), 0 (arsênio elementar), 3^+ (arsenito ou arsênio trivalente), também referido como As(III) e 5^+ (arsenato ou arsênio pentavalente), o As(V). O elemento é encontrado em baixas concentrações na natureza e ocorre nas formas orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos e processos químicos. Dentre as formas voláteis, a arsina é encontrada na atmosfera (AsH_3), enquanto o arsênio elementar (As^0) é de rara ocorrência natural (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Espécies solúveis do arsênio são encontradas na hidrosfera. O arsênio em águas naturais pode ocorrer como arsenito (As^{3+}), arsenato (As^{5+}), íon monometilarsônico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA). Águas subterrâneas contêm arsênio como As^{3+} e As^{5+} . Em águas de mar, lagoas, lagos, e onde

houver possibilidade de biometilação, As^{3+} e As^{5+} ocorrem junto com MMA e DMA. A flora e a fauna marinha contêm compostos de arsênio, pois nas vias metabólicas o nitrogênio e o fósforo podem ser facilmente trocados por ele. Tais compostos também incluem além da arsenobetaina, arsenocolina e arseno-açúcares de origem algal (VAN LOON; BAREFOOT, 1992). Em depósitos minerais, o metalóide é encontrado principalmente na forma de arsenopirita (FeAsS) e pirita arsenífera que podem alterar-se a arsenatos e sulfoarsenatos em superfície, o arsênio pode ser parcialmente liberado para as águas e ainda imobilizado via adsorção em óxidos- hidróxidos de ferro, alumínio e manganês ou em minerais de argila (NESBITT et al., 1995).

Poucas são as substâncias que, assim como o arsênio, possuem uma história médica tão fantástica. Seu uso terapêutico data de 400 a.C., havendo relatos de seu emprego por Hipócrates, Aristóteles, Dioscórides e Plínio, o Velho (NEUBAUER, 1947).

O arsênio foi utilizado como fonte medicamentosa de maneira ampla e diversa. Sua fase áurea como agente terapêutico se deu entre o final do século XIX e meados do século XX (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005). Os compostos arsenicais eram empregados, com ou sem respaldo científico, no tratamento de dermatoses tão numerosas quanto distintas como psoríase, pênfigo, eczemas, dermatite herpetiforme, acne, líquen plano, leishmaniose, angina e sífilis, como por exemplo os medicamentos Sulfarsenol, Stovarsol, Novarsenobenzol, Narsenol, Luatol e Epaseno. Justificando ainda mais sua condição de panacéia, eram ainda prescritos como tônicos e fortificantes, aplacadores de condições como nervosismos e “acessos”, ou ainda no tratamento da malária, epilepsia e asma (PUPO, 1926; CHAKRABORTI et al., 2003), dentre outras doenças, como é possível constatar pelos anúncios constantes na primeira edição dos Anais Brasileiros de Dermatologia, reproduzidos na Figura 1.

Figura 1 - Arsênio utilizado como fonte medicamentosa

Laboratorio de Biochimica Medica, de Paris

SULFARSÉNOL

$C_{12}H_{11}As_2N_2CH_2OS_2Na$

O emprego do **SULFARSÉNOL** está indicado em todos os periodos da Syphilis, onde a sua efficacia é completamente notavel, tanto sobre as manifestações contagiosas, que desaparecem mediante um pequeno numero de injeções, como sobre o resultado negativo da reacção de Wassermann, obtido muitas vezes, em poucas semanas, graças ao emprego de doses accumuladas. Com effeito, a toxidez relativamente fraca do medicamento, permite esta maneira de proceder.

E' util ainda e muitas vezes indispensavel, no tratamento do paludismo, especialmente nas fórmias, que resistem á quinina, na febre recorrente, na framboesia na filariose, na ulcera tropical, no kala-azar, na angina de Vincent, na varíola, na escarlatina, na doença do somno, e nas complicações locais ou geraes da blennorrhagia (em particular, *orchites, rheumatismos, arthrites, nas peri e parametrites, salpingites*; Duræux). Em taes casos, constitue um verdadeiro especifico.

Em pequenas doses, de 2 centigrammas (Empôla D) é utilissimo nas *anemias*, nas *chloroses* e estados similares (*convalescenças*).

Em egualdade de doses, o Sulfarsénol é cinco vezes menos toxico que o 606, e quatro vezes menos que o 914. Em egualdade de doses therapeuticas, a differença de toxidez a favor do Sulfarsénol é ainda mais pronunciada. A julgar pelo seu effeito sobre as lesões visiveis, 12 centigrammas de Sulfarsénol correspondem á 20 centigrammas de 914.

E' o unico sal arsenical que se applica em injeção Subcutanea ou Intramuscular sem analgesico, dor, endurecimento ou inflamação.

NOTA - Cada caixa leva rotulo de garantia com numero de control, impossibilitando imitação e venda clandestina.

Therapeutica Chimica da Syphilis

Tratamento POR VIA BUCCAL

STOVAR SOL

(Acido acetyl-oxyamino phenylarsinico - Composto 190)

O **STOVAR SOL** tem sido estudado em Paris, no Instituto Pasteur pelos Drs. Levaditi e Navarro-Martin e pelo Sur. Dr. Fournier, do Hospital Cochín.

Presentação: Les Établissements Poulenc Frères apresentam o **STOVAR SOL** em vidros de 14 e 28 Comprimidos dosados á 0gr. 25 e em vidros de 24 comprimidos dosados á 0,01 para therapeutica infantil.

Novarsenobenzol Billon

(Dioxydiamidoarsenobenzol methyleno sulfoxyato de sodio)

Emprego de extrema simplicidade
em Injeções intra-venosas ou rectaes.
Innocuidade e Efficacia garantidas
por milhares de Injeções já effectuadas.

No tratamento da Syphilis, do Typho Recurrente, da Angina de Vincent, do Impaludismo, etc...

PREÇOS AO	0 15	0 30	0 45	0 60	0 70	0 90
PUBLICO	3.400	4.200	5 000	5.900	7.300	8 200

NARSENOL

(Novarsenobenzol em comprimidos)

Indicações: As mesmas do que o Novarsenobenzol Billon.

Presentação: Em vidros de 30 Comprimidos de 0gr. 10.

LUATOL

Solução aquosa e suspensão de tartro-bismuthato de sodio e de Potassio (sal solavel) para o tratamento da Syphilis pela via intramuscular.

Presentação: Em caixinhas de 10 amp. de 1 cc. (aquoso) ou 12 amp. de 4 cc. (oleoso) dosadas á 0gr. 10 por cc.

Em todos os casos de Syphilis arsenio e mercuro-resistentes.

EPARSENO

(Preparado 132 do Dr. Pomaret)

Solução estavel, esteril de amino arsenophenol para a arsenotherapie da Syphilis pela via intramuscular.

Indicações: Para todos os que não toleram o arsenico pela via venosa.

Presentação: Em caixinhas de 5 ampolas de 1 cc

Existe o mesmo producto para Therapeutica Infantil :
Em caixinhas de Somp. de 1 cc. á 0,05

Les Établissements Poulenc Frères
Sociedade Anonyma com um capital de 60 milhões de Francos
86, 92, rue Vieille du Temple - Paris (3)

Agente Geral para o Brasil: A. J. LARRAT-31, rua General Camara - RIO

TREPARSOL

O novo arsenical da SYPHILIS

Treatmento da SYPHILIS em qualquer periodo

sem injeção
sem dor
sem dieta

Medicamento de acção rapida e poderosa

Cicatrisante immediato

Espirilicida eficaz

Tonicificante energico

Cada tubo de **TREPARSOL** contem 30 comprimidos rigorosamente dosados

Compostos arsenicais eram empregados no tratamento de sífilis (Sulfarsenol, Stovarsol, Novarsenobenzol, Narsenol, Luatol, Epaseno e Treparsol), entre outras doenças.

Fonte: Ehrlich;Hata (1910) apud Neubauer (1947). Com permissão.

Em adição, Paul Ehrlich desenvolveu o medicamento Salvarsan, pílula contendo arsênio, destinada para a cura da sífilis, sendo então contemplado pelo recebimento do Prêmio Nobel da Medicina em 1908 (EHRlich;HATA, 1910; THORBURN, 1983).

Atualmente sabe-se que, a maioria das formas do metalóide é tóxica. A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênio é: arsina > arsenito > arsenato > ácidos alquil-arsênicos > compostos de arsênio > arsênio elementar. Portanto, o arsênio trivalente é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente. Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA). A arsenobetaína e arsenocolina são não relativamente tóxicas (BARRA et al., 2000). Entretanto, atualmente, no ramo da medicina veterinária, o arsênio é ainda utilizado como agente antiparasitário e como aditivo em ração animal para acelerar o crescimento (BARRA et al., 2000). Além disso, utiliza-se o trióxido de arsênio (As_2O_3) como agente citostático no tratamento no subtipo da Leucemia Promielocítica Aguda (SOIGNET et al., 2001). A droga encontra-se disponível como ampolas de Trisenox® para infusão intravenosa (ANTMAN, 2006).

2.3.1 Poluição das águas por arsênio

O meio industrial representa outra poderosa fonte de As. O metalóide é utilizado produção de cobre a partir sulfuretos, mineração de ouro, cobalto, zinco, níquel, manufatura de vidros, esmaltes, tintas, tecidos e couros, produção de pesticidas, herbicidas, em preservativos de madeira e amplamente utilizado na indústria de eletro-eletrônicos na forma de arsenido de gálio e gás arsina em semicondutores (ATSDR, 2007). As principais fontes antrópicas de contaminação ambiental incluem a queima de combustíveis fósseis, uso de pesticidas e herbicidas na agricultura, além do descarte inadequado de efluentes. (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002).

A contaminação na água potável tem sido motivo de numerosos e elaborados estudos. Já no final do século XIX foram relatados casos ocorridos em Reichstein e Silésia (YEH; HOW; LIN, 1968). O arsenicismo crônico regional endêmico também foi constatado na província de Córdoba, Argentina, resultando em 323 casos de epiteliomas e 39 de intoxicação arsenical (ARGUELLO et al., 1938). Destaca-se ainda episódios de hidroarsenicismo ocorridos na Tailândia, México, Estados Unidos (WAGNER et al., 1979; ALBORES et al., 1979; YEH; HOW; LIN, 1968).

Os maiores focos endêmicos estão localizados em Bengala Ocidental, Índia. Em uma região composta por seis distritos e uma população de 30 milhões de habitantes, estima-se, a partir de dados oriundos de uma pesquisa que avaliou apenas parte das áreas desse território, que pelo menos 800.000 pessoas bebam água contaminada por As e 175.000 delas apresentem lesões cutâneas decorrentes do arsenicismo (DAS et al., 1995). Em Taiwan, a conhecida “doença do pé preto”, um distúrbio vascular periférico endêmico que resulta em gangrena das extremidades, está intimamente relacionada à exposição ao As existente na água de poços artesianos. A contaminação por arsênio também foi descrita na Tailândia, Iraque e Vietnã (YU; LEE; CHEN, 2002).

Contudo, o maior episódio de contaminação arsenical ocorreu em Bangladesh. Os primeiros casos foram inicialmente detectados em 1993 em águas para o abastecimento populacional. A contaminação dos aquíferos em Bangladesh afeta ainda milhões de pessoas. No país, foram encontrados 5 milhões de poços artesianos contaminados com o metalóide (SMITH; LINGAS; RAHMAN, 2000). Estima-se que cerca de 80 milhões de pessoas em Bangladesh estejam contaminadas com arsênio atualmente (UDDIN et al., 2004). A Figura 2 é uma representação esquemática dos primeiros focos de contaminação de águas com arsênio descritas no mundo. As áreas destacadas em cor alaranjada indicam as áreas afetadas. A Figura destaca também países como a Hungria, Romênia, Mongólia e Nepal.

Figura 2 - Representação esquemática dos primeiros focos de contaminação de águas com arsênio descritas no mundo.

As áreas destacadas em cor alaranjada indicam as áreas afetadas: estados Unidos da América, México, Chile, Argentina, Hungria, Romênia, Nepal, Mongólia, Bangladesh, Taiwan, Vietnã e Tailândia.
 Fonte: Feroze, A. (2005). Com permissão.

O arsênio também foi encontrado como agente contaminante na maioria dos estuários e sistemas costeiros do mundo devido ao despejo de efluentes industriais (SANDERS et al., 1994).

2.3.2 Toxicidade do arsênio: efeitos da contaminação ambiental na saúde pública

A toxicidade dos compostos de arsênio depende de suas formas (orgânica ou inorgânica), valências, solubilidade, estado físico e taxas de absorção e eliminação no corpo humano. As formas inorgânicas são mais tóxicas que as formas orgânicas, pois são rapidamente absorvidos pelas células e de difícil eliminação por serem altamente solúveis em água. As formas menos tóxicas têm baixa absorção celular e, portanto, tem rápida eliminação.

Embora as formas orgânicas sejam menos tóxicas quando comparadas às espécies inorgânicas, o uso do metil e fenil arsênico, amplamente utilizados na agricultura como pesticidas, têm afetado a saúde dos animais que vivem em áreas rurais (ATSDR 2007).

Em humanos, a rota primária de entrada de arsênio no organismo se dá por via inalatória e ingestão, sendo a exposição, sempre cumulativa. A forma mais comum de exposição é através da ingestão de alimentos marinhos e água contaminados. O

envenenamento através do ar e solo não apresenta taxas significativas, pois a contaminação por contato é possível, porém de baixa ocorrência (ATSDR 2007). A meia-vida do arsênio inorgânico em humanos é de aproximadamente 10 horas. (ROSSMAN, 2007).

A exposição crônica ao As causa sérios problemas metabólicos às pessoas. De acordo com o Ministério da Saúde – Portaria nº 518 de 2005, 130 mg de arsênio inorgânico é a dose considerada letal.

No caso de inalação de formas inorgânicas, 95 % do metalóide se deposita no trato respiratório, passando pelos tecidos mucociliares e resultando na absorção gastrointestinal, podendo sofrer biometilação no fígado (YIP e DART, 2001). Após absorção nos pulmões e trato gastrointestinal, o arsênio encontra-se amplamente distribuído no sangue. (ATSDR 2007). O arsênio é captado pelas células sanguíneas e outras células onde ocorre a redução de arsenato em arsenito para o processo de metilação (WINSKI; CARTER, 1995; WANG et al., 1996). Uma porção do As(III) é metilada no fígado, através de transferência do grupo metil pela enzima sadenosilmetionina, originando o metilarsênico (MMA V) e dimetilarsínico (DMA V) (APOSHIAN et al., 2004; STYBLO et al., 2002). Os metabólitos resultantes são rapidamente excretados pelos rins, através da urina. O metalóide também pode ser eliminado pelas fezes, suor, descamação da pele, unhas e cabelos. Portanto, o processo de metilação tem sido considerado a principal rota de detoxificação de arsênio em humanos. Quando a capacidade de metilação do fígado é excedida, ocorre a retenção de arsênio inorgânico em tecidos.

O arsênio é uma substância carcinogênica e genotóxica que causa danos irreversíveis na membrana e morte celular por inibir vias bioquímicas, e interagir com proteínas e DNA (KITCHIN, 2001). Portanto, a retenção das espécies inorgânicas nos tecidos pode resultar em episódios severos.

As principais doenças verificadas em pacientes envenenados incluem: hiperqueratose, hiperpigmentação da pele, hepatomegalia, necrose renal, cardiopatias, neoplasias diversas, neuropatias, encefalopatia grave, hemólise, depressão da medula óssea, aumento da frequência de abortos espontâneos, inúmeras outras doenças graves e morte (ABERNATHY et al., 1997; ATSDR, 2007).

A urina e os cabelos são os principais bioindicadores de exposição, uma vez que o arsênio inorgânico tem especial afinidade com tecidos ricos em queratina e, em casos de ingestão ou inalação, a principal via de excreção é renal (SANTOS et al., 2003).

A intoxicação por arsênio, seja acidental ou deliberada, alegada ou comprovada, está associada inúmeras mortes e doenças de personagens conhecidos na História.

Um importante relato de morte por intoxicação por arsênio, com grande repercussão, foi o de Napoleão Bonaparte (1769-1821). O corpo foi encontrado em um cativo, na ilha de Santa Helena, e amostras forenses de seu cabelo mostraram níveis de arsênio 13 vezes acima do considerado normal.

De forma curiosa, os pintores impressionistas usavam frequentemente o pigmento designado como verde-esmeralda. Este pigmento é constituído, essencialmente, por compostos de arsênio, suspeitando-se que tenha sido responsável pela intoxicação acidental de alguns artistas como Cézanne, que desenvolveu diabetes grave. A cegueira de Monet e mesmo as perturbações psíquicas de Van Gogh podem também ter sido parcialmente devidas ao uso do verde-esmeralda. A intoxicação com outras substâncias vulgarmente usadas em pinturas, como os pigmentos de chumbo e mercúrio, podem ser fatores que também contribuíram para os casos aqui apontados (STEVEN-MARCUS, 2007).

2.4 A Legislação Ambiental

As características de toxicidade de determinadas substâncias, a que se alia, muitas vezes, elevado potencial de persistência e bioacumulação, tornam necessário um controle estrito das emissões para o ambiente, em particular para o meio aquático.

Numa perspectiva de proteção dos recursos hídricos, que, sendo um componente fundamental do ambiente biofísico, são indispensáveis ao desenvolvimento da sociedade humana, é fundamental atuar preventivamente sobre as principais fontes de poluição e exercer uma vigilância ativa dos meios receptores, de forma que não acarrete aumento de poluição por essas substâncias noutros meios e resulte em consequentes problemas de saúde pública.

Portanto, o presente item não tem como objetivo principal, descrever e explicar todas as legislações ambientais existentes em diversos países, mas destacar algumas delas, em especial, aquelas que enfatizam a preocupação com manutenção da água e com o descarte adequado de resíduos que contêm mercúrio e arsênio, principais elementos abordados no presente trabalho.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em inglês, “World Health Organization” (WHO), concentrações de mercúrio total não devem ultrapassar 25 ng/L na água para beber, 5-100 ng/L na água da chuva e 0,5 µg/L na hidrosfera, sendo que este valor pode apresentar-se levemente aumentado devido a disposição do metal em sedimentos naturais (WHO, 2010).

A OMS também estabelece valores para as concentrações de arsênio na natureza. A concentração total do metal não deve ultrapassar 1–2 µg/L em águas oceânicas, 10 µg/L em rios e lagoas, com exceção de regiões vulcânicas e depósitos de sulfeto naturais que devem apresentar limites superiores. Da mesma forma, podem ser encontrados níveis elevados de arsênio no solo (1 a 40 mg/kg), devido à composição geológica e presença de sulfetos (WHO, 2001).

2.4.1 Legislação ambiental no Brasil

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de Março de 2005, estabelece os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos de qualidade da água, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A Tabela 2 demonstra os valores máximos de mercúrio e arsênio total permitidos em águas doces de classe 1 e classe 3; em águas salinas de classe 1 e 2; em águas salobras de classe 1 e 2; e nos efluentes a serem lançados, de modo a não inviabilizar o abastecimento das populações e/ou acarretar efeitos tóxicos em organismos aquáticos.

Tabela 2 – Valores máximos de mercúrio e arsênio total permitidos em águas doces de classe 1 e classe 3; em águas salinas de classe 1 e 2; em águas salobras de classe 1 e 2; e nos efluentes industriais, de acordo com a Resolução CONAMA N° 357, de 17 de Março de 2005.

Águas Doces - Classe 1	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,01 mg/L As
Mercúrio total	0,0002 mg/L Hg
Padrões para copos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo intensivo	
Arsênio total	0,14 µg/L As
Águas Doces - Classe 3	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,033 mg/L As
Mercúrio total	0,002 mg/L Hg
Padrões para copos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo intensivo	
Arsênio total	0,14 µg/L As
Águas Salinas - Classe 1	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,01 mg/L As
Mercúrio total	0,0002 mg/L Hg
Padrões para copos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo intensivo	
Arsênio total	0,14 µg/L As
Águas Salinas - Classe 2	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,069 mg/L As
Mercúrio total	1,8 µg/L Hg
Águas Salobras - Classe 1	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,01 mg/L As
Mercúrio total	0,0002 mg/L Hg
Padrões para copos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para consumo intensivo	
Arsênio total	0,14 µg/L As
Águas Salobras - Classe 2	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,069 mg/L As
Mercúrio total	1,8 µg/L Hg
Lançamento de Efluentes	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Arsênio total	0,5 mg/L As
Mercúrio total	0,01 mg/L Hg

Ainda, de acordo com a Resolução CONANA nº 357 de Março de 2005:

“Art 24. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedçam as condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis”

“Art. 29. A disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não poderá causar poluição ou contaminação das águas.”

“Art. 30. No controle das condições de lançamento, e vedada, para fins de diluição antes do seu lançamento, a mistura de efluentes com águas de melhor qualidade, tais como as águas de abastecimento, do mar e de sistemas abertos de refrigeração sem recirculação.”

“Art. 32. Nas águas de classe especial e vedado o lançamento de efluentes ou disposição de resíduos domésticos, agropecuários, de aquicultura, industriais e de quaisquer outras fontes poluentes, mesmo que tratados.”

A Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente.

A Lei nº 12.300, de 16 de Março de 2006, institui a Política Estadual de Resíduos Sólidos e define princípios e diretrizes, com o objetivo de implementar instrumentos para a gestão integrada e compartilhada de resíduos sólidos, com vistas à prevenção e ao controle da poluição, à proteção e à recuperação da qualidade do meio ambiente, e à promoção da saúde pública, assegurando o uso adequado dos recursos ambientais. O Decreto nº 54.645 de 5 de Outubro de 2009 regulamenta os dispositivos da Lei Estadual nº 12.300, de 16 de Março de 2006.

O projeto de lei 33/2008 institui as normas e procedimentos para a reciclagem, gerenciamento e destinação final do lixo tecnológico., porém os artigos 6º, 7º, 9º e 10º foram recentemente vetados pelo Governador do Estado de São Paulo, José Serra. As razões do veto parcial estão expostas a seguir: Em relação ao artigo 6º, compete ao Poder Executivo, estabelecer normas de controle de quantidade de produtos e componentes de que trata o projeto, sujeitos à reciclagem, ao gerenciamento e à destinação final ambientalmente adequada do lixo tecnológico. Neste caso, o veto baseia-se na inconstitucionalidade, pois a

conveniência e oportunidade do exercício da função administrativa insere-se no campo das competências exclusivas ao Poder Executivo, consoante o artigo 47, inciso II, da Constituição Estadual, o que obsta o estabelecimento heterônomo de restrições à função. Assim, fixar o Poder Legislativo prazo para a prática de determinado ato pelo Poder Executivo, viola o princípio constitucional da separação dos Poderes.

Relativamente ao artigo 7º, que estabelece penalidades em caso de descumprimento da lei em que vier a se converter o projeto destaca-se que, embora a competência para legislar sobre produção e consumo seja concorrente (artigo 24, inciso V, da Constituição Federal), as unidades federadas devem observar as normas gerais editadas pela União. No que tange à violação das normas contidas nas leis de defesa do meio ambiente, o infrator se sujeita às sanções administrativas já especificadas e seguintes da Lei federal nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998.

O artigo 9º, de natureza tipicamente administrativa, vinculada à organização e ao funcionamento de órgãos e entidades da Administração Pública, se insere no campo da competência privativa do Governador do Estado (artigo 47, incisos II, XIV e XIX, da Constituição do Estado), a quem pertence, com exclusividade, a iniciativa da lei, quando necessária. (artigo 61, § 1º, II, “e”, da Constituição Federal). Entretanto, a Lei nº 12.300, de 16 de março de 2006, que instituiu a Política Estadual de Resíduos Sólidos, já define princípios, diretrizes, objetivos e instrumentos para a gestão integrada e compartilhada de resíduos sólidos, por meio da articulação entre Poder Público, iniciativa privada e demais segmentos da sociedade civil, objetivando a prevenção e o controle da poluição, a proteção e a recuperação da qualidade do meio ambiente, e a promoção da saúde, para o fim de assegurar o uso adequado dos recursos ambientais no Estado de São Paulo.

O vício de inconstitucionalidade recai sobre o artigo 10 da medida, que autoriza o Poder Executivo a implementar ações que se inserem no estrito campo da gestão administrativa, como é o caso da celebração de convênios, por envolver órgãos da Administração Pública Paulista, outros entes públicos e entidades privadas. A atribuição de encargos caracteriza função reservada ao Poder Executivo, não se admitindo intervenção legislativa. A autorização para celebrar convênios com instituições públicas ou privadas refoge ao campo de atuação do Poder Legislativo, conforme reiteradas decisões do Supremo Tribunal Federal (ADI's nºs 342, 676, 1.166 e 1.857) e não se harmoniza, portanto, com as imposições decorrentes do princípio da separação dos poderes (artigo 2º da Constituição da República e artigo 5º, “caput”, da Constituição Estadual).

A Lei nº 13.576, de 6 de julho de 2009, institui normas e procedimentos para a reciclagem, gerenciamento e destinação final de “lixo tecnológico”, que envolvem componentes e periféricos de computadores, monitores e televisores, baterias e pilhas e produtos magnetizadores, a fim de que estes produtos devem receber destinação final adequada e que não provoque danos ou impactos negativos ao meio ambiente e à sociedade. Cabe, entretanto, processos de reciclagem e aproveitamento para finalidade original ou diversa; práticas de reutilização total ou parcial e neutralização e disposição final apropriada dos componentes tecnológicos equiparados a lixo químico. O objetivo é diminuir, regular o descarte inadequado e descontrolado de eletroeletrônicos, como também, extinguir os processos de incineração para a eliminação deste tipo de resíduo.

O Decreto nº 57.071 de 20 de Junho de 2011 altera a redação do artigo 27 do Decreto estadual nº 54.645 de 5 de Outubro de 2009, que regulamenta a Lei Estadual nº 12.300, de 16 de Março de 2006, caracterizando produtos eletroeletrônicos, lâmpadas contendo mercúrio e agrotóxicos como resíduos de significativo impacto ambiental.

2.4.2 Legislação ambiental na União Europeia

Na União Européia, a preocupação com os níveis de contaminação aliada à escassez de recursos hídricos forçou o aperfeiçoamento da legislação ambiental, limitando a descarga de contaminantes tóxicos de águas residuais, incluindo metais pesados, obrigando os diversos segmentos produtivos a aplicar tecnologias avançadas de tratamento (REMOUDAKI et al., 2003).

A Comunidade Económica Europeia (CEE), cuja personalidade jurídica é transmitida e consolidada em toda União Europeia, dispõe de Diretrizes para o gerenciamento de efluentes contendo mercúrio e arsênio, de forma a incluir na ordem jurídica, disposições para a regulação da descarga destas substâncias perigosas de forma adequada no meio hídrico.

A Diretriz 76/464/CEE é relativa à poluição causada por substâncias perigosas lançadas no meio aquático, incluindo o mercúrio e o arsênio. O mercúrio é classificado como elemento pertencente à lista I, conhecida como lista negra. Substâncias classificadas na lista I devem ter o despejo previamente autorizado pelo órgão competente, obedecendo as normas que estabelecem os limites e parâmetros de qualidade para o lançamento de efluentes. O arsênio é pertencente à lista II, denominada lista cinza. O despejo de substâncias classificadas na lista II, também estão sujeitas à autorização prévia, novamente de acordo com as normas de emissão e descarga. Entretanto, o Conselho das Comunidades Europeias requer o

estabelecimento de novos programas com a finalidade de reduzir os valores de emissão permitidos das substâncias pertencentes à lista II.

A Diretriz nº 82/176/CEE, de 22 de Março de 1982, estabelece os limites e os parâmetros de qualidade para as descargas de mercúrio provenientes de eletrólise dos cloretos alcalinos. Esta diretriz foi transposta pelo Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto de 1998, mantida em vigor e, aplicável a unidades industriais que façam despejos de águas residuais desta natureza.

A Diretriz 84/156/CEE de 8 de Março de 1984, estabelece os limites e parâmetros de qualidade nas descargas de efluentes contendo mercúrio provenientes de setores que não o da eletrólise dos cloretos alcalinos. Esta diretriz foi transposta pelo Decreto-Lei nº 52/99/CEE de 20 de Fevereiro de 1999, mantida em vigor e, aplicável a unidades industriais que façam despejos de águas residuais desta natureza.

Tabela 3 - Valores ou cargas limite de emissão de mercúrio mensal, segundo as normas estabelecidas pelo Decreto-Lei nº 52/99/CEE

Tipos de Instalações Industriais	Valores Limite
Indústrias químicas que utilizam catalisadores mercuriais	
a) Para a produção de cloreto de vinilo.....	0,05 mg/L Hg em efluentes 0,1 g/t da capacidade de produção de cloreto de vinilo
b) Outras produções.....	0,05 mg/L Hg em efluentes 5g/kg de Hg tratado
Fabricação de catalizadores mercuriais utilizados para a produção de cloreto de vinilo	0,05 mg/L Hg em efluentes 0,7 g/kg de Hg tratado
Fabricação de compostos orgânicos e não orgânicos de mercúrio	0,05 mg/L Hg em efluentes 0,05 g/kg de Hg tratado
Fabricação de baterias	0,05 mg/L Hg em efluentes 0,03 g/kg de Hg tratado
Indústrias de metais não ferrosos	
a) Instalações de recuperação de mercúrio.....	0,05 mg/L Hg em efluentes
b) Extração e refino de metais não ferrosos.....	0,05 mg/L Hg em efluentes
Instalações de tratamento de resíduos tóxicos contendo mercúrio	0,05 mg/L Hg em efluentes

Fonte: Decreto-Lei nº 52/99/CEE

O Decreto-Lei nº 52/99/CEE de 20 de Fevereiro de 1999, estabelece que a concentração de mercúrio total nas águas de superfície afetadas pelas descargas de efluentes não deve exceder 1 µg/L; a concentração de mercúrio nos estuários afetados pelas descargas não deve exceder 0,5 µg/L; a concentração de mercúrio em águas marítimas territoriais e nas águas costeiras do litoral, não estuárias, afetadas pelas descargas não deve exceder 0,3 µg/L.

Os parâmetros de qualidade das águas superficiais, destinadas à produção de água potável, são estabelecidos pela Regulação de Águas de Superfície, de 1 de Dezembro de 1989.

As águas de superfície são classificadas como A1, A2 ou A3, de acordo com a ordem crescente do tratamento que será aplicado. Os valores máximos de arsênio e mercúrio estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores máximos de arsênio e mercúrio em águas de superfície, estabelecidos pela Regulação Nacional da União Europeia, de 1 de Dezembro de 1989.

Classificação de águas de superfície	Valor máximo de arsênio em águas de superfície	Valor máximo de mercúrio em águas de superfície
A1	0,05 mg/L As	0,001 mg/L
A2	0,05 mg/L As	0,001 mg/L
A3	0,10 mg/L	0,001 mg/L

Fonte: Regulação Nacional da União Europeia, de 1 de Dezembro de 1989.

Em relação ao arsênio, a Diretriz 76/769/CEE de 27 de Julho de 1976 que permitia a utilização de determinados compostos de arsênio, foi alterada pela Diretriz 2006/139/CEE de 20 de Dezembro de 2006. A Diretriz 2006/139/CEE estabelece que a utilização de compostos de arsênio em substâncias ou preparações destinadas ao tratamento de águas industriais é ilegal. E que compostos de arsênio não podem mais ser colocados no mercado, nem utilizados como substâncias e componentes de preparações destinadas a impedir a proliferação de microrganismos, plantas ou animais. Fica também proibido o uso de compostos de arsênio como preservativo de madeira em cascos de embarcações, gaiolas, flutuadores, redes e qualquer outro dispositivo utilizado em piscicultura ou equipamento que fique total ou parcialmente imerso em água. A madeira tratada deste modo não pode mais ser utilizada como cerca para gado, em construções residenciais ou domésticas, não pode ter contato com água e nem ser utilizada para fins agrícolas, com exceção daquelas utilizadas em instalações industriais, utilizando vácuo ou pressão para impregnar a madeira, quando se trate de soluções de compostos inorgânicos do tipo cobre, cromo ou arsênio (CCA). Neste último caso, toda a madeira tratada colocada no mercado deverá apresentar um rótulo com a menção "Exclusivamente para uso profissional e instalação industrial, contém arsênio", e, deverá apresentar rótulo com a menção "Para manusear esta madeira, é necessário usar luvas, máscara e proteção ocular". Os desperdícios deverão ser tratados como resíduos perigosos por empresa devidamente autorizada.

2.4.3 Legislação ambiental nos Estados Unidos da América

Nos Estados Unidos, a “Food and Drug Administration” (FDA) estabelece as concentrações seguras de presença de mercúrio em frutos do mar disponíveis ao consumo humano (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 2006).

As medidas, inspeção, relatórios de emissão, legislação e regulação estabelecendo os níveis de mercúrio e arsênio nas águas são realizados pela “Environmental Protection Agency” (EPA).

De acordo com o Critério de Qualidade de Água de 1986 da EPA, os valores máximos de mercúrio em ambientes aquáticos destinados ao uso humano e que contenham organismos deve ser na faixa de 0,012-2,5 µg/L. Nas águas salinas para uso humano e que contenham organismos, o limite estabelecido é de 0,025-2,1 µg/L. Na água utilizada nos sistemas públicos de abastecimento, a concentração de mercúrio não deve exceder a concentração de 0,002 mg/L. Nos efluentes, a concentração de mercúrio total não deve ser superior a 0,05 mg/L (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA, 1986).

A EPA estabelece que a concentração de arsênio total na água fresca não deve exceder 0,15 mg/L. Nas águas salinas o limite é de 0,036 mg/L. Já nas águas destinadas ao consumo humano e que contenha organismos, o valor máximo permitido é de 0,018 µg/L (EPA, 2004). Em efluentes, o nível máximo de contaminação arsenical, em inglês de nominado “Maximum Contaminant Level” (MCL), é 0,010 mg/L, entretanto, este critério está sendo revisado pela EPA e o valor de MCL para arsênio poderá ser reduzido a 0,005 mg/L (EPA, 2002).

Em 2011, a “Agency for Toxic Substances and Disease Registry” (ATSDR), classificou o arsênio como o primeiro elemento da lista de prioridade para substâncias perigosas devido ao seu alto potencial carcinogênico. O mercúrio ocupa o terceiro lugar na ordem (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR, 2011).

Nos estados Unidos, 90 % da madeira tratada com CCA era amplamente utilizada em *playgrounds* e ambientes domésticos. Atualmente, assim como ocorre na União Europeia, o uso deste tipo de preservativo para madeira é proibido, sendo, entretanto, ainda permitido em instalações industriais (ATSDR 2007).

Destaca-se, todavia, que desde tempos remotos até os dias atuais, o número de informações na literatura relatando a diversidade de sítios contaminados com mercúrio e arsênio como consequência de atividades industriais e descarte inadequado de produtos e efluentes em nível global tem aumentado constantemente.

Atualmente, apesar das legislações vigentes, os limites estabelecidos para a proteção ambiental, encontram-se drasticamente elevados nos ecossistemas como resultado de atividades antrópicas variadas, (KANNAN;e KRISHNAMOORTHY, 2006; MORENO et al., 2008), onde muitos cursos de água apresentam elevados níveis de contaminação em nível mundial, devido à presença de contaminantes potencialmente tóxicos, em especial o arsênio e o mercúrio, que continuam a ser descartados inadvertidamente (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004).

Deste modo, as agências, organizações e instituições de proteção ambiental têm sido focadas na aplicação de processos de remediação, visando a recuperação de sítios contaminados, de modo a proteger a fauna e flora do meio, assim como os seres humanos.

2.5 Métodos físico-químicos utilizados para a recuperação de áreas degradadas

A descontaminação de sítios poluídos é um dos maiores desafios para o desenvolvimento sustentável. Dentre os métodos disponíveis para a remediação de ambientes contaminados com mercúrio e arsênio, as técnicas físico-químicas têm sido amplamente utilizadas.

2.5.1 Métodos físico-químicos utilizados para a remediação de sítios contaminados com mercúrio

Os métodos físico-químicos usualmente utilizados para a remoção de mercúrio em águas contaminadas estão descritos como se segue:

a) Precipitação e co-precipitação: nesta metodologia utiliza-se aditivos para transformar contaminantes em elementos sólidos ou apolares ou sólidos insolúveis onde o contaminante é adsorvido. As formas insolúveis são removidas em fase líquida por clarificação ou filtração; b)

b) Adsorção: neste procedimento é utilizada uma coluna contendo sorbentes imobilizados por onde circula a água contaminada. Os contaminantes ficam retidos na coluna;

c) Filtração por Membrana: a água contaminada passa através de uma membrana semi-permeável que bloqueia a passagem do mercúrio, porém não impede a passagem da água e de seus outros constituintes (EPA, 2007).

As vantagens e desvantagens dos diferentes processos de remoção de mercúrio em águas estão apresentadas de forma comparativa na tabela 5:

Tabela 5 - Comparação entre as principais tecnologias de remoção de mercúrio em águas contaminadas.

Tecnologia	Vantagens	Desvantagens
a) Precipitação e Co-precipitação:	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica relativamente simples e bem conhecida; - Economicamente viável em processos de larga escala; 	<ul style="list-style-type: none"> - A remoção de mercúrio não é efetiva; - Técnica utilizada apenas como tratamento prévio à outros processos de remediação.
b) Adsorção:	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica de menor custo; - Operação simples; 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é ideal para processos em grande escala;
c) Filtração por membrana	<ul style="list-style-type: none"> - Efetiva na remoção de mercúrio; 	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica muito dispendiosa e, portanto, apesar de efetiva, é pouco utilizada; - Produz elevadas quantidades de resíduos tóxicos; - Técnica sensível a outros contaminantes e componentes da água a ser tratada, sendo assim, de baixa especificidade;

Fonte: EPA 2007. Com permissão.

2.5.2 Métodos físico-químicos utilizados para a remediação de sítios contaminados com arsênio

O arsênio na água é comumente presente nas formas inorgânicas trivalente As(III) e pentavalente As(V). Os princípios básicos de remoção de arsênio da água contaminada são baseados em técnicas convencionais que podem ser agrupadas nas categorias seguintes:

a) Oxidação e sedimentação: a oxidação pode ser realizada utilizando-se ar ou agentes químicos;

b) Coagulação e filtração: a coagulação é feita com alumina (trióxido de alumínio) ou ferro;

c) Filtração por sorção: nesta técnica são utilizados a alumina ativada, o ferro revestido com areia e resina de troca iônica como principais sorbentes;

d) Filtração por membrana: utiliza-se, normalmente, membranas de nanofiltração e osmose reversa (FEROZE, 2005).

Na maioria dos tratamentos, a oxidação do As(III) a As(V) é necessária para a remoção do metaloide de forma efetiva. As vantagens e desvantagens dos diferentes processos de remoção de arsênio estão apresentadas de forma comparativa na tabela 6:

Tabela 6 - Comparação entre as principais tecnologias de remoção de arsênio em águas contaminadas.

Tecnologia	Vantagens	Desvantagens
a) Oxidação e sedimentação:	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica relativamente simples; - A oxidação química é rápida; - A oxidação com ar apresenta baixo custo; - Oxida outras impurezas e mata micróbios contaminantes. 	<ul style="list-style-type: none"> - A oxidação com ar é muito lenta; - Remove quantidades insignificantes de arsênio; - Técnica utilizada apenas como tratamento prévio à outros processos de remediação.
b) Coagulação e filtração:	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica com relativo baixo custo; - Operação simples; - Os agentes químicos utilizados são facilmente disponibilizados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é ideal para águas com elevada presença de ânions, em especial na presença de fosfatos; - Produz grande quantidade de lodo tóxico; - Remove quantidades insignificantes de arsênio; - Requer oxidação prévia do metaloide; - Inadequada para padronização adequada de águas contaminadas.
c) Filtração por sorção	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica bem conhecida e disponível comercialmente; - Apresenta possibilidades no âmbito de futuros desenvolvimentos da técnica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é ideal para águas com elevada presença de ânions, em especial na presença de fosfatos; - Produz quantidades relevantes de efluentes e resíduos sólidos ricos em arsênio; - Necessita de alta e dispendiosa tecnologia para operação e manutenção;
d) Filtração por membrana	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica bem definida; - Apresenta elevada capacidade para a remoção de arsênio; - Capaz de remover, simultaneamente, outros contaminantes; 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessita investimento significativo para implementação da técnica; - Técnica de alto custo para manutenção e operação; - Produção de dejetos tóxicos ricos em arsênio.

Fonte: Feroze (2005). Com permissão.

Observando-se as inúmeras desvantagens apresentadas pelas metodologias físico-químicas atualmente empregadas para a remediação de sítios poluídos com mercúrio e arsênio, a busca por processos remediadores que sejam economicamente viáveis e ecologicamente corretos foram se intensificado nos últimos anos e a biorremediação tem sido descrita como uma alternativa atrativa (VON CANSTEIN et al., 1999; NEALSON; BELZ; MCKEE, 2002; VALLS; LORENZO, 2002; PIEPER; SEEGER, 2008; MORGANTE et al., 2010; SAAVEDRA et al., 2010). Quando comparada aos processos convencionais, apresenta as seguintes vantagens: a) os biossorventes podem ser produzidos com baixo custo; b) podem ser reutilizáveis; c) podem promover elevados valores de acumulação dos contaminantes; d) podem apresentar seletividade a metais específicos; e) quando imobilizados, a separação da solução é eficiente e rápida, f) não há formação de lodo contaminado sem destinação apropriada; g) não há geração e efluentes tóxicos durante o processo, h) apresenta possibilidade de descontaminação desde níveis submolares de contaminantes até aqueles significativamente elevados (VOLESKY; HOLAN, 1995; DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; ZOUBOULIS; LOUKIDOU; MATIS, 2004; BARROS et al., 2006; WANG; CHEN, 2006).

2.6 Biorremediação de mercúrio e arsênio com bactérias

A biorremediação é o processo pelo qual organismos vivos, sejam eles viáveis ou não, modificados ou não, são utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente, sejam estes orgânicos ou metais pesados (GAYLARDE et al., 2005).

A biorremediação de metais pesados resulta da capacidade destes agentes de imobilizar íons de metais pesados por simples adsorção em sua superfície celular, promovendo a precipitação, ou por processos de formação de complexos intracelulares (DIELS; VAN DER LELIE; BASTIAENS, 2002; VALLS; LORENZO, 2002).

A interação entre micro-organismos e metais pesados vem ocorrendo desde o início da vida no planeta, há 4 bilhões de anos (SILVER; PHUNG, 2005).

Para apresentar toxicidade, os metais pesados precisam primeiramente entrar na célula microbiana. Para tanto, existem duas vias de entrada: uma inespecífica e outra de grande especificidade. A primeira ocorre através de um gradiente quimiosmótico da membrana citoplasmática (transporte passivo), e a segunda envolve hidrólise de ATP (transporte ativo) (NIES; SILVER, 1995; GRASS; FRICKE; NIES, 2005). De maneira geral, as proteínas

envolvidas no transporte passivo de íons são expressas constitutivamente pelas células, enquanto a expressão das proteínas de transporte ativo é regulada.

Cátions de metais pesados divalentes, como o Hg^{2+} , são estruturalmente muito similares ao Mg^{2+} , adentrando a célula passivamente em bactérias Gram-negativas, pelo sistema de incorporação de magnésio (MIT). Ânions como o arsenito (AsO_3^{3-}), se assemelham ao fosfato (PO_4^{3-}), entrando na célula pela bomba de influxo de fosfato (PIT), via assimilação passiva.

Entretanto, sabe-se que, uma vez dentro das células, os íons de metais pesados ou de arsênio, em concentrações acima do limite fisiológico, causam diversos danos tais como, aberrações genéticas, inibição da transcrição, tradução, inibição da divisão celular, de enzimas e proteínas importantes para o metabolismo celular, podendo até resultar na lise bacteriana (ROANNE; PEPPER, 2000) (Figura 3).

Figura 3 - Interferências celulares frequentes causados pelo influxo de íons de mercúrio e arsênio.

Os danos comumente visualizados envolvem aberrações cromossômicas, inibição da transcrição, tradução, da divisão celular, inibição de enzimas e proteínas importantes para o metabolismo e lise.

Fonte: Modificado de Biondo (2008). Com permissão.

Porém, a exposição prolongada de cepas bacterianas em sítios contaminados com metais pesados conduziu ao aumento na habilidade de resistência de determinadas

comunidades que residem nesses locais para a manutenção de sua sobrevivência através do desenvolvimento de mecanismos específicos de detoxificação celular (DIELS; MERGEAY; NIES, 1985; CHEN et al., 1986; VALLS; LORENZO, 2002). Tal fato proporcionou a sobrevivência destas bactérias em ambientes contendo elevadas concentrações de íons metálicos (SILVER; PHUNG, 2005; VALLS; LORENZO, 2002).

A partir de então, inúmeros estudos têm sido realizados para a compreensão do funcionamento desses sistemas biológicos naturalmente desenvolvidos e a prospecção de novas linhagens potencialmente resistentes (SILVER, 1998; VETRIANI et al., 2005; OJO et al., 2006; LEFEBVRE; KELLY; BUDD, 2007; MÜLLER et al., 2007; RASMUSSEN et al., 2008; CAI et al., 2009; ZHANG et al., 2009; ZENG et al., 2009).

Atualmente, uma considerável variedade de bactérias, com graus distintos de resistência e capazes de adsorver mercúrio e arsênio têm sido descritas (MACASKIE; DEAN, 1990; GADD, 1992; KOSTAL et al., 2004; WAWRZYŃSKA et al., 2005; ACHOUR-ROKBANI et al., 2010; ROJAS et al., 2011). Esta multiplicidade de linhagens e mecanismos de resistência vem tornando possível a utilização desses micróbios em estratégias de biorremediação, seja em *in-situ* (no próprio local da área contaminada), ou *ex-situ* (envolvendo a remoção do material contaminado para ser tratado em outro local).

2.6.1. Mecanismo de resistência bacteriana ao mercúrio

Em bactérias, genes que conferem resistência ao mercúrio encontram-se, geralmente, organizados em operons contendo os genes *mer*, altamente conservados entre as espécies e, localizados em plasmídeos e transposons (SILVER; PHUNG, 2005).

O operon de baixo espectro *merRTPADE* confere resistência a mercúrio inorgânico e por isso é considerado de baixo espectro (SILVER; PHUNG, 2005; KIYONO et al., 2009). D. A bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34, por exemplo, possui o operon *merRTPADE* que encontra-se localizado nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30 (CHAMPIER et al., 2004; ROJAS et al., 2011).

O operon de amplo espectro *merRTPAGBDE* confere resistência tanto às formas de mercúrio inorgânico quanto orgânicas e, por isso, é denominado de amplo espectro. Estudos metagenômicos em sedimentos altamente poluídos com mercúrio no Rio Nura, localizado na região central do Kazaquistão, demonstram a existência de micro-organismos não cultiváveis carregando o operon *mer* de amplo espectro *merRTPAGBDE*, localizado no plasmídeo pTP6 destes micro-organismos (GI 84310666:c33933-33499) (SMALLA et al., 2006).

Os componentes essenciais do operon *merRTPADE* de baixo espectro em bactérias Gram-negativas incluem o gene *merR*, que codifica uma proteína regulatória (SUMMERS 1992; ZENG. et al. 1998), *merT* e *merP*, codificam o sistema de captação de íons Hg^{2+} (MORBY; HOBMAN; BROWN, 1995; STEEL; OPELLA, 1997), o *merA*, que produz uma enzima íon redutase (MILLER et al. 1991; SCHIERING et al. 1991), *merD* codifica um co-repressor da transcrição (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). O gene *merE* que, por sua vez, não tem função conhecida (SILVER; PHUNG, 2005) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do operon *merRTPADE* de baixo espectro.

merR, codifica uma proteína regulatória; *merT* e *merP*, codificam o sistema de captação de íons Hg^{2+} ; *merA* produz uma enzima íon redutase; *merD* codifica um co-repressor da transcrição; *merE* não tem função conhecida.

Fonte: Parada (2012).

Os genes presentes no operon *merRTPAGBDE* de amplo espectro incluem os mesmos genes *merRTPADE*, apresentando, porém, o gene *merB* que codifica a liase organomercurial (MISRA, 1992), além do produto do gene *merG* que está envolvido na redução da permeabilidade celular (KIYONO; PAN-HOU, 1999) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do operon *merRTPAGBDE* de amplo espectro.

merR codifica uma proteína regulatória; *merT* e *merP*, codificam o sistema de captação de íons Hg^{2+} ; *merA* produz uma enzima íon redutase; envolvido na redução da permeabilidade celular; *merB* que codifica a liase organomercurial; *merD* codifica um co-repressor da transcrição; *merE*, provavelmente, codifica uma proteína que atue na mediação do transporte de metilmercúrio.

Fonte: Parada (2012).

O mecanismo de detoxificação de mercúrio em bactérias Gram-negativas inclui a regulação do produto gênico de *merR* que codifica a proteína de maior afinidade seletiva a íons Hg^{+2} já descrita (RALSTON; O'HALLORAN, 1990) e age como ativador ou repressor da transcrição dos genes *mer*, na presença ou ausência de mercúrio, respectivamente (NI'BHRIAIN; SILVER; FOSTER, 1983; PERMINA et al., 2006). A captação e transporte de íons Hg^{2+} são feitos através da proteína de membrana interna MerT e da proteína

periplasmática MerP que atuam juntas para desencadear esta função. Durante o mecanismo de detoxificação, sugere-se que a proteína MerE, provavelmente, atue como uma proteína transportadora, agindo na mediação do transporte de metilmercúrio no caso de operons de amplo espectro ou Hg^{2+} em operons de baixo espectro (KIYONO et al., 2009). A redutase citosólica MerA reduz íons de Hg^{2+} a mercúrio elementar (Hg^0) (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). Excepcionalmente, no caso o operon de amplo espectro, o gene *merB* codifica a liase organomercurial que catalisa a clivagem das ligações de carbono no íon metálico (MISRA, 1992) e o produto do gene *merG* está envolvido na redução da permeabilidade celular a componentes organomercuriais (KIYONO; PAN-HOU, 1999). MerD tem, provavelmente, a função de um co-repressor distal da transcrição (BARKAY; MILLER; SUMMERS, 2003). Portanto, na presença de mercúrio, o ativador transcricional MerR leva à expressão dos genes estruturais *mer* (BROWN et al., 2003). Assim, no citoplasma da célula, ocorre a redução dos íons Hg^{2+} em Hg^0 pela redutase citosólica (TAKEUSHI et al., 2003; HOLTZE et al., 2006), fazendo com que o metal seja volatilizado para fora da célula (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo bacteriano para a detoxicação de mercúrio pela ativação dos operons *mer* de baixo e amplo espectro.

MerA: redutase mercúrica; **MerB:** liase organomercurial; **MerP:** proteína periplasmática ligadora de mercúrio; **MerT:** proteína transportadora de membrana; **MerG:** proteína periplasmática envolvida na permeabilidade celular; **MerE:** proteína de membrana transportadora de mercúrio; **MerR:** (pentágono preto) ativador ou repressor transcricional; **MerD:** co-repressor da ativação transcricional; Pt: promotor dos genes *merT* e *merB2*.

Fonte: Rojas et al. (2011). Com permissão.

Bactérias contendo este sistema de detoxificação são altamente específicas na remoção de íons Hg^{2+} , podendo eliminar até 98% do metal em solução como demonstra Von Canstein et al., (1999) que, ao incubar a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas putida* Spi3 em biorreatores contendo efluentes industriais com concentração mercurial de 7,6 mg/L, foi possível verificar a remoção de 7 mg/L de íons Hg^{2+} . Estas observações demonstram que bactérias contendo o mecanismo de desintoxicação de mercúrio são capazes de contribuir eficientemente para a remoção do metal tóxico do meio contaminado.

A *Pseudomonas fluorescens*, linhagem BM07, apresentou habilidade em biosorver 60 mg Hg^{2+} /g de massa seca, quando incubada em pH 7,0 e 30 °C de temperatura (NOGHABI et al., 2007).

Pesquisadores descobriram que a *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de reduzir 10 mg/L de Hg^{2+} , com 70 % de eficiência, em 24 horas. Após a otimização do processo de biorremediação, alterando-se parâmetros como agitação, pH, fonte de carbono e volume

celular no meio, a habilidade da bactéria em reduzir Hg^{2+} a Hg^0 foi de 99,29 %, significando um aumento na eficiência do processo de 29,3% (TUPE; RAJWADE; PAKNIKAR, 2007).

A bactéria também Gram-negativa mercúrio-resistente *Enterobacter* sp, recentemente estudada para fins de biorremediação de sítios poluídos com mercúrio, exibiu a propriedade de bioacumulação do metal com síntese simultânea de nanopartículas de mercúrio esféricas intracelulares, medindo 2-5 nm de diâmetro. As nanopartículas foram visualizadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão, difração com raios-X e microscopia de força atômica. O mercúrio, quando presente em baixas concentrações, é encapsulado nas partículas não sendo capaz de ser reduzido a sua forma elementar volátil, para retornar ao meio ambiente constituindo, portanto, uma efetiva forma de tratamento de águas contaminadas (SINHA; KHARE, 2011).

2.6.2 Mecanismo de resistência bacteriana ao arsênio

Bactérias arsênio-resistentes têm desenvolvido diferentes estratégias para a biotransformação de arsênio, incluindo a oxidação do As^{3+} , redução citoplasmática de arsenato, redução respiratória de As^{5+} e metilação de As^{3+} (SILVER; PHUNG, 2005). A função primária destas transformações é garantir a sobrevivência celular em sítios contendo altas concentrações deste metalóide potencialmente tóxico. Deste modo, plasmídeos contendo genes que conferem resistência, têm sido isolados de bactérias (KAUR; ROSEN, 1992). Determinantes de resistência ao arsênio, denominados genes *ars*, podem ser encontrados em bactérias Gram-positivas e em Gram-negativas, consistindo em genes organizados em uma única unidade transcricional (SILVER; WALDERHAUG, 1992).

Por exemplo, o operon *ars*, denominado, *arsRDABC*, localizado no plasmídeo R773, isolado de *Escherichia coli*, é composto por 5 genes (CHEN et al., 1986). O gene *asrR* codifica um repressor induzível (WU; ROSEN, 1991), que é considerada a proteína de maior afinidade e especificidade de ligação a íons As^{3+} e As^{5+} , encontrada na natureza (RAMANATHAN et al., 1997; ZHANG et al., 2009). O ArsD é uma proteína co-repressora, que controla elevados níveis de transcrição (WU; ROSEN, 1993). Os genes *arsA* e *arsB* codificam uma ATPase e uma bomba de efluxo presente na membrana celular, respectivamente. A enzima arsenato redutase é sintetizada pelo *arsC* (JI; SILVER, 1992) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema da disposição do operon *arsRDABC* do plasmídeo R773 isolado de *Escherichia coli*.

arsR, codifica um repressor; **arsD**, codifica a proteína regulatória para o controle de níveis elevados de transcrição; **arsA**, codifica uma ATPase; **arsB**, bomba de efluxo presente na membrana da célula e **arsC** codifica a enzima arsenato redutase.

Fonte: Parada (2012).

Nas espécies de *Staphylococcus*, por exemplo, os genes *arsRDB* são conservados. Os demais genes não foram identificados até o momento (ROSEINSTEIN et al., 1992).

O operon *ars* de *Cupriavidus metallidurans* CH34 é composto pelos genes *arsR-arsI-arsC₁-arsB,-arsC₂-arsH-arsP*. Estudos descrevem que o gene *arsR* codifica a proteína reguladora da transcrição, *arsI* sintetiza uma proteína da família das glioxalases; *arsC₁* e *arsC₂* codificam duas arsenato redutases; *arsB* é responsável pela bomba de efluxo, pertencente à classe de permeases ACR3; *arsH* produz a redutase FMN NADPH-dependente e o gene *arsP* é responsável pela produção da permease putativa “the major facilitator family” (MFS). Entretanto, o funcionamento detalhado do *arsRIC₁BC₂HP* de *C. metallidurans* CH34 ainda não foi completamente elucidado (ZHANG et al., 2009).

Por ainda ser pouco conhecido, estudos sugerem que o operon *ars* funciona de acordo com a figura explicativa (Figura 8). Íons de As^{5+} (AsO_4^{3-}), devido a sua similaridade com o fosfato (PO_4^{3-}), entram pela bomba de influxo do fosfato. O arsênio pentavalente liga-se à proteína ArsR que ativa a transcrição gênica do operon *ars*. O íon As^{5+} é convertido em As^{3+} . Esta oxidação é mediada pela arsenato redutase ArsC. O efluxo da forma trivalente é feito através da bomba de efluxo de arsenito, codificada pelo gene *arsB/A*. Na presença As^{3+} proteína ArsR liga-se ao íon de arsenito também ativando o mecanismo de detoxificação celular. (SIMEONOVA et al., 2005; SILVER; PHUNG, 2005; ORDONEZ et al, 2008; ORDONEZ et al, 2009; ZHANG et al., 2009).

Figura 8 - Esquema ilustrativo do mecanismo do operon *ars* em bactérias.

As^{5+} (AsO_4^{3-}), devido a sua similaridade com o fosfato (PO_4^{3-}), entram pela bomba de influxo do fosfato (Pit). O íon As^{5+} é convertido em As^{3+} pela arsenato redutase **ArsC**. O efluxo de As^{3+} é feito através da bomba de efluxo de arsenito **ArsB**.

Fonte: Silver; Phung (2005). Com permissão.

Devido a presença deste mecanismo de detoxificação natural, a bactéria Gram-negativa *Acidithiobacillus ferrooxidans* demonstrou ser eficiente para a remoção de formas orgânicas de arsênio (YAN et al., 2010).

A *Marinomonas communis* foi capaz de remover quando incubada em meio de cultura na presença do metaloide. A acumulação máxima de arsênio pela célula foi de 2.290 $\mu\text{g As/g}$ de massa seca na presença de 5 mg As/L de arsenato de sódio (Na_3AsO_4), sendo, portanto, considerada pelos autores, um micro-organismo potencial para o emprego em processos de biorremediação (TAKEUCHI et al., 2006).

As observações descritas revelam que bactérias contendo o mecanismo de detoxicação de mercúrio podem contribuir para a remoção do metal tóxico do meio contaminado. Todavia, apesar de Chang et al. (1998) e Von-Canstein et al. (1999) afirmarem que a redução microbiana de Hg^{2+} a Hg^0 seja uma alternativa eficiente em relação aos métodos físicos-químicos para a remoção de mercúrio de efluentes contaminados, esse mecanismo bacteriano não contribui para a retirada do metal potencialmente tóxico do meio, pois libera a forma

elementar na atmosfera que pode ser precipitada em outras regiões e, novamente ser convertida a Hg^{2+} através do ciclo biogeoquímico.

Da mesma forma, micro-organismos que possuem o sistema de oxidação do arsenito, apesar de serem considerados modelos biotecnológicos para a eliminação de arsenato presente em sítios contaminados, acabam por liberar a forma mais tóxica do metaloide, não podendo ter um uso eficiente na biorremediação de arsênio.

Apesar da incineração destes micro-organismos, após o uso em processos de biorremediação, ser uma possível estratégia para a recuperação dos elementos potencialmente tóxicos, o presente estudo visa, como alternativa à incineração, o emprego de desorção celular com a possível re-utilização das células. Por este motivo, bactérias, em seus estados naturais, não reúnem por completo as características desejáveis para serem empregadas na estratégia de biorremediação em questão. Entretanto, consistem em excelentes ferramentas que podem receber melhoramentos genéticos para aplicações as biotecnológicas, sendo este, o principal objetivo do presente trabalho.

2.7 Engenharia genética de microrganismos para a biorremediação de mercúrio e arsênio

O uso de proteínas naturais de superfície como uma ferramenta para ancoragem de proteínas heterólogas “cell surface display” vem apresentando ampla aplicação nas diferentes áreas da ciência (WERNÉRUS; STÅHL, 2004). A literatura tem mostrado que microrganismos recombinantes, cuja superfície celular foi enriquecida com proteínas de alta afinidade a metais potencialmente tóxicos, apresentaram capacidade superior de adsorção dos íons metálicos, quando comparados às linhagens não recombinantes, constituindo, portanto, uma alternativa biotecnológica para desenvolvimento de novos agentes biorremediadores.

Avanços da engenharia genética demonstram várias estratégias que podem ser adotadas para ancorar peptídeos na membrana externa de bactérias Gram-negativas: inserções de genes nas sequências de subunidades celulares (exemplo flagelos e pili), sequências codificadoras de proteínas de membrana externa ou, ainda, utilizando o mecanismo de secreção de proteínas autotransportadoras, como é o caso do sistema de secreção da protease da imunoglobulina A (IgA) da bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, adotado para o desenvolvimento desta Tese (WERNÉRUS; STÅHL, 2004).

O sistema natural de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* representado na Figura 9A, é composto de quatro domínios: (a) PS: peptídeo sinal, capaz de ser reconhecido

pela maquinaria de secreção (Sec), que realiza o transporte da proteína para o periplasma. Uma vez que a proteína esteja no periplasma, o peptídeo sinal sofre uma clivagem, liberando a pré-proteína; (b) domínio da protease propriamente dita, uma das responsáveis pela patogênese de *N. gonorrhoeae*, (c) domínio rico em α -hélices de função desconhecida, e, (d) β -domínio capaz de formar um poro na membrana externa em forma de β -barril, responsável pela passagem e secreção da protease através da membrana externa. Uma vez na superfície bacteriana, a protease ganha a sua conformação ativa, clivando-se nos sítios a, b e a, enfim liberando-se do β -domínio (POHLNER et al., 1987). Klauser et al., (1990) foram os primeiros a adaptar o sistema natural de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* para aplicações biotecnológicas, utilizando este mecanismo para a ancoragem de peptídeos heterólogos na superfície de outras bactérias. No estudo, foram utilizadas partes do sistema de secreção da IgA protease para a ancoragem do domínio B da toxina da cólera (*ctxB*) na superfície celular de *Salmonella typhimurium* (*CtxB*). A sequência gênica correspondente ao domínio *ctxB* foi inserida entre as sequências codificadoras do peptídeo sinal (PS) e a do β -domínio do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* (Figura 9B) e, após expressão gênica, os autores verificaram que o peptídeo *CtxB* estava exposto na superfície celular do microrganismo (Figura 9C) (KLAUSER et al., 1990). Trabalhos posteriores demonstram que diferentes peptídeos podem ser ancorados na membrana externa de bactérias Gram-negativas por intermédio desse sistema (VEIGA et al., 2002; WERNÉRUS; STÅHL, 2004).

Figura 9 - Representação do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*.

A: Representação do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*. **B:** Esquema representativo da construção genética visando a ancoragem da proteína CtxB utilizando o PS e β-domínio do sistema de secreção da IgA protease. **C:** Esquema representativo da ancoragem da proteína CtxB na membrana externa de *Salmonella typhimurium*.

Fonte: Modificado de Pohlner et al. (1987) e Klauser et al. (1990). Com permissão.

Por exemplo, em recente estudo desenvolvido por nosso grupo, o mecanismo de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* foi utilizado para ancorar a fitoquelatina sintética EC20 na superfície de *C. metallidurans* CH34. A EC20 consiste numa nova classe de peptídeo que adsorve íons de metais pesados diversos, proposta por Bae et al. (2000), quando a estratégia era desenvolver um gene sintético que codifica uma proteína análoga à fitoquelatina natural, porém com repetições consecutivas do sítio de ligação com o metal da fitoquelatina natural, a fim de produzir uma fitoquelatina sintética com capacidade aumentada para quelar metais pesados. Portanto, a estrutura primária da fitoquelatina sintética baseia-se em 20 repetições dos aminoácidos ácido glutâmico (E) ou (Glu) e cisteína (C) ou (Cys), com uma glicina (G) ou (Gly) ligada à porção N-terminal da molécula. Por este motivo, a proteína sintética foi denominada EC20 e sua estrutura primária pode ser representada por (Glu-Cys)₂₀Gly (BAE et al., 2000) (Figura 10).

Figura 10 - Estrutura química da fitoquelatina sintética EC20.

A ligação peptídica entre o ácido glutâmico e a cisteína é feita entre o carboxi e o amino terminal do carbono assimétrico destacado em vermelho (20= número de repetições de ácido glutâmico e cisteína).

Fonte: Modificado de Bae et al., (2000). Com permissão.

A bactéria *C. metallidurans* CH34 recombinante expressando a EC20 na superfície celular, apresentou capacidade de imobilizar Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} do meio externo, em níveis superiores aos apresentados pela linhagem selvagem, (BIONDO, 2008 - PI 0.801.282-2). Entretanto, os mesmos resultados não foram visualizados para íons Hg^{2+} (Tabela 1)

Vários autores têm construído linhagens recombinantes de bactérias que expressam EC20, visando a obtenção de microrganismos com capacidade aumentada de ligação de íons de metais pesados, visando o seu emprego em biorremediação (BAE et al., 2000, 2002; XU et al., 2002; LEE; WOOD; CHEN, 2006; WAWRZYŃSKA et al., 2005; WU et al., 2006). Contudo, devido ao elevado número de cisteínas na cadeia polipeptídica e à elevada capacidade dos metais pesados em se ligar fortemente aos grupos sulfidríla ($-\text{SH}$) (GARREL; MACKENZIE; HUNT, 1975; PFEIFFER, 2007), a fitoquelatina sintética EC20 não demonstra seletividade para a captação de íons metálicos e, portanto, sistemas específicos para a ligação seletiva de determinados íons deve ser considerada.

Sabendo-se que o mercúrio e o arsênio são os íons de elevada toxicidade, ainda lançados em grande quantidade na natureza por atividades antrópicas, e que a fitoquelatina sintética EC20 não possui seletividade para a captação destes íons potencialmente tóxicos, a proposta do presente trabalho foi em ancorar a proteína MerR (conhecida como a de maior

especificidade e afinidade para a ligação à íons Hg^{2+}) (RALSTON; O'HALLORAN, 1990), e ArsR (proteína que apresenta maior especificidade e afinidade de ligação à íons As^{5+}) (RAMANATHAN et al., 1997; ZHANG et al., 2009), na membrana externa de *C. metallidurans* CH34, empregando-se o mecanismo natural de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*, previamente proposto por Pohlner et al. (1987) e utilizado por Klauser et al. (1990) para aplicações biotecnológicas (Figura 11). Deste modo, visamos otimizar a capacidade bacteriana de acumular íons de mercúrio ou arsênio para ser aplicada em processos biológicos de biorremediação ambiental em sítios contaminados com mercúrio ou arsênio.

Figura 11 - Representação da utilização do mecanismo natural de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* para ancoragem das proteínas MerR ou ArsR no presente trabalho.

A: Representação da fusão gênica do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*. **B:** Esquema representativo da construção genética visando a ancoragem da proteína MerR ou AsrR utilizando o PS e β-domínio do mecanismo de secreção da IgA protease. **C:** Esquema representativo da ancoragem da proteína MerR ou ArsR na membrana externa de bactérias Gram-negativas.

Fonte: Modificado de Pohlner et al. (1987) e Klauser et al. (1990). Com permissão.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi oferecer uma contribuição às pesquisas relacionadas com a biorremediação de efluentes contaminados com mercúrio e arsênio visando a construção de plasmídeo de amplo espectro para bactérias Gram-negativas, que permite a expressão e ancoragem das proteínas MerR ou ArsR de *C. metallidurans* CH34 através do mecanismo de secreção natural da IgA protease de *N. gonorrhoeae*.

3.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral deste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Obtenção do DNA total de *C. metallidurans* CH34, de acordo com Taghavi et al. (1994).
2. Obtenção do gene *merR* do *operon mer*, localizado no plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34 (GeneID:3170462), destituído do códon de terminação da tradução *tag*;
3. Obtenção do gene *arsR* do *operon ars*, localizado no cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34 (GeneID:4037120), destituído do códon de terminação da tradução *tga*, conforme Zhang et al. (2009);
4. Obtenção do cassete de expressão e ancoragem de proteínas heterólogas presente no plasmídeo pCM2 (BIONDO, 2008 - PI 0.801.282-2), contendo as sequências codificadoras do peptídeo sinal (PS), domínio de ancoragem do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*, (β -domínio), promotor *pan* (RIBEIRO-DOS-SANTOS, et al., 2010 - PI 018080019208) e gene repórter E-tag, destituído do gene EC20sp;
5. Fusão dos genes *merR* e *arsR* entre as sequências codificadoras do peptídeo sinal e do E-tag/ β -domínio de ancoragem do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*, originando os plasmídeos pCM-Hg e pCM-As, respectivamente;
6. Transformação genética para inserção dos plasmídeos pCM-Hg e pCM-As nas células hospedeiras *E. coli* DH5 α e UT5600 e *C. metallidurans* CH34;
8. Análise da expressão e ancoragem das proteínas MerR e ArsR na membrana externa de *C. metallidurans* CH34 e *E. coli* UT5600, hospedeiras dos plasmídeos pCM-Hg e pCM-As comparadas às linhagens selvagens;
9. Análise do bioacúmulo de íons Hg²⁺ na superfície celular das bactérias recombinantes *C. metallidurans*/pCM-Hg e *E. coli*/pCM-Hg comparadas às linhagens selvagens;
10. Análise do bioacúmulo de íon As⁵⁺ na superfície celular das bactérias recombinantes *C. metallidurans*/pCM-As e *E. coli* UT5600/pCM-As comparadas às linhagens selvagens;
11. Análise do crescimento bacteriano em meio contendo diferentes concentrações de mercúrio ou arsênio.
12. Avaliação da capacidade da *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg em adsorver Hg²⁺ do meio aquoso, comparada às linhagens selvagens;
13. Avaliação da capacidade da *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As em adsorver As⁵⁺ do meio aquoso, comparada às linhagens selvagens;

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram de grau de pureza analítica e a água usada foi deionizada (Milli-Q millipore, Billerica, M.A., EUA).

As soluções foram esterilizadas a 120°C, durante 15 minutos e, quando necessário, filtradas em membrana com poros de 0,22µm (Sartorius, Santo André, S.P., Brasil).

4.2 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens e plasmídeos descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Linhagens	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F'/endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR (Φ80dlacΔ(lacZ) M15	Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA
<i>Escherichia coli</i> UT5600	Δ ompT proC leu-6 trpE38 entA	Invitrogen
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	Selvagem, pMOL28, pMOL30, cromossomo 1, cromossomo 2	Mergeay et al (1985)
Plasmídeos	Características	Referência
pGEM®-T System	Vetor de clonagem comercial, lacZ, Amp ^R	Promega, Madison, W.I., EUA
pCM2	Sequência do peptídeo sinal, domínio de ancoragem do sistema de secreção da IgA protease de <i>N. gonorrhoeae</i> , promotor pan, antígeno E-tag e gene EC20sp	Biondo (2008)
pGEMT-Hg	Plasmídeo comercial pGEM®-T System contendo o gene merR do operon mer, do plasmídeo pMOL28 de <i>C. metallidurans</i> CH34 inserido no vetor	Este trabalho
pGEMT-As	Plasmídeo comercial pGEM®-T System contendo o gene arsR do operon ars, do cromossomo 1 de <i>C. metallidurans</i> CH34	Este trabalho
pCM-Hg	Plasmídeo pCM2 contendo o gene merR inserido entre as sequências gênicas do peptídeo sinal e antígeno E-tag.	Este trabalho
pCM-As	Plasmídeo pCM2 contendo o gene arsR inserido entre as sequências do peptídeo sinal e antígeno E-tag.	Este trabalho

4.3 Iniciadores de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados neste trabalho.

Os oligonucleotídeos empregados nas reações de PCR neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Iniciadores de PCR utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência de Oligonucleotídeos (Invitrogen®)	Anelamento (°C)	Amplicon Tamanho Esperado (pb)	Nome
<i>ars</i> -F* (20 pb)	5'TGCTCTAGAGCAATGGAAACCG AAAACGCTCT 3'	56	342	Obtenção do gene <i>arsR</i> do cromossomo 1 de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34
<i>ars</i> -R* (21 pb)	5'ACGCGTCGACGGACTCCGTAGC GACTGAACA 3'			
<i>mer</i> -F (27 pb)	5'TGCTCTAGAGCAATGGAAAAC AATTTGGAGAACCTGACC 3'	62	447	Obtenção do gene <i>merR</i> do plasmídeo pMOL30 de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34
<i>mer</i> -R (31 pb)	5'ACGCGTCGACAGGCATAGC CGAACCTGCCAAGCTT 3'			
pCM-F (18 pb)	5' ACGCGTCGACGGTGCGCCG GTG 3'	58	6.490	Obtenção do plasmídeo pCM2 destituído do gene EC20sp e Sequenciamento do cassete de expressão e ancoragem.
pCM-R (27 pb)	5' TGCTCTAGÁGCAGGCCGCGAG TAATAACAATCCAGC 3'			

* Zhang et al. (2009)

4.4 Anticorpos comerciais utilizados neste trabalho.

Os anticorpos comerciais empregados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Anticorpos comerciais utilizados neste trabalho.

Nome	Fornecedor	Características	Sequencia Primária de reconhecimento	Finalidade
Anticorpo Anti-E-tag	GE Life Sciences	-anticorpo sintético - primário, -anti-camundongo, - policlonal, - não conjugado, - isotipo IgG -anti-camundongo, - produzido em cabra.	Proteína E-tag GAPVPYPDPLEPR (13 aa)	Reconhecimento da fusão MerR/E-tag/ β -domínio e ArsR/E-tag/ β -domínio em imunoensaaios.
Anticorpo Conjugado com a peroxidase	Sigma-Aldrich®	-anticorpo de afinidade, -secundário, -anti-camundongo -policlonal, -conjugado com a peroxidase, -Isotipo IgG -produzido em cabra;	—	Reconhecimento da fusão proteica MerR/E-tag/ β -domínio e ArsR/E-tag/ β -domínio por “Western Blot”
Anticorpo Conjugado com FITC	Sigma-Aldrich®	-anticorpo de afinidade - molécula inteira, -secundário, -anti-camundongo -policlonal, -conjugado com o fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína), -Isotipo IgG -produzido em cabra;	—	Reconhecimento da fusão proteica MerR/E-tag/ β -domínio e ArsR/E-tag/ β -domínio por Microscopia de Fluorescência

4.5 Descrição dos plasmídeos

4.5.1 pGEM®-T System

O vetor comercial pGEM®-T (Promega) consiste em um plasmídeo linearizado, contendo um resíduo de timidina nas extremidades 3', para facilitar a ligação ao inserto obtido por PCR, que por sua vez, possui adeninas desemparelhadas na extremidade 3'. Apresenta alto número de cópias e múltiplos sítios de clonagem. Permite a rápida seleção dos clones

transformantes Amp^R , que carregam o plasmídeo com inserto, através da visualização de colônias brancas “Bluescript” quando o 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) e o isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) são adicionados ao meio sólido (Figura 12).

Figura 12 - Esquema representativo do vetor pGEM-T e múltiplo sítio de clonagem.

Vetor comercial linearizado com um resíduo de timidina nas extremidades 3', alto número de cópias, múltiplos sítios de clonagem, gene Amp^R e seleção dos transformantes através da visualização de colônias brancas “Bluescript”.

Fonte: Manual Promega®

4.5.2 pCM2

O plasmídeo pCM2 é um derivado dos plasmídeos pBBR1MCS (KOVACH et al., 1994) e pHE β (VEIGA et al., 2002). O pBBR1MCS (4.700 pb) (KOVACH et al., 1994) é um plasmídeo de amplo espectro para bactérias Gram-bactérias negativas, isolado da *Bordetella bronchiseptica*, médio número de cópias, contendo os genes Cm^R , Mob^+ e múltiplo sítio de clonagem construído a partir do pBluescript® II KS-lacZ (Stratagene, Santa Clara, C.A., EUA) (Figura 13). Este plasmídeo foi gentilmente Cedido pelo Prof. Dr. José Gregório C. Gómez do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Figura 13 - Figura esquemática do plasmídeo pBBR1MCS.

CM^R: gene de resistência a cloranfenicol; **MOB⁺**: gene de mobilização; **REP**: origem de replicação, **MCS**: múltiplo sítio de clonagem e **plac**: promotor do *operon* de lactose.

Fonte: Biondo (2008). Com permissão.

O plasmídeo pHE β (VEIGA et al., 2002) contém os genes Cm^R, a sequência sinal da IgA protease de *N. gonorrhoeae*, uma cauda de histidina, a sequência do epítipo E-tag e do β -domínio da IgA protease de *N. gonorrhoeae*. O cassete de ancoragem do pHE β encontra-se sob o comando do promotor *plac* de *E. coli* (Figura 14) e foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Angel Fernández Herrero do Centro Nacional de Biotecnologia de Madri, Espanha.

Figura 14 - Figura esquemática do plasmídeo pHE β .

CM^R: gene de resistência a cloranfenicol; **lacI**: gene codificador do repressor do promotor *plac*; **plac**: promotor do operon da lactose; **PS**: sequência do peptídeo sinal do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*; **6His**: sequência codificadora de seis resíduos de histidina; **E-tag**: epítipo e **IgA β** : sequência do β -domínio da via de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*.

Fonte: Biondo (2008). Com permissão.

A partir dos plasmídeos pBBR1MCS (KOVACH et al., 1994) e pHE β (VEIGA et al., 2002), o plasmídeo pCM2 foi contruído por noos grupo de pesquisa (Biondo 2008), contendo a sequência codificadora da fitoquelatina sintética EC20 (EC20sp) ladeada pelas sequências codificadoras do peptídeo sinal (PS) de *N. gonorrhoeae*, epítipo E-tag e β -domínio do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*. Esta fusão gênica no pCM2 está sob regulação de expressão do promotor do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis*, com modificações (*pan*) desenvolvido em nosso laboratório por Ribeiro-dos-Santos et al., (2010) (Figura 15).

Figura 15 - Figura esquemática da origem e características do plasmídeo pCM2 (BIONDO, 2008).

pan: promotor do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis*, com modificações; **EC20sp**: gene que codifica a fitoquelatina sintética EC20; **E-tag**: epitopo; e, **PS**: sequência do peptídeo sinal do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*; e **β-domínio**: sequência do β-domínio da via de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*.
Fonte: Biondo (2008). Com permissão.

4.6 Condições de cultivo de bactérias

As linhagens *C. metallidurans* CH34 foram cultivadas a 28 °C, sob agitação, em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific, Enfield, C.T., EUA). O meio de cultura utilizado foi o caldo nutriente (CN) (Difco, Franklin Lakes, N.J., EUA), conforme especificado pela coleção de culturas ou o meio mínimo TSM (Tris 6,06 g/L, NaCl 4,68 g/L, KCl 1,49 g/L, NH₄Cl 1,07 g/L, Na₂SO₄ 0,43 g/L, MgCl₂ x 6.H₂O 0,2 g/L, CaCl₂ x 2.H₂O 0,03 g/L, Na₂HPO₄ x 12.H₂O 0,23 g/L, Fe(III)(NH₄) citrato 0,005 g/L, gluconato de sódio 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, M.O., EUA) e 1 mL de solução de elementos traço SL7, conforme Mergeay et al. (1985). Para a seleção dos clones recombinantes, foram adicionados 230

µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) em caldo nutriente ou 130 µg/mL de cloranfenicol em meio TSM.

As bactérias *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) (Difco) a 28 °C no caso da linhagem UT5600 e a 37 °C para as linhagens DH5α, sob agitação. A seleção de transformantes foi realizada em meio suplementado com 25 µg/mL de cloranfenicol (pCM2 e derivados) ou 100 µg/mL de ampicilina (pGEMT e derivados).

Aos meios sólidos foram adicionados 2 % de ágar (Difco).

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 min. e os antibióticos, quando necessário, foram acrescentados nas concentrações adequadas para cada caso após resfriamento.

4.7 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600 a íons Hg²⁺

Para a análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600, empregou-se a técnica de Concentração Inibitória Mínima de crescimento (MIC).

Inicialmente, cada linhagem de *E. coli* foi cultivada em tubo de ensaio, contendo 3 mL de meio LB estéril, com o antibiótico cloranfenicol (25 µg/mL) (Sigma-Aldrich), quando necessário. Os pré-inóculos foram cultivados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 18 horas em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). A partir dos pré-inóculos crescidos, foi realizada uma diluição bacteriana (1:100) em meio de cultura LB estéril.

Simultaneamente, foram adicionados 1 mL de LB (Difco) estéril em uma sequência de tubos de ensaio. No último tubo contendo LB, adicionou-se mais 1 mL de solução estoque de 200 µM de cloreto de mercúrio (Sigma-Aldrich), preparada em água ultrapura estéril (Milli-Q) e submetida à filtração em membrana com poros de 0,22 µm (Sartorius). Foram realizadas diluições seriadas transferindo-se 1 mL de um tubo para o próximo, de modo a obter tubos de ensaio contendo LB, cuja concentração de HgCl₂ (Sigma-Aldrich) variou de 0 a 100 µM (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 µM de HgCl₂). Em cada tubo de ensaio contendo LB (Difco) nas diferentes concentrações de HgCl₂ (Sigma-Aldrich), foram adicionados 100 µL da diluição bacteriana previamente realizada (1:100). Os tubos de ensaio foram incubados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 18 horas. Após incubação, o crescimento bacteriano em cada tubo foi medido em termos de densidade óptica a 600 nm, em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, S.P., Brasil). As linhagens crescidas em meio LB (Difco) na

ausência de cloreto de mercúrio foram consideradas os controles positivos do experimento. Tubos contendo LB (Difco) com HgCl_2 (Sigma-Aldrich) sem bactérias inoculadas foram usados como controles negativos de ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* CH34 a íons Hg^{2+}

Para a análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* CH34, empregou-se a técnica de Concentração Inibitória Mínima de crescimento (MIC).

Inicialmente, cada linhagem de *C. metallidurans* foi cultivada em tubo de ensaio, contendo 3 mL de meio LB estéril, com o antibiótico cloranfenicol (130 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich), quando necessário. Os pré-inóculos foram cultivados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 24 horas em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). A partir dos pré-inóculos crescidos, foi realizada uma diluição bacteriana (1:100) em meio de cultura TSM estéril.

Simultaneamente, foram adicionados 1 mL de TSM estéril em uma sequência de tubos de ensaio. No último tubo contendo TSM, adicionou-se mais 1 mL de solução estoque de 100 μM de HgCl_2 (Sigma-Aldrich) preparada em água ultrapura estéril (Milli-Q) e submetida à filtração em membrana com poros de 0,22 μm (Sartorius). Foram realizadas diluições seriadas transferindo-se 1 mL de um tubo para o outro de modo que obteve-se tubos de ensaio contendo TSM com diferentes concentrações de HgCl_2 (Sigma-Aldrich), variando de 0 a 100 μM (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 μM de HgCl_2). Em cada tubo de ensaio contendo TSM nas diferentes concentrações de HgCl_2 (Sigma-Aldrich), foram adicionados 100 μL da diluição bacteriana previamente realizada (1:100). Os tubos de ensaio foram incubados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 24 horas. Após incubação, o crescimento bacteriano em cada tubo foi medido em termos de densidade óptica a 600 nm, em espectrofotômetro Micronal B582. As linhagens crescidas em meio LB na ausência de cloreto de mercúrio foram consideradas os controles positivos do experimento. Tubos contendo TSM com HgCl_2 (Sigma-Aldrich) sem bactérias inoculadas foram usados como controles negativos de ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600 a íons As^{5+}

A análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600 foi, realizada por MIC.

Cada linhagem de *E. coli* UT5600 foi cultivada em tubo de ensaio, contendo 3 mL de meio LB (Difco) estéril, com o antibiótico cloranfenicol (25 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich), quando necessário, a 28 °C, sob agitação a 220 rpm, em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). A partir dos pré-inóculos crescidos, foi realizada uma diluição bacteriana (1:100) em meio de cultura LB (Difco) estéril.

Simultaneamente, foram adicionados 1 mL de meio de cultura LB (Difco) em uma sequencia de tubos de ensaio devidamente identificados. No último tubo, adicionou-se mais 1 mL de solução estoque de 400 mM de arsenato de sódio (Sigma-Aldrich). Em seguida, adicionou-se 1 mL desta mistura ao próximo tubo de modo a realizar diluições seriadas, transferindo-se 1 mL de um tubo para o outro e obter tubos de ensaio contendo LB com diferentes concentrações de Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich), variando de 0 a 200 mM (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 M de Na_3AsO_2). Em cada tubo de ensaio contendo LB nas diferentes concentrações de Na_3AsO_4 , foram adicionados 100 μL da diluição bacteriana previamente realizada (1:100). Os tubos de ensaio foram incubados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 18 horas em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). Após incubação, o crescimento bacteriano em cada tubo foi medido em termos de densidade óptica a 600 nm, em espectrofotômetro Micronal B582. As linhagens crescidas em meio LB (Difco) na ausência de arsenato de sódio foram consideradas os controles positivos do experimento. Tubos contendo LB (Difco) com Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich) sem bactérias inoculadas foram usados como controles negativos de ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.10 Análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* CH34 a íons As^{5+}

A análise da resistência das linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* CH34 foi, realizada por MIC.

Cada linhagem de *C. metallidurans* foi cultivada em tubo de ensaio, contendo 3 mL de meio TSM estéril, com o antibiótico cloranfenicol (130 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich), quando necessário. Os pré-inóculos foram cultivados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 24 horas

agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). A partir dos pré-inóculos crescidos, foi realizada uma diluição bacteriana (1:100) em meio de cultura TSM estéril.

Em seguida, foram adicionados 2 mL de meio de cultura TSM contendo 1.000 mM de Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich) num primeiro tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de TSM estéril em uma série tubos de ensaio. Foram realizadas diluições seriadas transferindo-se 1 mL do tubo de 2 mL contendo 1000mM de Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich) para o próximo tubo de modo que obteve-se uma diluição seriada resultando em tubos contendo TSM com diferentes concentrações de Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich), variando de 0 a 1.000 mM (0; 8; 16; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1.000 M de Na_3AsO_4). Em cada tubo de ensaio contendo TSM nas diferentes concentrações de Na_3AsO_4 , foram adicionados 100 μL da diluição bacteriana previamente realizada (1:100). Os tubos de ensaio foram incubados a 28 °C, sob agitação (220 rpm), por 24 horas. Após incubação, o crescimento bacteriano em cada tubo foi medido em termos de densidade óptica a 600 nm, em espectrofotômetro Micronal B582. As linhagens crescidas em meio TSM na ausência de arsenato de sódio foram consideradas os controles positivos do experimento. Tubos contendo TSM com Na_3AsO_4 (Sigma-Aldrich) sem bactérias inoculadas foram usados como controles negativos de ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.11 Extração de DNA total de *C. metallidurans* CH34

O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi isolado conforme descrito por Taghavi et al. (1994). As células foram cultivadas em 15 mL de caldo nutriente por 18 h, a 28 °C, em incubadora Innova 4300 (New Brunswick Scientific), com agitação a 220 rpm, coletadas por centrifugação a 12.000 g, 5 min, a 4 °C em centrífuga refrigerada CF7D2 (Himac, Niagara Falls, O.N., Canada), ressuspensas com 5 mL de tampão E (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,9) e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão E e foram adicionados 2 mL de solução de lise fresca (Tris 40 mM, SDS 1 %, pH 12,6). A mistura foi incubada por 20 min, a temperatura ambiente, com agitação manual e, subsequentemente, incubada a 68 °C, por 75 min em banho-maria. Após incubação, foram adicionados 0,5 mL de NaCl 4 M e 8 mL de fenol-clorofórmio 1:1, saturado pH 4,8 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 30 min. Após centrifugação a 20.000 g, por 20 min, a 4 °C em ultracentrífuga MX 150/MX 120 (Sorvall, Newport Pagnell, Buckinghamshire, Inglaterra). Em seguida, foi realizada incubação por 2 h, em gelo. A fase aquosa foi transferida para outro tubo estéril. Foram

adicionados 2 mL de dietil éter (Merck). A fase superior foi descartada e o residual foi incubado por 20 min, a 37 °C em banho-maria até ser evaporado. Alíquotas de 1,8 mL da solução de DNA foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf e ultracentrifugadas por 3 h, a 50.000 g, a 4 °C. O sedimento de DNA foi lavado três vezes com 1,8 mL de etanol 70 % gelado, submetido a secagem à vácuo e ressuspensão em 100 µL de água estéril ultrapura.

4.12 Extração e purificação de plasmídeos

A extração e purificação de plasmídeos foram realizadas de acordo com Sambrook; Russell (2001). Para o isolamento de grandes quantidades de DNA, foi utilizado o protocolo de preparação de DNA em grande escala (partindo de 200 mL de cultura) e, para extração em pequena escala, foi utilizado o protocolo de mini-preparação (5 mL de cultura).

4.12.1 Preparação de DNA plasmidial em grande escala - 200 mL de cultura (Maxi-preparação)

Para a preparação do DNA plasmidial em grande escala, foi feito um pré-inóculo da bactéria portadora do plasmídeo desejado em 5 mL de meio de cultura apropriado, suplementado com o antibiótico de seleção adequado. O cultivo foi realizado a 28 °C para as linhagens selvagens ou recombinantes de *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34, e a 37 °C para o crescimento de células de *E. coli* DH5α, por 18 h, com agitação a 220 rpm em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). Todo o volume do pré-inóculo foi vertido em 200 mL do mesmo meio, contendo o antibiótico de seleção, no caso do crescimento de linhagens recombinantes, e cultivado nas mesmas condições anteriores. A cultura foi centrifugada por 10 min, a 4 °C, 6000 g em centrífuga refrigerada CF7D2 (Himac). O precipitado foi ressuspensão em 4 mL de solução 1 (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, dextrose 0,5 M) e a suspensão foi incubada por 15 min, a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 8,0 mL de solução 2 (NaOH 1 M, SDS 1 %) e a mistura foi incubada por 10 min, a temperatura ambiente. Foram adicionados 6,0 mL de solução 3 (ácido acético glacial 11,5 %, 60 % acetato de potássio 5 M), agitou-se manualmente e incubou-se por 10 min, a 4 °C. O material foi centrifugado por 15 min a 4 °C, 8000 g em centrífuga refrigerada CF7D2 (Himac). O sobrenadante foi recuperado e o precipitado descartado. Foram adicionados 12 mL de isopropanol, e incubou-se a solução por 10 min a temperatura ambiente. Novamente o

material foi centrifugado por 15 min, a 4 °C, 8000 g em centrífuga refrigerada CF7D2 (Himac). O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de água ultrapura estéril e foram adicionados 10 µL de RNase 10 mg/mL (Ribonuclease A – Sigm-Aldrich), seguido de incubação por 30 min, a 37 °C, em banho-maria. Foram adicionados 500 µL de fenol tamponado pH 4,8 e centrifugou-se por 5 min, a 4 °C, 10.000 g em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22. (Jouan Inc., Winchester, V.A., EUA) Transferiu-se a porção aquosa para outro tubo, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio (24:1, v/v saturado) (Merck) e foi realizada nova centrifugação por 5 min, 4 °C e 10.000 g em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22 (Jouan). Alíquotas de 500 µL da fase superior foram transferidas para novos microtubos. O DNA foi precipitado adicionando-se 50 µL de acetato de amônia 10 M e 1100 µL de etanol absoluto a 4 °C (Merck). Os microtubos foram incubados por 2 h, a 4 °C e centrifugados por 10 min, a 4 °C, 10.000 g em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22 (Jouan). O precipitado foi lavado com etanol 70 %, a 4 °C, seco e ressuspensão em 100 µL de água ultrapura estéril (Milli-Q).

4.12.2 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala - 5 mL (mini-preparação)

Para a preparação do DNA plasmidial em pequena escala, foi feito um inóculo da bactéria hospedeira do plasmídeo desejado, cultivada em 5 mL de meio de cultura apropriado, suplementado com o antibiótico de seleção, que foi cultivado por 18 h, a 28 ou 37 °C, sob agitação a 220 rpm em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). A cultura foi centrifugada por 2 min, a 8000 g, a 4 °C em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22 (Jouan). O precipitado foi ressuspensão em 300 µL de solução 1 (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, dextrose 0,5 M). Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução 2 (NaOH 1 M, SDS 1 %). A mistura foi mantida por 5 min, a temperatura ambiente. Foram adicionados 300 µL de solução 3 (ácido acético glacial 11,5 %, 60 % acetato de potássio 5 M) (Merck). A mistura foi incubada por 10 min, a 4 °C. O material foi centrifugado por 15 min, 4 °C e 10.000 g em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22 (Jouan). O sobrenadante foi recuperado e o precipitado descartado. Foram adicionados 10 µL de RNase 10 mg/mL (Ribonuclease A – Sigma-Aldrich), e realizada a incubação por 30 min, a 37 °C, em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) (Merck) agitou-se manualmente e repetidamente para a extração protéica e, novamente centrifugou-se por 2 min, a 4°C e 10.000 g em centrífuga refrigerada de bancada Jouan MR 18 22. A fase aquosa foi recuperada e 600 µL de isopropanol foram adicionados. Incubou-se

por 30 min, a temperatura ambiente e realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi lavado com etanol (Merck) 70 % gelado e, em seguida, ressuspenso em 20 µL de água ultrapura estéril (Milli-Q).

4.13 Análise eletroforética de DNA em gel de agarose 0,8 % e purificação de fragmentos

A análise dos tamanhos dos fragmentos de DNA e para a separação dos fragmentos de interesse, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8 % (0,8 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 1X), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8,0). As amostras de interesse contendo tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5 %; glicerol 50 % e EDTA 100 mM, pH 8,0), foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese contendo o tampão TBE 1X, durante 2 h, a 70 V e 25 mA. Posteriormente, o gel foi analisado por visualização das bandas em transluminador com luz ultravioleta a 365 nm e fotodocumentado em sistema *Eagle Eye II* (Eagle Eye Inc., Durham, N.C., EUA).

A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada por comparação das intensidades das bandas da amostra com as exibidas por DNA de fago γ (Promega) com concentração conhecida (50, 100 e 200 ng). O padrão de peso molecular utilizado foi o “Gene O’ruler DNA Ladder” 100-1000 pb (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, EUA).

O isolamento de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose foi realizado após a eletroforese, realizando-se a excisão da banda de interesse diretamente do gel, seguido de etapa de purificação utilizando-se o “Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

4.14 Clivagem dos plasmídeos e fragmentos de DNA com enzimas de restrição

A digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Todas as enzimas de restrição utilizadas foram da marca Fermentas.

4.15 Preparação de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes de *C. metallidurans* CH34 foram preparadas conforme Taghavi et al. (1994). Células de *C. metallidurans* CH34 foram cultivadas em 5 mL de meio

SOB (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10mM e KCl 2,5 mM) por 16 h, a 28 °C, sob agitação a 220 rpm em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). Em seguida, a cultura foi inoculada em 500 mL de meio SOB e o cultivo foi realizado nas mesmas condições anteriores, até atingir uma Absorbância a 660_{nm} (Abs_{660nm}) 0,8. As células foram coletadas por centrifugação durante 15 min, 6.000 g, a 4 °C em centrífuga refrigerada de bancada Jouan MR 18 22, ressuspensas em 200 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q) a 4 °C, contendo 10 % (v/v) de glicerol e novamente centrifugadas como previamente. O sedimento foi novamente submetido à etapa de lavagem com solução de glicerol 10 % estéril gelada. As células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10 %, aliquotadas em 40 µL em tubos do tipo Eppendorf e estocadas a -80 °C.

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e UT5600 foram preparadas conforme Sambrook; Russell (2001). Células de *E.coli* DH5α ou *E. coli* UT5600 foram cultivadas em 5 mL de LB por 16 h, a 28 ou 37 °C, respectivamente, sob agitação a 220 rpm, em agitador Innova 4300 (New Brunswick Scientific). Em seguida, esta cultura foi inoculada em 500 mL de meio LB o cultivo foi realizado a nas mesmas condições anteriores até atingir uma Absorbância a 600_{nm} (Abs_{600nm}) 0,5. As células foram coletadas por centrifugação a 4 °C, em centrífuga refrigerada de bancada Jouan MR 18 22, durante 15 min, a 6.000 g, ressuspensas em 250 mL de água ultrapura estéril contendo 10 % (v/v) de glicerol gelada, e novamente centrifugadas. Este procedimento foi repetido por mais três vezes. As células foram ressuspensas em 1 mL de solução de glicerol 10 % gelada, 40 µL foram aliquotados em tubos do tipo Eppendorf e estocados a -80 °C.

4.16 Transformação genética de bactérias por eletroporação

A transformação de *C. metallidurans* CH34 foi como descrito por Taghavi et al. (1994). O procedimento foi realizado em cubetas de 1,0 mL e equipamento eletroporador Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, C.A., EUA) com os seguintes ajustes: voltagem de 2,43 V, 200 ohms de resistência e 25 µF de capacitância. Utilizou-se cubetas de 1 mL próprias para o procedimento de eletroporação. Foram utilizados 50 ng de plasmídeo ou 0,5 µL de mistura de ligação diluídos, em 10 µL de água ultrapura estéril (Milli-Q), para cada 40 µL de células competentes retiradas 5 minutos antes do procedimento para serem descongeladas. O tubo do tipo Eppendorf, contendo a mistura de 40 µL de células e o DNA diluído em 10 µL foi incubado em gelo por 1 minuto e transferidos para cubeta de eletroporação gelada. A cubeta foi transferida e justada ao suporte do eletroporador e após o choque elétrico, as células foram

ressuspensas em 1 mL de meio SOC (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10mM e KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glicose 20 mM), incubadas por 1 h, a 220 rpm e 28 °C. Foram retiradas alíquotas de 50 µL da cultura em SOC que foram semeadas em meio sólido contendo o antibiótico de seleção cloranfenicol (230 µg/mL). As placas de Petri foram incubadas a 28 °C 18 h.

A transformação de linhagens *E. coli* foi realizada por eletroporação utilizando cubetas de 1,0 mL e eletroporador Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad) com os seguintes ajustes: voltagem de 2,5 V, 200 ohms de resistência e 25 µF de capacitância. Em cada cubeta, foram utilizados 200 ng de plasmídeo ou 2 µL de cada mistura de ligação para cada 40 µL de células competentes previamente descongeladas por 5 min. Após choque elétrico, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC, incubadas por 1 h, sob agitação a 100 rpm, a 28 °C, se *E. coli* UT5600 e a 37 °C, se *E. coli* DH5α. Foram retiradas alíquotas de 50, 100, 150 e 200 µL da cultura em SOC que foram semeadas em meio sólido contendo o antibiótico de seleção cloranfenicol (25 µg/mL para plasmídeos derivados de pCM ou ampicilina 100 µg/mL de para pGEMT e derivados) (Sigma-Aldrich). As placas de Petri foram incubadas a 28 °C ou 37 °C, por 18 h.

Cubetas contendo 40 µL de células competentes na ausência de DNA plasmidial ou misturas de ligação foram submetidas ao mesmo procedimento de eletroporação para controle negativo do experimento.

4.17 Obtenção dos genes *merR* e *arsR* de *C. metallidurans* CH34, destituído do códon de terminação de síntese proteica

O gene *merR* do *operon mer*, localizado no plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34 (GeneID:3170462), foi obtido por PCR destituído do códon de terminação *tag*, empregando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores *mer-F* e *mer-R*, desenhados neste trabalho, utilizando o programa DNA Star (Lasergene, Madinson, W.I., EUA). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se listadas na Tabela 8 (ver 4.2). 100 ng do DNA total de *C. metallidurans* (ver 4.11) foi utilizado como DNA molde nos ensaios de PCR. A melhor condição encontrada para amplificação do gene *mer* foi: 200 ng de DNA, tampão para PCR 1X, mistura de dNTP's contendo 0,5 mM de cada base nitrogenada (adenina, guanina, citosina e timina), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,3 µM do iniciador dianteiro (*mer-F*) "Foward", 0,3 µM do iniciador reverso (*mer-R*) "Reverse" e 2 unidades da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante,

diluídos em água ultrapura estéril para o volume final de 50 µL. Com exceção dos oligonucleotídeos, todos os reagentes e enzima utilizados na reação de PCR, foram adquiridos pela empresa Fermentas. A reação foi realizada em termociclador PTC-200 MJ Research (Bio-Rad) com desnaturação inicial a 94 °C, durante 2 min; 30 ciclos de 95 °C, por 45 s para desnaturação; 62 °C, por 30 s para o anelamento; 72 °C, por 1 min para a extensão da enzima polimerase e 72 °C por 10 min para extensão final. O amplicon obtido de 447 pb foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

O gene *arsR* (GeneID:4037120) do *operon ars*, localizado no cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34, foi obtido por PCR, destituído do códon de terminação *tga*, empregando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores *ars-F* e *ars-R* desenhado conforme descrito por Zhang et al. (2009) (Tabela 8 - ver 4.2). A reação de PCR foi realizada de acordo com Zhang et al. (2009) utilizando-se o DNA total de *C. metallidurans* CH34 como molde (ver 4.11). Todos os reagentes e enzima utilizados na reação foram adquiridos pela empresa Fermentas com exceção dos oligonucleotídeos que foram sintetizados pela Invitrogen. O amplicon obtido de 342 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

4.18 Clonagem do gene *merR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-Hg

O protocolo utilizado para a clonagem do gene *merR* obtido por PCR no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) seguiu as recomendações do fabricante. A mistura de ligação foi realizada em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL e consistiu na reação de ligação com volume final de 10,0 µL contendo 5,0 µL de tampão de ligação, 50 ng do vetor de clonagem pGEM-T (3000 pb), 14 ng do gene *merR*, previamente obtido por PCR (453 pb), 1,5 unidade de enzima T4 DNA ligase (Promega) e 2,5 µL de água livre de nucleases. A proporção molar utilizada entre vetor/inserto foi de aproximadamente 1/3. A mistura foi suavemente homogeneizada, incubada durante 1 hora em temperatura ambiente e incubada a 4°C, por 16 horas. A reação originou o plasmídeo denominado pGEMT-Hg com 3.447 pb (Figura 16).

Figura 16 – Representação da clonagem do gene *merR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-Hg.

Para a mistura de ligação utilizou-se 50 ng do vetor de clonagem pGEM-T (3000 pb) e 14 ng do gene *merR*, previamente obtido por PCR (453 pb), proporção molar vetor/inserto de aproximadamente 1/3. A reação originou o plasmídeo denominado pGEMT-Hg com 3.453 pb
Fonte: Parada (2012).

4.19 Clonagem do gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-As

O protocolo utilizado para a clonagem do gene *merR* obtido por PCR no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) seguiu as recomendações do fabricante. A mistura de ligação

foi realizada em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL e consistiu na reação de ligação com volume final de 10,0 µL contendo 5,0 µL de tampão de ligação, 50 ng do vetor de clonagem pGEM-T (3000 pb), 14 ng de gene *arsR* (342 pb), previamente obtido por PCR, 1,5 unidade de enzima T4 DNA ligase (Promega) e 22,3 µL de água livre de nucleases. A proporção molar utilizada entre vetor/inserto foi de aproximadamente 1/2. A mistura foi suavemente homogeneizada, incubada durante 1 hora em temperatura ambiente e incubada a 4°C, por 16 horas. A reação originou o plasmídeo denominado pGEMT-As com 3.342 pb (Figura 17).

Figura 17 – Representação da clonagem do gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pGEM-T (Promega): construção do plasmídeo recombinante pGEMT-As.

Para a mistura de ligação utilizou-se 50 ng do vetor de clonagem pGEM-T (3000 pb) e 14 ng do gene *arsR*, previamente obtido por PCR (342 pb), proporção molar vetor/inserto de aproximadamente 1/3. A reação originou o plasmídeo denominado pGEMT-As com 3.342 pb

Fonte: Parada (2012).

4.20 Ligação entre fragmentos de DNA

As ligações entre fragmentos de DNAs foram realizadas empregando-se uma enzima que catalisa a ligação fosfodiéster entre a terminação 5'-fosfato e a terminação 3'-hidroxi das fitas de DNA, promovendo a recircularização do plasmídeo, ou a ligação entre fragmentos de DNA. As concentrações de DNA utilizadas na mistura de ligação geralmente seguem a proporção molar 1/3 (vetor/inserto). As misturas de ligação foram realizadas neste trabalho com volume final de 10 µL, preparadas e incubadas empregando-se as recomendações do fabricante da enzima (Fermentas).

4.21 Obtenção do plasmídeo pCM2, que contém o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas

O vetor de expressão pCM2 sem inserto EC20sp foi obtido por amplificação por PCR empregando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores pCM-F e pCM-R, desenhados neste trabalho, utilizando o programa DNA Star (Lasergene), cujas sequencias estão apresentadas na tabela 8 (ver 4.2). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen®. O par de oligonucleotídeos iniciadores anela ao plasmídeo pCM2 (6.613 pb) (BIONDO, 2008-PI 0.801.282-2) e promove a amplificação do plasmídeo inteiro, com exceção da região que codifica a fitoquelatina sintética EC20, gene EC20sp (Figura 18). A melhor condição encontrada para a reação foi: 400 ng do DNA molde, plasmídeo pCM2, previamente extraído da bactéria recombinante *C. metallidurans* CH34/pCM2 (Biondo, 2008), tampão de PCR 1X, mistura de dNTP's contendo 0,2 mM de cada base nitrogenada, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM do iniciador dianteiro (pCM-F), 0,3 µM do iniciador reverso (pCM-R), DMSO 3 % e 2 unidades da enzima Long TaQ DNA Polimerase (Fermentas), diluídos em água ultrapura estéril, para o volume final de 50 µL. Com exceção dos oligonucleotídeos, todos os reagentes e enzima utilizados na reação foram adquiridos pela Fermentas®. A reação de PCR foi realizada em termociclador (PTC-200 MJ Research) utilizando desnaturação inicial a 94 °C, durante 2 min; 35 ciclos: 94 °C, por 30 s, para desnaturação; 58 °C, por 30 s, para anelamento; e 68 °C, durante 6 min para a extensão da enzima polimerase. O amplicon obtido, denominado plasmídeo pCM (6.490 pb), foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 18).

Figura 18 – Representação da obtenção do plasmídeo pCM2, que contém o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas.

O vetor de expressão pCM2 sem inserto EC20sp foi amplificado por PCR empregando-se o par de oligonucleotídeos pCM-F e pCM-R, que anela ao pCM2 (6.613 pb) e promove a amplificação do plasmídeo inteiro, com exceção da região que codifica a fitoquelatina sintética EC20. Para a reação, o plasmídeo pCM2, previamente extraído da bactéria recombinante *C. metallidurans* CH34/pCM2 (Biondo, 2008), foi utilizado como DNA molde.

Fonte: Parada (2012).

4.22 Subclonagem do gene *merR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pCM: construção do plasmídeo recombinante pCM-Hg

O gene *merR* de *C. metallidurans* CH34, flanqueado por sítios de reconhecimento para as enzimas *Xba*I e *Sal*I, obtido por amplificação por PCR (453 pb) (ver 4.17) foi purificado (ver 4.13) e inserido entre as timidinas adicionais presentes no plasmídeo pGEM-T (Promega), originando o plasmídeo pGEMT-Hg (3.453 pb) (ver 4.18) (Figura 16). A seleção

das colônias de *E. coli*, contendo o plasmídeo recombinante, foi efetuada pela resistência ao antibiótico ampicilina e pela coloração branca “Bluescript”. Em seguida, o plasmídeo pGEMT-Hg foi purificado (ver 4.12.1) e digerido com as endonucleases de restrição *XbaI/SalI* (ver 4.14) liberando o gene *merR* destituído do códon de terminação *tag*. Este fragmento foi purificado e quantificado (ver 4.13). O amplicon correspondente ao vetor pCM (6490 pb) foi submetido à digestão dupla com as enzimas *SalI* e *XbaI* (ver 4.14), purificado e quantificado (ver 4.13), gerando um vetor de expressão linear, contendo as mesmas extremidades coesivas do inserto (Figura 19).

Para a ligação entre o inserto *merR* e o vetor pCM foi realizada uma mistura com volume final de 20 µL contendo: 2 µL de tampão de ligação T4 ligase (Fermentas), 2 µL de polietilenoglicol (PEG) (Fermentas), 50 ng do plasmídeo, 15 ng de inserto (proporção vetor/inserto 1/3), 12,5 µL de água ultrapura estéril e 2,5 unidades de enzima T4 DNA ligase 10X (Fermentas). A mistura foi suavemente homogeneizada e incubada durante 1 h, a 37 °C, por 15 min a temperatura ambiente e, posteriormente, a 16 °C, por 16 h. A transformação genética em células eletrocompetentes de *E. coli*, linhagens DH5α, UT5600 e *C. metallidurans* CH34 foi realizada com 2 µL da mistura de ligação (ver 4.16). A seleção das colônias contendo o plasmídeo recombinante, denominado pCM-Hg (6.937 pb), foi efetuada pela resistência ao antibiótico cloranfenicol. A análise dos transformantes foi realizada por análise de restrição, PCR e sequenciamento para a confirmação da construção (Figura 19). As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

Figura 19 - Esquema da construção do plasmídeo pCM-Hg

A: O gene *merR*, sem o códon de terminação *tag*, (453 pb) foi removido de pGEMT-Hg (3.453 pb) por digestão com *XbaI* e *SalI*. B: O pCM (6.490 pb) foi pré-digerido com as mesmas enzimas, resultando num vetor de expressão linear com as mesmas extremidades coesivas do inserto de DNA. C: A ligação entre os fragmentos originou o plasmídeo pCM-Hg (6.937 pb).

Fonte: Parada (2012).

4.23 Subclonagem do gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34 no vetor pCM: construção do plasmídeo recombinante pCM-As

O gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34 (342 pb), flanqueado por sítios de reconhecimento para as enzimas *XbaI* e *SalI*, foi obtido por amplificação por PCR (ver 4.17). Após etapa de purificação (ver 4.13), o gene *arsR* (342 pb) foi inserido no plasmídeo pGEMT (Promega®), originando o pGEMT-As (3.342 pb) (Figura 17). A seleção das colônias contendo o plasmídeo recombinante foi efetuada pela resistência ao antibiótico ampicilina e pela coloração branca “Bluescript”. Em seguida, o plasmídeo pGEMT-As foi digerido com as endonucleases de restrição *XbaI*/*SalI* (ver 4.14) liberando o gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34, destituído do códon de terminação *tga*. Este fragmento foi purificado e quantificado (ver 4.13).

O plasmídeo pCM-Hg (6.943 pb), obtido neste trabalho (ver 4.22), foi submetido à digestão dupla com *SalI* e *XbaI* (ver 4.14), liberando o gene *merR* (453 pb) e resultando novamente no vetor pCM (6.490 pb) com mesmas extremidades coesivas. Para a ligação entre o inserto *arsR* (342 pb) e o vetor pCM (6.490 pb) foi realizada uma mistura com volume final de 20 µL contendo: 2 µL de tampão de ligação T4 ligase 10X (Fermentas), 2 µL de PEG (Fermentas), 50 ng do plasmídeo, 18 ng de inserto (proporção vetor/inserto de aproximadamente 1/3), 12,5 µL de água livre de nucleases e 2,5 unidades de enzima T4 DNA ligase (Fermentas). A mistura foi suavemente homogeneizada e incubada durante 1 hora, a 37 °C, por 15 minutos, a temperatura ambiente e, posteriormente, a 16 °C por 16 horas (Figura 20). A transformação genética em células eletrocompetentes de *E. coli*, linhagens DH5α, UT5600 e *C. metallidurans* CH34 (ver 4.16) foi realizada com 2 µL da mistura de ligação. A seleção das colônias contendo o plasmídeo recombinante, denominado pCM-As (6.832 pb), foi efetuada pela resistência ao antibiótico cloranfenicol. O plasmídeo foi isolado dos transformantes (ver 4.12.2) e submetido à análise de restrição, PCR e sequenciamento para a confirmação da construção. As reações de sequenciamento foram realizadas por Vanessa Naomi, no Centro de Estudos do Genoma Humano - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -

Figura 20 - Esquema da construção do plasmídeo pCM-As.

O gene *arsR*, sem o códon de terminação *tga* (342 pb), foi liberado do pGEMT-As (3.342 pb) por digestão com *XbaI* e *SalI*. O plasmídeo pCM-Hg (6.937 pb) foi pré-digerido com as mesmas enzimas resultando no plasmídeo linear pCM (6.490 pb) sem o inserto *merR* (453 pb). O gene *arsR* (342 pb) foi inserido no vetor pCM (6.490 pb), originando o pCM-As (6.832 pb).

Fonte: Parada (2012).

4.24 Expressão de proteínas recombinantes sob regulação do promotor constitutivo *pan*

Células *E. coli* UT5600, selvagem e recombinante, foram cultivadas a 28 °C, por 18 h, sob agitação a 220 rpm, em agitador Inova (New Brunswick Scientific), em 100 mL de meio

LB contendo 25 µg/mL de cloranfenicol, quando necessário. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g, 4 °C, por 10 min em centrífuga refrigerada himac CF7D2.

Linhagens de *C. metallidurans* selvagem e recombinante foram cultivadas a 28 °C, por 18 h, sob agitação a 180 rpm, em 100 mL de meio caldo nutriente contendo 230 µg/mL de cloranfenicol, quando necessário. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g, 4 °C, por 10 min.

4.25 Fracionamento de proteínas

A separação de proteínas de membranas foi realizada conforme Veiga et al. (1999), com modificações. As células coletadas por centrifugação tiveram o sedimento ressuspense em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8 (NaH₂PO₄ x H₂O) e foram lisadas por sonicação utilizando seis pulsos de 30 s, a 60 mA, em sonicador MA-103 (Marconi, Piracicaba, S.P., Brasil). As células não rompidas foram removidas por centrifugação a 5.000 g, por 5 min, a 4 °C, em centrífuga refrigerada de bancada Jouan MR 18 22. O sobrenadante foi centrifugado por 1 h, a 100.000 g, 4 °C, em ultracentrífuga Sorvall MX 150/MX 120, para recuperar a fração de proteínas de membrana. O sobrenadante foi considerado a fração solúvel (FS). O sedimento foi ressuspense em 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6.8 contendo 1,5 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e incubado por 30 min, a 4 °C. A solução foi submetida a ultracentrifugação por 30 min, 100.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi considerado a fração de membrana interna (MI) e o sedimento, a fração de membrana externa (ME).

4.26 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Sódio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE)

Para a análise de proteínas, o extrato total bacteriano foi analisado por eletroforese em gel de SDS-PAGE 15 % realizada como descrito por Laemmli (1970), utilizando-se placas de vidro de 8 x 10 cm e aparato Bio-Rad. Géis de separações de 15 % foram preparados na proporção acrilamida/bisacrilamida de 30:0,8 em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 contendo SDS 10 %, TEMED 0,15 % e persulfato de amônio 10 %. O gel superior para concentração das amostras foi preparado com acrilamida/bisacrilamida 45:1,2, na concentração final de 3 % em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8 contendo SDS 10 %, TEMED 0,05 %, e persulfato de amônio 10 %. As amostras foram ressuspensas, na proporção 1:2, em tampão de amostra (Tris-HCl 2 M, pH 6,8 contendo SDS 20 %, sacarose 40 %, azul de bromofenol 1 % e β-

mercaptoetanol 4 %). As amostras foram aquecidas a 95 °C, durante 5 minutos e aplicadas no gel em volume máximo de 20 µL. Os padrões de peso molecular utilizados foram o “Prestained Protein Weight Marker” (20-120 kDa) e “PageRuler Unstained Protein Ladder” (10-200 kDa) (Fermentas). O tampão de corrida foi o Tris 0,025 M contendo glicina 0,18 M e SDS 0,1 %. As corridas foram desenvolvidas a temperatura ambiente com duração de aproximadamente 2 horas, sob 100 V. Após a corrida, o gel foi retirado do suporte e submetido à coloração com “Comassie Brilliant Blue R250” (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, I.L., EUA). Para esta coloração utilizou-se solução contendo 0,2 g de “Coomassie Brilliant Blue R250”, metanol 40 % e ácido acético 10 %. Para a visualização das bandas, o gel foi incubado em solução descorante (metanol 40 %, ácido acético 10 %) por 18 h, a temperatura ambiente.

4.27 “Western Blotting”

As proteínas de interesse foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15 % (ver 4.26) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C Extra – GE Life Sciences, Piscataway, N.J.,EUA) em cuba Semi Dry – Bio-Rad, com tampão de transferência (metanol 20 %, Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,037 %), aplicando-se 30 mA e 50 W durante 18 horas. As proteínas imobilizadas na membrana foram bloqueadas com leite em pó Molico desnatado, 5 % em tampão PBS-K (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) sob incubação e agitação durante 18 horas, a 4 °C. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens com 50 mL de PBS-K contendo 0,05 % Tween 20, de 5 min cada. Para a detecção da proteína de interesse, a membrana foi incubada com 1 mg/mL de anticorpo anti-E-tag (ver 4.4 – tabela 9) em solução bloqueadora (PBS-K; 0,05 % Tween; 5 % leite em pó Molico desnatado) por 90 min, a temperatura ambiente, sob moderada agitação. Novamente, a membrana foi submetida a três lavagens com 50 mL de PBS-K contendo 0,05 % Tween 20, de 5 min cada. Adicionou-se o anticorpo secundário anti-camundongo IgG conjugado com a peroxidase (ver 4.4 – tabela 9) na concentração de 0,03 u/mL incubando a membrana por 90 min, a temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado com novo ciclo de três lavagens com PBS-K contendo 0,05 % Tween. A revelação foi realizada com o kit ECL plus (GE Life Sciences) de acordo com as especificações do fabricante e a membrana foi exposta a filme radiográfico (Kodak, São Paulo, S.P., Brasil), sendo este revelado através da utilização da solução reveladora (Kodak) e fixadora (Kodak).

4.28 Microscopia de fluorescência

As linhagens selvagens e recombinantes de *C. metallidurans* e *E. coli* foram cultivadas em 10 mL de meio mínimo TSM e meio completo LB, respectivamente, contendo antibiótico cloranfenicol na concentração adequada, quando necessário. As bactérias cresceram sob agitação de 220 rpm, a 28 °C, durante 16 h em agitador Inova (New Brunswick Scientific). 12 mL de cultura foram centrifugados por 5 min, a 10.000 g, 4 °C em centrífuga refrigerada de bancada Jouan MR 18 22 e o sedimento foi lavado três vezes com tampão PBS (NaCl 2,5 M, Na₂HPO₄ 10 mM, 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,6). As células foram ressuspensas em 50 µL de PBS e a mistura foi fixada em lâmina pela adição de solução de formaldeído 2 % (Merck) em quantidade suficiente para cobrir a lâmina. Em seguida, foi adicionada à lâmina, solução de bloqueio contendo BSA 5 % (Syngenic, São Paulo, S.P., Brasil) em PBS, seguido de incubação no escuro, durante 2 h, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi retirada e as lâminas foram incubadas durante 2 h com o anticorpo primário, anti-E-tag (GE Life Sciences) (ver 4.4 – tabela 9), diluído 1:250 em PBS. Foram realizadas três lavagens com PBS e, em seguida, as lâminas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário “goat anti-mouse IgG conjugated FITC” (Sigma-Aldrich) (ver 4.4 – tabela 9) diluído 1:500. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e submetidas à secagem a temperatura ambiente para análise em microscópio de fluorescência DM IRE2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), no laboratório de Genética - INSTITUTO BUTANTAN. As imagens foram capturadas com aumento de 1.000 X.

4.29 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Células de *E. coli* UT5600, das linhagens selvagem e recombinante, foram cultivadas em 50 mL de meio LB até atingir Abs_{600nm} 1,0 medida em espectrofotômetro Micronal B582. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 6.000 g por 5 min, a temperatura ambiente em centrífuga refrigerada himac CF7D2. O sedimento bacteriano de cada linhagem foi incubado em 50 mL de água ultrapura estéril contendo 500 µM de HgCl₂ ou 500 mM de Na₂AsO₄ durante 2 h, a temperatura ambiente e 220 rpm. Novamente, a solução foi centrifugada a 6.000 g por 5 min, a temperatura ambiente, em centrífuga refrigerada himac CF7D2.

Células de *C. metallidurans* CH34, das linhagens selvagem e recombinante, foram cultivadas em 50 mL de meio TSM até atingir Abs_{600nm} 1,5 medida em espectrofotômetro Micronal B582. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 6.000 g por 5 min, a

temperatura ambiente em centrífuga refrigerada himac CF7D2. O sedimento bacteriano de cada linhagem foi incubado em 50 mL de água ultrapura estéril contendo 500 μM de HgCl_2 ou 500 mM de Na_3AsO_4 , durante 2 h, a temperatura ambiente, com agitação a 220 rpm. Novamente, a solução foi centrifugada a 6.000 g por 5 min, a temperatura ambiente, em centrífuga refrigerada himac CF7D2.

Todos os sedimentos bacterianos foram submetidos a procedimentos para preparo de cortes histológicos. O preparo dos blocos de resina contendo os sedimentos bacterianos foi realizado por Gaspar Ferreira de Lima, no setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

A observação dos cortes histológicos foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Hitachi High Technologies America, Inc., Pleasanton, C.A., EUA), com aumento de (X 40K), no setor de Fotografia, do Instituto de Ciências Biomédicas, - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

4.30 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}

A bactéria foi pré-inoculada em tubos do tipo Erleymeier contendo 20 mL de meio de cultura adequado para cada linhagem. O cultivo foi realizado em agitador Inova (New Brunswick Scientific), a 28 °C, durante 18 h, a 220 rpm. Em uma segunda etapa, 20 mL do inóculo inicial foi vertido em 180 mL do mesmo meio de cultura em tubos do tipo Erleymeier onde obteve-se uma diluição bacteriana 1:10. O inóculo 1:10 foi cultivado nas mesmas condições iniciais até atingir o início da fase estacionária da bactéria em estudo. Em seguida, o inóculo foi vertido em garrafa própria para centrífuga refrigerada himac CF7D2 e as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante (meio de cultura), foi descartado. Após duas lavagens consecutivas com 30 mL de solução salina 0,1 % gelada para a retirada do meio de cultura residual, as células foram ressuspensas em 5 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q) e transferidas para tubos falcon de 50 mL. Adicionou-se no tubo falcon já contendo os 5 mL de água ultrapura estéril, mais 5 mL de solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2) 30 mM de modo que o volume final em cada falcon fosse 10 mL de solução HgCl_2 15 mM. A bactéria foi incubada, na presença de solução HgCl_2 15 mM, sob leve agitação, a temperatura ambiente, em diferentes tempos: 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min e 240 min. A viabilidade celular, após os diferentes tempos de incubação na presença de 4 ppm ($\mu\text{g/mL}$) de Hg^{2+} , foi analisada retirando-se alíquotas de 100 μL da amostra em cada tempo inicial (T0) e 100 μL ao término de cada incubação (T10, T30, T60, T120, T240). As

alíquotas foram plaqueadas em meio sólido na diluição 10^6 para facilitar a contagem de colônias. As colônias bacterianas em meio sólido foram crescidas em estufa, a 28 °C, por 18 h.

Após os diferentes tempos de incubação da bactéria na presença de solução HgCl_2 15 mM, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com solução salina 0,1 %, o sedimento final foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q) e liofilizado por 18 h. A massa seca obtida após cada tempo de incubação em 15 mM de HgCl_2 foi determinada por pesagem em balança analítica digital e 20 mg do peso seco foram submetidos ao processo de digestão. Para a digestão de cada amostra, foram adicionados 4 mL de ácido nítrico P.A saturado (Merck) bidestilado aos 20 mg de massa seca, seguido de incubação a temperatura ambiente por 18 horas. As amostras digeridas foram diluídas (1:10) com ácido nítrico P.A (Merck) bidestilado 20 % e analisadas em espectrômetro de absorção atômica a vapor frio, modelo Spectra AA 2201FS (Varina, Santa Clara, C.A., EUA), com lâmpada “hollow cathode lamp mercury” (Varian) sob a supervisão e colaboração do Prof. Dr. Jorge Sarkis e do Prof. Marcos Hotellani na Central de Laser e Aplicações do INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS NUCLEARES.

As análises da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+} pelas células microbianas foram realizadas com as linhagens recombinantes *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg como também com as bactérias selvagens *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34 que foram os controles negativos do experimento.

Todas as análises foram feitas em duplicatas.

4.31 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}

A bactéria foi pré-inoculada em tubos do tipo Erleyeier contendo 20 mL de meio de cultura adequado para cada linhagem. O cultivo foi realizado em agitador Inova (New Brunswick Scientific), a 28 °C, durante 18 h, a 220 rpm. 20 mL do inóculo inicial foi vertido em 180 mL do mesmo meio de cultura em tubos do tipo Erleyeier. O inóculo 1:10 foi cultivado nas mesmas condições iniciais até atingir o início da fase estacionária de cada bactéria em estudo e foi vertido em garrafa própria para centrífuga refrigerada himac CF7D2 onde as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante (meio de cultura), foi descartado e, após duas lavagens consecutivas com 30 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q) gelada para eliminar o meio de cultura residual, as células foram ressuspensas em 5 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q), sendo transferidas para tubos

falcon. Adicionou-se no falcon já contendo os 5 mL de água ultrapura estéril, mais 5 mL de solução de Na_3AsO_4 2 mM, de modo que o volume final no falcon fosse 10 mL de Na_3AsO_4 1 mM, solução contendo 31,2 ppm ($\mu\text{g/mL}$) de íons As^{5+} . A bactéria foi incubada, na presença de solução Na_3AsO_4 1 mM, sob leve agitação, a temperatura ambiente, em diferentes tempos: 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min e 240 min. A viabilidade celular, após os diferentes tempos de incubação na presença de Na_3AsO_4 1 mM, foi analisada retirando-se alíquotas de 100 μL da amostra em cada tempo inicial (T0) e 100 μL ao término de cada incubação (T10, T30, T60, T120, T240). As alíquotas foram plaqueadas em meio sólido, na diluição 10^6 , para facilitar a contagem de colônias. As colônias bacterianas em meio sólido foram crescidas em estufa, a 28 °C, por 18 h.

Após os diferentes tempos de incubação da bactéria em Na_3AsO_4 1 mM, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com água ultrapura estéril (Milli-Q), o sedimento final foi ressuspensão em 1 mL de água ultrapura estéril (Milli-Q) e liofilizado por 18 h. A massa seca obtida foi determinada por pesagem em balança analítica digital e 20 mg foram submetidos ao processo de digestão. Para a digestão de cada amostra, foram adicionados 4 mL de ácido nítrico P.A saturado (Merck) bidestilado aos 20 mg de massa seca, seguido de incubação a temperatura ambiente por 18 horas. As amostras digeridas foram diluídas (1:10) com ácido nítrico P.A (Merck) bidestilado 20 %, seguido de quantificação direta de íons As^{5+} na massa microbiana por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), modelo Spectro Cirrus CCD (Spectro, Kleve, Handelsregister, Alemanha) ao final dos diferentes períodos de incubação. A análise por ICP-AES foi realizada por Rebecca Yatsuzuka na Central Analítica do Instituto de Química - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

Os estudos de biorremediação com As^{5+} foram realizados com as linhagens recombinantes *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As como também com as bactérias selvagens *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34 que foram os controles negativos do experimento.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do gene *merR* do plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34

A figura 15 mostra a obtenção do gene *merR* (GeneID:3170462), sem o *códon* de terminação *tag*, do plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34. O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi extraído e purificado (ver 4.11) e visualizado em gel de agarose 0,8 % demonstrando o sucesso do procedimento (Figura 21A). O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi utilizado como molde para a amplificação do gene *merR* do plasmídeo pMOL28 de *C. metallidurans* CH34, destituído do *códon* de terminação *tag*. Após a reação de pCR para a amplificação do gene de interesse, o perfil eletroforético demonstrou a obtenção de um fragmento aparente de 453 pb com especificidade (Figura 21B). A figura 21C mostra a sequencia do gene *merR*, sem o *códon* de terminação da síntese proteica *tag*, confirmada por sequenciamento de DNA, podendo também ser observado o posicionamento do par de oligonucleotídeos *mer-F* (destacado em azul) e *mer-R* (destacado em vermelho), flanqueados por sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI* (sublinhado). O *códon* de iniciação da síntese proteica *atg* está destacado em *itálico* na sequencia gênica.

Figura 21 - Obtenção do gene *merR*, sem o códon de terminação tag, de *C. metallidurans* CH34.

A: O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi utilizado como DNA molde para amplificação do gene *merR* **B:** Amplicon com 453 pb visualizado em eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O marcador de tamanho molecular foi utilizado o “Gene O’Ruler 1 Kb Plus DNA ladder 50 ng/μL da Fermentas. **C:** Sequencia *merR*, sem o códon *tag*, amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos *mer-F* (azul) e *mer-R* (vermelho), flanqueada por sítios de restrição para *XbaI* e *SalI* (sublinhado). O códon de iniciação *atg* está destacado em itálico. Fonte: Parada (2012).

5.2 Obtenção do gene *arsR* de *C. metallidurans* CH34

A figura 22 mostra a obtenção do gene *arsR* (GeneID:4037120), sem o códon de terminação *tga*, do cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34. O DNA total de *C. metallidurans* CH34 (Figura 22A) foi utilizado como molde para a amplificação do gene *arsR* do cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34, destituído do códon de terminação *tga*. Após a reação de pCR para a amplificação do gene de interesse, o perfil eletroforético demonstrou a obtenção de um fragmento aparente de 342 pb, sem visualização de bandas inespecíficas (Figura 22B). A figura 22C mostra a sequencia do gene *arsR* confirmada por sequenciamento de DNA, sem o códon de terminação da síntese proteica *tga*, podendo também ser observado o posicionamento do par de oligonucleotídeos *ars-F* (destacado em azul) e *ars-R* (destacado

em vermelho) utilizados na reação de PCR, flanqueados por sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Xba*I e *Sal*I (sublinhado). O códon de iniciação da síntese proteica *atg* está destacado em itálico na sequência gênica.

Figura 22 - Obtenção do gene *arsR*, sem o códon de terminação *tga*, de *C. metallidurans* CH34.

A: O DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi utilizado como DNA molde para amplificação do *arsR* **B:** Amplicon com 342 pb visualizado em eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O marcador de tamanho molecular foi utilizado o “Gene O Ruler 1 Kb Plus DNA ladder 50 ng/μL da Fermentas. **C:** Sequência *arsR*, sem o códon *tga*, amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos *ars*-F (azul) e *ars*-R (vermelho), flanqueada por sítios de restrição para *Xba*I e *Sal*I (sublinhado). O códon de iniciação *atg* está destacado em itálico.

Fonte: Parada (2012).

5.3 Clonagem dos genes *merR* e *arsR*

Uma vez que os insertos de DNA obtidos por PCR possuem adeninas emparelhadas na extremidade 3', pela ação da Taq DNA Polimerase, os genes *merR* e *arsR* de *C. metallidurans* CH34 foram purificados, quantificados e inseridos no plasmídeo pGEM-T entre as timidinas adicionais das extremidades 3' do vetor de clonagem (ver 4.18 e 4.19). A mistura de ligação (ver 4.20) foi empregada na transformação genética (ver 4.16) da bactéria

eletrocompetente *E. coli* DH5 α (ver 4.15). Dentre as colônias Amp^R obtidas, foram selecionadas as colônias brancas (colônias contendo o plasmídeo com o inserto). O DNA plasmidial destas colônias foi isolado e digerido com as endonucleases de restrição *Xba*I, *Sal*I e *Xba*I/*Sal*I (ver 4.14). A análise dos perfis de migração em gel, submetido à eletroforese de agarose 0,8 %, permitiu verificar que houve a liberação dos fragmentos de DNA com tamanhos correspondentes aos genes *merR* (453 pb) e *arsR* (342 pb), indicando o sucesso da clonagem (Figuras 23A e 23B).

O vetor pGEM-T contendo o gene *merR*, sem o *códon* de terminação, foi denominado pGEMT-Hg (3.453 pb) (Figura 23A). O vetor pGEM-T, contendo o gene *arsR* sem o *códon* de terminação, originou o plasmídeo recombinante pGEMT-As (3.342 pb) (Figura 23B).

Figura 23 - Clonagem dos genes *merR* e *arsR*.

A: *merR* inserido no vetor pGEM-T, originando o plasmídeo pGEMT-Hg (3.453 pb). O pGEMT-Hg foi digerido com as *XbaI*, *SalI* e *XbaI/SalI*, resultando na liberação do fragmento de 453 pb. **B:** *arsR* inserido no vetor pGEM-T. O plasmídeo recombinante, denominado pGEMT-As (3.342 pb), foi digerido com *XbaI*, *SalI* e *XbaI/SalI*, resultando na liberação do fragmento de 342 pb. Resultados visualizados em gel de agarose 0,8 % **1:** 50 ng/μL de “Gene O’Ruler 1 Kb Plus DNA ladder” (Fermentas®) como marcador de tamanho molecular; **2:** plasmídeo circularizado; **3:** digestão com *XbaI*; **4:** digestão com *SalI*; **5:** digestão dupla com *XbaI/SalI*, com liberação do inserto de DNA.

Fonte: Parada (2012).

5.4 Obtenção do vetor de expressão (pCM) contendo o cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em bactérias Gram-negativas

O plasmídeo pCM2 (6.613 pb) foi extraído da bactéria *C. metallidurans* recombinante, capaz de expressar a proteína EC20 ancorada à superfície celular que foi previamente construída por nosso grupo (BIONDO, 2008 - PI 0.801.282-2) (ver 4.5 - Figura 15).

Para a obtenção de um vetor de expressão linearizado, de amplo espectro para bactérias Gram-negativas, contendo o completo cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas, o plasmídeo pCM2 foi extraído da bactéria *C. metallidurans*/pCM2

(BIONDO, 2008- PI 0.801.282-2) em grande escala (Figura 24A). Foram desenhados um par de oligonucleotídeos, pCM-F e pCM-R (Tabela 8 - ver 4.3), que permitisse a amplificação do plasmídeo pCM2 por PCR, destituído do gene que codifica a EC20sp (Figura 24B). Após a otimização das condições de reação, foi obtido um fragmento único e específico, com cerca de 6.490 pb, tamanho correspondente ao plasmídeo pCM2 na ausência do gene EC20sp, originando o vetor de expressão linear pCM (Figura 24C).

Figura 24 - Obtenção do vetor pCM.

A: Plasmídeo pCM2 (6.613 pb) extraído da bactéria *C. metallidurans*::pCM2. **B:** Esquema da amplificação do plasmídeo pCM2, destituído do gene que codifica EC20, empregando-se os oligonucleotídeos pCM-F e pCM-R. **C:** Obtenção do fragmento com 6.490 pb, originando o vetor de expressão pCM (pCM2 sem o gene EC20sp).

Fonte: Parada (2012).

5.5 Construção do plasmídeo pCM-Hg

O gene *merR* de 453 pb, destituído do códon de terminação *tag* e clonado no vetor pGEM-T, foi removido por digestão dupla com as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI*, gerando um inserto de DNA com extremidades coesivas (453 pb) (Figura 23A). O vetor de expressão linearizado pCM (6.490 pb) obtido por PCR, contendo o completo cassete para expressão e ancoragem de proteínas heterólogas (Figura 24), foi pré-digerido com as mesmas enzimas. Foi realizada a mistura de ligação do gene *merR* coesivo (453 pb) com o vetor pCM coesivo (6.490 pb), originando o plasmídeo recombinante pCM-Hg (6.937 pb) (Figura 25A). Esta

mistura foi empregada na transformação genética (ver 4.16) das bactérias *E. coli* linhagens DH5 α , UT5600 e de *C. metallidurans* CH34.

As colônias dos clones transformantes foram selecionadas por apresentarem resistência ao antibiótico cloranfenicol. Foram realizadas preparações plasmidiais (ver 4.12.2), sendo submetidas à análise de restrição com várias endonucleases de restrição (ver 4.14) para a seleção dos clones portadores do plasmídeo desejado. Os perfis de migração dos fragmentos liberados foram analisados em gel de agarose 0,8% e submetido à eletroforese (Figura 25B). A digestão com as enzimas *Kpn*I e *Sal*I liberou o fragmento correspondente aos genes codificadores das sequências E-tag/ β -domínio (1.368 pb) e o restante do plasmídeo (5.569 pb) (Figura 25, canaleta 2 e 3). A digestão dupla com as enzimas *Xba*I/*Sac*I liberou os fragmentos correspondentes à fusão *mer*R/E-tag/ β -domínio (1.821 pb), aos genes que codificam o promotor *pan*/peptídeo sinal (478 pb) e o restante da molécula (4.638 pb) (Figura 25, canaletas 4 e 5). A digestão com *Xba*I/*Sal*I liberou o gene *mer*R de 453 pb e o restante do plasmídeo, fragmento este com 6.484 pb (Figura 25, canaleta 6 e 7). O novo plasmídeo foi denominado pCM-Hg (6.937 pb).

Figura 25 - Análise de restrição do plasmídeo pCM-Hg.

A: Esquema do plasmídeo pCM-Hg (6.937 pb) e tamanho das sequências gênicas que codificam o gene *merR* e o cassete expressão-ancoragem. **B:** Análise eletroforética dos perfis de migração de fragmentos liberados na digestão do vetor pCM-Hg com várias enzimas: **1:** pCM-Hg circularizado (6.937 pb); **2 e 3:** pCM-Hg:*KpnI/SalI*; **4 e 5:** pCM-Hg:*XbaI/SacI*; **6 e 7:** pCM-Hg: *XbaI/SalI*; **8:** padrão de tamanho molecular “Gene O’ ruler DNA 1Kb Ladder” 50 ng/μL (Fermentas).

Fonte: Parada (2012).

Por fim, a construção gênica foi confirmada por sequenciamento de DNA, realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

5.6 Construção do plasmídeo pCM-As

O gene *arsR*, sem o códon de terminação *tga*, clonado no vetor pGEM-T foi removido por digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI*, gerando um inserto de DNA com extremidades coesivas de 342 pb. O plasmídeo pCM-Hg foi digerido com as mesmas enzimas, liberando o gene *merR* (453 pb) e resultando novamente no vetor de expressão linear, contendo o completo cassete de expressão e ancoragem de proteínas heterólogas, sem inserto, denominado pCM (6.490 pb). Foi realizada uma mistura de ligação do gene *arsR* (342 pb) com o vetor pCM (6.490 pb) (ver 4.20). O produto da reação de ligação, o plasmídeo

pCM-As (6.832 pb), foi empregado na transformação genética das bactérias *E. coli*, linhagens DH5 α , UT5600 e *C. metallidurans* CH34 (Figura 26A).

As colônias dos clones transformantes foram selecionadas em meio com antibiótico cloranfenicol. Foram realizadas preparações plasmidiais dos clones selecionados (ver 4.12.2) e estas foram submetidas à análise de restrição (ver 4.14). Os perfis de migração dos fragmentos liberados foram analisados em gel de agarose 0,8% por eletroforese (Figura 26B). A digestão com a enzima *SacI* liberou um fragmento de 2.188 pb, correspondente ao tamanho do cassete de expressão e ancoragem do gene *arsR* e outro correspondente ao restante do plasmídeo (4.644 pb) (Figura 26B, canaleta 3). A clivagem com as enzimas *KpnI* e *SalI* liberou o fragmento correspondente às sequências codificadoras dos genes β -domínio/E-tag (1368 pb) *arsR* e outro correspondente ao restante do plasmídeo (5.464 pb) (Figura 26B, canaleta 4). O plasmídeo digerido com *XbaI/SalI* liberou o gene *arsR* de 342 pb e o restante da molécula (6.490 pb) (Figura 26B, canaletas 5). A digestão dupla com as enzimas *XbaI/SacI* liberou o fragmento correspondente à fusão *arsR*/E-tag/ β -domínio (1.710 pb), o fragmento dos genes *pan*/peptídeo sinal (478 pb) e o restante do plasmídeo (4.644 pb) (Figura 26B, canaletas 6). O novo plasmídeo foi denominado pCM-As (6.832 pb). A canaleta 1 da figura 26 mostra o padrão de tamanho molecular “Gene O’ruler DNA 1Kb Ladder” 50 ng/ μ L (Fermentas).

Figura 26 - Análise de Restrição do plasmídeo pCM-As.

A: Plasmídeo pCM-As e tamanho dos fragmentos do cassete expressão-ancoragem da proteína ArsR. **B:** Análise eletroforética dos perfis de migração de fragmentos liberados na digestão do vetor pCM-As com várias enzimas: **1:** padrão de tamanho molecular "Gene O'ruler DNA 1Kb Ladder" 50 ng/μL (Fermentas®); **2:** pCM-As circularizado (6.832 pb); **3:** pCM-As/ScaI; **4:** pCM-As/KpnI/SalI; **5:** pCM-As/XbaI/SalI; **6:** pCM-As/XbaI/ScaI. Fonte: Parada (2012).

Por fim, a construção de pCM-As foi confirmada por sequenciamento de DNA, realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

5.7 Expressão e fracionamento das proteínas recombinantes

A expressão do cassete de ancoragem da proteína MerR, sob o comando do promotor *pan* (ver 4.24) foi avaliada nas linhagens *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34, selvagens e recombinantes, pela comparação do perfil protéico de cada linhagem em SDS-PAGE 15 % (ver 4.26) (Figura 27). A análise dos perfis de proteínas totais demonstrou que as linhagens recombinantes de *E. coli* UT5600/pCM-Hg (Figura 27A – canaleta 1) e de *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg (Figura 27B – canaleta 1) apresentaram banda adicional, com cerca de 62,4 kDa, correspondente à proteína de fusão β-domínio do sistema de secreção da IgA protease (45,2 kDa) (VEIGA et al., 2002), epitopo E-tag (1,4 kDa) e a proteína MerR (15,8 kDa). Os mesmos resultados não foram visualizados para as linhagens selvagens *E. coli* UT5600

(Figura 27A – canaleta 2) e *C. metallidurans* CH34 (Figura 27B – canaleta 2). O padrão de peso molecular utilizado foi o “Prestained Protein Marker” (20-120 kDa) 2 X 250 µL (Fermentas).

Figura 27 - Análise da expressão da proteína de fusão MerR/E-tag/β-domínio nas bactérias recombinantes *E. coli* e *C. metallidurans*.

Extrato de Proteínas Totais - SDS-PAGE 15 %

A: SDS-PAGE 15 %- proteínas totais de *E. coli* UT5600 e UT5600/pCM-Hg. **B:** SDS-PAGE 15 %- proteínas totais de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg. **1:** Extrato da bactéria recombinante. **2:** Extrato da bactéria selvagem; **3:** “Prestained Protein Marker” 20-120 kDa (Fermentas). Bactérias recombinantes apresentaram banda de 62,4 kDa, correspondente à fusão protéica MerR (15,8 kDa)/E-tag (1,4 kDa)/β-domínio (45,2 kDa) visualizada em SDS-PAGE 15 %. A seta indica a banda protéica de 62,4 kDa.

Fonte: Parada (2012).

Para comprovar a produção da proteína de fusão MerR/E-tag/β-domínio (62,5 kDa) e verificar se a proteína MerR estava sendo, de fato, ancorada à membrana externa da bactéria *E. coli* UT5600/pCM-Hg, o extrato de proteínas totais da linhagem selvagem e recombinante, foi fracionado em Fração Solúvel (FS) (Figura 28A – canaletas 1 e 2), Membrana Interna (MI) (Figura 28, canaletas 3 e 4) e Membrana Externa (ME) (Figura 28A, canaletas 5 e 6).

As canaletas de numeração ímpar (Figura 28A, canaletas 1, 3 e 5) correspondem ao fracionamento das proteínas provenientes da bactéria selvagem (*E. coli* UT5600).

As canaletas de numeração par (Figura 28A, canaletas 2, 4 e 6) mostram o fracionamento das proteínas provenientes da bactéria recombinante *E. coli* UT5600/pCM-Hg.

A análise eletroforética demonstra a presença de uma proteína de tamanho aparente de 62,4 kDa, peso molecular correspondente à fusão MerR/E-tag/ β -domínio, visualizada apenas na fração ME de *E. coli* UT5600/pCM-Hg (Figura 28A, canaleta 6).

A presença da proteína conjugada ao sistema de ancoragem previamente observada em SDS-PAGE foi confirmada por técnica “Western-blotting” (ver 4.27), utilizando-se anticorpo primário anti-E-tag e o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase (Tabela 9 - ver 4.4). O imunoensaio mostrou reatividade apenas na fração ME da *E. coli* UT5600/pCM-Hg (Figura 28B, canaleta 6). Em adição, a banda reativa apresentou peso molecular correspondente ao MerR/E-tag/ β -domínio (62,4 kDa) (Figuras 28B, canaleta 6).

Figura 28 - Fracionamento protéico de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg em SDS-PAGE 15 % e ensaio de “Western Blotting”.

LEGENDA:

- 1 - FS: Fração Solúvel - *E. coli* UT5600
 - 2 - FS: Fração Solúvel - *E. coli* UT5600/pCM-Hg
 - 3 - MI: Membrana Interna - *E. coli* UT5600
 - 4 - MI: Membrana Interna - *E. coli* UT5600/pCM-Hg
 - 5 - ME: Membrana Externa - *E. coli* UT5600
 - 6 - ME: Membrana Externa - *E. coli* UT5600/pCM-Hg
- (kDa) “PageRuler Unstained Protein Ladder” 10-200 kDa (Fermentas)

A: SDS-PAGE: FS: Fração Solúvel. MI: Membrana Interna; ME: Membrana Externa. **1:** FS *E. coli* UT5600; **2:** FS *E. coli* UT5600/pCM-Hg; **3:** MI *E. coli* UT5600; **4:** MI *E. coli* UT5600/pCM-Hg; **5:** ME *E. coli* UT5600; **6:** ME *E. coli* UT5600/pCM-Hg. A seta indica a proteína de 62,4 kDa sendo produzida apenas na ME da *E. coli* UT5600/pCM-Hg. O marcador de peso molecular utilizado foi o “PageRuler Unstained Protein Ladder” 10-200 kDa (Fermentas). **B: “Western Blotting”:** A seta indica a reatividade da banda protéica de 62,4 kDa na ME da *E. coli* UT5600/pCM-Hg.

Fonte: Parada (2012).

Para comprovar a produção da proteína de fusão MerR/E-tag/ β -domínio (62,5 kDa) e verificar se a proteína MerR estava sendo, de fato, ancorada à membrana externa da bactéria *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, o extrato de proteínas totais da linhagem selvagem e recombinante, foi fracionado em Fração Solúvel (FS) (Figura 29A – canaletas 1 e 2),

Membrana Interna (MI) (Figura 29, canaletas 3 e 4) e Membrana Externa (ME) (Figura 29A, canaletas 5 e 6).

As canaletas de numeração ímpar (Figura 29A, canaletas 1, 3 e 5) correspondem ao fracionamento das proteínas provenientes da bactéria selvagem (*C. metallidurans* CH34).

As canaletas de numeração par (Figura 29A, canaletas 2, 4 e 6) mostram o fracionamento das proteínas provenientes da bactéria recombinante *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg.

A análise eletroforética demonstra a presença de uma proteína de tamanho aparente de 62,4 kDa, peso molecular correspondente à fusão MerR/E-tag/ β -domínio, visualizada apenas na fração ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg (Figura 29A, canaleta 6).

A presença da proteína conjugada ao sistema de ancoragem observada em SDS-PAGE foi confirmada por técnica “Western-blotting” (ver 4.27), utilizando-se anticorpo primário anti-E-tag e anticorpo secundário conjugado com a peroxidase (Tabela 9 - ver 4.4). O imunoensaio mostrou reatividade apenas na fração ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg (Figura 29B, canaleta 6). A banda reativa apresentou peso molecular correspondente ao MerR/E-tag/ β -domínio (62,4 kDa) (Figuras 29B, canaleta 6). Os resultados alcançados foram similares para as bactérias *E. coli*/pCM-Hg (Figura 28A e 28B) e *C. metalidurans* CH34/pCM-Hg (Figura 29A e 29B), indicando sucesso na construção molecular e na produção correta da fusão proteica de interesse em ambas as recombinantes.

Figura 29 - Fracionamento protéico em SDS-PAGE de proteínas de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg e ensaio de “Western Blotting”.

LEGENDA:

- 1 - FS: Fração Solúvel - *C. metallidurans* CH34
- 2 - FS: Fração Solúvel - *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg
- 3 - MI: Membrana Interna - *C. metallidurans* CH34
- 4 - MI: Membrana Interna - *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg
- 5 - ME: Membrana Externa - *C. metallidurans* CH34
- 6 - ME: Membrana Externa - *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg
- 7 - “PageRuler Unstained Protein Ladder” 10-200 kDa (Fermentas)

A: SDS-PAGE: FS: Fração Solúvel. MI: Membrana Interna; ME: Membrana Externa. **1: FS** *C. metallidurans* CH34; **2: FS** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg; **3: MI** *C. metallidurans* CH34; **4: MI** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg; **5: ME** *C. metallidurans* CH34; **6: ME** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg. A seta indica a proteína de 62,4 kDa sendo produzida apenas na ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg. **B: “Western Blotting”:** A seta indica a reatividade da banda protéica de 62,4 kDa na ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg. Os marcadores de peso molecular utilizado foram o “Prestained Protein Marker” 20-120 kDa e “PageRuler Unstained Protein Ladder” 10-200 kDa (Fermentas).

Fonte: Parada (2012).

A expressão do cassete de ancoragem da proteína ArsR, sob o comando do promotor *pan*, também foi avaliada nas linhagens *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34, selvagens e recombinantes, pela comparação do perfil do extrato protéico de cada linhagem em SDS-PAGE 15 % (ver 4.26) (Figura 30). A análise dos perfis de proteínas totais demonstrou que as linhagens recombinantes de *E. coli* UT5600/pCM-As (Figura 30A) e de *C. metallidurans* CH34/pCM-As (Figura 30B) apresentaram uma banda adicional, de aproximadamente 58 kDa, indicada pela seta na figura 30, correspondente à proteína de fusão β -domínio do sistema de secreção da IgA protease (45,2 kDa) (VEIGA et al., 2002), epitopo E-tag (1,4 kDa) e a proteína ArsR (11,4 kDa). (Figuras 30A e 30B). Estes resultados indicam que a proteína de fusão está sendo produzida pelas linhagens recombinantes.

Figura 30 - Análise da expressão da proteína de fusão ArsR/E-tag/ β -domínio nas bactérias recombinantes *E. coli* e *C. metallidurans*.

Extrato de Proteínas Totais - SDS-PAGE 15 %

A: SDS-PAGE 15 % de proteínas totais de *E. coli* UT5600 e UT5600/pCM-As. **B:** SDS-PAGE 15 % de proteínas totais de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As. **1:** Extrato total da bactéria recombinante. **2:** Extrato total da bactéria selvagem; **3:** “Prestained Protein Marker” 20-120 kDa (Fermentas), utilizado como padrão de peso molecular. Bactérias recombinantes apresentaram banda aparente com 58 kDa, correspondente à fusão protéica ArsR (15,8 kDa)/E-tag (1,4 kDa)/ β -domínio (45,2 kDa) visualizada em SDS-PAGE 15 %. A seta indica a banda protéica de 58 kDa

Fonte: Parada (2012).

Para comprovar a produção da proteína de fusão ArsR/E-tag/ β -domínio (58 kDa) e verificar se a proteína ArsR estava, de fato, ancorada na membrana externa da bactéria *C. metallidurans*/pCM-As, as proteínas do extrato total (ET) das linhagens selvagem e recombinante (Figura 31A, canaletas 1 e 2, respectivamente), foi fracionado em proteínas provenientes da Fração Solúvel (FS), Membrana Interna (MI) e Membrana Externa (ME), sendo visualizados em SDS-PAGE 15 % (Figura 31).

As canaletas de numeração ímpar (Figura 31, canaletas 1, 3, 5 e 7) apresentam proteínas do extrato total (ET) e o fracionamento proteico (FS, MI e ME) das proteínas da bactéria *C. metallidurans* CH34 selvagem.

As canaletas de numeração par (Figura 31A, canaletas 2, 4, 6 e 8) mostram o extrato total (ET) e o fracionamento (FS, MI e ME) das proteínas provenientes da bactéria *C. metallidurans* CH34/pCM-As.

Uma proteína de tamanho aparente de 58 kDa, peso molecular correspondente à fusão ArsR/E-tag/ β -domínio foi detectada apenas na fração de proteínas totais (ET) (Figura 31A, canaleta 2) e entre as proteínas da membrana externa (ME) de *C. metallidurans*/pCM-As (Figura 31A, canaleta 8).

A presença da proteína conjugada ao sistema de ancoragem foi confirmada através de técnica de “Western-blotting” (ver 4.27), utilizando-se anticorpo primário anti-E-tag e o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase (Tabela 9 - ver 4.4). O imunoensaio mostrou reatividade apenas nas frações ET e ME de *C. metallidurans*/pCM-As (Figura 31B, canaleta 8). No ensaio de “Western blotting”, utilizando-se o anticorpo anti-E-tag, a banda reativa apresentou peso molecular correspondente ao ArsR/E-tag/ β -domínio, cerca de 58 kDa, confirmando o sucesso da construção gênica, com consequente expressão da proteína de interesse.

Figura 31 - Análise do fracionamento protéico de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34 /pCM-As.

LEGENDA:

kDa - "Prestained Protein Marker" 20-120 (Fermentas®)
 1 - ET: Extrato total - *C. metallidurans* CH34
 2 - ET: Extrato total - *C. metallidurans* CH34/pCM-As
 3 - FS: Fração Solúvel - *C. metallidurans* CH34
 4 - FS: Fração Solúvel - *C. metallidurans* CH34/pCM-As
 5 - MI: Membrana Interna - *C. metallidurans* CH34
 6 - MI: Membrana Interna - *C. metallidurans* CH34/pCM-As
 7 - ME: Membrana Externa - *C. metallidurans* CH34
 8 - ME: Membrana Externa - *C. metallidurans* CH34/pCM-As
 kDa - "PageRuler Unstained Protein Ladder" 10-200 kDa (Fermentas®)

A: SDS-PAGE: 1: ET *C. metallidurans* CH34; 2: ET *C. metallidurans* CH34/pCM-As; 3: FS de *C. metallidurans* CH34; 4: FS de *C. metallidurans* CH34/pCM-As; 5: MI de *C. metallidurans* CH34; 6: MI de *C. metallidurans* CH34/pCM-As; 7: ME de *C. metallidurans* CH34; 8: ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-As. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o "Prestained Protein Marke" 20-120 kDa e o "PageRuler Unstained Protein Ladder" 10-200 kDa (Fermentas). A seta indica a proteína de 58 kDa sendo produzida apenas na ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-As. **B: "Western Blotting":** A seta indica que houve reatividade em banda protéica de 58 kDa presente na ME de *C. metallidurans* CH34/pCM-As.

Fonte: Parada (2012).

Resultados silimares foram obtidos para a bactéria *E. coli* UT5600/pCM-As (Figura 32A e 32 B). O fracionamento das proteínas totais de *E. coli* UT5600 selvagem e recombinante foi analisado por SDS-PAGE 15 %. O perfil eletroforético permitiu a visualização de banda protéica com, aproximadamente, 58 kDa apenas nas proteínas da fração da ME da *E. coli* UT5600/pCM-As (Figura 32A, canaleta 7). O imunoensaio (ver 4.27) mostrou reatividade em banda localizada na mesma posição visualializada em SDS-PAGE, com peso molecular correspondente à proteína de fusão ArsR/E-tag//β-domínio (58 kDa) (Figura 32B, canaleta 7). As setas negras indicam a fusão de 58 kDa sendo produzida apenas na ME de *E.coli* UT5600/pCM-As. Os resultados demonatrados confirmam o sucesso da construção gênica, com conseqüente expressão de ArsR/E-tag/β-domínio.

Figura 32 - Análise do fracionamento protéico de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600 /pCM-As. **LEGENDA:**

- 1 - "Prestained Protein Marker" 20-120 (Fermentas)
- 2 - FS: Fração Solúvel - *E. coli* UT5600
- 3 - FS: Fração Solúvel - *E. coli* UT5600/pCM-As
- 4 - MI: Membrana Interna - *E. coli* UT5600
- 5 - MI: Membrana Interna - *E. coli* UT5600 /pCM-As
- 6 - ME: Membrana Externa - *E. coli* UT5600
- 7 - ME: Membrana Externa - *E. coli* UT5600 /pCM-As
- 8 - "PageRuler Unstained Protein Ladder" 10-200 kDa (Fermentas)

A: SDS-PAGE: 1: "Prestained Protein Marker" 20-120 kDa; 2: FS *E. coli* UT5600; 3: FS *E. coli* UT5600/pCM-As; 4: MI *E. coli* UT5600; 5: MI *E. coli* UT5600/pCM-As; 6: ME *E. coli* UT5600; 7: ME *E. coli* UT5600/pCM-As; 8: o "PageRuler Unstained Protein Ladder" 10-200 kDa (Fermentas). A seta indica a proteína de 58 kDa sendo produzida apenas na ME de *E. coli* UT5600/pCM-As. **B: "Western Blotting":** A seta indica que houve reatividade em banda protéica presente na ME de *E. coli* UT5600/pCM-As.

Fonte: Parada (2012).

5.8 Caracterização das linhagens recombinantes por microscopia de fluorescência

A análise da funcionalidade do sistema de ancoragem, tanto *C. metallidurans* CH34, quanto *E. coli* UT5600, carregando os plasmídeos recombinantes pCM-Hg e pCM-As, foi realizada em microscópio de fluorescência (ver 4.28). Para este ensaio, utilizou-se anticorpo primário anti-E-tag (GE Life Sciences) e anticorpo secundário anti-camundongo FITC conjugado para a emissão de fluorescência (Tabela 8 - ver 4.4). As imagens capturadas com aumento de 1.000 X permitiram a observação do transporte do epítipo E-tag para a membrana externa das células recombinantes, através da detecção de sinal verde fluorescente emitida após reação de reconhecimento específica entre antígeno e anticorpo (Figuras 33B, 33C, 33E e 33F). As linhagens não recombinantes foram utilizadas como controles negativos do experimento e não apresentaram reatividade (Figuras 33A e 33D). Os resultados mostram que o sistema de ancoragem de proteínas heterólogas está sendo funcional.

Figura 33 - Microscopia de Fluorescência de células bacterianas selvagens e recombinantes (aumento de 1.000 X).

A: *C. metallidurans* CH34; **B:** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg; **C:** *C. metallidurans* CH34/pCM-As. **D:** *E. coli* UT5600; **E:** *E. coli* UT5600/pCM-Hg; **F:** *E. coli* UT5600/pCM-As. O transporte do epitopo E-tag para a membrana externa das células recombinantes foi confirmado através da detecção de sinal verde fluorescente na superfície bacteriana. Linhagens não recombinantes foram utilizadas como controles negativos do experimento e não apresentaram reatividade.

Fonte: Parada (2012).

5.9 MET das bactérias *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg na presença de íons Hg^{2+}

Para analisar a capacidade de ligar íons mercúrio, as células *E. coli* UT5600 carregando o plasmídeo pCM-Hg foram visualizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para tanto, células da linhagem selvagem (*E. coli* UT5600) e recombinante (*E. coli* UT5600/pCM-Hg) foram cultivadas até o início da fase estacionária e incubadas por 2 horas na presença de 500 μM de $HgCl_2$ (ver 4.29).

As imagens capturadas por MET (x 40K) demonstraram que, células de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg cultivadas na presença de mercúrio apresentaram alterações de membrana, além de coloração citoplasmática escurecida (Figura 34B e 34D).

A formação de agregados ligados à membrana externa da bactéria foi observada somente para a linhagem recombinante tratada com 500 μM de $HgCl_2$. (Figura 34D).

Nenhuma modificação foi visualizada nas linhagens selvagens ou recombinantes tratadas somente com água ultrapura estéril (Milli-Q) que foram os controles negativos do experimento (Figura 34 – painéis A e C).

Figura 34 - MET de cortes histológicos de células de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg cultivadas na presença de 500 μM de HgCl_2 . Aumento de 40.000 X sem contração.

→ Agregados ligados à membrana externa

→ Coloração citoplasmática escurecida

A: *E. coli* UT5600 incubada água; **B:** *E. coli* UT5600 incubada em 500 μM de HgCl_2 ; **C:** *E. coli* UT5600/pCM-Hg incubada em água. **D:** *E. coli* UT5600/pCM-Hg incubada em 500 μM de HgCl_2 . As setas vermelhas indicam agregados de Hg^{2+} ligados na membrana externa bacteriana. As setas azuis indicam a precipitação citoplasmática de Hg^{2+} . Nenhuma alteração foi visualizada na *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg incubadas com água.

Fonte: Parada (2012).

Os mesmos procedimentos foram realizados para as bactérias *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg (ver 4.29) e as imagens capturadas por MET demonstraram resultados semelhantes (Figura 35). *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, cultivadas na presença de mercúrio, apresentaram alterações de membrana, além de coloração citoplasmática escurecida (figura 35 B e 35D). A formação de agregados ligados à membrana externa da bactéria foi observada somente para a linhagem recombinante tratada com 500 μM de HgCl_2 . (Figura 35D).

Figura 35 - MET de cortes histológicos de células de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg cultivadas na presença de 500 μM de HgCl_2 . Aumento de 40.000 X sem contrastação.

→ Agregados ligados à membrana externa
 → Coloração citoplasmática escurecida

A: *C. metallidurans* CH34 incubada água; **B:** *C. metallidurans* CH34 incubada em 500 μM de HgCl_2 ; **C:** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg incubada em água. **D:** *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg incubada em 500 μM de HgCl_2 . As setas vermelhas indicam agregados de Hg^{2+} ligados na membrana externa bacteriana. As setas azuis indicam a precipitação citoplasmática de Hg^{2+} . Nenhuma alteração foi visualizada na *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg incubadas com água.

Fonte: Parada (2012).

5.10 MET das bactérias *E. coli*UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As na presença de íons As^{5+}

Para analisar a capacidade de ligar íons mercúrio, as células *E. coli* UT5600 carregando o plasmídeo pCM-As foram visualizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para tanto, células da linhagem selvagem (*E. coli* UT5600) e

recombinante (*E. coli* UT5600/pCM-As) foram cultivadas até o início da fase estacionária e incubadas por 2 horas na presença de 500 mM de Na_3AsO_4 (ver 4.29).

As imagens capturadas por MET (x 40K) demonstraram que, células de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-AS cultivadas na presença de arsenato de sódio apresentaram alterações de membrana, contudo menos significativas quando comparadas às células expostas ao mercúrio. Também foram observadas coloração citoplasmática escurecida (Figura 36B e 36D).

A formação de agregados ligados à membrana externa da bactéria foi observada somente para a linhagem recombinante tratada com 500 mM de Na_3AsO_4 (Figura 36D). Nenhuma modificação foi visualizada nas linhagens selvagens ou recombinantes tratadas somente com água ultrapura estéril (Milli-Q) que foram os controles negativos do experimento (Figura 36A e 36C).

Figura 36 - MET de cortes histológicos de células de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-As cultivadas na presença de 500 mM de Na_3AsO_4 . Aumento de 40.000 X sem contrastação.

- Agregados ligados à membrana externa
→ Coloração citoplasmática escurecida

A: *E. coli* UT5600 incubada água; **B:** *E. coli* UT5600 incubada em 500 mM de Na_3AsO_4 ; **C:** *E. coli* UT5600/pCM-As incubada em água. **D:** *E. coli* UT5600/pCM-As incubada em 500 mM de Na_3AsO_4 . As setas vermelhas indicam agregados de As^{5+} ligados na membrana externa bacteriana. As setas azuis indicam a precipitação citoplasmática de As^{5+} . Nenhuma alteração foi visualizada na *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-As incubadas com água.

Fonte: Parada (2012).

Os mesmos procedimentos foram realizados para as bactérias *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As (ver 4.29) e as imagens capturadas por MET demonstraram resultados semelhantes (Figura 37). O escurecimento citoplasmático foi detectado em ambas as linhagens tratadas com arsenato de sódio (Figura 37B e 37D). A formação de agregados ligados à membrana externa da bactéria foi observada somente para a *C. metallidurans* CH34/pCM-As tratada com 500 mM de Na_3AsO_4 . (Figura 37D).

Figura 37 - MET de cortes histológicos de células de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg cultivadas na presença de 500 mM de Na_3AsO_4 . Aumento de 40.000 X sem contrastação.

A: *C. metallidurans* CH34 incubada água; **B:** *C. metallidurans* CH34 incubada em 500 mM de Na_3AsO_4 ; **C:** *C. metallidurans* CH34/pCM-As incubada em água. **D:** *C. metallidurans* CH34/pCM-As incubada em 500 mM de Na_3AsO_4 . As setas vermelhas indicam agregados de As^{5+} ligados na membrana externa bacteriana. As setas azuis indicam a precipitação citoplasmática de As^{5+} . Nenhuma alteração foi visualizada na *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As incubadas com água.

Fonte: Parada (2012).

5.11 Análise da resistência bacteriana das linhagens selvagem e recombinante em meio a íons Hg^{2+}

Foram avaliadas as resistências a íons mercúrio inorgânico Hg^{2+} nas linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600. Após o crescimento das culturas, foi realizada a leitura da $\text{Abs}_{600\text{nm}}$. A MIC de HgCl_2 para *E. coli* UT5600 foi 25 μM , indicando que esta bactéria apresenta uma elevada resistência natural a íons Hg^{2+} (Figura 38A). A linhagem

recombinante *E. coli* UT5600/pCM-Hg apresentou a MIC de 50 μM , um aumento da capacidade de sobrevivência 100 % superior à da linhagem selvagem (Figura 38B). Ainda a figura 38C demonstra a representação gráfica para melhor comparação do crescimento bacteriano entre as linhagens *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg em meio a íons Hg^{2+} .

Os ensaios foram realizados em triplicata, apresentando sempre os mesmos perfis.

Figura 38 - MIC das linhagens *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg na presença de HgCl_2 .

A: A MIC para *E. coli* UT5600 foi 25 μM . **B:** A MIC para *E. coli* UT5600/pCM-Hg foi 50 μM . A bactéria portadora do plasmídeo pCM-Hg apresentou aumento de 100 % na sua capacidade de sobrevivência em meio contendo Hg^{2+} . **C:** Representação gráfica do ensaio de MIC para comparação do crescimento bacteriano em meio contendo HgCl_2 entre as linhagens *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg.

Fonte: Parada (2012).

A MIC das linhagens *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg também foram estudadas frente a íons Hg^{2+} . Após o cultivo bacteriano, foi realizada leitura de $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ (ver 4.8). A linhagem *C. metallidurans* CH34 apresentou a MIC de 12,5 μM (Figura 39A). A linhagem recombinante *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg apresentou a MIC de 25 μM , indicando um aumento da capacidade de sobrevivência na presença de mercúrio 100 % superior quando comparada à linhagem selvagem (Figura 39B). A Figura 39C demonstra a

representação gráfica do crescimento bacteriano em meio a íons Hg^{2+} de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de MIC.

Os ensaios foram feitos em triplicata, apresentando sempre os mesmos perfis.

Figura 39 - MIC das linhagens *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg na presença de HgCl_2 .

A: A MIC de HgCl_2 para *C. metallidurans* CH34 foi 12,5 µM. **B:** A MIC de HgCl_2 para *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg foi 25 µM, indicando elevação de 100 % na capacidade de sobrevivência da linhagem hospedeira do plasmídeo pCM-Hg. **C:** Representação gráfica do crescimento bacteriano para comparação entre *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg em meio a íons Hg^{2+} .

Fonte: Parada (2012).

5.12 Análise da resistência bacteriana das linhagens selvagem e recombinante em meio a íons As^{5+}

A resistência a íons arsênio As^{5+} foi avaliada na linhagem selvagem *E. coli* UT5600 e recombinante *E. coli* UT5600/pCM-As. Após o cultivo, foi realizada a leitura em $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ (ver 4.9). A MIC de Na_3AsO_4 para *E. coli* UT5600 foi 25 mM (Figura 40A). A linhagem recombinante *E. coli* UT5600/pCM-As apresentou a MIC de 50 mM, indicando aumento da capacidade de sobrevivência 100 % superior em relação à linhagem selvagem (Figura 40B). A

Figura 40C demonstra a representação gráfica do crescimento bacteriano em meio a íons As^{5+} de acordo com os resultados de MIC.

Os ensaios foram feitos em triplicata, apresentando sempre os mesmos perfis.

Figura 40 - MIC das linhagens *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-As na presença de Na_3AsO_4 .

A: A MIC de Na_3AsO_4 para *E. coli* UT5600 foi 25 μM . **B:** A MIC de Na_3AsO_4 para *E. coli* UT5600/pCM-As foi 50 μM , indicando aumento de 100 % na capacidade de sobrevivência da bactéria hospedeira do plasmídeo pCM-As. **C:** Representação gráfica do crescimento bacteriano na presença de Na_3AsO_4 para comparação entre *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-As.

Fonte: Parada (2012).

A MIC das linhagens *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As também foram estudadas. Após o cultivo foi realizada leitura da $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ (ver 4.10). A MIC de Na_3AsO_4 para *C. metallidurans* CH34 foi de 500 mM, indicando elevada resistência ao arsenato (Figura 41A). A MIC de *C. metallidurans*/pCM-As foi > 1000 mM, indicando aumento da capacidade de sobrevivência aos íons As^{5+} superior a 100 % (Figura 41B). A Figura 41C demonstra a representação gráfica do crescimento bacteriano em meio a íons As^{5+} de acordo com os resultados de MIC.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata, apresentando sempre os mesmos perfis.

Figura 41 - MIC das linhagens *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As na presença de Na_3AsO_4 .

A: A MIC de Na_3AsO_4 para *C. metallidurans* CH34 foi 500 mM. **Painel B:** A MIC de Na_3AsO_4 para *C. metallidurans* CH34/pCM-As foi > 1000 mM, indicando aumento maior que 100 % na capacidade de sobrevivência em sítios poluídos com íons As^{5+} . **C:** Representação gráfica do crescimento bacteriano na presença de Na_3AsO_4 para comparação entre *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As. Fonte: Parada (2012).

5.13 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}

Os experimentos para a análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+} foram realizados de forma a quantificar o metal diretamente na massa microbiana das linhagens hospedeiras do plasmídeo pCM-Hg após 0, 10, 30, 60, 120, e 240 min de incubação em solução de água ultrapura estéril (Milli-Q) contendo 15 μM de HgCl_2 ou 4 ppm (mg/L) de íons Hg^{2+} . As análises também foram feitas com as linhagens não modificadas que foram os controles negativos do experimento. A determinação de Hg^{2+} foi feita por espectrometria de absorção atômica a vapor frio como descrito em Material e Métodos (ver 4.30).

Os resultados de quantificação de íons Hg^{2+} na massa microbiana de *E. coli* UT5600, pré-incubada em 15 μM de HgCl_2 , 4 ppm de Hg^{2+} , por diferentes tempos mostraram que a cepa selvagem possui a capacidade natural de ligar até 0,12 mg/L de Hg^{2+} (6052,25 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) após 30 minutos de exposição. A *E. coli* UT5600, hospedeira do plasmídeo pCM-Hg adsorveu 0,27 mg/L de Hg^{2+} (13422,50 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) nos primeiros 10

minutos de incubação. Além do aumento da velocidade de ligação com o metal, o acúmulo de Hg^{2+} na bactéria recombinante foi três vezes superior nos primeiros 10 minutos (Figura 42).

Figura 42 - Adsorção de mercúrio pelas linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600 em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).

A concentração residual de mercúrio nas células está demonstrada em partes por milhão. **A:** mg de Hg²⁺/L de água **B:** µg de Hg²⁺/g de peso seco. A *E. coli* UT5600/pCM-Hg foi capaz de ligar até 0,27 mg/L de Hg²⁺ (13422,50 µg de Hg²⁺/g de peso seco) pós 10 minutos, demonstrando capacidade 3 vezes superior em adsorver íons Hg²⁺ quando comparada à linhagem selvagem.

Fonte: Parada (2012).

A capacidade natural de quelar mercúrio também foi verificada na bactéria *C. metallidurans* CH34, demonstrando que, a bactéria selvagem possui capacidade natural de quelar cerca de 0,13 mg/L de Hg^{2+} (6297,00 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), em 10 minutos. No mesmo, período, a recombinante apresentou habilidade em bioacumular 0,28 mg/L (13963 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), correspondendo a um aumento duas vezes superior. Já a *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg adsorveu 0,38 mg/L (19115,75 $\mu\text{g/g}$) após 240 min (4 h) de incubação, que foi o período máximo estudado (Figura 43).

Figura 43 - Adsorção de mercúrio pelas linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).

A concentração residual de mercúrio nas células está demonstrada em partes por milhão. **A:** mg de Hg^{2+} /L de água **B:** μg de Hg^{2+} /g. de peso seco. A *C. metallidurans* CH34 selvagem adsorveu o máximo de 0,13 mg de Hg^{2+} /L de água contaminada (6297 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) em 10 min. A *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, no mesmo período foi capaz de ligar até 0,28 mg/L (13963 μg /g) de Hg^{2+} . Após 240 min de incubação, *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg foi capaz de quelar 0,38 mg/L de Hg^{2+} (19115,75 μg de Hg^{2+} /g de peso seco).

Fonte: Parada (2012)

Comparando-se os dados obtidos para ambas as recombinantes *E. coli* UT560/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, verificou-se que, nos primeiros 10 minutos, a bactéria *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg demonstrou capacidade semelhante de adsorção em relação a *E. coli* UT5600/pCM-Hg, ao ligar 0,27 mg/L de Hg^{2+} (13422, 50 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) (Figura 42). Em adição, observa-se que, em *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, a adsorção de mercúrio continua aumentando em relação ao tempo de incubação, alcançando índices de 0,38 mg/L de íons Hg^{2+} (19115,75 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), em 4 h que foi o tempo máximo analisado (Figura 44).

Figura 44: Comparação entre *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg em relação à capacidade conferida em adsorver íons Hg^{2+} do meio externo.

Nos primeiros 10 minutos, a bactéria *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg demonstrou capacidade semelhante de adsorção em relação a *E. coli* UT5600/pCM-Hg. Entretanto, em *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, a adsorção de mercúrio continua aumentando em relação ao tempo de incubação, alcançando índices de 0,38 mg/L (19115,75 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), em 4 h que foi o tempo máximo analisado.

Em ambos os casos a viabilidade celular não foi alterada após o cultivo em solução água ultrapura estéril (Milli-Q) contendo 15 μM de HgCl_2 .

5.14 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}

Os experimentos para a análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+} foram realizados de forma a quantificar o metalóide diretamente na massa microbiana das linhagens hospedeiras do plasmídeo pCM-As após 0, 10, 30, 60, 120, e 240 min em solução de água

ultrapura estéril (Milli-Q) contendo 1 mM de Na_3AsO_4 ou 31,2 ppm (mg/L) de íons As^{5+} . A determinação de As^{5+} foi feita por ICP-AES, como descrito em Material e Métodos (ver 4.31).

Os resultados da quantificação de arsênio pentavalente na massa microbiana das linhagens *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-As, estão apresentados na Figura 45, onde a concentração residual de arsenato nas células está demonstrada em partes por milhão de As^{5+} .

Os resultados de quantificação de íons As^{5+} na massa microbiana pré-incubada em 1 mM de Na_3AsO_4 , 31,2 ppm (mg/L) de As^{5+} , por diferentes tempos mostraram que a cepa não modificada possui capacidade natural de ligar até 0,37 mg/L de As^{5+} (18500 μg de As^{5+} /g de peso bacteriano). A *E. coli* UT5600/pCM-As foi capaz de ligar até 6,63 mg/L de As^{5+} (331500 μg de As^{5+} /g de peso seco) em 4 h, demonstrando habilidade 18 vezes superior em remover As^{5+} do meio externo (Figura 45).

Figura 45 - Adsorção de arsênio pentavalente pelas linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* UT5600 em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).

A: A concentração residual de arsênio está demonstrada em mg de As^{5+} /L de água contaminada. **B:** A concentração residual de arsênio está demonstrada em μg de As^{5+} /g de peso seco bacteriano. A *E. coli* UT5600/pCM-As foi capaz de ligar até 6,63 mg/L de Hg^{2+} (331500 μg de As^{5+} /g de peso seco) em 4 h, demonstrando habilidade 18 vezes superior em remover As^{5+} do meio externo.

Fonte: Parada (2012).

Os resultados da quantificação de arsênio pentavalente na massa microbiana das linhagens *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As, estão apresentados na Figura 46, onde a concentração residual de arsenato nas células está demonstrada em partes por milhão de As^{5+} .

Os dados obtidos durante a determinação de íons As^{5+} na massa microbiana pré-incubada em 1 mM de Na_3AsO_4 , 31,2 ppm (mg/L) de As^{5+} , por diferentes tempos, demonstrou que, como na *E. coli*, a linhagem não modificada possui a capacidade natural de ligar até 0,37 mg/L de íons As^{5+} (18500 μg de As^{5+} /g de peso). A bactéria recombinante foi capaz de bioacumular 22,28 mg/L de As^{5+} (1114000 μg de As^{5+} /g de peso seco) após 240 min (4 h), demonstrando habilidade em adsorver íons arsenato do meio externo cerca de 60 vezes superior quando comparada à cepa selvagem, no mesmo período de tempo (Figura 46).

Figura 46 - Adsorção de arsênio pentavalente pelas linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* CH34 em diferentes tempos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min).

A: A concentração residual de arsênio está demonstrada em mg de As^{5+} /L de água contaminada. **B:** A concentração residual de arsênio está demonstrada em μg de As^{5+} /g de peso seco bacteriano. A *C. metallidurans* CH34/pCM-As foi capaz de ligar até 22,28 mg/L de As^{5+} (1114000 μg de As^{5+} /g de peso seco) em 4 h, demonstrando habilidade 18 vezes superior em remover As^{5+} do meio externo.

Fonte: Parada (2012).

A *E. coli* UT5600/pCM-As foi capaz de ligar até 6,63 mg/L de As^{5+} (331500 μg de As^{5+} /g de peso seco) em 4 h. A bactéria *C. metallidurans*, carregando o mesmo plasmídeo recombinante, adsorveu 22,28 mg/L de As^{5+} (1114000 μg de As^{5+} /g de peso seco) após igual período de incubação, apresentando eficiência cerca de três vezes superior quando comparada à bactéria *E. coli* recombinante. Em ambas as bactérias recombinantes, observa-se a adsorção crescente de arsênio durante a cinética de tempo estabelecida em até 4 h (Figura 47).

Figura 47: Comparação entre *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As em relação à capacidade conferida em adsorver íons As^{5+} do meio externo.

A *E. coli* UT5600/pCM-As foi capaz de ligar até 331500 μg de As^{5+} /g de peso seco em 4 h. A bactéria *C. metallidurans*, carregando o mesmo plasmídeo recombinante, adsorveu 1114000 μg de As^{5+} /g de peso seco após igual período de incubação, apresentando eficiência cerca de três vezes superior.

O tempo de incubação na presença de Na_3AsO_4 não influenciou na captação iônica, que se manteve constante, em ambas as linhagens não modificadas.

A viabilidade celular de todas as bactérias estudadas não foi alterada após o cultivo em solução contendo 1 mM de Na_3AsO_4 .

6 DISCUSSÃO

6.1 A bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34

A forma dos microrganismos interagirem com os íons de metais pesados potencialmente tóxicos depende, em parte, do fato de serem eucariotos ou procariotos. Os eucariotos são mais sensíveis à toxicidade de metais do que as bactérias.

A presença de concentrações tóxicas de metais pode ativar inúmeros mecanismos de resistência, como por exemplo: produção de peptídeos da família de proteínas ligadoras de metais, regulação da concentração intracelular de alguns metais pesados, expressão de proteínas transportadoras de complexos ligante-metal e efluxo de íons metálicos por canais iônicos presentes na parede celular (VALLS; LORENZO, 2002).

Em bactérias, estes mecanismos de tolerância são inúmeros, sendo, na maioria dos casos, codificados por plasmídeos (VALLS; LORENZO, 2002). Portanto, neste trabalho, optamos por desenvolver um sistema que permita a ancoragem e expressão de peptídeos com capacidade para quelar de íons específicos na superfície celular bacteriana. Este sistema seria introduzido numa bactéria que oferecesse potencial significativo para ser empregada como hospedeira dos plasmídeos recombinantes aqui construídos e para a possível utilização das bactérias hospedeiras do dito plasmídeo em processos de biorremediação.

Inicialmente, a bactéria de escolha foi *C. metallidurans* CH34, pois tem sido relatada como uma bactéria altamente resistente a ampla gama de íons metais pesados tóxicos quando comparada a outras bactérias, demonstrando, segundo a literatura, características potenciais para o emprego em processos de biorremediação de efluentes que contenham tanto diversidades de metais pesados, como contaminação por íons específicos (MERGEAY et al., 1985; NIES, 2000; MERGEAY et al, 2003). Entretanto, o sistema para adsorção de íons Hg^{2+} e As^{5+} construído neste trabalho foi primeiramente testado na bem conhecida bactéria *E. coli* e, para nossa surpresa, foi observado um potencial significativo desta bactéria em quelar estes íons potencialmente tóxicos. Por este motivo, resolvemos apresentar os resultados obtidos com *E. coli* e compará-los com os visualizados para *C. metallidurans*. Destaca-se, no entanto, que o sistema por nós desenvolvido apresenta amplo espectro para bactérias Gram-negativas, possibilitando o emprego do dito sistema em outras bactérias da mesma classe.

6.2 Engenharia genética de bactérias para utilização na biorremediação de mercúrio e arsênio

Várias estratégias têm sido desenvolvidas utilizando a tecnologia do DNA recombinante a fim de produzir linhagens bacterianas melhoradas geneticamente para utilização em processos de biorremediação. Muitas consistem em “equipar” a parede celular bacteriana com polipeptídeos de alta afinidade a íons metálicos, geralmente ricos em cisteína, fusionados a domínios de ancoragens. Os polipeptídeos frequentemente utilizados são as metalotioneínas, fitoquelatinas naturais ou sintéticas e glutathione (SOUZA et al., 1998; BAE et al., 2001; BAE et al., 2002; BAE et al., 2003). Peptídeos como a fitoquelatina sintética EC20, apresentam capacidade de imobilizar ampla diversidade de metais pesados do meio externo; entretanto, a mesma eficiência não é visualizada para a captação do íon de mercúrio (BIONDO, 2008- PI 0.801.282-2). Ainda, por possuírem um número muito elevado de cisteína posicionadas em suas estruturas primárias, estes peptídeos não possuem seletividade, tornando-se inviáveis para a utilização na remoção e reciclagem de íons metálicos específicos.

Sabe-se que o mercúrio é um dos metais pesados mais tóxicos e que, ainda, é lançado em grandes quantidades na natureza, resultante de atividades industriais. Tal fato motivou-nos a desenvolver este projeto que visa, em parte, a construção de um microrganismo especialmente desenhado para a biorremediação de íons Hg^{2+} .

Na tentativa de desenvolver uma bactéria engenheirada para a descontaminação específica de mercúrio, resolvemos utilizar o que a natureza nos oferece. Como já dito na introdução deste trabalho (ver 2.6.1), muitas bactérias adquirem resistência a metais pesados realizando a produção metabólica de proteínas de transporte e enzimas que agem na detoxificação celular (NIES, 1999; SILVER; PHUNG, 2005). Esses mecanismos de resistência são altamente específicos e são ativados apenas na presença de determinado metal. A especificidade destes sistemas é controlada por proteínas regulatórias que ativam circuitos genéticos (*operons*), com alta afinidade, em níveis submolares.

A proteína regulatória MerR é 90% conservada entre as espécies, sendo codificada pelo gene *merR*, localizado no *operon mer* de bactérias que possuem o mecanismo de detoxificação de íons Hg^{2+} (SHEWCHUK et al., 1989; RALSTON; O'HALLORAN, 1990). Apresenta elevada afinidade e especificidade de ligação a íons Hg^{2+} , mesmo na presença de outros metais pesados, com uma seletividade não visualizada em outros peptídeos ricos em resíduos de cisteínas (ZENG et al., 1998; BAE et al., 2001).

Estudos relatam que a proteína MerR demonstra ser um dímero e uma molécula separada pelo domínio de ligação com DNA, localizado na porção N-terminal e o domínio de ligação com o metal, na porção C-terminal. Sua capacidade efetiva de ligar especificamente íons Hg^{2+} ocorre pela presença de cisteínas, geralmente apenas três, localizadas nas posições Cys82, Cys117 e Cys126 da molécula. Entretanto, estudos relatam que resíduos localizados entre as posições 80-128 contêm informação estrutural suficiente para a formação do sítio de ligação de íons Hg^{2+} . Estes aminoácidos formam uma coordenação trigonal onde o motivo de ligação com íons de Hg^{2+} ocorre pela interação (-SH) entre os resíduos Cys117 e Cys126 de um monômero, com o resíduo Cys82 de outro (WRIGHT, J.G. et al., 1990a; WRIGHT, J.G. et al., 1990b; SONG et al., 2004; QIN et al., 2006) (Figura 48).

Figura 48 - Predição da estrutura tridimensional da proteína MerR.

A: Estrutura cristalográfica da proteína CueR (CHANGUELA et al., 2003), que possui elevada similaridade com proteínas da família MerR. Um monômero da molécula está indicado em cinza e a hélice de dimerização em vermelho. O sítio de ligação com DNA está representado em azul escuro. O sítio de ligação com o metal está representado em roxo e o Hg^{2+} em ciano. **B:** Predição da estrutura terciária tridimensional da proteína MerR e a ligação do íon Hg^{2+} , representado em preto, ao sítio específico. Um monômero está indicado em verde e o outro em ciano. **C e D:** Predição da estrutura terciária tridimensional da proteína MerR após rotação de 90°.

Fonte: Modificado de Wright, J.G. et al. (1990a). Com permissão.

Neste trabalho, para a construção de bactérias desenhadas para a biorremediação específica de íons mercúrio, optamos por realizar a ancoragem da proteína MerR de *C. metallidurans* CH34 na superfície celular, empregando para isto, o mecanismo de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae*.

A proteína MerR de *C. metallidurans* CH34, codificada pelo gene *merR*, localizado no plasmídeo pMOL30, por nós utilizada, possui 144 aminoácidos, 15,8 kDa e o sítio de ligação com íons Hg^{2+} compreende quatro cisteínas localizadas nas posições Cys82, Cys115, Cys117 e Cys126 da sequência primária da molécula (Quadro 1).

Quadro 1 - Sequência da proteína MerR de *C. metallidurans* CH34, codificada pelo gene *merR*, localizado no plasmídeo pMOL28.

10	20	30	40	50	60
MENNLENLT	GVFAKAAGVN	VETIRFYQRK	GLLLEPDKPY	GSIRRYGEAD	VTRVRFVKSA
70	80	90	100	110	120
QRLGFSLDEI	AELLRLEDGT	HCEEASSLAE	HKLKDVREKM	ADLARMEAVL	SELVCACHAR
130	140				
RGNVSCPLIA	SLQGGASLAG	SAMP			

O sítio de ligação com o íons Hg^{2+} compreende os resíduos Cys82, Cys115, Cys117 e Cys126.

Fonte: NCBI.

C = resíduo de cisteína

Já a estrutura da proteína ArsR e seu motivo de ligação com íons arsênio ainda são pouco conhecidos. Estudos cristalográficos da proteína ArsR de *E. coli* demonstram uma geometria trigonal piramidal e um sítio responsável pela ligação da proteína às formas pentavalente e trivalente do metalóide. A interação ocorreria pela presença de três resíduos de cisteínas, localizados na porção N-terminal da molécula (Cys32, Cys34, Cys37) numa região α -hélice (Figura 49). Segundo os autores da publicação, a interação simultânea do As^{3+} com os resíduos Cys32 e Cys34 torna-se uma associação anormal, pois o motivo sugerido causaria uma significativa perturbação estrutural protéica. Portanto, a conformação estrutural da proteína ArsR não está totalmente esclarecida e estudos adicionais necessitam ser realizados (TOUW et al., 2007).

Figura 49 - Sítio de ligação com íons As^{5+} e As^{3+} na proteína ArsR.

A: O centro da estrutura contém um íon de arsênio coordenado com três resíduos de cisteínas numa geometria piramidal trigonal. **B:** Visão lateral da ligação do íon de arsênio no sítio de ligação da proteína ArsR.

Fonte: Touw et al. (2007). Com permissão.

Em *C. metallidurans*, proteína ArsR, codificada pelo gene *arsR*, localizado no cromossomo 1, contém 109 aminoácidos, 11,4 kDa, e o sítio de ligação com o metalóide compreende o motivo CCXGXXC, localizado na porção C-terminal da molécula (QIN et al, 2007; ZHANG et al., 2009) (Quadro 2).

Quadro 2 - Sequência da proteína ArsR de *C. metallidurans* CH34, codificada pelo gene *arsR*, localizado no cromossomo 1.

10	20	30	40	50	60
METENALEAL	AALAHGIRLA	VFRLLVQAGP	EGLPAGRIAE	LMEMPASSLS	FHLKELHRAG
70	80	90	100		
LLASRQEGRS	IYMAQFETM	NALLGYLTEN	CCGGAPCSPV	SSCSVATES	

O sítio de ligação com os íons As^{5+} e As^{3+} compreende os resíduos Cys91, Cys92, Cys97, Cys103.

C = resíduo de cisteína

Fonte: NCBI.

ArsR de *C. metallidurans* CH34 possui alta homologia com a ArsR de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (93% de identidade) e *Cupriavidus taiwanensis* (84% de identidade), mas apenas 17 % de identidade com ArsR de *E. coli*, codificada pelo plasmídeo R773 (QIN et al., 2007). Ainda, é considerada a proteína de maior afinidade e especificidade a íons arsênio já descrita (RAMANATHAN et al., 1997; SONG et al., 2004; ZHANG et al., 2009).

Os íons de arsênio são extremamente tóxicos, podendo ser letais. Portanto, o presente trabalho também foi baseado na expressão e ancoragem da proteína ArsR na superfície de *C. metallidurans* CH34, empregando-se o mesmo mecanismo para ancoragem do MeR, para ser utilizada no tratamento de sítios contaminados por arsênio.

6.3 Obtenção dos genes de interesse

Para atingir os objetivos propostos, os genes *merR* e *arsR* foram obtidos do plasmídeo pMOL30 e cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34, respectivamente, por amplificação com PCR. Foi utilizado o DNA total de *C. metallidurans* CH34, como molde. Ambos os fragmentos foram amplificados, ladeados por sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição *XbaI* e *SalI*, a fim de, posteriormente, facilitar a ligação entre moléculas recombinantes. Ambos os fragmentos foram obtidos, destituídos dos *códons* de terminação da síntese proteica para que a fusão MerR/E-tag/ β -domínio ou ArsR/E-tag/ β -domínio seja produzida após a construção do completo cassete de expressão e ancoragem de proteínas heterólogas. A análise eletroforética demonstrou a obtenção do amplicon de 453 pb, tamanho correspondente ao gene *merR*, proveniente do plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34. A amplificação do gene *arsR*, localizado no cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34, também foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, demonstrando a obtenção de amplicon com 342 pb.

Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados e inseridos em vetor intermediário para facilitar os procedimentos de clonagem. O vetor intermediário de escolha foi o pGEM-T (Promega) que é um sistema conveniente para clonagem de produtos de PCR, pois consiste em um plasmídeo linearizado, com timidinas adicionais nas extremidades 3', que facilitam a ligação de insertos obtidos por PCR, que possuem adeninas desemparelhadas na extremidade 3'. Além disso, este vetor permite rápida seleção de clones *E. coli* recombinantes pela cor, após utilização de X-Gal e IPTG, "Bluescript". Com os genes *merR* e *arsR* foram inseridos neste vetor, originou-se os plasmídeos recombinantes pGEMT-Hg e pGEMT-As, respectivamente. Cada plasmídeo foi inserido na bactéria *E. coli* DH5 α e os transformantes selecionados (colônias brancas) tiveram os DNAs plasmidiais isolados e digeridos com as enzimas *XbaI* e *SalI*, liberando os insertos de DNA esperados, indicando o sucesso das clonagens.

6.4 Obtenção do cassete de expressão e ancoragem

O plasmídeo pCM2 (BIONDO, 2008- PI 0.801.282-2), escolhido como vetor para a transformação genética de *C. metallidurans* CH34, é um vetor de amplo espectro para bactérias Gram-negativas, e, ainda, contém o completo cassete para expressão e ancoragem de proteínas na superfície celular bacteriana. Visto que o pCM2 possui, em sua sequência, o gene

que codifica a fitoquelatina sintética EC20sp, tornou-se necessário realizar a substituição deste por cada gene de interesse neste trabalho. Observando a Figura 15 (ver 4.5.2) que demonstra o esquema representativo do plasmídeo pCM2, pode-se verificar que o gene EC20sp não está flanqueado por sítios de reconhecimento por endonucleases de restrição. Há apenas um sítio de restrição para a enzima *SalI* em uma das extremidades, o que resulta na impossibilidade de remover o gene EC20sp por simples digestão enzimática. Assim, foram desenhados um par de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 8 – ver 4.3), flanqueados por sítios de reconhecimento de *XbaI* e *SalI*. Estes oligonucleotídeos foram utilizados para a amplificação do plasmídeo pCM2 inteiro, porém destituído do gene EC20sp, por técnica de PCR. Para uma reação de alta acurácia e especificidade, utilizou-se enzima adequada Long TaQ DNA Polimerase (Fermentas) para a obtenção do amplicon sem mutações.

Após otimização da reação de PCR, a análise eletroforética demonstrou a amplificação de um único fragmento com tamanho parente de 6.490 pb, correspondente ao plasmídeo pCM2 sem o gene EC20. O amplicon obtido consiste num vetor linearizado, de amplo espectro para transformação genética de bactérias Gram-negativas, contendo o completo cassete de expressão e ancoragem para proteínas heterólogas em Gram-negativas e foi denominado pCM.

6.5 Construção do plasmídeo pCM-Hg

O gene *merR* (453 pb) clonado no vetor pGEM-T, foi removido por digestão dupla com as enzimas de restrição *XbaI* e *SalI*. O vetor de expressão pCM (6.490 pb) foi digerido com as mesmas enzimas. O gene *merR* foi inserido no vetor pCM, entre as sequências codificadoras do peptídeo sinal e E-tag. O produto da reação de ligação, plasmídeo pCM-Hg (6.937 pb), foi inserido nas hospedeiras *E. coli* linhagens DH5 α , UT5600 e *C. metallidurans* CH34 por transformação genética. A seleção dos clones transformantes foi efetuada pela resistência ao antibiótico cloranfenicol. Colônias crescidas em meio sólido tiveram seus DNAs plasmidiais isolados. O sucesso da construção molecular foi confirmada por análise de restrição, visualizada em gel de agarose após corrida eletroforética e por sequenciamento que demonstrou que a fusão gênica estava em fase correta para a posterior expressão protéica.

6.6 Construção do plasmídeo pCM-As

O gene *arsR* (342 pb), previamente inserido no vetor pGEM-T, foi removido por digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *Sall*. O plasmídeo pCM-Hg foi digerido com as mesmas enzimas, liberando o gene *merR* e resultando novamente no plasmídeo linear pCM (6.490 pb). O gene *arsR* foi inserido no pCM entre as sequências do peptídeo sinal e E-tag. O produto da reação de ligação, plasmídeo pCM-As, foi inserido nas hospedeiras *E. coli* linhagens DH5 α , UT5600 e *C. metallidurans* CH34 por transformação genética. A seleção dos transformantes foi efetuada pela resistência ao antibiótico cloranfenicol. Colônias crescidas em meio sólido tiveram seus DNAs plasmidiais isolados. O sucesso da construção molecular foi confirmada por análise de restrição, visualizada em gel de agarose após corrida eletroforética e por sequenciamento que demonstrou que a fusão gênica estava em fase correta para a posterior expressão protéica.

6.7 Análise da expressão e ancoragem das proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas MerR e ArsR, os plasmídeos construídos neste trabalho foram inseridos separadamente nas bactérias *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34. A linhagem *E. coli* UT5600 foi escolhida para a produção protéica por se tratar de uma cepa de laboratório, específica para a expressão de proteínas recombinantes devido a deleção do gene *ompT*, que codifica uma protease de membrana, evitando a degradação de proteínas recombinantes ancorada à superfície celular. Por outro lado, nenhuma degradação foi visualizada em *C. metallidurans* CH34, provavelmente pelo fato das proteínas MerR e ArsR utilizadas neste trabalho, serem naturalmente produzidas por esta bactéria.

A produção das proteínas recombinantes foi realizada sob o controle do promotor *pan*. O *pan* é um promotor constitutivo, proveniente de *Bacillus subtilis*, com modificações (RIBEIRO-DOS-SANTOS, et al., 2010 – PI 018080019208). Estudos realizados por nosso grupo permitiram verificar a expressão do gene da EGFP sob o controle do promotor *pan* de *B. subtilis* por citometria de fluxo onde a detecção e intensidade de fluorescência nas bactérias *C. metallidurans* CH34 e *E. coli* foram avaliadas (BIONDO, 2008- PI 0.801.282-2). Em *E. coli*, o promotor *pan* se mostrou constitutivo abrindo perspectivas inéditas de utilização para expressão de genes heterólogos em *E. coli*. Por outro lado, foi observado que a força de expressão do promotor *pan* é quatro vezes superior em *C. metallidurans* CH34. Na presença de íons metálicos, observou-se que esta expressão foi ainda aumentada (Figura 50).

Figura 50 - Bactérias *E. coli* e *C. metallidurans* hospedando plasmídeos com diferentes promotores para a expressão da proteína EGFP e comparação da intensidade de fluorescência relativa por citometria de fluxo.

A: Comparação da intensidade de fluorescência relativa medida por citometria de fluxo em *C. metallidurans* CH34 hospedando diversos plasmídeos, cada um com genes que codificam diferentes promotores. Foram empregados meios com e sem metais pesados. B: Comparação da intensidade de fluorescência relativa medida por citometria de fluxo em *E. coli* hospedando diversos plasmídeos, cada um com genes que codificam diferentes promotores.

Fonte: Biondo (2008). Com permissão.

É possível que o aumento da expressão da EGFP pelo *pan* em *C. metallidurans* CH34 na presença de metais seja devido à similaridade dos promotores dos *operons* dessa bactéria, pela sequência consenso de *pan*.

A região -35 de um promotor tem como função servir como sinal de reconhecimento para a ligação da RNA-polimerase, enquanto a região -10 permite o desenrolamento da fita de DNA para o início de transcrição. A distância entre essas regiões é crucial para a adequada ligação da RNA-polimerase (LEWIN et al., 2001). O alinhamento das sequências dos promotores induzidos por metais em *C. metallidurans* CH34 com o promotor *pan* permitiu verificar que a região -10 desse promotor tem grande similaridade com a mesma região dos promotores *czcN* e *cnrY* (Figura 51). Quanto ao *plac* e *pbrA*, nota-se que há duas bases de discrepância nessa região e três bases quando se compara com o promotor *merR*. As regiões -35 desses promotores, entretanto, apresentam maiores discrepâncias.

Observando-se que o promotor *arsR* de *C. metallidurans* CH34 também possui grande similaridade com o promotor *pan*, este fato poderia explicar a elevada habilidade visualizada para as bactérias *E. coli*/pCM-As e, principalmente *C. metallidurans* CH34/pCM-As de ligar íons As^{5+} durante os ensaios de biorremediação em meio contendo arsenato de sódio (Figuras 38 e 39 – Resultados).

Figura 51 - Comparação da sequência de promotores diversos com a sequência do promotor *pan*.

	-35		-10
<i>pan</i>	T T G A T T	15 pb	T A T A A T
<i>czcN</i>	C T G A C A	15 pb	T A G A A T
<i>cnrY</i>	T T C A A G	21 pb	T A T A A G
<i>plac</i>	T T T A C A	18 pb	T A T G T T
<i>pbrA</i>	T T G A C T	19 pb	T T A A A T
<i>merR</i>	A C A G G A	16 pb	T A T C G C
<i>arsR</i>	T T G C A C	17 pb	T A T A T T

pan: promotor do gene *mrgA* de *B. subtilis* com modificações; *czcN*: promotor do operon *czc* de *C. metallidurans* CH34; *cnrY*: promotor do operon *cnr* de *C. metallidurans* CH34; *plac*: promotor do operon de lactose de *E. coli*; *pbrA*: promotor do operon *pbr* de *C. metallidurans* CH34; *merR*: promotor do operon *mer* de *C. metallidurans* CH34; *arsR*: promotor do operon *ars* de *C. metallidurans* CH34. Em vermelho estão representados os nucleotídeos idênticos ao promotor *pan* e, em preto, aqueles discrepantes.

Fonte: Parada (2012).

Uma vez que o *pan* que tem a capacidade promover a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e em *C. metallidurans* sem a necessidade da adição de qualquer

indutor, além de promover expressão aumentada de proteínas em *C. metallidurans* na presença de íons metálicos tóxicos (BIONDO, 2008; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010 - PI 018080019208), esse promotor, consequentemente, foi eleito para a expressão do cassete de ancoragem de proteínas heterólogas nessas bactérias, sendo o primeiro promotor heterólogo de forte expressão a ser utilizado em *C. metallidurans* CH34.

Para verificar se o sistema de expressão e ancoragem de proteínas heterólogas estava sendo funcional, o transporte do epítipo E-tag foi visualizado por microscopia de fluorescência. Para tanto, utilizou-se o anticorpo primário comercial anti-E-tag que é capaz de reconhecer especificamente o epítipo E-tag. O epítipo E-tag é um peptídeo de 12 aminoácidos e sua sequência codificadora encontra-se posicionada entre o gene *merR* e o β -domínio, no plasmídeo pCM-Hg. No plasmídeo pCM-As, esta sequência está localizada entre o gene *arsR* e o β -domínio. O peptídeo E-tag é reconhecido pelo anticorpo em ensaios imunoenzimáticos e funciona, portanto, como repórter da ancoragem na membrana externa (VALLS et al., 2000; VEIGA; LORENZO; FERNANDEZ, 1999) (Figura 52).

Figura 52 - Sequência gênica e estrutura primária do Epítipo E-tag.

O E-tag é um peptídeo de 12 aminoácidos e sua sequência encontra-se posicionada entre o gene *merR* e o β -domínio, no plasmídeo pCM-Hg. No plasmídeo pCM-As, a sequência está localizada entre o gene *arsR* e o β -domínio. O peptídeo E-tag é reconhecido pelo anticorpo comercial anti-E-tag em ensaios imunoenzimáticos e funciona como repórter da ancoragem na membrana externa. Fonte: Manual GE Life Sciences.

Fonte: Parada (2012).

Para este ensaio, utilizou-se anticorpo E-tag produzido em camundongos. Após a adição do anticorpo secundário FITC conjugado anti-camundongos, verificou-se a emissão de fluorescência apenas nas células hospedeiras dos plasmídeos recombinantes, indicando que o epítipo E-tag está sendo transportado através da membrana e permanecendo ancorado na superfície celular, o que significa que o sistema construído para a expressão e ancoragem de proteínas heterólogas através do sistema de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* apresenta-se funcional.

Apesar dos resultados obtidos por microscopia de fluorescência, a técnica não comprova o transporte e ancoragem dos híbridos MerR/E-tag/ β -domínio ou ArsR/E-tag/ β -domínio, uma vez que o anticorpo só é capaz de reconhecer o peptídeo E-tag. Por este motivo,

a produção das proteínas de fusão MerR/E-tag/ β -domínio e ArsR/E-tag/ β -domínio foram estudadas por SDS-PAGE.

A sequência do β -domínio do sistema de secreção da IgA protease codifica uma proteína de 45,2 KDa (VEIGA et al., 2002), o gene E-tag produz o epitopo de 1,4 kDa e o *merR* codifica o peptídeo de 15,8 kDa, que, unidas, formam um híbrido de aproximadamente 62,4 KDa. Da mesma forma, o gene *arsR* codifica a proteína ArsR de 11,4 kDa. Quando fusionada ao β -domínio e E-tag, apresenta-se com tamanho aproximado de 58 kDa. A comparação dos perfis de proteínas totais por SDS-PAGE 15 %, das linhagens selvagens e recombinantes, permitiu verificar a presença de uma banda adicional com tamanho correspondente ao da proteína de fusão, confirmando a expressão do cassete de ancoragem fusionado às proteínas de interesse. Convém ressaltar que, apesar do sucesso obtido, uma vez que a síntese de proteínas foi regulada pelo promotor *pan*, nenhum indutor foi adicionado ao meio e, portanto, a banda correspondente às fusões protéicas dos clones recombinantes foi visualizada em SDS-PAGE em níveis inferiores aos máximos oferecidos por estes clones se a expressão gênica fosse realizada na presença de um indutor sintético. Por outro lado, houve a produção das fusões protéicas desejadas, visualizadas em SDS-PAGE.

O passo seguinte consistiu em verificar se as completas fusões protéicas estariam sendo direcionadas e ancoradas na membrana externa dos clones. Para tanto, foi realizado o fracionamento protéico do extrato bacteriano onde se obteve, separadamente, proteínas citoplasmáticas, provenientes da Fração Solúvel (FS) bacteriana, proteínas da Membrana Interna (MI) e Membrana Externa (ME). A análise de todas as frações por SDS-PAGE permitiu verificar a presença de banda adicional com tamanho correspondente ao MerR/E-tag/ β -domínio (62,4 kDa) ou ArsR/E-tag/ β -domínio (58 kDa) apenas na fração da ME dos clones recombinantes, confirmando novamente o sucesso da expressão do cassete de ancoragem fusionado às proteínas de interesse e a localização das proteínas na superfície dos transformantes.

Para comprovar se as bandas protéicas visualizadas em SDS-PAGE, eram, são de fato, as proteínas recombinantes de interesse e para confirmar mais uma vez a localização na fração da membrana externa bacteriana, porém com maior acurácia, foram realizados ensaios de “Western blotting”, utilizando-se anticorpo primário anti-E-tag e anticorpo secundário conjugado com a peroxidase.

As diferentes frações de membrana da bactéria foram analisadas e somente na fração de membrana externa ou no extrato total das bactérias recombinantes, a produção das fusões protéicas foi detectada no imunoensaio. A banda que apresentou reatividade durante o ensaio

de “Western blotting” apresentou peso molecular equivalente a fusão proteína/E-tag/ β -domínio, fazendo com que a possibilidade da ancoragem somente do peptídeo E-tag possa ser descartada.

O conjunto dos resultados alcançados demonstra que as proteínas heterólogas estão sendo produzidas corretamente e que o sistema de secreção está sendo funcional, possibilitando a ancoragem das proteínas MerR ou ArsR na membrana externa da bactéria, de acordo com o plasmídeo que hospedam.

6.8 Avaliação da capacidade das bactérias recombinantes *E. coli*/pCM-Hg e *C. metallidurans*/pCM-Hg em bioacumular mercúrio na membrana celular, comparadas às linhagens selvagens

Após observação da funcionalidade do sistema de expressão e ancoragem e da produção das proteínas recombinantes na membrana externa das células, foram avaliadas a capacidade das bactérias recombinantes *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg em acumular mercúrio na membrana celular, comparadas às linhagens selvagens.

As células, no início da fase estacionária, foram incubadas em água ultrapura estéril contendo 500 μ M de HgCl_2 , por 2 h. Para a visualização das estruturas celulares da bactéria por MET, geralmente há necessidade de tratamento de contrastação com citrato de chumbo e acetato de uranila. Apesar de sua alta afinidade e especificidade por íons Hg^{+2} , é possível que, na ausência de outros agentes quelantes, a proteína MerR também possa ligar íons Pb^{2+} com baixa eficiência (SONG et al. 2004). Não existem dados na literatura que demonstrem uma possível afinidade da proteína MerR por urânio. A partir dessas observações, optamos, neste experimento, em visualizar células tratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e células com pouca ou nenhuma contrastação para comparação, visando evitar a obtenção de resultados falso-positivos, caso haja interação entre o MerR e íons Pb^{2+} provenientes da solução de contraste. Os resultados foram observados em células contrastadas e em células com pouca ou nenhuma contrastação, indicando que não houve interação entre o citrato de chumbo e a proteína MerR, pois nenhuma diferença entre as imagens obtidas foi verificada. Entretanto, uma vez que a interação entre a proteína MerR e íons Pb^{2+} já foi relatada na literatura, optamos por demonstrar, no presente trabalho, somente as imagens obtidas sem nenhuma contrastação.

Com a microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se, comparativamente, que as células recombinantes incubadas com Hg^{+2} apresentaram-se recobertas superficialmente por uma densa camada de pequenos agregados. Estas observações sugerem que as células hospedeiras do plasmídeo pCM-Hg foram capazes de bioacumular o metal na membrana externa.

As linhagens selvagens (controles negativos do experimento), quando tratadas com 500 μM de HgCl_2 , demonstraram o enegrescimento da porção interna celular, quando comparadas às linhagens tratadas com água pura. As linhagens recombinantes também apresentaram o escurecimento citoplasmático, porém em menor concentração aparente. Sabendo-se que tanto a bactéria *E. coli* como a *C. metallidurans* possuem o *operon mer* em seus genomas (DIELS; MERGEAY; NIES, 1985; LUND; BROWN, 1989; MISRA, 1992; MERGEAY et al., 2003; GUPTA; ALI, 2004), e, portanto, contêm o mecanismo de detoxificação para mercúrio, tal fato sugere a ocorrência de acúmulo citoplasmático do metal, caracterizando o perfil visualizado. Devido à toxicidade celular que o mercúrio ocasiona, as células selvagens ou recombinantes cultivadas na presença de Hg^{2+} , apresentaram alterações de membrana.

Assim como Liedrich et al. (2005), que também empregaram MET para demonstrar a capacidade de *C. metallidurans* CH34 em ligar íons Ag^+ na membrana externa da bactéria, nossos resultados podem comprovar tanto a ocorrência da ligação de íons Hg^{2+} pela proteína recombinante MerR ancorada na superfície das células transgênicas, como o aumento do potencial biorremediador das linhagens hospedeiras do plasmídeo pCM-Hg construído neste trabalho. Os resultados alcançados indicam que as linhagens aqui desenvolvidas possuem potencial biorremediador, podendo ser possivelmente empregadas em processos de descontaminação de sítios poluídos com mercúrio. Ainda, nossos dados sugerem a possibilidade de ser realizada a desorção destes íons e novo ciclo de emprego das bactérias recombinantes no processo de biorremediação.

6.9 Avaliação da capacidade das bactérias recombinantes *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As em acumular arsênio na membrana celular, comparadas às linhagens selvagens

A capacidade das bactérias *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As em acumular arsênio na superfície celular, também foi analisada por MET.

As células *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As foram incubadas em água contendo 500 mM de Na_3AsO_4 , por 2 h.

Não existem dados na literatura que demonstrem uma possível afinidade da proteína ArsR por chumbo ou urânio. Entretanto, foram analisadas estruturas celulares com contrastação, pouca, e nenhuma contrastação. Nenhuma diferença entre as imagens obtidas foi verificada. Optamos por demonstrar, no presente trabalho, somente as imagens obtidas sem nenhuma contrastação como realizado para as células hospedeiras do plasmídeo pCM-Hg.

Assim como observado para bactérias hospedeiras do plasmídeo pCM-Hg, as bactérias hospedeiras do plasmídeo pCM-As apresentaram membrana externa revestida por uma densa camada de agregados em todo o perímetro celular, sugerindo a adsorção de íons de arsênio pela proteína ArsR. O enegrescimento citoplasmático foi novamente visualizado nas linhagens selvagens e recombinantes tratadas com Na_3AsO_4 , quando comparadas àquelas incubadas com água pura, sugerindo a precipitação de arsênio no citoplasma da célula, devido ao sistema de detoxificação que ambas bactérias possuem, uma vez em contato com íons arsênio, ocorre a transcrição dos genes presentes no *operon ars*, acionando o mecanismo para a proteção celular (CHEN et al., 1986; WU; ROSEN, 1991; JI; SILVER, 1992; WU; ROSEN, 1993; SILVER; PHUNG, 2005; ZHANG et al., 2009).

Deste modo, os resultados obtidos demonstram a ligação de íons As^{5+} na proteína ArsR recombinante e ancorada na superfície das células transgênicas, demonstrando que ambas as linhagens construídas neste trabalho possuem aumento no potencial biorremediador, podendo ser possivelmente empregadas em processos de descontaminação de sítios poluídos com arsênio pentavalente.

É importante ressaltar que após os experimentos de bioacúmulo de mercúrio e arsênio, a viabilidade celular não foi alterada, comprovando que os mecanismos de resistência das bactérias apresentavam-se estavam ativos, protegendo-as do efeito tóxico dos metais. Ainda, nossos dados sugerem a possibilidade de ser realizada a desorção destes íons e novo ciclo de emprego das bactérias recombinantes em novo processo biológico para o tratamento de sítios contaminados.

6.10 Análise do crescimento bacteriano em meio contendo cloreto de mercúrio

A resistência de *E. coli* UT5600 e *E. coli* UT5600/pCM-Hg, como de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg frente a diferentes concentrações de HgCl_2 foi analisada por MIC. O ensaio foi realizado como descrito nos Procedimento Metodológicos

(ver 4.7 e 4.8). A MIC das linhagens selvagens de *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34 foi 25 μM e 12,5 μM de HgCl_2 , respectivamente, indicando que ambas as bactérias possuem resistência natural em níveis elevados quando cultivadas em meio contendo íons Hg^{2+} . Este resultado já era esperado, uma vez que ambas as linhagens apresentam o circuito gênico denominado *operon mer* que aciona mecanismo de detoxificação celular na presença de íons Hg^{+2} por redução de Hg^{2+} a Hg^0 e subsequente evaporação da forma elementar a partir da célula (DIELS; MERGEAY; NIES, 1985; LUND; BROWN, 1989; MISRA, 1992; MERGEAY et al., 2003; GUPTA; ALI, 2004).

E. coli UT5600/pCM-Hg apresentou MIC de 50 μM de HgCl_2 . *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg apresentou MIC de 25 μM . A partir desses resultados, pode-se concluir que, linhagens carregando o plasmídeo recombinante construído neste trabalho, passaram a apresentar capacidade de sobrevivência 100 % maior, quando comparadas às linhagens selvagens. Esses dados sugerem que, por ser um plasmídeo amplo espectro para bactérias Gram-negativas, o plasmídeo pCM-Hg pode ser inserido por transformação genética em outras bactérias desta classe, a fim de elevar os níveis de sobrevivência celular a íons Hg^{2+} ou fornecer esta capacidade a novas linhagens até então consideradas inviáveis.

Quando se compara a resistência de *C. metallidurans* CH34 com a de outras bactérias isoladas de ambientes contendo metais pesados, verifica-se que essa bactéria apresenta um amplo espectro de resistências, muitas vezes superior quando comparada a outros micro-organismos (MERGEAY et al, 2003). De forma interessante e inédita, o presente trabalho demonstra que, frente a íons Hg^{2+} , as linhagens *E. coli* UT5600 selvagem e recombinante apresentaram níveis de resistência duas vezes superiores em relação a *C. metallidurans* CH34 carregando o plasmídeo pCM-Hg ou não.

6.11 Análise do crescimento bacteriano em meio contendo arsenato de sódio

A resistência de *E. coli* UT5600e *E. coli* UT5600/pCM-As, como de *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As frente a diferentes concentrações de Na_3AsO_4 foi analisada por MIC. O ensaio de MIC foi realizado como descrito nos Procedimentos Metodológicos (ver 4.9 e 4.10).

A MIC das linhagens selvagens de *E. coli* e *C. metallidurans* foi 25 mM e 500 mM de Na_3AsO_2 , respectivamente, indicando que ambas as bactérias possuem resistências naturais em níveis elevados a compostos de arsênio. Este resultado já era esperado, uma vez que ambas as bactérias apresentam o circuito gênico denominado *operon ars* que aciona mecanismo de

detoxificação celular na presença de íons de arsênio (CHEN et al., 1986; KAUR; ROSEN, 1992; CARLIN et al., 1995; MERGEAY et al., 2003; ZHANG et al., 2009 ROJAS et al. 2011).

A linhagem recombinante *E. coli* UT5600/pCM-As apresentou MIC de 50 μ M de Na_3AsO_2 . Esse resultado demonstra que a presença do plasmídeo pCM-As em *E. coli* forneceu o aumento de 100 % na capacidade de sobrevivência da bactéria recombinante, quando comparada à cepa selvagem.

Surpreendentemente, *C. metallidurans* CH34/pCM-As apresentou MIC > 1000 mM. de Na_3AsO_2 . Concentrações superiores de 1 M não puderam ser estudadas, pois atingem o coeficiente de solubilidade do Na_3AsO_2 . A partir desses dados pode-se destacar que, a linhagem *C. metallidurans* CH34/pCM-As apresenta aumento ainda superior a 100 % na capacidade de sobrevivência frente a íons As^{5+} quando comparada a linhagem selvagem.

Algumas bactérias Gram-positivas possuem elevada resistência natural frente ao arsênio pentavalente, como é o caso da *Microbacterium sp* A33, cuja MIC é 800 mM (ACHOUR-ROKBANI et al. 2010). A *Corynebacterium glutamicum* e *Rhodococcus fascinas* também merecem destaque por apresentarem MIC > 500 mM de As^{5+} (ORDÓNES et al., 2005) (Quadro 3).

Apesar do *operon ars* de *C. metallidurans* CH34 ter sido recentemente caracterizado e estudos complementares ainda são necessários para o completo entendimento do mecanismo em questão (MERGEAY et al., 2003; ZHANG et al., 2009, ROJAS et al, 2011), a resistência a níveis extremos ao arsenato apresentada por esta bactéria (MIC de 500 mM de Na_3AsO_2 para a linhagem selvagem e MIC > 100mM para a linhagem recombinante) foi identificada pela primeira vez neste trabalho, podendo ser assim considerada uma das bactérias Gram-negativas mais resistentes a íons de arsênio, já relatada na literatura até o momento, como apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Resistência a íons As^{5+} de *C. metallidurans* CH34 selvagem e recombinante comparada à de outras bactérias descritas na literatura.

Bactéria	Gram	MIC [As^{5+}] (mM)	Referência
<i>Microbacterium</i> sp A33	+	800	Achour-Rokbani et al. 2010
<i>Ochrobactrum tritici</i>	-	800	Branco;Chung;Morais (2008)
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	-	800	Baker-Austin et al. (2007)
<i>Microbacterium lacticum</i>	+	800	Mokashi e Paknikar (2002)
<i>Escherichia coli</i> K12	-	0,05 – 1	Carlin et al. (1995)
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	-	0,05	Carlin et al (1995)
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110 pWPS1	-	5	Carlin et al (1995)
<i>Escherichia coli</i> W3110 pBC101	-	> 6	Carlin et al (1995)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	> 2	Campos et al. (2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	150	Ordóñez et al. (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378	-	> 300	Mateos et al. (2006)
<i>Pseudomonas putida</i>	-	200	Ordóñez et al. (2005)
<i>Wautersia solanacearum</i>	-	3	Campos et al. (2007)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	> 8	Campos et al. (2007)
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	> 8	Campos et al. (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	> 8	Campos et al. (2007)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	+	200	Ordóñez et al. (2005)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> / pECAS1	+	> 500	Ordóñez et al. (2005)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> /pECAS2	+	>500	Ordóñez et al. (2005)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	+	25	Ordóñez et al. (2005)
<i>Nocardia corynebacteroides</i>	+	100	Ordóñez et al. (2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	50	Ordóñez et al. (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	+	75	Ordóñez et al. (2005)
<i>Streptomyces lividans</i>	+	150	Ordóñez et al. (2005)
<i>Rhodococcus fascians</i>	+	> 500	Ordóñez et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i> UT5600	-	25	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i> UT5600::pCM-As	-	50	Este trabalho
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	-	500	Este trabalho
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34::pCM-As	-	> 1000	Este trabalho

A capacidade de sobrevivência de *C. metallidurans* CH34 selvagem e recombinante, em concentrações extremas de arsenato, foi identificada pela primeira vez neste trabalho, podendo ser considerada uma das bactérias Gram-negativas mais resistentes ao arsênio pentavalente já relatada.

Fonte: Parada (2012).

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o plasmídeo o pCM-As foi capaz de elevar a capacidade de sobrevivência celular de ambas as Gram-negativas testadas, podendo, os plasmídeos construídos neste trabalho, serem utilizados em outras bactérias Gram-negativas a fim de aumentar os índices de sobrevivência de outras linhagens frente ao arsenato, como também fornecer essa capacidade de sobrevivência a íons As^{5+} para bactérias Gram-negativas muito sensíveis a estes íons ou até mesmos fornecer-lhes viabilidade.

6.12 Análise da capacidade de biorremediação de íons Hg^{2+}

A determinação de íons Hg^{2+} em solução, após a incubação com a massa microbiana, consiste apenas numa medida indireta de que as bactérias estão adsorvendo o mercúrio.

Decidiu-se então, medir a quantidade de metal ligada diretamente na massa microbiana por entender que, de fato, a capacidade de biorremediação das linhagens é referente à quantidade de metal ligada às células e não aquela medida pela diminuição do metal em solução, devido às interferências próprias do experimento como a ligação de metal às paredes dos tubos, diferenças de pipetagem, entre outros artefatos experimentais (ROANE; PEPPER, 2000).

Conseqüentemente, os experimentos seguintes do trabalho foram realizados por incubação das linhagens transgênicas *E. coli*/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg em solução de água ultrapura estéril contendo 15 μM de HgCl_2 ou 4 ppm (mg/L) de íons Hg^{2+} . O metal foi quantificado diretamente na massa microbiana por espectrometria de absorção atômica a vapor frio como descrito em Material e Métodos (ver 4.30) ao final dos diferentes períodos de incubação (0, 10, 30, 60, 120 e 240 min). As análises também foram feitas com as linhagens não modificadas que foram os controles negativos do experimento.

Os resultados de quantificação de íons Hg^{2+} na massa microbiana de *E. coli* UT5600, pré-incubada em 15 μM de HgCl_2 , 4 ppm de Hg^{2+} , por diferentes tempos mostraram que, como esperado, devido a presença do operon *mer* em seu genoma, a cepa selvagem possui a capacidade natural de ligar até 0,12 mg/L de Hg^{2+} (6052,25 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) após 30 minutos de exposição. A *E. coli* UT5600, hospedeira do plasmídeo pCM-Hg adsorveu 0,27 mg/L de Hg^{2+} (13422,50 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) nos primeiros 10 minutos de incubação. Além do aumento da velocidade de ligação com o metal, o acúmulo de Hg^{2+} na bactéria recombinante foi > 100 % superior em relação à linhagem selvagem (Figura 42).

A capacidade natural de quelar mercúrio também foi verificada em *C. metallidurans* CH34, devido a presença do operon *mer* em seu genoma. A bactéria mostrou habilidade em ligar 0,13 mg/L de Hg^{2+} (6297,00 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), em 10 minutos. Quando comparada à *E. coli* UT5600, destaca-se em relação à velocidade de ligação ao metal, por conseguir adsorver aproximada concentração de mercúrio em tempo três vezes inferior (Figura 44).

Verificou-se que, nos primeiros 10 minutos, a bactéria *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg demonstrou capacidade semelhante de adsorção em relação a *E. coli* UT5600/pCM-Hg, ao ligar 0,28 mg/L de Hg^{2+} (13983,00 μg de Hg^{2+} /g de peso seco) (Figura 44). Em adição, observa-se que, em *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, a adsorção de mercúrio continua aumentando em relação ao tempo de incubação, alcançando índices de 0,38 mg/L de íons Hg^{2+} (19115,75 μg de Hg^{2+} /g de peso seco), em 4 h que foi o tempo máximo analisado (Figura 43).

A viabilidade celular não foi alterada após os experimentos de biorremediação, o que já era esperado, uma vez que os ensaios foram realizados em água ultrapura estéril contendo 15 μM de HgCl_2 , e os resultados de MIC demonstram que as bactérias selvagens ou recombinantes possuem capacidade de sobrevivência na concentração utilizada.

Bae et al. (2001), realizaram a ancoragem da fitoquelatina sintética EC20 na superfície de *E. coli* JM109 carregando o plasmídeo pLO20 que é um derivado do pUC18, porém contendo o sistema de expressão e ancoragem Lpp-OmpA. A bactéria recombinante expressando a fusão Lpp-OmpA-EC20 foi capaz de remover 7,22 μg de Hg^{2+}/g de massa seca em 20 min, demonstrando aumento da habilidade em acumular mercúrio quando comparada a linhagem original.

Em recente estudo desenvolvido por nosso grupo, o mecanismo de secreção da IgA protease de *N. gonorrhoeae* foi utilizado para ancorar a EC20 na membrana externa de *C. metallidurans* CH34 (BIONDO, 2008- PI 0.801.282-2). A bactéria *C. metallidurans* CH34, expressando a EC20 na superfície celular, apresentou capacidade de imobilizar 40,12 μg de Hg^{2+}/g de massa seca do meio externo, níveis superiores aos apresentados pela *E. coli* JM109/pLO20 (BAE et al., 2001). Comparando-se os resultados obtidos com *C. metallidurans* CH34/pCM2, expressando a EC20 na superfície celular e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg, expressando a proteína MerR ancorada à membrana externa da bactéria, fica evidente que MerR apresenta grande afinidade por íons Hg^{2+} , confirmando ser a proteína de maior afinidade ao mercúrio encontrada na natureza (RALSTON; O'HALLORAN, 1990).

Devido ao elevado número de cisteínas na cadeia polipeptídica da EC20, a proteína não apresenta especificidade de ligação a um único íon metálico. Quando empregada em processos de biorremediação para a adsorção de íons Hg^{2+} , pode acabar retirando do meio ambiente elementos metálicos de ocorrência natural. Uma vez, que as principais contaminações ambientais por mercúrio localizam-se próximos de áreas de mineração e, sabendo-se que áreas de mineração são ricas em íons metálicos diversos por causa da escavação de camadas profundas do solo (ROULET et al., 1998A; AMORIN et al., 2000; LEBEL, et al., 2006), existe a necessidade de se desenvolver um sistema específico para a recuperação de áreas contendo elevadas concentrações de determinados íons potencialmente tóxicos, sem interferir na composição natural do ecossistema.

No entanto, poucos trabalhos relatam a ancoragem da proteína MerR na superfície de bactérias. Em 2003, Bae et al. (2002) realizaram a ancoragem da proteína MerR na superfície de *E. coli* JM109, utilizando o plasmídeo pUNIM, que contém o sistema de ancoragem de

proteínas nucleadoras de gelo (INP). A bactéria recombinante expressando a fusão MerR/INP foi capaz de remover 6,94 µg de Hg²⁺/g de massa seca em 1 h.

É importante ressaltar que nos estudos de Bae, para a síntese da proteína híbrida, houve a necessidade da utilização de um indutor sintético, o IPTG, pois os sistemas construídos (Lpp-OmpA-EC20 e MerR/INP) foram expressos a partir do promotor induzido *plac*. No sistema por nós desenvolvido, a produção das proteínas recombinantes ocorre sob regulação do promotor *pan* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010 - PI 018080019208), que por ser um promotor constitutivo, não necessita do uso de indutores artificiais, o que é vantajoso para um agente de biorremediação, candidato para possível o uso em processos industriais, uma vez que a utilização de um indutor tornaria o processo mais dispendioso.

Em adição, os sistemas desenvolvidos e publicados na literatura, foram testados em meios de cultura, o que não é adequado, pois geralmente quelam os metais da solução, além de fornecer nutrientes essenciais para o bom funcionamento do metabolismo microbiano o que facilita a produção das proteínas recombinantes.

Quando comparamos a capacidade das linhagens construídas no nosso trabalho, com outras bactérias recombinantes descritas na literatura até agora, verifica-se que, quanto à ligação ao Hg²⁺, nossos resultados foram muito superiores (Quadro 4).

Quadro 4 - Comparação da capacidade biorremediadora de mercúrio das linhagens recombinantes descritas na literatura com as linhagens construídas no presente trabalho.

Bactéria Recombinante	Promotor	Sistema de Ancoragem	Peptídeo	Bioacúmulo µg Hg ²⁺ /g peso seco*	Tempo	Referência
<i>E. coli</i> JM109/pLO20	<i>plac</i>	Lpp-OmpA	EC20	7,22	20 min	Bae et al. (2001)
<i>E. coli</i> JM109/pUNIM	<i>plac</i>	INP	MerR	6,94	1 h	Bae et al. (2003)
<i>E. coli</i> UT5600/pCM-Hg	<i>pan</i>	IgA protease	MerR	13422,50	10 min	Este Trabalho
<i>C. metallidurans</i> CH34/pCM2	<i>pan</i>	IgA protease	EC20	40,12	24 hs	Biondo (2008)
<i>C. metallidurans</i> CH34/pCM-Hg	<i>pan</i>	IgA protease	MerR	19115,75	4 h	Este Trabalho

Verifica-se que, em relação à capacidade de ligação ao Hg²⁺, nossos resultados foram significativamente superiores.

Fonte: Parada (2012).

Por outro lado, trabalhos recentes têm focado a construção de um gene sintético, codificando apenas a região dimérica, correspondente ao sítio de ligação com o mercúrio da proteína MerR de *Shigella flexneri*, na tentativa de se obter um peptídeo de 107 resíduos, denominado “Metal-Binding Domain” (MDB), com capacidade e seletividade à íons de mercúrio aperfeiçoada. O MDB foi construído pela fusão de duas cópias consecutivas do domínio de ligação com o Hg^{2+} de MerR com uma ponte SSG flexível para permitir que uma das cópias do domínio de ligação com Hg^{2+} forme uma coordenação trigonal pela interação (-SH) entre os resíduos Cys117 e Cys126 de um monômero, com o resíduo Cys82 de outro. (SONG et al., 2004; QIN et al., 2006) (Figura 53).

Figura 53 - Esquema da construção do MDB e predição de sua estrutura cristalográfica.

A: Estrutura linear da região codificadora da proteína MerR. **B:** Construção do MDB. O MDB foi construído pela fusão de duas cópias consecutivas do domínio de ligação com o Hg^{2+} com uma ponte SSG flexível. As barras azuis indicam as cópias consecutivas do domínio de ligação com o mercúrio. Os pontos alaranjados representam as cisteínas envolvidas no sítio de ligação de íons Hg^{2+} . A porção vermelha indica a ponte SSG. As linhas azuis e verdes mostram o “loop” após a dimerização do sítio de ligação com o mercúrio e a região após o “loop”, respectivamente. **C:** Predição da estrutura cristalográfica do peptídeo MDB. Íons de Hg^{2+} ligados ao sítio específico da proteína MerR estão indicados em formas pretas arredondadas.

Fonte: Song et al. (2004). Com permissão.

Entretanto, os resultados demonstraram que o MDB apresenta-se 95 % na forma monomérica e com diversas alterações estruturais, quando comparado ao motivo de ligação de mercúrio da proteína MerR nativa. Isso pode estar ocorrendo porque modificando-se a conformação protéica, o sítio para ligação com metal se altera e os resultados publicados consistiram na produção de um peptídeo com maior afinidade a As^{3+} que a Hg^{+2} (SONG et al., 2004; QIN et al., 2006). Já a proteína MerR recombinante, é capaz de manter sua conformação estrutural nativa quando sintetizada no citoplasma ou na superfície da célula (BAE et al., 2003). Além disso, possui elevada afinidade e especificidade a íons de mercúrio mesmo na presença de agentes desnaturantes ou EDTA (BAE et al., 2003; SONG et al., 2004; QIN et al., 2006). Por este motivo, optamos em trabalhar com a proteína MerR ao invés de utilizar o MDB.

Em suma, com os resultados alcançados, é possível considerar que as linhagens *E. coli* UT5600/pCM-Hg e *C. metallidurans* CH34/pCM-Hg construídas em nosso trabalho são excelentes agentes de biorremediação para Hg^{2+} , pois, além de serem altamente resistentes e serem capazes de colonizar ambientes contendo este metal, mostraram habilidade em bioacumular este íon na superfície das células quando incubada em água contaminada. Este fato que abre perspectiva de utilizar o próprio efluente industrial contendo mercúrio como meio de cultivo dessa bactéria, proporcionando uma concomitante biorremediação durante o crescimento celular, com a possível recuperação do metal por desorção como subproduto do processo e a reutilização celular no processo. Tais observações permitem afirmar que a expressão e ancoragem da MerR na superfície de *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34 é uma estratégia adequada para otimizar a capacidade destas bactérias em ligar Hg^{2+} , o que abre oportunidades para uso deste sistema em outras bactérias Gram-negativas.

6.13 Análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+}

Os experimentos para a análise da capacidade de biorremediação de íons As^{5+} foram realizados por ICP-AES, de forma a quantificar o metalóide diretamente na massa microbiana das linhagens hospedeiras do plasmídeo pCM-As, visando evitar possíveis interferências durante o experimento devido à elevada volatibilidade do arsenato. O experimento foi conduzido como descrito nos Procedimentos Metodológicos (ver 4.31), onde estabeleceu-se uma cinética de tempo para determinar o tempo ótimo de ligação de íons As^{5+} pela proteína ArsR ancorada à superfície celular bacteriana.

Os resultados da quantificação de arsênio pentavalente na massa microbiana das linhagens de *E. coli* UT5600, *E. coli* UT5600/pCM-As, *C. metallidurans* CH34 e *C. metallidurans* CH34/pCM-As, incubadas em diferentes tempos (0, 10, 30, 60, 120, e 240 min), na presença de 31,2 ppm de As^{5+} estão apresentados nas Figuras 45 e 46, respectivamente, onde a quantidade residual de arsênio nas células está demonstrada em partes por milhão (mg/L) de As^{5+} e microgramas de As^{5+} por grama de peso seco.

A determinação de íons As^{5+} na massa microbiana pré-incubada em 1 mM de Na_3AsO_4 , 31,2 ppm (mg/L) de As^{5+} , por diferentes tempos, mostrou que ambas as cepas selvagens possuem a capacidade natural de ligar até 0,37 mg/L de As^{5+} (18500 μg de As^{5+} /g de peso seco). A *E. coli* UT5600/pCM-As foi capaz de ligar até 6,63 mg/L de As^{5+} (331500 μg de As^{5+} /g de peso seco) em 4 h. A bactéria *C. metallidurans*, carregando o mesmo plasmídeo recombinante, adsorveu 22,28 mg/L de As^{5+} (1114000 μg de As^{5+} /g de peso seco) no mesmo período, demonstrando habilidade cerca de três vezes superior em ligar íons As^{5+} (Figura 47).

O tempo de incubação em Na_3AsO_4 não influenciou na captação iônica, que se manteve constante, nas linhagens não modificadas. Entretanto, em ambas as bactérias recombinantes, observa-se a adsorção crescente de arsênio durante a cinética de tempo estabelecida em até 4 h.

A viabilidade celular não foi alterada após os experimentos de biorremediação, o que já era esperado, uma vez que os ensaios foram realizados em água ultrapura estéril contendo 1 mM de Na_3AsO_4 , e os resultados de MIC demonstram que as bactérias selvagens ou recombinantes possuem capacidade de sobrevivência na concentração utilizada.

Muitas publicações têm enfatizado a superexpressão citoplasmática de ArsR em bactérias e leveduras para possível utilização em processos de biorremediação de compostos de arsênio (KOSTAL et al., 2004, ORDONÉZ et al., 2005; SHAH et al., 2010). Entretanto, a produção da proteína ArsR intracelularmente foi realizada a partir de promotores induzidos. Os demais sistemas foram testados em meios de cultura, que fornecem nutrientes essenciais para o metabolismo microbiano, facilitando a produção das proteínas recombinantes.

No sistema para a biorremediação de arsênio por nós desenvolvido, a regulação da síntese proteica ocorreu pelo promotor *pan* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010 - PI 018080019208), que por ser um promotor constitutivo, não necessita do uso de indutores artificiais. Em adição, a expressão e ancoragem de ArsR não foi relatada na literatura até o momento, destacando o caráter inovador do presente trabalho.

Ressaltados esses pontos, as linhagens *E. coli* UT5600/pCM-As e *C. metallidurans* CH34/pCM-As construídas em nosso trabalho podem ser consideradas agentes eficientes de

biorremediação de ambientes contendo o arsenato e mostraram habilidade em bioacumular elevadas concentrações de As^{5+} na superfície das células quando incubada em água contaminada, além de serem resistentes e capazes de colonizar ambientes contendo o metaloide. Este fato abre perspectivas de utilizar o próprio efluente industrial contendo arsênio como meio de cultivo dessas bactérias, proporcionando uma concomitante biorremediação durante o crescimento celular, com a possível recuperação do metal por desorção e a reutilização celular no processo. Tais observações permitem afirmar pela primeira vez que a expressão e ancoragem da ArsR na superfície de *E. coli* UT5600 e *C. metallidurans* CH34 é uma estratégia adequada para otimizar a capacidade de bactérias em ligar As^{5+} , o que abre oportunidades para uso deste sistema em outras Gram-negativas.

7. CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados descritos demonstra a construção de um plasmídeo de amplo espectro para bactérias Gram-negativas, capaz de produzir na superfície celular, proteínas com alta afinidade e seletividade para imobilizar íons Hg^{2+} ou As^{5+} sem a necessidade de adição de indutor artificial. As linhagens engenheiradas neste trabalho apresentam resistência aumentada, quando comparadas às cepas selvagens e, de fato, possuem habilidade em bioacumular os metais específicos na membrana externa. Portanto, essas novas linhagens transgênicas podem ser consideradas como agentes potenciais para serem utilizadas em processos de biorremediação de ambientes contendo mercúrio e arsênio. Uma vez, acumulado na superfície celular, provavelmente o metal poderá ser recuperado por desorção (Figura 54).

Figura 54 - Esquema ilustrativo da possível utilização das bactérias construídas neste trabalho em processos de biorremediação.

A e B: As bactérias recombinantes promovem a expressão das proteínas MerR ou ArsR na superfície celular sob a regulação do promotor *pan*. **C:** No efluente contaminado, ocorre a adsorção de íons Hg^{2+} ou As^{5+} pela proteína MerR e ArsR, respectivamente. **D:** Uma vez, acumulado na superfície celular, os íons podem ser recuperados por desorção e a célula é encaminhada para reutilização.

Fonte: Modificado de Diels et al. (2009).

A partir desse trabalho, torna-se possível estabelecer uma cinética de ligação a íons Hg^{2+} e As^{5+} , de tal forma a utilizar um volume de células transgênicas conhecido para adsorver uma determinada quantidade de metal em solução, visando descontaminar o efluente poluído e enquadrá-lo nos padrões de emissão de metais determinados pela legislação vigente.

O objetivo principal deste trabalho, qual seja de aperfeiçoar a capacidade de biorremediação de bactérias Gram-negativas, em especial a de *C. metallidurans* CH34, foi atingido, indicando que a estratégia de ancorar proteínas quelantes de metais na superfície bacteriana é viável e contribui para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas úteis para a preservação do meio ambiente, em particular de um recurso natural tão precioso quanto a água.

Por fim, vale ressaltar que os resultados aqui descritos já produziram um pedido de patente, em colaboração com a companhia Vale (antiga Vale do Rio Doce), protocolado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), referente à proteção e direito de uso, tanto das sequências gênicas construídas neste trabalho, quanto das linhagens recombinantes biorremediadoras de Hg^{2+} (VICENTE, E.J.V., SCHENBERG, A.C.G.; PARADA, C.A.; BIONDO, R.. Pedido de Patente nº 014110001427, Data de depósito: 29/04/2011); e um segundo documento está sendo encaminhado para a proteção e direito de uso das sequências gênicas e linhagens recombinantes biorremediadoras de As^{5+} .

REFERÊNCIAS

ABE, T.; OHTSUKA, R.; RONGO, T.; SUZUKI, T.; TOHYAMA, C.; NAKANO, A.; AKAGI, H.; AKIMICHI, T. High hair and urinary Mercury levels of fish eaters in the nonpolluted environment of Papua New Guinea. **Arch. Environ. Health**. v. 50, n. 5, p. 367-373, 1995.

ABERNATHY, C.O.; CALDERON, R.L.; CHAPPELL, W.R. (Eds.). Arsenic exposure and health effects. [S.l.]:**Chapman & Hall**. 1997, p. 429.

ACHOUR-ROKBANI, A.; CORDI, A.; POUPIN, P.; BAUDA P.; BILLARD, P. Characterization of the ars gene cluster from extremely arsenic-resistant *Microbacterium* sp strain A33. **Appl. and Environ. Microbiol.** v.76, n. 3, p. 948-955, 2010.

ALBORES, A.; CEBRIAN, M.E.; TELLEZ, I.; VALDEZ, B. Estudio comparativo de hidroarsenicismo crónico en dos comunidades rurales de la region lagunera de México. **B Ofic. Sanit. Panam.** v. 86, p.196-205, 1979.

ALVAREZ-LEITE, E.M.; et al. Urinary homovanillic acid and serum prolactin levels in children with low environmental exposure to lead. **Biomarkers**. v.7, p.49–57, 2002.

AMORIM, MIM; MERGLER, D; BAHIA, MO; DUBEAU, H; MIRANDA, DC; LEBEL, J; BURBANO, RR; LUCOTTE, M. Cytogenetic Damage Related to Low Levels of Methyl Mercury Contamination in the Brazilian Amazon. **An. Acad. Bras. Ci.** v. 72, n. 4, p.497-507, 2000.

ANTMAN, K. H. Introduction: The history of arsenic trioxide in cancer therapy. **Oncologist**. v.6, n. 2, p.1–2, 2006.

ARGUELLO, R.A.; CENGET, D.D.; TELLO, E.E. Cancer y arsenicismo regional endémico en Córdoba. **Ver Argent Dermatosisifilogr.** v. 22, p.461-487, 1938.

APOSHIAN, H.V.; ZAKHARYAN, R.A.; AVRAM, M.D.; SAMPAYO-REYES, A.; WOLLENBERG, M.L. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 198:327–335, 2004.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for arsenic. Draft for Public Comment**. Atlanta GA. Agosto de 2007. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2007. Detailed data table for the 2011 priority list of hazardous substances that will be object of toxicological profiles. 2011. Disponível em: http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2011_SPL_Detailed_Data_Table.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2011.

AVOSCAN, L.; COLLINS, R.; CARRIERE, M.; GOUGET, B.; COVÈS, J. Selenomethionine is the predominant organic form of selenium in *Cupriavidus metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 9, p.6414-6416, 2006.

AVOSCAN, L.; UNTEREINER, G.; DEGROUARD, J.; CARRIERE, M.; GOUGET B. Uranium and selenium resistance in *Cupriavidus Metallidurans* CH34. **Toxicol. Lett.** v.172, n. 1, p.157, 2007.

AZEVEDO, F.A; CHASIN, A.A.M. Metais: **Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003, p.554.

BAE, W.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; MEHRA R. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. **Biotechnol. Bioeng.** v. 70, p. 518-524, 2000.

BAE, W., MEHRA, R.K., MULCHANDANI, A., CHEN, W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 5335- 5338, 2001.

BAE, W., MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. **J. Inorg. Biochem.** v. 88, p. 223–227, 2002.

BAE, W.; WU, C.H.; KOSTAL, J.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, n.6, p. 3176–3180, 2003.

BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.; BURBANO, R.R.; VINCENT, S.; DUBEAU, H. Genotoxic Effects of Mercury on *in vitro* Cultures of Human Cells. **An. Acad. Bras. Ci.** v. 71, n. 3-I, p. 437-443, 1999.

BAKER-AUSTIN, C.; DOPSON, C.M; WEXLER, M.; SAWERS, R.G.; STEMMLER, A.; ROSEN, B.P.; BOND, P.L.. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon ‘*Ferroplasma acidarmanus*’ Fer1. **Extremophiles.** v.11:425–434, 2007.

BAKIR, F.; DAMBUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTHADA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N.Y.; TIKRITE, S.; DHAHIR, H.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, P.A. Methylmercury Poisoning in Iraq. **Science**. v. 181, p.230, 1973.

BALDRIAN, P.; IN DER WIESCHE, G.; GABRIEL, J.; NERUD, F.; ZADRAZIL, F. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleorotus ostreatus* in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p.2471-2478, 2000.

BARKAY, T.; MILLER, S.M.; SUMMERS, A.O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27, p. 355–384, 2003.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R.E; ABRÃO, J.J; DE LA GUARDIA, M. Especificação de arsênio: uma revisão. **Química Nova**. v.23, n.1, p. 58-70, 2000.

BARROS, A. J. M.; PRASAD, S.; LEITE, V. D.; SOUZA A. G. The process of biosorption of heavy metals in bioreactors loaded with sanitary sewage sludge, **Braz. J. Chem. Eng.** v. 23, n. 2, p.153 - 162, 2006.

BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. 2008. 171 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BOENING, D.W. Ecological Effects, Transport, and Fate of Mercury: a general review. **Chemosphere**. v. 40, p.1335-1351, 2000.

BOYD, S.A.; SEGER, D.; VANNUCCI, S.; LANGLEY, M.; ABRAHAM, J.L.; KING J.R. Mercury Exposure and Cutaneous Disease. **Am. Acad. Dermatol. J.** v. 43, n. 1, p.81-89, 2000.

BRANCO, R.; CHUNG, A.P; MORAIS, E.P.V. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. **BMC Microbiol.** v.8, p.95, 2008.

BROWN, N.L.; STOYANOV, J.V.; KIDD, S.P.; HOBMAN, J.L. The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27, p. 145–163, 2003.

CAI, L.; LIU, G.; RENSING, C.; WANG, G. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. **BMC Microbiol.** v. 9, p. 4, 2009.

CAMPOS, V.; VALENZUELA, C.; ALCORTA, M.; ESCALANTE G.; MONDACA, M.A. Isolation of arsenic resistance bacteria from volcanic rocks of Quebrada Camaronês, Parinacota region. Chile. **Gayana.** v.71, n.2: 150-155, 2007.

CARLIN, A.; SHI, W.; DEY, S.; ROSEN, B.P. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 981–986, 1995.

CHANGELA, A., CHEN, K., XUE, Y., HOLSCHEIN, J., OUTTEN, C. E., HALLORAN, T. V.; MONDRAGO, A. Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. **Science.** 301, 1383-1387, 2003.

CHAKRABORTI, D.; MUKHERJEE, S.C.; SAHA, K.C.; CHOWDHURY, U.K.; RAHMAN, M.M.; SENGUPTA, M.K. Arsenic toxicity from homeopathic treatment. **J Toxicol. Clin. Toxicol.** v. 41, p. 963-967, 2003.

CHAMPIER, L.; DUARTE, V.; MICHAUD-SORET, I.; COVÈS, J. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the *mer* operon. **Mol. Microbiol.** v. 52, n.5, p. 1475-1485, 2004.

CHANG, J.S.; CHAO, Y.P.; LAW, W.S. Repeated fed-batch operations for microbial detoxification of mercury using wild-type and recombinant mercury-resistant bacteria. **J Biotechnol.** v.64, p. 219–230, 1998.

CHEN, C.M.; MISRA, T.K.; SILVER, S.; ROSEN, B. P.; Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump: the plasmid-encoded arsenical resistance *operon*. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 15030-15038, 1986.

CODEX STANDARD. 108-1981, Rev. 1 – 1997, Amend. 2001. Disponível em: <<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000ip55-att/2r9852000000ips7.pdf>> Acesso em 16 nov. 2011.

CRUMP, K.S.; KJELLSTRÖM, T.; SHIPP, A.M.; SILVERS, A.; STEWART, A. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. **Risk Anal.** v.18, n. 6, p. 701-713, 1998

DAS, D.; CHATTERJEE, A.; MANDAL, B.K.; SAMANTA, G.; CHAKRABORTI, D.; CHANDA, B. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. **Analyst**. v. 120, p.917-924, 1995.

DAVIS, T.A.; VOLESKY, B; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metalbiosorption by brown algae, **Water Res.** v. 37, n. 18, p. 4311- 4330, 2003.

DE FLORA, S.; BENNICELLI, C.; BAGNASCO, M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutat. Res.** v. 317, p. 57-79, 1994.

DIÁRIO DA REPUBLICA – I série A nº 43 – 20 de Fevereiro de 1999. Disponível em <<http://dre.pt/pdf1s/1999/02/043A00/09940998.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Poder Executivo, José Serra – Governador, vol. 119, nº 125, São Paulo, 7 julho 2009. Disponível em: <http://lixoeletronico.org/system/files/pg_0005-VETO%2Blei%2B33.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2012.

DIELS, M.F.; MERGEAY, M.; NIES, D. Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. **Arch. Int. Physiol. Biochim.** v.93, p. B27-28, 1985.

DIELS, L.; VAN DER LELIE, D.; BASTIAENS, L. New developments in treatment of heavy metal contaminated soil. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** v.1, p. 75-82, 2002.

DIELS, L.; ROY, S.V.;TAGHAVI, S.; HOUDT, R.V.From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. **Antonnie Van Leeuwenhoek.** v.96, p. 247-258, 2009.

DJOKO, K.Y.; XIAO, Z.; WEDD, A.G. Copper resistance in *E. coli*: the multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in Cu(I)Cu(II)-PcoC. **Chem. Biochem.** v. 9, n. 10, p.1579-1582, 2008.

DOREA, J. G.; et al. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **Int. J. Environ. Health Res.** v.13, p.239-248, 2003.

DUKER, A.A; CARRANZA, E.J.M.; HALE, M. Arsenic geochemistry and health. **Environ. Int.** v.31, p. 631-641, 2005.

EHRlich, P.; HATA, S. Die experimentelle chemoterapie der spirillosen. Berlin: Julius Springer, 1910.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1986. **Mercury Water. Water Quality Standards Criteria Summaries: A compilation of state/federal criteria.** Washington D.C. Setembro de 1988. EPA 440/5-88/005. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/upload/2009_01_13_criteria_goldbook.pdf> Acesso em: 10 jan. 2012.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2002. **Implementation Guidance for the arsenic rule. Drinking Water Regulations for Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring.** EPA-816-K-02-018. Disponível em:< http://water.epa.gov/drink/info/arsenic/upload/2005_11_10_arsenic_ars_final_mainguide_9-13.pdf> Acesso em 10 nov. 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2004. **Local limits development guidance appendices.** EPA 833-R-04-002B. Disponível em: <http://www.final_local_limitsappendicesEPA.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2007. **Treatment technologies for mercury in soil, waste and water.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/tio/download/remed/542r07003.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

EUR-LEX – **Acesso ao direito da União Europeia.** Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/pt/legis/latest/index.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

FADINI, P.S.; JARDIM, W.F.; Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Sci. Total Environ.** v.275, n.1-3, p. 71-82, 2001.

FARO, F.R.L. **Efeitos do Mercúrio Sobre a Liberação de Dopamina no Núcleo Estriado de Ratos. Possíveis Mecanismos de Ação e Proteção.** 2000. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2000.

FATTA, D.; et al. Organochlorine and organophosphoric insecticides, herbicides and heavy metals residue in industrial wastewaters in Cyprus. **J. Hazard. Mater.** v.145, p.169–179, 2007.

FEROZE, A. Arsenic contamination in south-east Asia region: Technologies for arsenic mitigation. **Tech. Report.** v.3, p. 166-209, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2006. **Mercury levels in commercial fish and shellfish**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/sea-mehg.html>> Acesso em: 1º maio 2010.

FRANKE, S.; GRASS, G.; NIES, D.H. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. **Microbiology**. v. 147, n. 4, p. 965-972, 2001.

FUKUDA, Y.; USHIJAMA, K.; KITANO, T.; SAKAMOTO, M.; FUTATSUKA, M. An analysis of subjective complaints Iná population living in a methylmercury-polluted area. **Environ. Res. Sect.** v.81, n. 2, p. 100-107, 1999.

GADD, G.M. Microbial control of heavy metal pollution. In: FRY, J.C.; GADD, G.M.; HERBERT, R.A.; JONES, C.W.; WATSON-CRIK, I.A. **Microbial control of pollution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

GAO, S.; BURAU, R.G. Environmental factors affecting rates of arsine evolution from and mineralization of arsenicals in soil. **J. Environ. Qual.** v.26, p. 753-763, 1997.

GARREL, R. M.; MACKENZIE, F. T.; HUNT, C. (Ed.) **Chemical cycles and the global environmental assessing human influences**. Califórnia:Willian Kanfmann Inc., Los Altos, Califórnia 1975, 206 p..

GAVRILESCU, M. Removal of heavy metals from environment by biosorption. **Eng. Life Sci.** v. 4, n. 3, p. 219-232, 2004.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotechnolog. Cienc. Desenvol.** v.34, p.36- 43, 2005.

GRASS, G.; FRICKE, B.; NIES, D.H. Control of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. **Biometals**. v.18, p. 437-448, 2005.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsenic: a historical review. **Na. Bras. Dermatol.** v.80. n. 1, p. 91-95, 2005.

GUO, T.L.; MILLER, M.; SHAPIRO, I.M.; SHENKER, B.J. Mercuric Chloride Induces Apoptosis in Human T Lymphocytes: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 153, p. 250- 257, 1998.

GUPTA, N.; ALI, A. Mercury volatilization by R factor systems in *Escherichia coli* isolated from aquatic environments of India. **Curr. Microbiol.** v.48, n. 2, p. 88-96, 2004.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.** v.6, n.9, p. 370-378, 1998.

HOLTZE, M.S.; NIELSEN, P.; EKELUND, F.; RASMUSSEN, L. D.; JOHNSEN, K. Mercury affects the distribution of culturable species of *Pseudomonas* in soils. **Appl. Soil Ecol.** v.31, p.228-238, 2006.

HOPENHAYN C. Arsenic in drinking water: Impact on human health. **Elements.** v.2, p. 103-107, 2006.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). 1990 **Methylmercury. Environmental Health Criteria 101.** World Health Organization, Geneva. Disponível em: < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). 1991 **Inorganic Mercury. Environmental Health Criteria 118.** World Health Organization, Geneva.. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc118.htm> Acesso em: 10 jan. 2012.

JL, G.; SILVER, S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. **PNAS.** v.89, p. 9474–9478, 1992.

JUHNKE, S.; PEITZSCH, N.; HÜBENER, N.; GROBE, C.; NIES, D.H. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. **Arch. Microbiol.** v.179, p.15-25, 2002.

KANNAN, S.K.; KRISHNAMOORTHY, R. Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury-A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India [J]. **Sci. Total Environ.** v.367, p. 341–353, 2006.

KAUR, P.; ROSEN, B.P. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. **Plasmid.** v.27, p. 29–40, 1992.

KINJO, Y.; HIGASHI, H.; NAKANO, A.; SAKAMOTO, M.; SAKAI, R. Profile of subjective complaints and activities of daily living among current patients with Minamata disease after three decades. **Environ. Res.** v.63, n.2, p. 241-251, 1993.

KITCHIN, K.T. Recent advances in arsenic carcinogenesis: Modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 172, p.49–261, 2001.

KIYONO, M.; PAN-HOU, H. The merG gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. **J. Bacteriol.** v.181, p. 762–730, 1999.

KIYONO, M.; SONE, Y.; NAKAMURA, R.; PAN-HOU, H.; SAKABE, K. The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** v.583, p. 1127–1131, 2009.

KLAUSER, T.; POHLNER, J.; MEYER, T.F. Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease β -domain: conformation dependent outer membrane translocation. **EMBO J.** v.9, p. 1991-1999, 1990.

KOSTAL, J.; YANG, R.; WU, C. H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. **Appl. Environ. Microbiol.** v.70, n. 8, p. 4582-4587, 2004.

KOVACH, M.E.; PHILLIPS, R.W.; ELZER, P.H.; ROOP, R.M.; PETERSON, K.M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques.** v. 16, n. 5, p. 800, 1994.

LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. **Mercury from gold and silver mining. A chemical time bomb?** Berlin: Springer Verlag, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature.** v.227, p. 680-685, 1970.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.I.M.; DOLBEC, J.; MIRANDA, D.; ARANTES, G.; RHEAULT, I.; PICHET, P. Evidence of Early Nervous System Dysfunction in Amazonian Populations Exposed to Low-Levels of Methylmercury. **Neurotoxicology.** v.17, p.157-168, 1996.

- LEE, W.; WOOD, T.; CHEN, W. Engineering TCE-degrading *Rhizobacteria* for heavy metal accumulation and enhanced TCE degradation. **Biotechnol. Bioeng.** p. 399- 403, 2006.
- LEFEBVRE, D.D; KELLY, D.; BUDD, K. Biotransformation of Hg(II) by Cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, n.1, p. 243–249, 2007.
- LEWIN, B. **Genes VII**. Tradução de Henrique Ferreira et al. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- LIEDRICH, M.L.; STEMMLER, S.; LAVAL-GILLY, P.; FOUCAUD, L.; FALLA, J. Precipitation of silver-thiosulfate complex and immobilization of silver by *Cupriavidus metallidurans* CH34. **Biometals.** v.18, p.643-650, 2005.
- LIN, C.J.; PEHKONEN, S.O. The Chemistry of Atmospheric Mercury: a review. **Atmos. Environ.** v.33, p.2067-2079, 1999.
- LORSCHIEDER, F.L.; VIMY, M.J.; SUMMERS, A.O. Mercury Exposure from “Silver” Tooth Fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. **FASEB J.** v. 9, p.504-508, 1995.
- LUND, P.A.; BROWN, N.L. Regulation of transcription in *Escherichia coli* from the *mer* and *merR* promoters in the transposon Tn501. **J. Mol. Biol.** v. 205, p. 343-353, 1989.
- MACASKIE, L.E.; DEAN, C.R. **Metal sequestering biochemical**. In: VOLESKY, B. (Ed.). Biosorption of heavy metals. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- MALM, O.; LACERDA, L.D. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estud. Av.** v.22, n.63, 2008.
- MATEOS, L.M.; ORDÓÑEZ, E.; LETEK, M.; GIL, J.A. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. **Int. Microbiol.** V.9, p.207-215, 2006.
- MERGEAY, M.; HOUBA, C.; GERITS, J. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. **Arch. Int. Physiol. Biochim.** v.86, p. 440-442, 1978.
- MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHELEGEL, H.G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; VAN GIJSEGEM, F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **J. Bacteriol.** v.162, p. 328-334, 1985.

- MERGEAY, M.; MONCHY, S.; VALLAEYS, T.; AUQUIER, A.; BENOTMANE, A.; BERTIN, P.; TAGHAVI, S.; DUNN, J.; VAN-DER-LELIE, D.; WATTIEZ, R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS Microbiol. Rev.** v.27, p.385-410, 2003.
- MESELSON, M.; YAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.
- MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p.487-495, 2000.
- MILLER, S.M.; MASSEY, V. WILLIAMS, C.H, BALLOU, D.P.; WALSH, C. T. Communication between the active sites in dimeric mercuric ion reductase: an alternating sites hypothesis for catalysis. **Biochemistry**. v.30, p.2600–2612, 1991.
- MIRETZKY, P.; BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. Sorption of Mercury (II) in Amazon soils from column studies. **Chemosphere**. v.62, n.2, p. 247-254, 2005.
- MISRA, T.K Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid**. v.27, p. 4–16, 1992.
- MOHAN, S.; TILLER, M.; VAN DER VOET, G.; KANHAI, H. (2005) Mercury exposure of mothers and newborns in Surinam: a pilot study. **Clin. Toxicol. Phila.** v.43, n. 2, p.101-104, 2005.
- MOKASHI, S. A., PAKNIKAR, E.K.M. Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 34:258–262, 2002.
- MORENO, F.N.; ANDERSON; C.W.N.; STEWART, R.B.; ROBINSON, B.H. Phytofiltration of mercury-contaminated water: Volatilisation and plant-accumulation aspects. **Environ. Exp. Bot.** v.62, p. 78–85, 2008.
- MONCHY, S.; VALLAEYS, T.; BOSSUS, A.; MERGEAY, M. Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** v.86. n.9, p.677-692, 2006

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev. Saúde Públ.** v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MORBY, A.P; HOBMAN, J.L.; BROWN, N.L. The role of cysteine residues in the transport of mercuric ions by the Tn501 MerT and MerP mercury-resistance proteins. **Mol. Microbiol.** v.17, p.25–35. 1995.

MORGANTE, V.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; FLORES, C.; GONZÁLEZ, M, GONZÁLEZ, B.; e cols. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.71, p. 114–126, 2010.

MULLER, D.; MÉDIGUE, C.; KOECHLER, S.; BARBE, V.; BARAKAT, M.; TALLA, E.; BONNEFOY, V.; KRIN, E.; e cols. A Tale of Two Oxidation States: Bacterial Colonization of Arsenic-Rich Environments. **PLos Genet.** v.3, n. 4, p. e53, 2007.

MURTAZA, I.; DUTT, A.; ALI, A. Relationship between the persistence of mer operon sequences in *Escherichia coli* and their resistance to mercury. **Curr. Microbiol.** V. 44, no. 3, p.178-183, 2002.

NEALSON, K.H.; BELZ, A.; McKEE, B. Breathing metals as a way of life: geobiology in action. **Antonie Van Leeuwenhoek.** v.81, p. 215–222, 2002.

NESBITT, H.W.; MUIR, I.J.; PRATT, A.R.. Oxidation of arsenopyrite by air and air-saturated, distilled water, and implications for mechanism of oxidations. **Geochim. Cosmochim. Acta.** v.59, n.9, p.1773-1786, 1995.

NEUBAUER, O. Arsenical cancer: a review. **Braz. J. Cancer.** v.1, p.192-244, 1947.

NRIAGU, J.O.; PACYNA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, p. 134-139, 1988.

NRIAGU, J. O.; et al. Mercury pollution in Brazil. **Nature**, v.356, p.389, 1992.

NI'BHRIAIN, N.N.; SILVER, S.; FOSTER, T.J. Tn5 insertion mutations in the mercuric ion resistance genes derived from plasmid R100. **J. Bacteriol.** v.155, p. 690–703, 1983.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.51, p. 730–750, 1999.

NIES, D.H. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. **Extremophiles**. v.4, p.77-82, 2000.

NIES, D.H.; SILVER, S. Ion efflux system involved in bacterial metal resistances. **J. Ind. Microbiol.** v.14, p.186-199, 1995.

NOGHABI, KA.; ZAHIRI, H.S.; LOFTI, A.S.; RAHEB, J.; NASRI, S.; YOON, S.C. Mercury absorption by *Pseudomonas fluorescens* BM07 grown at two different temperatures. **Pol. J. Microbiol.** v.56, no.2, p. 111-117, 2007

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutant. Res.** v.567, p.109-149, 2004.

OJO, K.K.; STRIPLIN, M.J.; ULEP, C.C.; CLOSE, N.S.; ZITTLE, J.; BERNARDO, M.; LEITÃO, J.; ROBERTS, M.C. *Staphylococcus* Efflux *msr(A)* Gene Characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* Isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.50, n.3, p. 1089–1091, 2006.

ORDONEZ, E.; LETEK, M.; VALBUENA, N.; GIL, J.A.; MATEOS, L.M. Analysis of Genes Involved in Arsenic Resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032⁺. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, no.10, p.6206-6215, 2005.

ORDONEZ, E.; THIYAGARAJAN, S.; COOK, J.D; STEMMLER, T.L.; GIL, J.A.; MATEOS, L.M.; ROSEN, E.B.P. Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. **J. Biol. Chem.** v. 283, p. 25706–25714, 2008.

ORDONEZ, E., et al. Arsenate reductase, mycothiol and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. **J. Biol. Chem.** v. 284, p.15107– 15116, 2009.

PERMINA, E.A.; KAZAKOV, A.E.; KALININA, O.V.; GELFAND, M.S. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. **BMC Microbiol.** v. 6, p. 49–60, 2006.

PFEIFFER, W. C.; MALM, O.; SOUZA, C. M. M.; LACERDA, L. D.; SILVEIRA, E. G. A ameaça do mercúrio nos garimpos. **Ciência Hoje**. v. 11, p. 10-12, 1990.

PIEPER, D.H.; SEEGER, M. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v.15, p.121–138, 2008.

PINHEIRO, J. C. V.; LIMA, A. T. de M. Valor econômico e elasticidade preço da demanda de água para irrigação no vale do Apodi-Ce. In: ROSA, A.L.T.; KHAN, A.S. (org). **Nordeste: reflexões sobre aspectos setoriais e locais de uma economia**. 1ª Ed. Fortaleza: CAEN serie de estudos econômicos, 2002. Capítulo XIII p. 293-308.

PORCELA, D.B. Mercury in the Environment: Biogeochemistry. In: WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J. W. (Ed.) **Mercury pollution: integration and synthesis**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1994. p.2-7.

POHLNER, J.; HALTER, R.; BEYREUTHER, K.; MEYER, T. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. **Nature**. v.325, p.458-462, 1987.

POLLARD, K.M.; HULTMAN, P. Effects of Mercury on the Immune System. **Met. Ions Biol. Syst.** v. 34, p.421-440, 1997.

PUPO, J.A. Tratamento da leishmaniose das mucosas pelo eparseno (amino-arsenophenol de Pomaret). **Rev. Med. Cir. São Paulo**. v. 9, p.239-242, 1926.

QIN, J.; SONG, L.; BRIM, H.; DALY, M. J.; SUMMERS, A. O. Hg(II) sequestration and protection by the MerR metal-binding domain (MDB). **Microbiology**. v.152, p.709-719, 2006.

QIN, J.; FU, H.; YE, J.; BENCZE, K.Z.; STEMMLER, T.L.; RAWLINGS, D.E.; ROSEN, B.P. Convergent Evolution of a New Arsenic Binding Site in the ArsR/SmtB Family of Metalloregulators. **J. Biol. Chem.** v. 282, n.47, p. 34346–34355, 2007.

RALSTON, D. M.; O'HALLORAN, T.V. Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. **PNAS**. v.87, p.3846–3850, 1990.

RAMANATHAN, S.; SHI, W.; ROSEN, B.P.; DAUNERT, S. Sensing antimonite and arsenite at the subattomole level with genetically engineered bioluminescent bacteria. **Anal. Chem.** v.69, p.3380–3384, 1997.

RASMUSSEN, L.D.; ZAWADSKY, C.; BINNERUP, S. J.; ØREGAARD, G.; SØRENSEN, S.J.; KROER, N. Cultivation of Hard-To-Culture Subsurface Mercury-Resistant Bacteria and Discovery of New *merA* Gene Sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** v.74, n.12, p.3795–3803, 2008.

REMOUDAKI, E.; HATZIKIOSEYIAN, A.; KOUSI, P.; TSEZOS, M. The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors. **Water Res.** v.37, p. 3843-3854, 2003.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; BIONDO, R.; QUADROS, O. F.; VICENTE, E. J.; SCHENBERG, A. C. G. A Metal-Repressed Promoter From Gram-Positive *Bacillus subtilis* Is Highly Active and Metal-Induced in Gram-Negative *Cupriavidus Metallidurans*. **Biotechnol. Bioeng.** v.107, n. 3, p.469-477, 2010.

RITTER, J.A.; BIBLER, J.P. Removal of mercury from wastewater: large-scale performance of an ion exchange process. **Wat. Sci. Technol.** v.25, p. 165–172, 1992.

ROANE, T.M.; PEPPER, I.L. Microorganisms and metal pollutants. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C. **Environ. Microbiol.** San Diego: Academic Press, 2000. Capítulo 17.

ROJAS, L.A.; YÁÑEZ, C.; GONZÁLEZ, M.; LOBOS, S.; SMALLA, K.; SEEGER, M. Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. **PLoS One.** v.6, n.3 e17555. doi:10.1371/journal.pone.0017555. 2011.

ROSENSTEIN, R.; PESCHEL, A.; WIELAND, B.; GOTZ, F. Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. **J. Bacteriol.** v. 174, p.3676–3683, 1992.

ROSSMAN, T. **Arsenic**. In: ROM, W.; MARKOWITZ, D. (Eds.). *Environ. Occup. Med.* 4th ed. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1006– 1017.

ROSSINI, S.R.G.; REIMÃO, R.; LEFÉVRE, B.H.; MEDRADO-FARIA, M.A. Chronic Insomnia in Workers Poisoned by Inorganic Mercury. **Arq. Neuropsiquiatr.** v.58, n. 1, p.32-38, 2000.

ROULET, M; LUCOTTE, M; FARELLA, N; SERIQUE, G; COELHO, H; PASSOS, SCJ; SILVA, E DE JESUS DA SILVA; P. SCAVONE DE ANDRADE; MERGLER, D; GUIMARÃES, J-RD; AMORIM, M. Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems. **Water Air Soil Pollut.** v.0, p.1-17, 1998a.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; RHEAULT, I.; FARELLA, N.; SILVA, E.J.; DEZENCOURT, J.; PASSOS, S.C.J.; SOARES, G.S.; GUIMARÃES, J.R.D.; MERGLER, D.; AMORIM, M.I.M. The Geochemistry of Mercury in Central Amazonian

Soils Developed on the Alter-do-Chão Formation of the Lower Tapajós River Valley, Pará State, **Braz. Sci. Technol. Environ.** v. 223, p.1-24, 1998b.

SAAVEDRA, J.M.; ACEVEDO, F.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. Mineralization of PCBs by the genetically modified strain *Cupriavidus necator* JMS34 and its application for bioremediation of PCBs in soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87, p.1543–1554, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.

SANDERS, J.G., RIEDEL, G.F., OSMAN, R.W. Arsenic Cycling and Its Impact In Estuarine and Coastal Marine Ecosystems. In: JEROME, O.; NRIAGU, J. (Eds). **Arsenic in the Environment, Part I: Cycling and Characterization**. Technical Reprint: University of Maryland. Wiley & Sons, Inc.1994. p. 289-308.

SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; BRABO, E.S.; FAYAL, K.F.; LIMA, M.O. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, n.2, p.171-185, 2003

SCHENBERG, A.C.G; BIONDO, R.; VICENTE, E.J.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.G. Plasmídeo recombinante contendo cassete de ancoragem, Linhagem bacteriana contendo o plasmídeo recombinante e seu uso. PI 0.801.282-2. Data do depósito no INPI/SP 10/06/2008.

SCHIERING, N.; KABSCH, W.; MOORE, M.J.; DISTEFANO, M.D.; WALSH, C.T.; PAI, E.F. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. **Nature**. v. 352, p.168–172, 1991.

SELBORNE, L. **A Ética do Uso da Água Doce: um levantamento**. Brasília: UNESCO, 2001. 80p.

SETTI, A. A. **A necessidade do uso sustentável dos recursos hídricos**. Brasília: IBAMA. 1994. 344p.

SCHUURS, AHB - Reproductive Toxicity of Occupational Mercury. A Review of the Literature. **J. Dentistry**. v. 27, p. 249-256, 1999.

SHAH, D.; SHEN, M. W. Y.; CHEN, W.; DA SILVA, N.A. Enhanced arsenic accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing transporters Fps1p or Hxt7p **J. Biotechnol.** v.150, p.101–107, 2010.

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. - Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells : Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. **Environ. Res.** v. 84A, p. 89-99, 2000.

SHEWCHUK, L.M., VERDINE, G.L., NASH, H. AND WALSH, C.T. Mutagenesis of the cysteines in the metalloregulatory protein MerR indicates that a metal-bridged dimer activates transcription. **Biochemistry.** v. 28, p. 6140-6145; 1989.

SIGEYUKI, A.; ETO, K.; KURISAKI, E.; GUNJI, H.; HIRAIWA, K.; SATO, M.; SATO, H.; HASUIKE, M.; HAGIWARA, N.; WAKASI, H. Acute Inorganic Mercury Vapor Inhalation Poisoning. **Pathol. Int.** v. 50, n. 3, p.169-174, 2000.

SILBERGELD, EK; TREVANI, C; STRICKLAND, GT; LIGGANS, G; WOODRUFF, S; SACCI, J; AZAD, A e McKenna, K. Effects of Mercury on Resistance to *P. yoelli* Malaria in a Mouse Model. **Toxicol. Sci.** v. 42, p.205, 1998.

SILVER, S. Genes for all metals--a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, n. 1. p.1-12, 1998.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32(11-12):587-605, 2005.

SILVER, S.; WALDERHAUG, V. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 56, p.195-228, 1992.

SILVER, S.; BUDD, K.; LEAHY, K.M.; SHAW, W.V.; HAMMOND, D.; NOVICK, R.P.; WILLSKY, G.R.; MALAMY, M.H.; ROSENBERG, H. Inducible Plasmid-Determined Resistance to Arsenate, Arsenite, and Antimony(III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.146, n. 3, p.963-996, 1981.

SIMEONOVA, D.D.; MICHEVA, K.; MULLER, D.A.; LAGARDE, F.; LETT, M.C.; GROUDEVA, V.I.; LIEVREMONT, D. Arsenite oxidation in batch reactors with alginate-immobilized ULPAs1 strain. **Biotechnol. Bioeng.** v. 91, n. 4, p.441-446, 2005.

SINHA, A. KHARE, S.K. Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. **Biodegradation.** DOI: Bioresour Technol v.10, n.5, p.4281-4284, 2011.

SMALLA, K.; HAINES, A. S.; JONES, K.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; HEUER, H.; SCHLOTER, M.; THOMAS, C.M. Increased abundance of Inc-1 β plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of incP-1 β plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element. **Appl. Environ. Microbiol.** v.72, n.11, p.7253-7259, 2006.

SMEDLEY, P.L.; KINNIBURGH, D.G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Appl. Geochem.** v.17, n.5, p.517–568, 2002.

SMITH, A.H.; LINGAS, E.O.; RAHMAN, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. **Bull. World Health Organ.** v.78, n.9, p.1093-1103, 2000.

SOIGNET, S.L et al. United States Multicenter Study of Arsenic Trioxide in Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia. **J. Clin. Oncol.** v.19, n. 18, p. 3852-3860, 2001

SONG, L.; CAGUIAT, J.; LI, Z.; SHOKES, J.; SCOTT, R. A.; OLLIF, L.; SUMMERS, A. O. Engineered single-chain, antiparallel, coiled coil mimics the MerR metal-binding site. **J. Bacteriol.** v.186, n. 6, p. 1861–1868, 2004.

SOUSA, C.; KOTRBA, P.; RUML, T.; CEBOLLA, A.; DE LORENZO, V. Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. **J. Bacteriol.** v.180, p.2280–2284, 1998.

STEEL, R.A.; OPELLA, S.J. Structures of the reduced and mercurybound forms of MerP, the periplasmic protein from the bacterial mercury detoxification system. **Biochemistry.** v.36, p.6885–6895, 1997.

STEINNES, E. (Ed.) **Mercury. Heavy Metals in Soils.** BJ Alloway, 1995.

STEVEN-MARCUS, M.D. **Arsenic Toxicity.** Citado em Dezembro de 2007. Disponível em <<http://www.emedicine.com>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

STYBLO, M.; DROBNA, Z.; JASPERS, I.; LIN, S.; THOMAS, D.J. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. **Environ. Health Perspect.** v.110, p.:767–771, 2002.

SUMMERS, A.O. Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. **J Bacteriol.** v. 174, p.3097–3101, 1992

TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; MERGEAY, M. Electroporation of *Alcaligenes eutrophus* with (mega) plasmids and genomic DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 60, n. 10, p. 3585-3591, 1994.

TAGHAVI, S.; MERGEAY, M.; NIES, D.; VAN-DER-LELIE, D. *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. **Res. Microbiol.**, v. 148, n. 6, p. 536-551, 1997.

TAKEUCHI, M.; KAWAHATA, H.; GUPTA, L.P.; KITA, N.; MORISHITA, Y.; ONO, Y.; KOMAI, T. Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria. **J. Biotechnol.** v.127, n.3, p. 434-442, 2006.

THORBURN, L. Paul Ehrlich: pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854-1915). **Br. J. Vener. Dis.** v. 59, n. 6, p. 404-405, 1983.

TOUW D.S.; NORDMAN, C.E.; STUCKEY, J.A; PECORARO, V.L. Identifying important structural characteristics of arsenic resistance proteins by using designed three-stranded coiled coils. **PNAS.** v. 104, n. 29, p. 11969–11974, 2007.

TUPE, S.G.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Taguchi approach significantly increases bioremediation process efficiency: a case study with Hg (II) removal by *Pseudomonas aeruginosa*. **Lett. Appl. Microbiol.** v.45, n.1, p. 36-41, 2007.

UDDIN, S.J.; SHILPI, J.A.; MURSHID, G.M.; RAHMAN, A.A.; SARDER, M.M.; ALAM, M.A. Determination of the binding site of arsenic on bovine serum albumin using warfarin (site-I specific probe) and diazepam (site-II specific probe). **J. Biol. Sci.** v.4, n. 5, p. 609-612, 2004.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM (UNEP). 2002. **Mercury Programme. Chemicals: Global Mercury Assessment.** Geneva. Disponível em:<<http://www.chem.unep.ch/mercury/report/gma-report-toc.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

VALLS, M.; LORENZO, V.; GONZÁLEZ-DUARTE, R.; ATRIAN, S. Engineering outermembrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhance heavy-metal bioadsorption. **J. Inorg. Biochem.**, v. 79, p. 219-223, 2000.

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 26, p. 327–338, 2002.

VAN LOON, J.C.; BAREFOOT, R.R. Overview of analytical methods for elemental speciation. **Analyst**. v.117, n. 3, p.563-570, 1992.

VEIGA, E.; LORENZO, V.; FERNANDEZ, L.A. Probing secretion and translocation of a betaautotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. **Mol. Microbiol.** v. 33, p. 1232-1243, 1999.

VEIGA, E.; SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H.; LORENZO, V.; FERNÁNDEZ, L.A. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. **EMBO J.** v. 21, n. 9, p. 2122-2131, 2002.

VETRIANI, C.; CHEW, Y.S.; MILLER, S.M.; YAGI, J.; COOMBS, J.; LUTZ, R.A.; BARKAY, T. Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, n. 1, p. 220–226, 2005.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metal. **Biotechnol. Prog.** v.11, p. 235-250, 1995.

VON CANSTEIN, H.; LI, Y.; TIMMIS, K.N.; DECKWER, W.D.; WAGNER-DOBLER, I. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 5279–5284, 1999.

WAGNER, S.L.; MALINER, J.S.; MORTON, W.E.; BRAMAN, R.S. Skin cancer and arsenical intoxication from well water. **Arch. Dermatol.** v.115, p.1205-1207, 1979.

WAGNER-DOBLER, I. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 62, p.124–133, 2003.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Biotechnol. Adv.** v. 24, p. 427-451, 2006.

WANG, Z.; DEY, S.; ROSEN, B.P.; ROSSMAN, T.G. Efflux mediated resistance to arsenicals in arsenic-resistant and hypersensitive Chinese hamster cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 137, p.112–119, 1996.

WAWRZYŃSKA, A.; WAWRZYŃSKI, A.; GAGANIDZE, D.; KOPERA, E.; PIATEK, K.; BAL, W.; SIRKO, A. Overexpression of genes involved in phytochelatin biosynthesis in *Escherichia coli*: effects on growth, cadmium accumulation and thiol level. **Acta. Biochim. Pol.** v. 52, n. 1, p. 109-116, 2005.

WERNÉUS, H.; STÅHL, S. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 40, p. 209-228, 2004.

WINSKI, S.L.; CARTER, D.E. Interactions of rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite. **J. Toxicol. Environ. Health.** v. 46, p.379-397, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2001 **Environmental Health Criteria 224. Arsenic and arsenic compounds.** 2a. Ed. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/224_As_Part_1.pdf>. Acesso em: 2 Abr 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003 **Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects.** Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>>. Acesso em: 2 Abr 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2010. **Mercury in drinking water.** 2010. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/mercuryfinal.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2011.

WRIGHT, D.C. (Ed.) **The History of China.** Greenwood Publishing Group. p. 49, 2001.

WRIGHT, J.G., TSANG, H.T., PENER-HAHN, J.E.; O'HALLORAN, T.V. Coordination chemistry of the Hg-MerR metalloregulatory protein evidence for a novel tridentate Hg-cysteine receptor-site. **J. Am. Chem. Soc.** v. 112, p. 2434-2435, 1990a.

WRIGHT, J.G.; JOHNSON, S.L.; UTSCHIG, L.M.; O'HALLORAN, T.V. Coordination chemistry and molecular basis of heavy metal recognition in the metalloregulatory protein, MerR. **J. Inorg. Biochem.** v. 43, p.519, 1990b.

WU, C. H.; WOOD, T. K.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 2, p.1129-1134, 2006.

WU, J. e ROSEN, B. P. The ArsR protein is a *trans*-acting regulatory protein. **Mol. Microbiol.** v. 5, p.1331-1336, 1991.

WU, J. e ROSEN, B. P. The *arsD* gene encodes a second *trans*-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. **Mol. Microbiol.** v. 5, p.1331-1336, 1993.

XU, Z.; BAE, W.; NULCHANDANI, A.; MEHRA, R. K.; CHEN, W. Heavy Metal Removal by Novel CBD-EC20 Sorbents Immobilized on Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 3, p. 462-465. 2002.

YAN, L.; YIN, H.; ZHANG, S.; DUAN, J.; LI, W.; CHEN, P.; LI, L. Organoarsenic resistance and bioremoval of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Bioresour. Technol.** v. 101, n. 16, p. 6572-6575, 2010.

YEH, S.; HOW, S.W.; LIN, C.S. Arsenical cancer of the skin. Histologic study with special reference to Bowen's disease. **Cancer**. v.21, p.312-339, 1968.

YIP, L.; DART, R. Arsenic. In: SULLIVAN, J.; KREIGER, G. (Eds.). **Clinical environmental health and toxic exposures**. Second Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 858-865.

YU, H.S.; LEE, C.H.; CHEN, G.S. Peripheral vascular diseases resulting from chronic arsenical poisoning. **J. Dermatol.** v.29, p.123-130, 2002.

ZHANG, Y.B; MONCHY, S.; GREENBERG, B.; MERGEAY, M.; GANG, O.; TAGHAVI, S., VAN DER LELIE, D. ArsR arsenic-resistance regulatory protein from *Cupriavidus metallidurans* CH34. **Antonie van Leeuwenhoek**. DOI 10.1007/s10482-009-9313-z, 2009.

ZENG, Q.; STALHANDSKE, C.; ANDERSON, M.C.; SCOTT, R.A.; SUMMERS, O.A. The core metal-recognition domain of MerR. **Biochemistry**. v. 37, p. 15885– 15895, 1998.

ZENG, X. X.; TAGN, J. X.; JIANG, P.; LIU, H. W.; DAI, Z. M.; LIU, X. D. Isolation, characterization and extraction of *mer* gene of Hg^{2+} resisting strain D₂. **Trans. Nonferrous Met. Soc. China**. v. 20, n. 2010, p. 507-512, 2009.

ZOUBOULIS, A.I.; LOUKIDOU, M.X.; MATIS, K.A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soil. **Process. Biochem.** v. 30, n. 8, p. 909-916, 2004.