

ARTIGO

TOXIDEZ DE COBRE EM MICRO-ORGANISMOS: A NECESSIDADE DA ESPECIAÇÃO QUÍMICA

Wilson F. Jardim¹, Annemarie König & H.W. Pearson

Botany Department, The University of Liverpool
Liverpool L69 3BX, Inglaterra

Recebido em 20/06/83

Embora seja um dos micro-nutrientes essenciais para todos os organismos vivos, quando em altas concentrações o cobre pode ser extremamente tóxico e letal. Devido à alta sensibilidade a este metal apresentada por certos micro-organismos, o mesmo passou a ser usado rotineiramente, desde o início do século, como algicida preferido em ambientes aquáticos, tais como reservatórios naturais de água potável bem como em piscinas. No entanto, embora extremamente eficaz, certos aspectos relativos ao uso deste metal como algicida eram desconhecidos e, em 1948, Prescott¹ já apontava a discrepância entre valores de concentração letal para *Aphanizomenon flos-aquae* encontrados na literatura.

Quando em 1955 Fogg e Westlake² demonstraram que uma espécie de alga verde-azulada (*A. cylindrica*) era capaz de produzir material extra-celular com poder de complexar alguns metais tais como ferro, cobre e zinco, o estudo da toxidez gerada por metais recebeu novo enfoque e, conseqüentemente, novas questões foram levantadas: (a) seriam os metais complexados tóxicos para os micro-organismos? (b) seria a concentração total do metal o fator determinante da toxidez? (c) seria apenas a fração iônica do metal responsável pelos efeitos nocivos?

Tais questões foram quase que totalmente esclarecidas na década passada quando diversos pesquisadores mostraram a relação direta existente entre toxidez e a fração iônica de cobre presente no meio aquoso^{3,4}. Trabalhos subseqüentes^{5,6} vieram ratificar que a concentração total do metal não era o parâmetro a ser realçado quando em se tratando de aspectos tóxicos, mas sim a diferenciação das formas do metal presentes, principalmente a fração iônica (ou íon "livre").

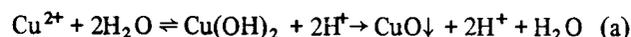
A DIFERENCIAÇÃO DAS FORMAS METÁLICAS

A especiação química do cobre em ambientes aquáticos é, ainda hoje, um procedimento analítico controvertido e, sob muitos aspectos, bastante desconhecido. Como a concentração total do metal em sistemas naturais é geralmen-

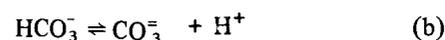
te da ordem de 10^{-6} M (ou menor), cuidados especiais são necessários a fim de se minimizar contaminações durante qualquer possível pré-tratamento, bem como procurar evitar que o equilíbrio natural seja perturbado. Uma revisão detalhada de métodos analíticos e comparação de resultados obtidos utilizando-se tais métodos foi recentemente publicada⁷.

No ambiente aquático o cobre pode ocorrer em diferentes formas⁸, exemplificadas no Quadro I. Como pode ser visto, diferentes sistemas aquáticos irão apresentar diferentes "capacidade de complexação". Em outras palavras, parâmetro este que irá fornecer dados a respeito da concentração total de ligantes *disponíveis* para complexar qualquer incremento na fração iônica do metal.

Tal "capacidade de complexação" irá depender do metal em estudo bem como das características físico-químicas da amostra. O pH é a variável de maior importância na distribuição das formas do cobre no ambiente aquático porque irá controlar a hidrólise e a precipitação do hidróxido:



como também regular o equilíbrio carbonato-bicarbonato:



favorecendo assim a precipitação de compostos tais como malaquita e azurita.

A co-precipitação do cobre com óxidos metálicos, principalmente MnO_2 , Fe_2O_3 e SiO_2 pode, em alguns casos, ser responsável pela remoção de mais de 90% de todo o metal presente na amostra⁹.

A presença de compostos orgânicos é outro aspecto de extrema importância na amenização dos efeitos tóxicos de cobre em micro-organismos, devido à habilidade apresentada pelos mesmos em complexar uma certa fração do metal. Dentre os compostos que ocorrem naturalmente e podem apresentar tal propriedade, destacam-se (a) material húmico proveniente da decomposição animal e ou vegetal (geo-polímeros ricos em anéis aromáticos e grupos $-\text{OH}$ e $-\text{COOH}$), (b) amino-ácidos e polipeptídeos oriundos principalmente da contaminação por esgoto sanitário e (c) material extra-celular tais como hidroxamatos ($-\text{CON}(\text{OH})-$) e polipeptídeos produzidos por micro-organismos.

BIO ENSAIO: MICRO-ORGANISMOS COMO INDICADORES DE POLUIÇÃO

O uso de micro-organismos como indicadores dos níveis de poluição por metais pesados já vem sendo estudado há algum tempo. Davey e colaboradores¹⁰ determinaram a capacidade de complexação de cobre em diversas amostras de água do mar utilizando uma espécie de diatomácea. Guillespie e Vaccaro¹¹, em semelhante experimento, mediram o consumo de glucose (^{14}C) em função de diferentes concentrações de cobre em bactérias isoladas "in loco".

Quando em condições muito bem controladas e definidas, tais bio-ensaios podem fornecer resultados precisos e confiáveis. Não obstante todos os cuidados que tal técnica

¹ Bolsa CNPq 200 110/80

Endereço atual:
Instituto de Química
UNICAMP
Caixa Postal 6154
13080 - Campinas - SP.

exige, o número de publicações neste campo cresceu muito nos últimos anos; infelizmente, a maior parte de tais trabalhos carece de elementos necessários para fazer com que os resultados obtidos possam, com segurança, ser extrapolados para outras condições que não as originais do ensaio.

A fim de se esclarecer melhor tal ponto, suponhamos o seguinte exemplo de teste de toxidez frequentemente encontrado na literatura:

Assunto: Toxidez de cobre em fitoplâncton.

Condições experimentais: — iluminação contínua
 — cultura estática (nutrientes não renováveis)
 — meio de cultura não tamponado

Decorrências: Devido à atividade fotossintética, o pH do meio de cultura irá aumentar concomitantemente com a fase logarítmica do crescimento, atingindo um patamar na fase estacionária (gráfico 1). Note que após 3 dias o valor do pH já ultrapassou 10 tanto para a espécie de alga verde como para a verde-azulada. (O mesmo gráfico comprova a eficácia do tampão.) Vejamos, pois, quais as consequências que tal mudança no pH irá acarretar na especiação do cobre presente no meio de cultura.

A figura 2 mostra a variação da fração *solúvel* de cobre em função do pH no meio de cultura, enquanto que a figura 3 mostra a variação na fração *iônica* ($-\log \text{Cu}^{2+}$) também em função do pH. Se por um lado a fração solúvel é reduzida em mais de 80% quando o pH atinge valores de 8, o decréscimo na fração iônica é de $\cong 10^5$ vezes quando o pH varia de 6 a 10 no meio de cultura sem os ligantes EDTA e citrato. Como era de se esperar, a variação na concentração dos íons cobre é menos acentuada quando tais ligantes estão presentes no meio de cultura na faixa de pH 6-9.

Voltemos ao teste de toxidez. Suponha-se que o metal seja inoculado após a fase exponencial, ou mesmo no fim da fase estacionária. De acordo com as condições pré-estabelecidas, o pH do meio estará próximo do seu valor máximo, isto é, em torno de 10. Se a concentração total de cobre escolhida para testar os efeitos tóxicos for 5×10^{-6} M, de acordo com a figura 2 tal concentração irá corresponder a uma concentração iônica de $\cong 10^{-11}$ M! (Não computando a perda do metal devido à adsorção nas paredes celulares). Simplesmente uma diferença de, no mínimo 100.000 vezes.

Caso o metal seja inoculado na fase pré-exponencial, então o resultado do ensaio será dependente do tamanho do inóculo, ou melhor, da bio-massa originalmente presente¹³. Tal fato deve-se ao decréscimo da fração iônica ocasionado pela adsorção do metal nas paredes celulares dos micro-organismos em estudo.

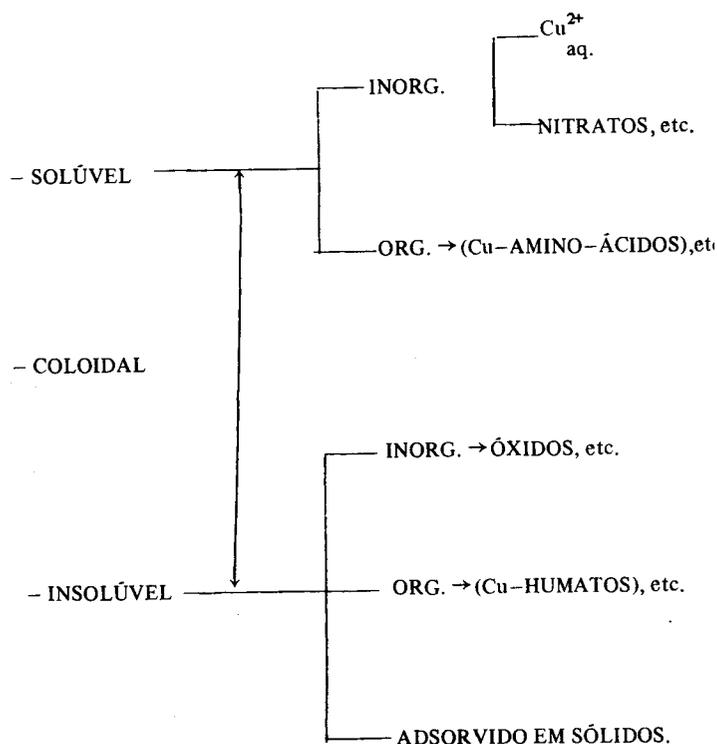
Conclusão

Quando em ambientes naturais, micro-organismos podem funcionar como indicadores da poluição oriunda da contaminação por metais pesados. Entretanto devemos ter em mente que as condições impostas no laboratório

são, na maioria dos casos, muito diferentes das encontradas na natureza não só no tocante às características físico-químicas do meio de cultura, mas principalmente quanto à bio-massa utilizada em testes de toxidez. Outro aspecto que merece especial atenção é a condição fisiológica inicial do organismo a ser testado, bem como a habilidade do mesmo em se adaptar às novas condições impostas pelo ensaio. Temperatura, ciclo de iluminação, micro-nutrientes disponíveis no meio de cultura são parâmetros que devem ser cuidadosamente controlados e mencionados para melhor caracterização do bio-ensaio. Desta maneira, os resultados gerados por tais ensaios podem ser comparados e reproduzíveis.

A caracterização do meio de cultura deve ser a meta prioritária do pesquisador engajado neste campo. O controle do pH é sempre recomendável porque, além de colocar o sistema mais próximo das condições naturais ambientais, inibe a grande variação na concentração dos íons cobre causada pela mudança de pH. Para tal o uso de tampões orgânicos tem se mostrado eficiente (Figura 1). No entanto deve-se computar que grande parte destes tampões pode complexar uma certa fração do metal, gerando resultados irreais caso não se apliquem correções adequadas.

QUADRO 1 — As diferentes formas de cobre no ambiente aquático.



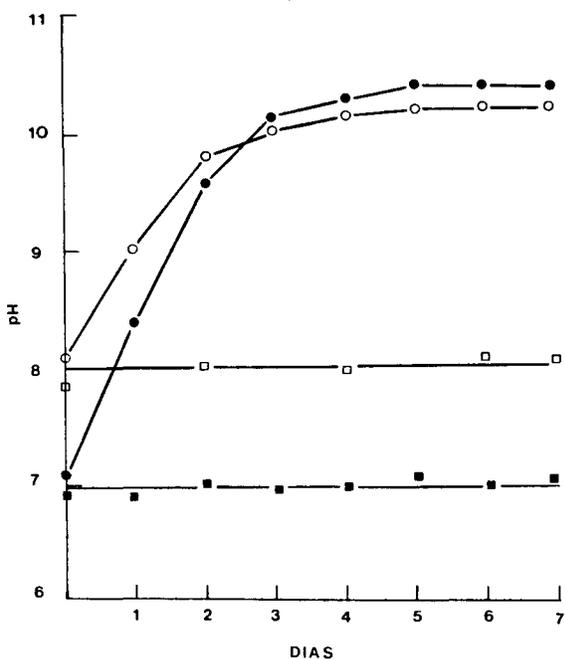


Fig. 1 - Variação do pH em função do tempo. Condições experimentais: iluminação contínua, meio de cultura Allen (12). (●) Alga verde-azulada em meio não tamponado e (▲) em meio com tampão HEPES à 10 mM. (○) Alga verde em meio não tamponado e (□) em meio com tampão BICINA à 10 mM.

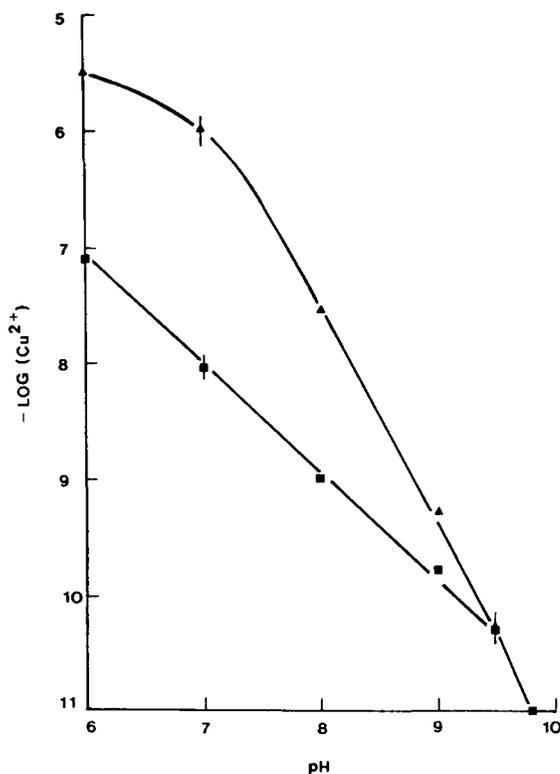


Fig. 3 - Variação da fração iônica do cobre em função do pH. Condições experimentais: (■) meio de cultura Allen; (▲) meio de cultura Allen sem EDTA e citrato férrico. Cu^{2+} determinado usando eletrodo específico (7)

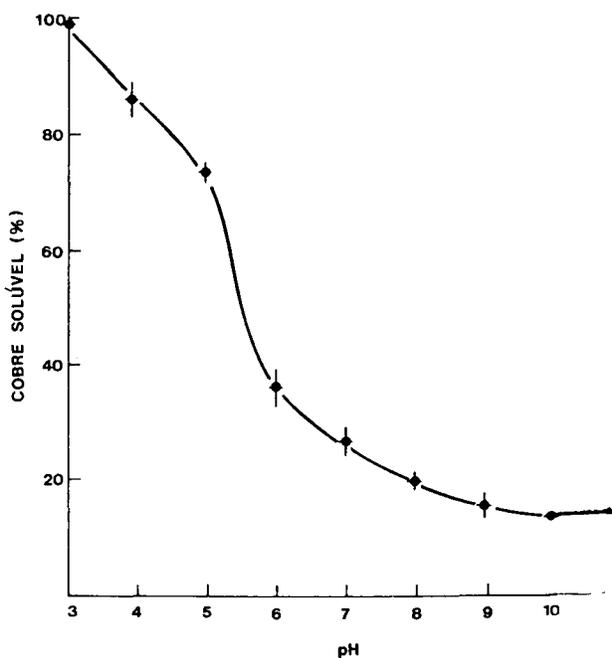


Fig. 2 - Precipitação do cobre em meio de cultura Allen em função do pH. Condições experimentais: $(\text{Cu}) = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$; amostras equilibradas por 24 h. e filtradas em papel Whatman GF/C. O filtrado foi acidificado (HNO_3 cc) e o cobre analisado usando Absorção Atômica (forno de grafite).

Referências Bibliográficas

1. G.W. Prescott. *Hydrobiologia*, 1, 1 (1948).
2. G.E. Fogg e D.F. Westlake. *Verh. int. Verein. Theor. angew. Limnol.*, 12, 219 (1955).
3. R.K. Gachter, Lum-Shue-Chan e Y.K. Chau. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 35, 252 (1974).
4. W. Sundae R.R.L. Guillard. *J. Mar. Res.*, 34, 511 (1976).
5. G.S. Canterford e D.R. Canterford. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)*, 60, 227 (1980).
6. H.E. Allen, R.H. Hall e T.D. Brisbin. *Environ. Sci. Technol.*, 14, 441 (1980).
7. W.F. Jardim e H.E. Allen. *International Symposium on Complexation of Trace Metals in Natural Waters. Netherland Institute for Sea Research. Texel, Holanda, 2 a 6 de maio de 1983.*
8. M.J. Stiff. *Water Research*, 5, 585 (1971).
9. K.H. Lieser, P. Burba, W. Calmano, W. Dyck, E. Heuss e S. Sondermeyer. *Mikrochimica Acta II*, 445 (1980).
10. E.W. Davey, M.J. Morgan e S.J. Erickson. *Limnol. Oceanogr.*, 18, 993 (1973).
11. P.A. Gillespie e R.F. Vaccaro. *Limnol. Oceanogr.*, 23, 543 (1978).
12. M.M. Allen. *J. Phycol.*, 4, 1 (1968).
13. S.A.L.M. Kooijman, A.O. Hanstveit e H. Oldersma. *Water Res.*, 17, 527 (1983).