



## **REMOÇÃO DE MERCÚRIO DE ÁGUA POR BIOSSORÇÃO ENVOLVENDO BACTERIÓFAGOS IMOBILIZADOS EM MATRIZ BIOPOLIMÉRICA**

Larissa F. dos Santos<sup>1</sup>

Denicezar Â. Baldo<sup>2</sup>

José M. Oliveira Jr<sup>3</sup>

Marta M. D. C. Vila<sup>4</sup>

Victor M. Balcão<sup>5</sup>

Saúde Ambiental

### ***Resumo***

A contaminação da água com mercúrio (Hg) constitui um grave problema de saúde pública, especialmente, em locais onde o uso de Hg ocorre de forma indevida/ilegal e negligente, como é o caso da Região Amazônica (Brasil), causando sérios danos ambientais e de saúde. O bioma aquático é de extrema importância para a economia e população local, sendo drasticamente afetado pela contaminação por Hg. Assim, é necessário desenvolver métodos de biorremediação/biomitigação visando a remoção de Hg das águas. Uma opção de metodologia alternativa para redução de Hg na água seria a biossorção por bacteriófagos. Neste sentido, foi desenvolvido um sistema de imobilização do bacteriófago em micropartículas de alginato de cálcio para adsorção de Hg. Os resultados, até o momento foram promissores, indicando elevada capacidade de biossorção de Hg pelos bacteriófagos microencapsulados.

**Palavras-chave:** Mercúrio; Contaminação da água; Víriões; Imobilização/estabilização de bacteriófagos; Biorremediação/biomitigação.

<sup>1</sup>Larissa F. dos Santos, aluna de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, [ferreira.lari2002@gmail.com](mailto:ferreira.lari2002@gmail.com).

<sup>2</sup>Prof. Me. Denicezar Â. Baldo, Universidade de Sorocaba, Campus Cidade Universitária, LaFiNAU, [denicezar.baldo@prof.uniso.br](mailto:denicezar.baldo@prof.uniso.br).

<sup>3</sup>Prof. Dr. José M. Oliveira Jr – LaFinNAU, [jose.oliveira@prof.uniso.br](mailto:jose.oliveira@prof.uniso.br).

<sup>4</sup>Profa. Dra. Marta M. D. C. Vila- VBlab, [marta.vila@prof.uniso.br](mailto:marta.vila@prof.uniso.br)

<sup>5</sup> Orientação: Prof. Dr. Victor M. Balcão, Universidade de Sorocaba, VBlab, [victor.balcao@prof.uniso.br](mailto:victor.balcao@prof.uniso.br)

## INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um dos contaminantes mais perigosos do planeta. A contaminação ambiental por mercúrio afeta grandes populações, tornando-o uma questão importante do ponto de vista da saúde pública. Efeitos adversos à saúde são comumente observados no sistema nervoso com sérios e irreversíveis danos neurológicos em animais e humanos (Vianna *et al.*, 2019).

A contaminação por mercúrio é um grave problema ambiental, particularmente na região Amazônica Brasileira, em função de garimpo ilegal. Um exemplo disso é o que ocorre na região dos rios de Couto de Magalhães, Catrimani, Paríma e Uraricoera, que apresentaram uma quantidade de 8600% acima a do limite permitido de mercúrio (Ramalho *et al.*, 2022). O uso generalizado de mercúrio na mineração de ouro tem levado à contaminação do ambiente e das pessoas, ameaçando a biodiversidade, a saúde humana e os meios de subsistência das populações tradicionais (Venturieri *et al.*, 2017). Os métodos rudimentares de extração de ouro lançam mercúrio nos recursos hídricos circundantes, com a geração da forma mais tóxica e biodisponível de Hg, o metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), através da conversão de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Hg}^0$  aquosos por bactérias redutoras de sulfato em ambientes aquáticos anóxicos. O  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  sobe então na cadeia alimentar de água doce através das raízes das plantas aquáticas e atinge os níveis tróficos dos peixes, onde se bioacumula e biomagnifica em concentrações mais elevadas nos tecidos dos principais predadores, incluindo o homem (Martoredjo *et al.*, 2024).

Pesquisas tem indicado que a contaminação por mercúrio, na Região Amazônica Brasileira têm afetado tanto indivíduos de áreas urbanas quanto ribeirinhas, que relataram consumo frequente de pescado local. Altos níveis desse metal foram encontrados em pessoas de todas as faixas etárias, ambos os sexos e todos os níveis de escolaridade. No entanto, os níveis mais elevados foram registados em pessoas que relataram elevado consumo diário de peixe. Isto indica que a exposição ao mercúrio não está apenas ligada ao local de residência, mas é diretamente influenciada pelo consumo de pescado contaminado (Meneses *et al.*, 2022). Estudos realizados na Bacia Amazônica têm revelado que grande parte dos peixes capturados nesta região apresentam níveis de metilmercúrio acima dos limites estabelecidos como aceitáveis (Vasconcellos *et al.*, 2022).

Neste sentido, medidas eficientes são essenciais para solucionar ou minimizar o problema da contaminação das águas por mercúrio no Brasil.

Tendo-se em mente que os vírus podem ser usados para processos de adsorção de íons de metais, ao invés da redução/metabolização dos mesmos, a aplicação desses se torna uma promissora opção. Os dos bacteriófagos com morfotipo T4, possuem sítios de ligação carregados negativamente, que são o término carboxilado das proteínas Soc (pequeno capsídeo externo) e o término amino das proteínas Hoc (capsídeo externo altamente antigênico) (Zhu *et al.*, 2023; Rao & Black, 2010). Provavelmente, tais sítios no capsídeo do bacteriófago T4 sejam capazes de bioissorver cátions (Tan, 2014; Dong *et al.*, 2021).

Nesta perspectiva e, pensando em métodos eficazes, de baixo custo e que não agridam o meio ambiente, os bacteriófagos surgem como uma opção promissora para a remoção por bioissorção de íons  $Hg^{2+}$  de águas contaminadas. Nesta pesquisa, avaliou-se a possibilidade de utilizar o sistema proteico estrutural de bacteriófagos em para a bioissorção de mercúrio visando remoção deste metal de água contaminada.

## METODOLOGIA

O bacteriófago denominado EcoM02 utilizado foi previamente isolado de fontes ambientais e caracterizado por Balcão *et al.* (2022).

Os bacteriófagos foram aprisionados em micropartículas de alginato de cálcio revestidas com quitosana a 0,3% (m/m) segundo Pereira *et al.* (2023) com pequenas alterações. As micropartículas com os bacteriófagos foram colocadas em um sistema integrando uma seringa de 100 mL em suporte universal, de modo a funcionar como uma coluna de empacotamento onde, no topo, foram adicionadas soluções aquosas com diferentes concentrações de mercúrio.

As micropartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio JEOL (model JSM-IT200, Tokio, Japão) e por análise tomografia por transmissão de Raios-X (XRT), utilizando tomógrafo Bruker microCT. A superfície e a morfologia, bem como a composição elementar da matriz biopolissacarídica das micropartículas também foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da JEOL (modelo JSM-IT200, Tóquio,



Japão) equipado com um espectrômetro de raios X por energia dispersiva (EDS) (detector JEOL - modelo DRY SD™25, Tóquio, Japão).

As micropartículas (com e sem bacteriófagos), após percolação com soluções com concentrações variadas de mercúrio foram analisados por espectrometria de fluorescência de Raios-X por dispersão de energia (EDXRF) para quantificar íons  $Hg^{2+}$  retido nas micropartículas.

Determinou-se a diferença de potencial das amostras de água coletadas na saída da coluna contendo as micropartículas (com e sem bacteriófagos) foram avaliadas usando um milivôlmetro (marca Hamilton, modelo POLYPLAST CABO FIXO BNC).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas de alginato de sódio e quitosana desenvolvida para o aprisionamento dos bacteriófagos e percolação de água contaminada por mercúrio apresentou estrutura uniforme e compacta e sem a formação de bolhas de natureza hidrofóbica. Essas observações são significativas, uma vez que, indica que os bacteriófagos estavam uniformemente dispersos dentro da matriz biopolimérica. Em relação a sua composição elementar, destacou-se a presença de oxigênio (O), carbono (C), sódio (Na), cloro (Cl), cálcio (Ca), cobre (Cu), zinco (Zn) e mercúrio (Hg). Nas partículas contendo os fagos observou-se, após percolação de água contaminadas com de íons  $Hg^{2+}$ , uma quantidade muito maior de zinco e mercúrio ( quase o dobro de mercúrio), o que foi mais um indicativo da capacidade dos bacteriófagos de reter mercúrio por biossorção eletrostática.

O efeito da presença de bacteriófagos nas micropartículas biopoliméricas foi significativo em termos de redução da diferença de potencial nas soluções percoladas através das micropartículas, indicando que o mercúrio foi retirado das soluções aquosas.

As micropartículas contendo vírions fagos, através dos quais foram percoladas soluções com concentrações variadas de íons  $Hg^{2+}$ , foram também analisadas por espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF), objetivando quantificar o mercúrio retido através da biossorção do bacteriófago. Foi obtida uma relação praticamente linear entre a quantidade de mercúrio ( $\mu g$ ) retido por biossorção nas micropartículas contendo os bacteriófagos e a quantidade de íons  $Hg^{2+}$



na água percoladas. A quantidade de mercúrio ( $\mu\text{g}$ ) retido por bioissorção por unidade de massa (g) de micropartículas aumentou com a concentração de íons de  $\text{Hg}^{2+}$  na água percolada até uma concentração de  $12 \mu\text{molHg}^{2+}/\text{L}$  água. Acima deste valor a quantidade de mercúrio retido pela bioissorção não aumenta, atingindo um nível assintótico. Provavelmente, um estado de saturação das micropartículas pode ter sido alcançado em termos da quantidade retida de íons  $\text{Hg}^{2+}$

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercúrio é um metal pesado de difícil quantificação, principalmente devido às suas características voláteis. Contudo, o método analítico utilizado para sua qualificação foi capaz de produzir resultados razoáveis. A capacidade do sistema desenvolvido para promover a remoção de íons  $\text{Hg}^{2+}$  mercúrio de águas contaminadas por bioissorção eletrostática simples por bacteriófagos foi inquestionável. A matriz polimérica utilizada no aprisionamento dos bacteriófagos foi adequada, permanecendo íntegra em todo o experimento. Isto é um dado importante, uma vez que não permitiu a liberação do bacteriófago no meio.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de Iniciação Científica (IC) concedida para L.S.F.

## REFERÊNCIAS

Balcão, V. M.; Belline, B. G.; Silva, E. C.; Almeida, P. F. F. B.; Baldo, D. Â.; Amorim, L. R. P.; Oliveira Júnior, J. M.; Vila, 705 M. M. D. C.; Del Fiol, F. S. (2022) Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages 706 for the biocontrol of *Escherichia coli* in uterine infections: in vitro and ex vivo preliminary studies in Veterinary Medicine. *Pharmaceutics* 14 (11): 2344; doi: 10.3390/pharmaceutics14112344



- Dong, J.; Chen, C.; Liu, Y.; Zhu, J.; Li, M.; Rao, V. B.; Tao, P. (2021) Engineering T4 bacteriophage for in vivo display by type V CRISPR-Cas genome editing. *ACS Synth. Biol.* 10 (10): 2639-2648; doi: 10.1021/acssynbio.1c00251.
- Martoredjo I.; Calvão Santos, L.B.; Vilhena J.C.E.; Rodrigues, A.B.L.; de Almeida A.; Sousa Passos, C.J.; Florentino, A.C. (2024) Trends in mercury contamination distribution among human and animal populations in the Amazon Region. *Toxics.* 12 (3): 204. doi: 10.3390/toxics12030204.
- Meneses, H. D. N. M.; Oliveira-da-Costa, M.; Basta, P. C.; Morais, C. G.; Pereira, R. J. B.; de Souza, S. M. S.; Hacon, S. S. (2022) Mercury Contamination: A Growing Threat to Riverine and Urban Communities in the Brazilian Amazon. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19 (5): 2816; doi: 10.3390/ijerph19052816.
- Pereira, A.O.; Barros, N.M.A.; Guerrero, B.R.; Emencheta, S.C.; Baldo, D.Â.; Oliveira Jr., J.M.; Vila, M.M.D.C.; Balcão, V.M. (2023) An edible biopolymeric microcapsular wrapping integrating lytic bacteriophage particles for *Salmonella enterica*: potential for integration into poultry feed. *Antibiotics* 12, 988; doi:10.3390/antibiotics12060988
- Ramalho, Y.; Oliveira, V.; Marques, M.; Abreu, L.; g1 RR; Rede Amazônica (2022) Rios na Terra Yanomami têm 8600% de contaminação por mercúrio, revela laudo da PF. G1. Available at: <https://g1.globo.com/rr/roraima/noticia/2022/06/06/rios-na-terra-yanomami-tem-8600percent-de-contaminacao-por-mercúrio-revela-laudo-da-pf.ghtml>. Accessed on: 09/05/2024.
- Rao, V. B.; Black, L. W. (2010) Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology* 407: 356; doi: 10.1016/j.virol.2010.07.017.
- Tan, Z. H. (2014) Biosorption of Heavy Metals onto the Surface of Bacteriophage T4. Dissertations and Theses in Biological Sciences. 64. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA; Available at: <http://digitalcommons.unl.edu/bioscidiss/64>.
- Vasconcellos, A.C.S.; Ferreira, S.R.B.; de Sousa, C.C.; de Oliveira, M.W.; de Oliveira Lima, M.; Basta, P.C. (2022) Health risk assessment attributed to consumption of fish contaminated with mercury in the Rio Branco Basin, Roraima, Amazon, Brazil. *Toxics* 10 (9): 516.; doi:10.3390/toxics10090516
- Venturieri, R.; Oliveira-da-Costa, M.; Gama, C.; Jaster, C.B. (2017) Mercury contamination within protected areas in the Brazilian Northern Amazon-Amapá State. *Am. J. Environ. Sci.* 13(1): 11-21; doi:10.3844/ajessp.2017.
- Vianna, A.S.; Matos, E.P.; Jesus, I.M.; Asmus, C.I.R.F.; Câmara, V.M. (2019) Human exposure to mercury and its hematological effects: a systematic review *Cad. Saúde Pública* 35(2):e00091618
- Zhu, J.; Batra, H.; Ananthaswamy, N.; Mahalingam, M.; Tao, P.; Wu, X.; Guo, W.; Fokine, A.; Rao, V. B. (2023) Design of bacteriophage T4-based artificial viral vectors for human genome remodeling. *Nat Commun.* 14 (1): 2928; doi: 10.1038/s41467-023-38364-1.