

HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS

**USO DE SENSOR DE POLIDIACETILENO PARA DETECÇÃO DE
CONTAMINANTES QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS EM ÁGUA
POTABILIZADA PARA CONSUMO HUMANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M488u
2016

Medeiros, Hiasmyne Silva de, 1985-

Uso de sensor de polidiacetileno para detecção de
contaminates químicos e microbiológicos em água potabilizada
para consumo humano / Hiasmyne Silva de Medeiros. – Viçosa,
MG, 2016.

xii, 118f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélío José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Água - Qualidade. 2. Água - Purificação. 3. Compostos
halogenados. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

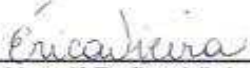
CDD 22 ed. 664.07

HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS

USO DE SENSOR DE POLIDIACETILENO PARA DETECÇÃO DE
CONTAMINANTES QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS EM ÁGUA
POTABILIZADA PARA CONSUMO HUMANO

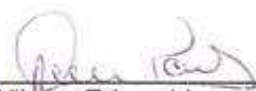
Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

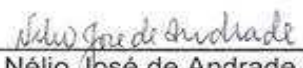
APROVADA: 21 de outubro de 2016.


Érica Nascif Rufino Vieira


Patrícia Érica Fernandes


Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)


Wilmer Edgard Luera Peña


Nélcio José de Andrade
(Orientador)

As pessoas que mais amo nesse mundo, especialmente a minha mãe Maria Aparecida, ao meu pai Heron e aos meus irmãos Hedwirges e Davi Rubens.

Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele minha vida não teria sentido. Agradeço por está sempre comigo em todos os momentos de minha, por ter guiado os meus passos, pelo teu amor eterno.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-graduação, em nível de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Com muito carinho a minha família, especialmente, ao meu pai Heron Medeiros, a minha mãe Maria Aparecida da Silva Medeiros e aos meus irmãos Hedwirges Silva de Medeiros e Davi Rubens Medeiros, pelo apoio, amor e por estarem sempre comigo!

Ao meu orientador, Nélcio José de Andrade, pela orientação, por sua presença constante em todas as etapas de realização da tese, pela amizade, apoio e pela confiança em mim conferida.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, por ter sido minha coorientadora durante meu doutorado, pela amizade e por tudo que fez por mim durante minha vida acadêmica.

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires, por ter sido minha coorientadora, pela ajuda e contribuição na tese.

Aos professores Wilmer Edgard Luera Pena, Erica Nascif Rufino Vieira e Patrícia Érica Fernandes pela disponibilidade e participação em minha banca.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia e Higiene Industrial, pela amizade e apoio, especialmente a Valéria pela amizade e os dias que passou comigo trabalhando no laboratório.

Aos meus parentes, aos meus tios e tias, primos e primas pelo amor e por sempre torcerem por mim, especialmente a minha avó Maria Verônica e aos que já se foram Raimundo, Rubens e Margarida Maria (Ângela).

Ao José Antônio, por está sempre comigo me apoiando e por todo amor em minha vida.

A cada um dos meus amigos e amigas pela amizade incondicional e por torcerem sempre por mim. Ao meu cunhado Pablo, pela amizade e torcida. A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu chegasse aonde cheguei, o meu muito obrigado!!

“Eu posso ir muito além de onde estou, vou nas asas do Senhor, o Teu amor é o que me conduz”

Pe. Fábio de Melo

BIOGRAFIA

HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS, filha de Heron Medeiros e Maria Aparecida da Silva Medeiros, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 04 de abril de 1985.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o mestrado no Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade federal de Viçosa.

Ingressou em agosto de 2011 no Doutorado do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, concluindo-o em outubro 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.3. Mecanismo de transição colorimétrica	9
3.4. Sensores a base de Polidiacetilenos (PDAs).....	11
3.6. Qualidade da água potável	17
3.7. Trihalometanos	18
3.8. Micro-organismos patógenos na água.....	24
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2	36
1. RESUMO	36
2. INTRODUÇÃO	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Reagentes.....	39
4.2. Produção das nanovesículas a base de PDA.....	39
4.3. Modificações nas diferentes condições de temperatura, pH e força iônica das suspensões vesiculares de PDA.....	40
4.4. Resposta Colorimétrica (RC).....	41
4.5. Medidas de tamanho por espalhamento dinâmico de luz e do potencial zeta. ..	41
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
6. RESULTADOS	42
6.1. Influência da temperatura nas vesículas de PDAs.....	42
6.2. Influência do pH no comportamento das vesículas a base de PDA.....	47

6.3. Influência da força iônica no comportamento das vesículas à base de PDA	51
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO 3	62
1. RESUMO	62
2. INTRODUÇÃO	63
3. OBJETIVO.....	65
3.1. Objetivo geral	65
3.2. Objetivos específicos	65
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1. Reagentes.....	66
4.2. Produção das nanovesículas a base de PDA.....	66
4.3. Detecção de trihalomentanos em água potabilizada	67
4.4. Resposta Colorimétrica (RC).....	67
4.5. Medidas de tamanho por Espalhamento dinâmico de luz e do Potencial Zeta.	68
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
6. RESULTADOS E DISCURSÃO.....	69
6.1. Identificação de triclorometano em água por vesículas de PDA	69
6.2. Determinação de diclorobrometano (DCBM) em água por vesículas de PDA ..	74
6.3. Identificação de dibromoclorometano (DBCM) em água por vesículas de PDA ..	77
6.4. Identificação de Bromofórmio (BM) em água por vesículas de PDA	79
6.5. Determinação do potencial zeta das suspensões na presença dos THM ao logo do tempo	82
7. CONCLUSÃO	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CAPÍTULO 4	86
1. RESUMO	86
2. INTRODUÇÃO	87
3. OBJETIVO.....	88
3.1. Objetivo geral	88
3.2. Objetivos específicos	88
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
4.1. Reagentes e micro-organismos.....	89
4. 2. Preparo das suspensões microbianas	89

4.3. Produção das nanovesículas a base de PDA.....	90
4.4. Resposta Colorimétrica (RC).....	90
4.5. Medidas de tamanho por Espalhamento dinâmico de luz e do Potencial Zeta ..	91
4.6. Detecção de micro-organismos em água potabilizada.....	91
4.7. Avaliação da RC de vesículas de PCDA, TRCDA e PCDA/TRDCA em gel vesicular a base de PCA, na detecção microbiana.....	92
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	93
6. RESULTADOS E DISCURSÕES	93
6.1. Avaliação das suspensões de vesículas de PDA na presença de micro-organismos	93
6.3. Avaliação do potencial zeta das vesículas de PDA na presença dos micro-organismos em água	102
6.4. Avaliação da mudança de cor das vesículas em meio de cultura	105
7. CONCLUSÕES	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
CONCLUSÃO GERAL.....	118

RESUMO

MEDEIROS, Hiasmyne Silva de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Uso de sensor de polidiacetileno para detecção de contaminantes químicos e microbiológicos em água potabilizada para consumo humano.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadoras: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Ana Clarissa dos Santos Pires.

A demanda por água de boa qualidade tem-se acentuado muito nos últimos anos, devido ao crescimento populacional. Muitos contaminantes levantam uma preocupação considerável tanto nos aspectos toxicológicos, físico-químicos e microbiológicos, especialmente quando estão acima dos valores de referência baseados em saúde humana. O desenvolvimento de sensores utilizando polímeros conjugados eficientes como matrizes de sensoriamento tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Especialmente, os sensores de Polidiacetilenos para a detecção de espécies biologicamente e quimicamente importantes têm sido intensamente investigadas devido à sua resposta quanto à mudança das propriedades colorimétricas. Para caracterizar uma água potável, são determinados diversos parâmetros, os quais representam as suas características físicas, químicas e biológicas. Esses parâmetros são indicadores da qualidade da água e constituem impurezas quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinado uso. Por isso, este estudo objetivou utilizar diferentes vesículas de polidiacetileno para avaliar a qualidade química e microbiológica da água para consumo humano, bem como otimização das condições de sensibilidade a mudança de cor dos sensores colorimétricos. Foram produzidas três tipos de vesículas diferentes: a de 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), de 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA) e com os dois PDAs (TRCDA+PCDA) e submetidas a diferentes condições termodinâmicas como mudanças no pH, temperatura e força iônica. Em cada condição foi avaliado tamanho, resposta colorimétrica e potencial zeta de cada suspensão vesicular. A presença de NaCl, a mudança de temperatura e pH resultaram na transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo que a sensibilidade e a porcentagem da resposta colorimétrica foram dependentes da composição das suspensões vesiculares e da condição termodinâmica estudada. Os tratamentos controles permaneceram na cor azul não havendo

transição colorimétrica mostrando que as mudanças colorimétricas que ocorrem durante os estudos foram causadas pela mudança termodinâmica do meio. Com base nos resultados, pode-se concluir que os valores de pH 7 temperatura de 40 °C e a concentração de 50 mmol·L⁻¹ de NaCl são as condições limites que antecederam a transição colorimétrica do azul para o vermelho para todas as vesículas e por isso foram utilizados no estudo posterior para identificação de trihalometanos (THMs) em água potável, afim de facilitar a mudança de cor. A presença do triclorometano (TCM), diclorobromometano (DCBM) e dibromoclorometano (DBCM) provocaram a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo a interação entre os THMs foi dependente da composição das vesículas. Estes resultados apontam a potencialidade do uso destas nanoestruturas como sensores para identificação de THM em água para consumo humano. A vesícula de TRCDA+PCDA conseguiu identificar três dos quatro THMs estudados. O bromofórmio foi o único THM que não teve resposta colorimétrica para nenhum dos sensores testados. Para o estudo dos micro-organismos a suspensão de vesícula TRCDA+PCDA obteve uma RC maior para *Escherichia fergusonii* do que para *Enterococcus faecium*, havendo transição colorimétrica apenas para primeira bactéria, com o tempo de 12 h de incubação a 35 °C, em todas as concentrações estudadas. Os sensores em gel Agar também o apresentaram mudança da cor verde para vermelho na presença de *E. fergusonii* com um tempo mínimo de 8 h e não mudou de cor para o micro-organismo *E. faecium* durante 22 h de incubação a 35 °C. Este trabalho auxiliou no entendimento do comportamento do processo associado à transição colorimétrica das vesículas e, além disso, serviu de base para aplicação das vesículas como sensores ou biossensores colorimétricos para controle e avaliação de água para consumo.

ABSTRACT

MEDEIROS, Hiasmyne Silva, D.Sc. Federal University of Viçosa, October, 2016.
Polidiacetileno sensor used for detecting chemical and microbiological contaminants in drinking potable water. Adviser: Nelio José de Andrade Co-advisers: Nilda de Fátima Ferreira Soares and Ana Clarissa dos Santos Pires.

The demand for good quality water has been accentuated in recent years due to population growth. Many contaminants pose a considerable concern both in toxicology, physical, chemical and microbiological aspects, especially when they are above the reference values based on human health. The development of sensors using efficient conjugated polymers as sensing arrays has received considerable attention in recent decades. Especially, the PDA sensors to detect chemically and biologically important species have been intensively investigated due to their answer as to change the colorimetric properties. To characterize a drinking water are determined various parameters, which represent its physical, chemical and biological. These parameters are water quality indicators and are impurities when they reach values higher than those established for a particular use. Therefore, this study aimed to use different vesicles polidiacetileno to evaluate the chemical and microbiological quality of water for human consumption as well as the optimization of the sensitivity of conditions the color change of the colorimetric sensors. Three different vesicles were produced: the PCDA of TRCDA and the two PDA (TRCDA + PCDA) and under different thermodynamic conditions such as changes in pH, temperature and ionic strength. In each condition was evaluated size, colorimetric response and zeta potential of each vesicle suspension. The presence of NaCl, the change of temperature and pH resulted in the colorimetric transition from polidiacetilênicas vesicles, and the sensitivity and Percentage RC were dependent on the composition of the vesicle suspensions and thermodynamic condition studied. Treatments controls remained blue in color with no showing that the colorimetric transition colorimetric changes occurring during the study were caused by the thermodynamic medium change. Based on the results, it can be concluded that pH 7 Temperature 40° C and concentration of 50 mmol·L⁻¹ of NaCl are the boundary conditions that antecedema colorimetric transition from blue to red for all vesicles and They were used in this study for subsequent identification of trihalomethanes in drinking water,

in order to facilitate the color change. The presence of TCM, DCBM and DBCM caused the colorimetric transition from polidiacetilênicas vesicles, and the interaction between THMs was dependent on the composition of the vesicles. These results indicate the potential use of these nanostructures as sensors for identification THM in drinking water. The vesicle TRCDA + PCDA was able to identify three of THMs the 4th studied. The bromoform was the only THM colorimetric response that was not tested for any of the sensors. For the study of microorganisms vesicle suspension TRCDA + PCDA obtained a CR higher for *Escherichia fergusonii* than for *Enterococcus faecium*, having colorimetric transition only for first bacterium, over time 12 h incubation at 35 °C in all concentrations studied. Agar gel Sensors also obtained green to red color change in the presence of *E. fergusonii* with a minimum time of 8 h and has not changed color to *E. faecium* microorganism during 22 h incubation at 35 °C. This work has helped in understanding of the process behavior associated with the colorimetric transition of vesicles and further provides the basis for application of the vesicles as colorimetric sensors or biosensors for control and evaluation of drinking water.

INTRODUÇÃO GERAL

Recentemente, novos métodos são estudados com o objetivo de permitir a identificação simples e rápida de contaminantes químicos e microbiológicos em água ou em alimentos. Dentre eles, desenvolvimento de sensores que se podem apresentar de diversas formas, vem chamando atenção.

As vesículas de polidiacetileno (PDA) mostraram transições cromogênicas em respostas a estímulos externos, tipicamente convertendo o polímero da cor azul para a vermelha. Devido às propriedades emissivas e à resposta ambiental crômica, compostos como PDA, têm sido particularmente atrativos para aplicação em biossensores, permitindo investigar variações ambientais tais como: mudança de pH, detectar a presença de compostos químicos, mudanças térmicas, estresse mecânico, além de presença de micro-organismos.

Pesquisas têm demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de PDA para atuarem como moléculas receptoras de moléculas alvo, permitindo uma identificação simples e rápida de compostos de interesse. Dessa forma, o uso de sensores colorimétricos, como as vesículas de PDA, torna-se uma alternativa às técnicas convencionais, como cromatografia, contagem padrão em placa e outras.

A água contém, geralmente, diversos componentes, os quais provêm do próprio ambiente natural ou foram introduzidos a partir de atividades humanas, como por exemplo a agricultura e industrialização. Para caracterizar uma água potável, são determinados diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos, que são indicadores de qualidade da água e constituem impróprios quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinado uso.

Por isso, o uso de sensores colorimétricos pode ser uma alternativa simples, prática e rápida para detecção de compostos e micro-organismos em água potabilizada para consumo humano, avaliando sua qualidade físico-química e microbiológica.

CAPÍTULO 1

SENSORES DE POLIDIACETILENO E OS CONTAMINANTES QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA POTÁVEL: UMA REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

As vesículas de polidiacetileno (PDA) mostraram transições cromogênicas em respostas a estímulos externos, tipicamente convertendo o polímero da cor azul para a vermelha. Devido às propriedades emissivas e à reposta ambiental crômica, compostos como polidiacetileno têm sido particularmente atrativos para aplicação em biossensores, permitindo investigar variações ambientais tais como: mudança de pH, detectar a presença de compostos químicos, mudanças térmicas, estresse mecânico, além de presença de micro-organismos.

Estudos vêm mostrando uma variedade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de PDA para atuarem como sensores, permitindo uma identificação simples e rápida de compostos de interesse. Dessa forma, o uso de sensores colorimétricos, como as vesículas de PDA, torna-se uma alternativa às técnicas convencionais, como cromatografia, contagem padrão em placa e outras.

2. OBJETIVO

Realizar um estudo bibliográfico sobre o uso de vesículas de polidiacetilenos, como sensores colorimétricos e sobre os principais contaminantes na água para consumo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biossensores Colorimétricos

Um sensor é definido como um dispositivo usado para detectar, localizar e quantificar a energia ou matéria, produzindo um sinal para a detecção ou medição de uma propriedade física ou química para a qual o dispositivo responde. Para se

qualificar como um sensor, um dispositivo deve fornecer um sinal contínuo. A maioria dos sensores pode conter duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. No receptor físico ou químico a informação é transformada em uma forma de energia que pode ser medida pelo transdutor. O transdutor é um dispositivo capaz de transformar a energia química ou física que transporta as informações sobre o produto em um sinal analítico (KERRY et al., 2006).

Assim, o desenvolvimento de melhores métodos para determinar a qualidade dos alimentos é extremamente importante para os fabricantes de alimentos, bem como para o consumidor, proporcionando segurança alimentar.

Segundo Yam et al. (2005), os biossensores são dispositivos compactos analíticos que detectam, registram e transmitem informações relativas em resposta às reações biológicas. Os biossensores consistem de um biorreceptor com função específica para analisar e um transdutor para converter os sinais biológicos quantificáveis dando resposta elétrica. Biorreceptores são materiais orgânicos tais como enzimas, antígenos, anticorpos, micro-organismos, hormônios e ácidos nucleicos. Os transdutores podem ser eletroquímicos, óticos, calorimétricos, entre outros e são dependentes do sistema.

Devido a esta seletividade, os biossensores oferecem a oportunidade de desenvolver dispositivos altamente específicos para um tempo real de análise em uma mistura complexa, sem a necessidade de pré-tratamento extensivo nas amostras ou grande volume de amostras. Ainda possui uma alta sensibilidade, rapidez, reprodução e ferramentas analíticas de fácil operação (GARCIA e MOTTRAN, 2003).

Biossensores vêm sendo pesquisados visando identificar reações específicas, que normalmente acontecem na natureza. Estas interações podem ocorrer de várias formas entre enzima e substrato, entre receptor e ligante e entre antígeno e anticorpo. Todas estas formas podem ser incorporadas na estrutura dos biossensores (OKADA et al., 1998).

3.2. Biossensores a base de Polidiacetileno (PDA)

Um componente que vem sendo estudado para aplicação em biossensores é o polidiacetileno (PDA) que apresenta característica própria de transição ótica

(OKADA et al., 1998). O PDA é um polímero anfifílico composto por uma parte polar, cujo grupo funcional é o ácido carboxílico e uma cauda apolar alquila. Os compostos 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA) e 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA) são exemplos de polidiacetileno (JAWOSKI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011).

O PDA é formado pela adição de 1,4 de monômeros de diacetileno (Figura 1), que quando irradiados com raios ultravioletas formam polímeros conjugados com alternância ene-ino em sua estrutura carbônica, sendo que não é necessária a adição de catalisadores ou inibidores para acarretar essa polimerização. Essa polimerização da cadeia do diacetileno é fortemente afetada por interações aromáticas, cadeias de hidrogênio, e interações hidrofóbicas especialmente entre grupos funcionais adjacentes (LEE *et al.*, 2011).

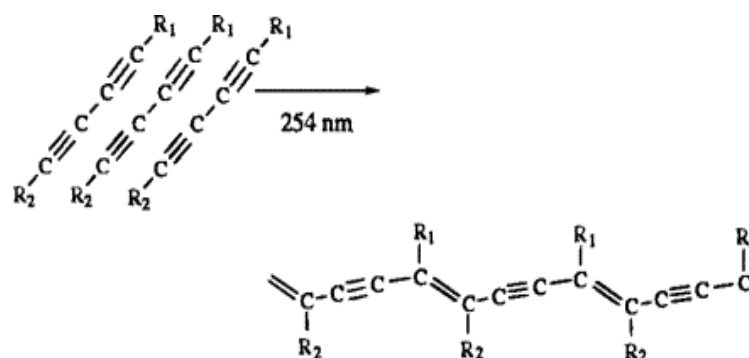


Figura 1. Polimerização de monômeros de diacetileno iniciada pela radiação UV
Fonte: OKADA *et al.*, 1998.

Os biossensores de PDA exibem absorvância acentuada nos picos de 640 nm ou 540 nm (Figura 2) resultando na forma não fluorescente azul e na forma fluorescente vermelha, respectivamente (WUT *et al.*, 2011). A transição espectrofotométrica, ou a transição colorimétrica azul-vermelho, muitas vezes é visível e tem sido explorada em diversos estudos para detecção de diversas alterações no sistema (OKADA et al., 1998; SHIN et al., 2015; SUN et al., 2010).

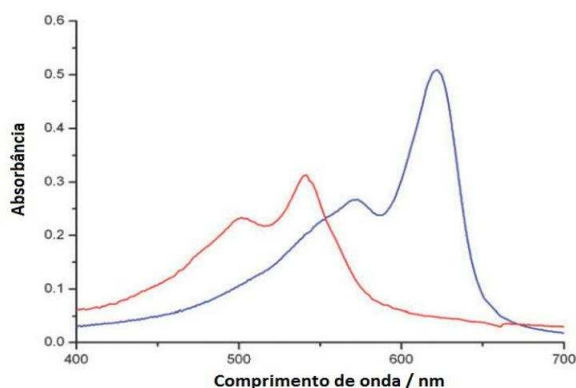


Figura 2. Espectros de absorção UV-Vis dos PDAs nos picos de 640 nm ou 540 nm.

Os PDAs são capazes de se auto-organizarem como filmes de languimir (Figura 3a), ou na forma de vesículas (Figura 3b) (PAN et al., 2011), dependendo das condições ambientais submetidas. Vesículas são estruturas em bicamadas, formadas por moléculas anfifílicas. Se estas estruturas são formadas por moléculas de fosfolipídios são, então, chamadas de lipossomas (SEGOTA e TEZAK, 2006).

Moléculas anfifílicas que não se organizam em estruturas compactas, como as micelas, geralmente se associam para formar vesículas ou bicamadas planas. Elas ocorrem por meio de um processo de auto-agregação molecular ou ao nível de escala nanométrica com uma grande variedade estrutural e diversas propriedades, proporcionando um ambiente reativo para as reações químicas (GIOKAS and VLESSIDIS, 2011).

Essas moléculas, em geral, possuem pequenos grupos hidrofílicos e grupos hidrofóbicos grandes e volumosos que impedem a formação de micelas. Portanto não exibem a forma de uma esfera sólida, mas sim a forma de uma esfera que contém um compartimento aquoso no interior da bicamada lipídica (SU et al., 2004). Sua alta versatilidade e reconhecida utilidade em várias aplicações provocaram um esforço científico interdisciplinar sobre a sua formação, caracterização e potenciais aplicações com resultados importantes (GIOKAS and VLESSIDIS, 2011).

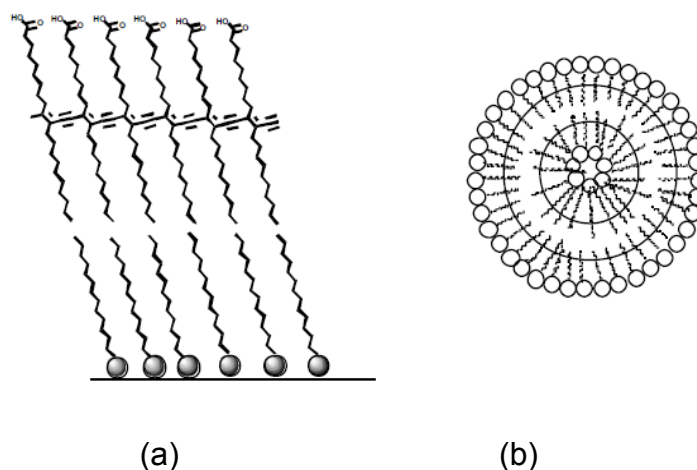


Figura 3. Formas de organização do polímero polidiacetileno: (a) Filme ultrafino em suporte sólido e (b) Vesícula em solução.

Fonte: PIRES, 2010.

A estabilidade destes agregados é governada pelas forças de interação entre os monômeros de diacetileno posicionados no interior da membrana, incluindo as forças de Van der Waals e forças de estabilização estérica. As forças de atração entre as cadeias hidrofóbicas e as forças repulsivas entre os grupos de cabeça hidrofílica irão determinar a geometria, o tamanho e a estabilidade das vesículas. (KIM et al., 2005).

Contudo, Kim et al. (2008) demonstraram que essas vesículas de PDA podem ser embebidas em filmes poliméricos e serem prontamente obtidos em soluções secas de polivinil-álcool (PVA), proporcionando maior estabilidade.

Da mesma forma, as bicamadas planas são camadas monomoleculares com espessura de uma única molécula constituídas de polidiacetilenos conhecidas como filmes de langmuir, e são obtidas espalhando-se uma pequena quantidade de um material, em geral, anfipático que contém parte hidrofílica e parte hidrofóbica sobre uma superfície aquosa muito limpa. Este material é inicialmente dissolvido num solvente volátil, que se evapora após a solução ser espalhada sobre a água. A camada monomolecular, insolúvel, é comprimida por barreiras móveis, promovendo a organização das moléculas e formação de uma monocamada molecular na forma de um filme altamente orientado no estado condensado (GAINES JR., 2006).

Tanto o filme de polidiacetileno (PDA) quanto à vesícula apresentam coloração azul, que pode se tornar vermelha em função de alterações em sua

estrutura, ocasionada por vários fatores externos, como a variação da temperatura, o efeito de estresse mecânico, a adição de solventes orgânicos, algumas perturbações interfaciais, a variação do pH, entre outros (JAWOSKI et al., 2011). Por exemplo, pela incorporação de fosfolipídios como o dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), como a esfingomielina (ES) e como o colesterol (CO) no conteúdo da vesícula, os quais amplificam o sinal do sensor levando a mudança cromática (SU et al., 2004).

Medeiros (2011) avaliou o comportamento de vesículas contendo PCDA, com e sem a adição de diferentes fosfolipídios como o CO, ES e o DMPC na presença de triclorometano (TCM) em água potável. Para avaliar sua sensibilidade foram preparadas soluções contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de TCM em água deionizada. Dos tratamentos testados, notou-se que a vesícula em pH 5,0, temperatura de 35°C foi o que obteve a maior resposta colorimétrica na solução contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de TCM que é o valor máximo permitido pela Portaria nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde. Os resultados mostram que a suspensão de vesícula avaliada apresenta potencial para indicar a presença de TCM em água com concentrações próximas às exigidas pela legislação brasileira.

O 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA ou TCDA) também produz polímeros conjugados que têm atraído grande atenção. Sua principal característica é que apresenta propriedades de cor (MA et al., 2002). O polidiacetileno é formado por adição de monômeros de diacetileno alinhados induzidas por radiação ultravioleta.

Acredita-se que o mecanismo molecular de transição de cor ocorre através da mudança estrutural induzida pelo estresse da espinha dorsal do polímero conjugado. As características estruturais da TRCDA, isto é, a cauda hidrofóbica (grupo metil) e um grupo polar hidrofílico (carboxilato) resultam na formação de agregados de vesículas, em soluções aquosas (REPPY E PINDZOLA., 2007;. Chen et al., 2011).

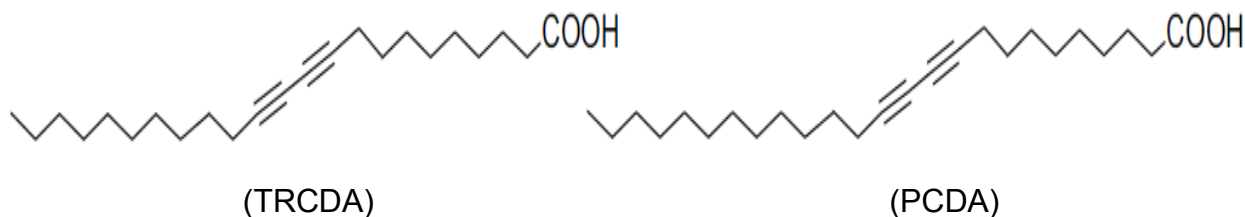


Figura 4. Estruturas do TRCDA e PCDA, respectivamente. Fonte: Boullanger 2008.

O TRCDA pode virar de azul para vermelho quando exposto ao calor, estresse mecânico, alteração do pH, ou ligação a agentes biológicos. Amplos estudos com diacetilenos polimerizados foram realizados em vesículas. As propriedades ópticas de transições de cores de PDA são adequadas para muitas aplicações em dispositivos ópticos e biossensores (Su et al., 2004, Su et al., 2005). As experiências descritas na literatura têm mostrado várias alternativas para detecção colorimétrica de proteínas, ácidos nucleicos e de micro-organismos, todos através da sua interação com as unidades de receptores específicos na superfície das vesículas TRCDA.

Em seus trabalhos, Rangin e Basu (2004) e Oeste et al. (2013) demonstraram o reconhecimento colorimétrico de lipolissacarídeos de diferentes bactérias usando TRCDA derivatizado com L-triptofano. Estes trabalhos mostram a possível aplicação deste receptor na interação com bactérias.

A utilização de materiais a base de TRCDA para a produção de biossensores é desafiadora por serem muito sensíveis às condições ambientais, tais como os íons, a pressão osmótica, mudanças de temperatura, solventes e do pH (REPPY e PINDZOLA, 2007). Com uma cadeia lateral mais curta o TRCDA produz interações de dispersão fracas inter e intra-cadeia nas bicamadas em comparação com o sistema de poli (PCDA), que por sua vez resulta numa transição de cor mais rápida após exposição aos estímulos (CHAROENTHAI et al., 2011).

Villalobos et al.(2012) apresentaram vários ensaios experimentais utilizando vesículas de TRCDA / DMPC que levaram a uma melhor resposta na detecção de *E. coli* e *S. Typhimurium* em água potável. Eles determinaram uma concentração bacteriana mínima necessária para produzir a transição do azul ao vermelho de 10^8

UFC·mL⁻¹ no prazo de 4 h, sendo mais rápido do que os métodos tradicionais, tais como NMP ou placa de contagem de Agar.

No estudo, realizado por Pattanatornchai et al. (2013) utilizaram o etanol como um estímulo na transição de cor de vesículas com diferentes poliacetilenos e verificou uma maior facilidade de transição do azul para o vermelho nas de TRCDA em comparação das de PCDA devido a uma menor interação entre as camadas interna das vesículas, devido à redução da cadeia alquila hidrofóbica.

3.3. Mecanismo de transição colorimétrica

O mecanismo de transição colorimétrica do azul para vermelho e sua correspondente fluorescência ainda não é bem conhecida. Inicialmente a transição de cor do PDAs de azul para vermelho foi hipoteticamente devido à correspondente transição estrutural da cadeia carbônica do PDA da forma eno-ino para a forma butatrieno. Entretanto, essa teoria não teve o suporte de resultados experimentais. Um mecanismo aceito é que a mudança de cor é relacionada à mudança de conformação da cadeia carbônica do PDA da forma planar para a não planar quando submetido a um estímulo externo, e a conformação da cadeia lateral também desempenha um papel importante na mudança da cadeia carbônica eno-ino (CHEN et al., 2012).

No caso de uma ligação viral, um efeito invasor pode ser induzido pela natureza multivalente do vírus, produzindo uma mudança de grande escala na conformação da cadeia lateral polimérica em consequência da ligação do vírus a diferentes sítios de ligação. A mudança conformacional da cadeia lateral polimérica leva diretamente à mudança de cor (CHEN et al., 2012).

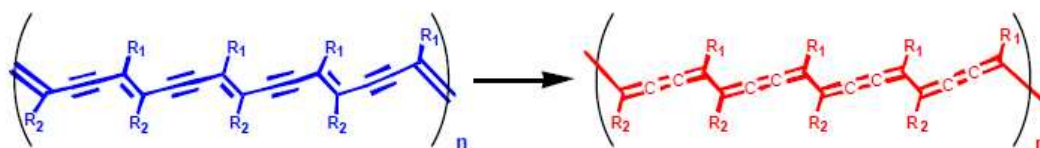


Figura 5. Mudança estrutural PDA proposto resultando na transição do azul-vermelho: mudança de estrutura conjugada eno-ino com uma estrutura butatriene.

Outro mecanismo de mudança de cor consiste em que algumas membranas lipídicas polidiacetilênicas incorporadas com gangliosídeos para detecção de toxina causadora da cólera, enterotoxina produzida por *E. coli* e neurotoxina botulínica levam a mudança conformacional, que pode ser atribuída ao encurtamento do comprimento da conjugação do deslocalizador do sistema π elétron ao longo da cadeia polimérica, acarretando em uma mudança conformacional no arranjo da cadeia lateral (CHEN et al., 2012).

De forma geral a mudança de conformação molecular, tal como um empacotamento, ordenação e orientação da cadeia lateral, causam um estresse na cadeia polimérica que altera sua conformação, assim a mudança do estado eletrônico e a sua absorção ótica correspondente (SU et al., 2004).

O termocromismo, isto é a transição colorimétrica induzida pelo aumento da temperatura, é uma das áreas mais estudadas para filmes e vesículas de PDA. Oliveira et al. (2012) avaliaram esses dois parâmetros em vesículas formadas por PCDA e dimetilfosfatidilcolina. Em temperaturas de refrigeração, 5 °C e 12 °C, não foi observado transição de cor, tampouco formação de agregados por 60 dias de armazenamento. Entretanto, a estocagem em temperaturas ambientes de 20 °C e 25 °C, por 60 dias, reduziu pela metade a intensidade da coloração azul. Essa redução de intensidade da cor azul foi atribuída à formação de agregados, devido à menor estabilidade dessas partículas em temperaturas ambientes. Já em temperaturas elevadas (30 °C, 60 °C e 90 °C) proveniente de aquecimento por 10 min, a transição de cor foi observada. Os autores verificaram aumento na intensidade da coloração vermelho correspondente ao comprimento de onda a 540 nm. Essa transição de cor foi irreversível, e a resposta colorimétrica foi maior e linear em relação ao aumento da temperatura.

No mesmo estudo, também avaliaram a mudança colorimétrica devido à variação do pH. Em pH menor que 4,0 foi observado formação de agregados e turbidez no meio, o que levou também à redução na intensidade da cor azul. Camilloto (2012) observou o mesmo resultado em vesícula de PCDA em pH 2,0 observando a floculação da vesícula. Este resultado pôde ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio de ionização dos grupos carboxílico presentes na superfície da vesícula, favorecendo a formação de vesículas com grupos

carboxílicos não ionizados, o que neutraliza a superfície vesicular. Esta neutralização rompe a repulsão eletrostática entre as nanoestruturas o que permite a aproximação e agregação das mesmas com formação de grandes flocos (Oliveira *et al.* 2012).

Pesquisas envolvendo o efeito das modificações estruturais na resposta colorimétrica a outros estímulos, como pH, íons, solventes e outros produtos químicos vêm chamando a atenção. O pH afeta a formação das ligações de H presentes na parte hidrofílica do PDA e as estruturas auto-organizadas das moléculas anfífilas de PDA são estabilizadas por ligações de H. Desta forma, as condições de pH do sistema são fundamentais (WU *et al.*, 2009). A influência do pH no cromismo de filmes e vesículas de PDA é importante para a aplicação dos mesmos como sensores para diversos sistemas.

Para vesículas constituídas apenas de TRCDA polimerizado, a transição de cor devido ao aumento de pH após a adição de NaOH foi atribuída a quebra das ligações de hidrogênio interfacial dos ácidos carboxílicos do grupo polar do polímero (CHEN *et al.*, 2012). Contudo Su *et al.* (2011) acreditam que a mudança de pH causa a ionização ou deionização do aminoácido da cabeça polar dos lipossomos polidiacetilênicos. Como um resultado das interações repulsivas coulombicas, a cabeça polar se rearranja de forma não-planar de modo a acomodar novas distribuições de cargas. Essa forma resulta em um zigue-zague da cadeia carbônica polimérica e ocorre mudança de cor do azul para vermelho nestas condições.

3.4. Sensores a base de Polidiacetilenos (PDAs)

Polímeros conjugados vêm sendo considerados grandes promissores no desenvolvimento de sensores colorimétricos, uma vez que possuem sensibilidade à estímulos externos, e podem apresentar mudanças significativas nas propriedades estrutural, química e física em resposta à flutuações nas condições ambientais, como por exemplo, temperatura, massa, luz, pH, estado de oxidação entre outros (SONG *et al.*, 2002).

Os polidiacetilenos vêm recebendo muita atenção nos últimos anos devido aos aspectos tecnológicos potencialmente importantes. Estes polímeros possuem

características óticas únicas que incluem a mudança de cor de azul para vermelho quando a estrutura é perturbada mecanicamente (CARPICK et al., 2004), por variações de temperatura (LEE et al., 2002) ou interações intermoleculares com diferentes substâncias químicas (Pires, et al., 2010a).

As técnicas colorimétricas são consideradas simples e relativamente de baixo custo, sendo amplamente aplicadas à fabricação de biossensores. Esta técnica baseia-se na mudança de cor de um determinado composto que pode ser distinguida visualmente ou por um espectrofotômetro. Assim, materiais que podem mudar de cor em virtude de estímulos externos têm despertado muito interesse de pesquisadores (CAMILLOTO, 2012).

A resposta colorimétrica de vesículas de PDA a vários estímulos químicos tem sido investigada por muitos pesquisadores. Assim a variação das estruturas de estímulo e suas propriedades físicas induzem diferentes transições colorimétricas dependendo do comportamento do PDA, onde estudos detalhados abordam este tópico de forma bastante limitada (PATTANATORNCHAI et al., 2013).

A temperatura e pH são parâmetros físicos importantes para a manutenção da estabilidade das vesículas de PDA e também pela manutenção da coloração azul do sistema, uma vez que por si só podem acarretar a transição colorimétrica do azul para o vermelho e portanto são considerados estímulos externos.

Segundo Pires et al. (2010b) a organização de moléculas anfifílicas na conformação vesicular tem sido intensamente pesquisada devido às numerosas aplicações práticas desses agregados multimoleculares. Por exemplo, as vesículas são utilizadas para estudar o comportamento de fase, a interação proteína-ligante, a cristalização bidimensional, liberação de drogas, além disso são estruturas atraentes para aplicações em sensores (RINGSDORF et al., 1988).

Alguns solventes têm sido associados à transição colorimétrica de vesículas e filmes de PDA. Chae et al., (2007) estudaram fibras estabilizadas com polímeros embebidas com diferentes estruturas de PDA que foram submetidas à exposição em diferentes solventes como clorofórmio, etil acetato e n-hexano. Observou-se que tanto o tipo de PDA quanto o de solvente influenciou na resposta colorimétrica das fibras. A alteração da cor de azul para vermelho foi atribuída ao solvatocromismo,

consequente da perturbação do sistema provocada pela interação entre solvente e PDA.

Pires et al. (2010a) também estudaram a termodinâmica de transição colorimétrica de vesículas de polidiacetileno induzida por diferentes solventes. Foram avaliadas vesículas de ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e vesículas de PCDA + esfingomielina (ES) + colesterol (CO). A adição de CHCl_3 , CH_2Cl_2 e CCl_4 causaram transição colorimétrica em ambas as vesículas. Pela técnica microcalorimétrica, os autores observaram uma mudança de entalpia associada com o processo de transição colorimétrica e com energia de interação entre as moléculas de solvente e as vesículas. Além disso, o solvente cloreto induziu transição colorimétrica, mas o mecanismo termodinâmico foi diferente dos demais. A transição colorimétrica pelo CHCl_3 foi governada entalpicamente, enquanto a transição induzida por CH_2Cl_2 ou CCl_4 foi governada entropicamente.

Holopainen et al. (2004) estudando vesículas contendo CO, ES e fosfatidilcolinas, demonstraram que a presença desses componentes formam microdomínios e é capaz de estabilizar os nanoagregados formados. Observa-se uma maior estabilidade interna das vesículas quando estas são incorporadas com lipídios, aumentando a interação entre as cadeias hidrofóbicas localizadas no interior da vesícula e consequentemente auxiliando na estabilidade ao longo do tempo de armazenamento.

Su et al. (2004) avaliaram o efeito da adição de etanol e 1-pentanol em vesículas de PDA. A resposta colorimétrica foi maior para vesículas adicionadas de 1-pentanol em função da sua maior hidrofobicidade comparado ao etanol. Os domínios hidrofóbicos da cadeia de PDA solubilizam as moléculas mais hidrofóbicas. Ao contrário, moléculas mais hidrofílicas se dissolvem melhor na água do que nos domínios hidrofóbicos não alterando, assim, a conformação do PDA levando o sistema a uma menor resposta colorimétrica.

Em outro trabalho, o solvatocromismo de agregados de PDA em solução também foi avaliado. PDAs contendo monômeros com diferentes comprimentos de cadeias foram utilizados. Em clorofórmio, o PDA apresentou coloração amarela,

entretanto, quando o clorofórmio foi misturado com hexano houve transição colorimétrica (DEI et al., 2008).

3.5. Biossensores Colorimétricos

A nanotecnologia pode ser utilizada para satisfazer a necessidade de novas tecnologias, para a detecção de bactérias, especialmente para aplicação em hospitais, na indústria de alimentos e para análise e proteção ambiental. Sistemas de biossensores compostos por polímeros conjugados são de interesse atual, e baseiam-se na mudança de conformação em um único local de sua cadeia carbônica perante a uma mudança ambiental, podendo induzir mudanças nas propriedades de absorção e fluorescência do sistema. O uso desses biossensores em tamanho nanométrico leva a um aumento na área interfacial, otimizando o contato entre o ambiente e o biossensor, o que leva a produção e grande amplificação do sinal (KOH et al., 2013) .

A detecção de micro-organismo é observada por meio da transição de cor desses materiais à base de PDA após interação entre o receptor e o organismo biológico, sendo que este sinal ótico pode ser observado visualmente; o que proporciona praticidade em sua utilização (PATTANATORNCHAI et al., 2013).

A resposta colorimétrica de vesículas de PDA a vários estímulos químicos tem sido investigada por muitos pesquisadores. Assim a variação das estruturas de estímulo e suas propriedades físicas induzem diferentes transições colorimétricas dependendo do comportamento do PDA, onde estudos detalhados abordam este tópico de forma bastante limitada (PATTANATORNCHAI et al., 2013).

Os PDAs têm atraído grande atenção para a aplicação dos mesmos como sensor devido à sua propriedade única de detecção dupla tanto devido a propriedades colorimétricas quanto a propriedades de fluorescência (ARIZA-CARMONA et al., 2013). Os PDAs são polímeros conjugados compostos por alternância "eno-ino" em sua cadeia carbônica após polimerização. Este sistema possui uma propriedade interessante de coloração azul, que na presença de um estímulo pode alterar suas propriedades cromáticas para roxo, amarelo ou vermelho

com base na alteração da conformação da estrutura carbônica (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta propriedade de transição de cor dos PDAs tem incentivado o desenvolvimento de biossensores, sensores químicos e termossensores. Muitos esforços têm sido empregados para explorar os atributos colorimétricos dos PDAs para a detecção de substâncias biológicas (KOH *et al.*, 2013).

Charoenthai *et al.* (2011) avaliaram o papel da cabeça hidrofílica e do comprimento da cauda hidrofóbica no comportamento de resposta colorimétrica de vesículas de PDA quando expostas a diferentes temperaturas, pHs e concentrações de etanol. As vesículas foram produzidas utilizando TRCDA, PCDA e o N-(2-aminoetil) 10,12-pentacosadinamida (AEPCDA). Os autores observaram forte influência da cabeça hidrofílica e do comprimento da cauda hidrofóbica na resposta colorimétrica das vesículas para temperatura, etanol e pH. Cadeias menores (TRCDA) apresentaram interações de dispersão inter e intramoleculares mais fracas quando comparadas às cadeias de PCDA, o que resulta em uma transição colorimétrica mais rápida após a exposição a todos os estímulos.

A primeira demonstração das potenciais aplicações biológicas do PDA foi à detecção colorimétrica do vírus influenza por estruturas de bicamadas polimerizadas (LINDSELL *et al.*, 2000). Os autores incorporaram um análogo de ácido siálico, um receptor específico para hemaglutinina do vírus influenza, à camada de PDA e obtiveram sinais de transição colorimétrica em resposta à ligação do vírus na superfície do material. Desde então, vários pesquisadores têm estudado o desenvolvimento de estruturas à base de PDA para detecção da chave de interação proteína-proteína (KOLUSHEVA *et al.*, 2001).

Ma *et al.* (1998) desenvolveram vesículas polidiacetilênicas incorporadas com dioctadecil gliceriléterglicosidase como receptor. As vesículas apresentaram transição colorimétrica de azul para vermelho quando em contato com *E. coli*, mas não exibiram sensibilidade a pequenos aminoácidos. Estes resultados mostraram que o potencial de utilização de estruturas lipídicas funcionalizadas com polidiacetileno como biossensores para diagnóstico de novas doenças.

Oliveira e colaboradores (2013) estudaram vesículas contendo lisina vesículas de PCDA/dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e

PCDA/ES/CO foram testados para determinar a resposta colorimétrica induzida por bactérias como *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *E. coli* e essas vesículas demonstraram um grande potencial para uso como um biossensor para detectar agentes patogênicos de alimentos em análises de rotina.

Villalobos et al. (2012) apresentaram vários ensaios experimentais utilizando vesículas de TRCDA/DMPC que levaram a uma melhor resposta na detecção de *E. coli* e *S. Typhimurium* em água potável. Eles determinaram uma concentração bacteriana mínima necessária para produzir a transição do azul ao vermelho de 10^8 UFC·mL⁻¹ no prazo de 4 h, sendo mais rápido do que os métodos tradicionais, tais como NMP ou placa de contagem de ágar.

Vários outros trabalhos foram desenvolvidos visando à detecção de *E. coli* através da alteração da cor do PDA. Vesícula de PDA funcionalizada com glicolipídio foi capaz de detectar a bactéria em suspensão com concentração aproximada de $9,0 \times 10^8$ células. mL⁻¹. Além disso, utilizou-se também no processo de formação da vesícula o fosfolipídio dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Su et al., 2005 informam que a interação entre bactéria e vesícula provavelmente foi intermediada pela pili tipo I presente em *E.coli* e em outras bactérias gram-negativas. De acordo com os autores, a presença de fosfolipídios favorece a transição colorimétrica, uma vez que eles auxiliam a mimetizar a superfície célula da mucosa, que é alvo na primeira etapa de processos infecciosos.

Apesar das inúmeras pesquisas relacionadas com o reconhecimento de moléculas biológicas por biossensores produzidos a partir de PDA, ainda não existem trabalhos que esclareçam completamente os mecanismos envolvidos no processo de transição colorimétrica ocasionado por micro-organismos ou toxinas.

Muitos métodos diferentes estão disponíveis para determinação de bactérias em matrizes alimentícias, dentre eles a inoculação em placas de petri com meio de cultura, espectroscopia de infravermelho, de fluorescência, técnicas cromatográficas e imunológicas, biossensores potenciométricos, acústicos e de ressonância de superfície de plasma (SPR). No entanto, são métodos caros e necessitam de um tempo de análise realizados em laboratórios. O desenvolvimento de métodos rápidos e indicadores da presença de contaminantes têm sido pesquisados, buscando uma

informação rápida e simples para os processadores de alimentos, bem como para os consumidores.

3.6. Qualidade da água potável

As principais fontes de contaminação que alteram a qualidade das águas são diversas: esgotos domésticos, efluentes industriais, efluentes da agricultura, desmatamento, mineração, resíduos sólidos, efluentes da suinocultura, poluição difusa em áreas urbanas, salinização, acidentes ambientais, construção de barragens e aquicultura (ANA, 2005). Com falta de saneamento básico, a população é uma fonte de contaminação dos recursos hídricos, devido ao despejo direto de seus resíduos sobre fontes de águas superficiais (ROHDEN, et al, 2009).

A água é um dos principais componentes de diversas operações em indústrias de alimentos. É usada como veículo para aquecimento e resfriamento, assim como para limpeza e sanitização de equipamentos. A água ainda é usada como matéria prima ou veículo para incorporar outros ingredientes ao alimento, participa de várias etapas do processamento, além de está em contato com alimentos, equipamentos e utensílios e ser usada para lavagem de mãos e asseio pessoal (ANDRADE, 2008).

O controle de qualidade da água para qualquer uso na indústria de alimentos é necessário para evitar possíveis riscos à saúde dos consumidores dos produtos comercializados. Esse controle reduz efeitos negativos que as características físicas, químicas e microbiológicas da água podem provocar na indústria, como processos corrosivos, depósitos de matéria orgânica e sedimentos; além de auxiliar a fabricação de alimentos que atendam aos critérios de qualidade exigidos dos produtos industrializados.

A água de qualidade, isto é, aquela que atenda aos padrões de potabilidade estabelecidos pelos órgãos responsáveis, é uma necessidade básica de qualquer ser humano. Desta forma, manter a água potável e constantemente disponível ao homem é uma das obrigações dos órgãos governamentais fiscalizadores. Mas, não é apenas responsabilidade pública e, sim, de toda a sociedade por se tratar de bem essencial (SILVA, 2004).

Alguns parâmetros são utilizados para a caracterização da água potável, como as características físico-químicas e biológicas, e indicadores de qualidade da água, que representam impurezas quando ultrapassam determinados valores estabelecidos. Esses parâmetros constam da Portaria MS nº 2914 de 12/12/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A legislação define, ainda, a quantidade mínima e a frequência em que as amostras de água devem ser coletadas, bem como os parâmetros e limites permitidos.

3.7. Trihalometanos

Os compostos orgânicos voláteis são os contaminantes mais comumente encontrados em águas. A contaminação da água devido a esses produtos pode ocorrer por substâncias usadas em manufaturas ou como resultado de processos de desinfecção, por frascos usados para estocar solventes, práticas de agricultura, entre outras possibilidades.

A cloração é o método mais importante na desinfecção da água para consumo humano, e é usada em todo o mundo (FANTUZZI et al., 2001) devido sua eficácia e seu preço relativamente baixo. Esse procedimento é a forma de proteger a água da contaminação microbiana externa e desenvolvimento de bactérias durante a distribuição para a população. A principal função do cloro é eliminar bactérias patogênicas, que podem causar sérias doenças e morte (LEE et al., 2004; ZANG et al., 2002), reduzindo a incidência de doenças associadas à ingestão de águas de má qualidade.

A reação do cloro com alguns compostos orgânicos leva à formação de trihalometanos (Figura 6). A água bruta pode conter ácidos fúlvicos e húmicos, cujas estruturas químicas ainda não são completamente conhecidas, resultantes da decomposição de matéria orgânica, como folhas da vegetação. A maioria desses ácidos contém radicais cetonas, que podem causar a formação de halofórmios após a reação com o cloro. Além disto, concentrações elevadas de bromo presentes em reservatórios usados como fontes para a água tratada podem contribuir para a

formação de compostos bromados ou subprodutos de desinfecção com a mistura de cloro/bromo (CAMPILLO et al., 2004).

Esses compostos clorados inorgânicos são instáveis ao armazenamento e muito reativos com a matéria orgânica; e, em razão disso, águas contendo ácidos fúlvicos e húmicos, oriundos de matéria orgânica em fase final de decomposição, podem reagir com esses compostos e ocorrer a formação de trihalometanos, conhecidos como THM. Esses compostos representados pelo triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano são considerados nocivos à saúde, pois existem evidências de que relacionam com câncer de intestino.

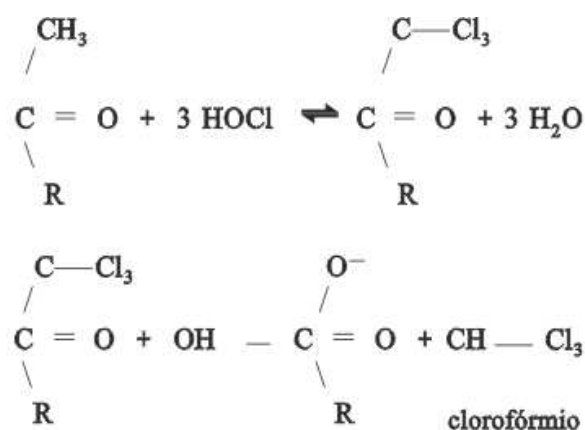


Figura 6. Formação de halofórmios.

A fórmula geral dos THM é CHX_3 podendo X ser ocupado por diferentes halogêneos como o cloro, o bromo, o flúor e o iodo. Porém os principais THM resultantes da desinfecção da água com o cloro são: triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano. Portanto, quando se faz referência aos THM, na realidade estão sendo mencionados os quatro compostos citados.

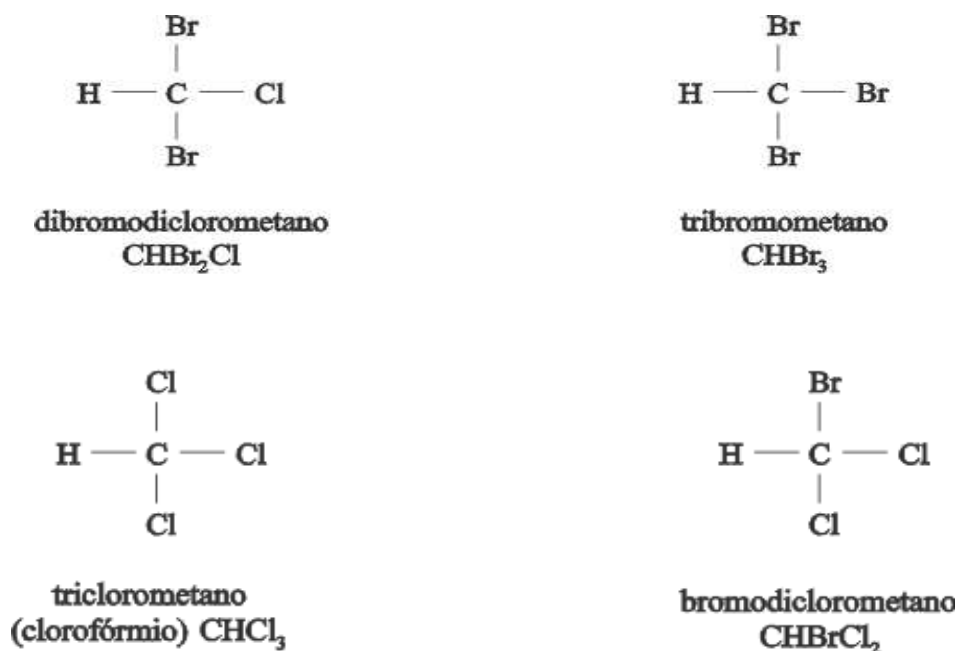


Figura 7. Estruturas químicas dos THM formados pela reação do cloro com os compostos orgânicos (VAN BREMEM, 1984).

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde de nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, estabelece normas para a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011). De acordo com esta portaria, a concentração máxima permitida de TTHM é de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para cada THM tem um limite como é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de THM para águas de consumo humano.

THM	(OMS) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Portaria nº 2914/2011 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Triclorometano	200	-
Bromodichlorometano	60	-
Dibromoclorometano	100	-
Tribromometano	100	-
THM totais	-	100

No Brasil, os limites de contaminantes no ambiente são determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Na resolução 357/2005, não há limite máximo para a concentração de THM no ambiente. Entretanto, no Artigo 21 desta resolução, que trata das condições de emissão de efluentes, é estabelecido um limite de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para triclorometano (TCM).

Medeiros (2011) analisou TCM em 28 amostras de água de 3 estações de tratamento de água, das redes de distribuição e ainda de 5 poços artesianos do município de Viçosa-MG. Apenas duas amostras, pouco mais de 2 % não se enquadraram dentro da legislação brasileira, a Portaria nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde. Verificou-se ainda uma tendência de aumento na concentração de TCM nos pontos de coleta na rede de distribuição, embora em valores abaixo do VMP (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Esse resultado se deve provavelmente ao bom controle nos sistemas de tratamento e distribuição de águas avaliadas, o que pôde ser constatado pelos bons resultados das análises físico-química, microbiológica das amostras analisadas, em particular da turbidez, cor e cloro residual livre.

Os estudos efetuados com THM mesmo em pequenas concentrações têm confirmado o potencial cancerígeno destas substâncias, revelando efeitos mutagênicos em diferentes espécies animais. Em relação ao homem, o efeito destas substâncias apresenta diferenças de atuação mais quantitativas que qualitativas, devido aos fenômenos biológicos de absorção, assimilação, excreção, desintoxicação e expressão genéticas (LEE et al., 2004).

Numerosos estudos epidemiológicos vêm sendo conduzidos na investigação da correlação entre a cloração da água e a mortalidade por câncer. Muitos estudos analíticos sugerem uma clara ligação entre a exposição à água clorada e o desenvolvimento de câncer de bexiga e sugerem também uma possível ligação com câncer retal. Outros estudos têm demonstrado que a exposição aos subprodutos da cloração está relacionada a abortos espontâneos e outras adversas consequências reprodutivas (LEE et al., 2004).

Isso ocorre, pois os THM apresentam alta volatilidade e são predominantemente lipossolúveis. Estudos experimentais realizados pelo OMS apontam que durante um banho de 8 min, a exposição aos THM é seis vezes maior

do que pela ingestão da mesma água durante um período de 24 h, devido a inalação de clorofórmio que pode se apresentar na forma gasosa no ambiente em virtude de sua volatilização. A detecção dos THM já foi comprovada em alimentos e bebidas que utilizam água clorada, como sorvetes, sucos e refrigerantes. Os THM são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal, o clorofórmio depois de ingerido com a água é rapidamente e quase totalmente absorvido na corrente sanguínea tanto em humanos quanto em animais, sendo rapidamente transportado para os tecidos.

Para as crianças, o caminho de exposição pode se dar também através da lactação, ou seja, a transferência de mãe para filho. Compostos orgânicos halogenados, como os THM, tende a ser hidrofóbicos e solúveis em gorduras, assim se acumulam em materiais gordurosos. Um exemplo é a fração lipídica do sangue ou leite. O leite humano pode oferecer um excelente indicador biológico da exposição da criança a substâncias lipofílicas (BATTERMAN, 2002).

Compete aos responsáveis pelo serviço de água avaliar a capacidade operacional do processo de tratamento e apurar quais as medidas a serem tomadas na coagulação/decantação para obter melhores resultados na remoção dos THMs. Isto pode incluir a necessidade de aprimorar a coagulação/floculação executando com maior frequência o ensaio de *jar-test* e assim variar a dose ou o tipo de coagulante para uma determinada qualidade de água, modificando ainda o ponto de aplicação do cloro para locais com baixo conteúdo de matéria orgânica, diminuindo consideravelmente a concentração dos THMs na água de consumo humano. Portanto, o responsável pela unidade de tratamento de água deve avaliar a possibilidade de alterar o ponto de aplicação de cloro, mas sem prejuízo da segurança bacteriológica da água a ser consumida.

Atualmente dispõe-se de várias técnicas para a identificação e medição dos THMs. A mais popular das técnicas de quantificação é a da purga e sequestro, que foi aperfeiçoada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA). Outra técnica é a extração por solvente. A última é consideravelmente mais simples e facilmente adaptável à amostragem automática. Devido justamente ao seu baixo custo, a

técnica de extração por solvente é a escolhida para análises de rotina de THMs. Foi demonstrado que as duas técnicas são de exatidão comparáveis.

Ambas as técnicas requerem a cromatografia a gás como etapa final da análise, a técnica de purga e sequestro inclui a remoção dos THMs da amostra de água mediante o uso de gás inerte como o hélio e a absorção dos mesmos numa resina. Esta é aquecida e o gás faz fluir dentro do cromatógrafo para a separação e quantificação dos THMs. A extração com solvente inclui simplesmente o tratamento da amostra com um solvente de baixo ponto de ebulição, como o tolueno ou o hexano para que os THMs passem ao solvente. Em seguida se injeta o extrato no cromatógrafo de gás para a separação e quantificação dos trihalometanos.

Carlos et al. (2011), determinaram a presença dos trihalometanos, clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio em amostras de água destinada ao consumo humano e água superficial do município de Viçosa, MG. As amostras de água tratada apresentaram contaminação pelos THMs clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano. Para todas as amostras analisadas os valores máximos de concentração de clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano encontrados foram $4,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $3,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A soma da concentração dos trihalometanos foi menor do que $9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em todas as amostras analisadas, valor menor do que o VMP estabelecido pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde.

A formação de THM também é a principal fonte de contaminação para a vida aquática podendo ter efeitos ecotoxicológicas irreversíveis. Como a água do mar contém um alto índice de brometo (aproximadamente $65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), com a aplicação de doses de cloro, o bromo é formado pela oxidação do brometo, levando a formação de compostos organobromados. Como consequência, na cloração da água do mar, os THM são normalmente compostos por bromofórmio e bromoclorometanos (ALLONIER et al., 2003).

Devido à alta toxicidade destes compostos, a *Environmental Protection Agency* (EPA) estabelece um limite de concentração máxima de $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para THM totais (TTHM), existindo a intenção de reduzir este valor para $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Muitos

países europeus, como a Alemanha, têm restringido o limite de TTHM para $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (CAMPILLO et al., 2004).

A concentração de THM no ambiente da atmosfera varia, dependendo de vários fatores como ventilação, temperatura da água e a quantidade de precursores orgânicos presentes nesta água. Para controle dos níveis desses compostos na água, dentre as alternativas disponíveis e viáveis, estão o controle dos precursores, que pode ser realizado durante o tratamento convencional da água, nas etapas de floculação, decantação e filtração, e o uso de agentes clorados menos reativos com a matéria orgânica (ANDRADE, 2008).

3.8. Micro-organismos patógenos na água

A presença de micro-organismos tem sido usada há décadas para monitorar e controlar a qualidade da água e é um procedimento importante na proteção dos ecossistemas aquáticos. Os bioindicadores são extremamente úteis, principalmente para a avaliação de impactos ambientais decorrentes de descargas pontuais de esgotos domésticos e efluentes industriais.

Os micro-organismos indicadores são rotineiramente empregados para avaliar a qualidade do produto final e a higiene empregada no processamento. O isolamento e a identificação de patógenos específicos são adequados para investigação e controle de surtos. Os micro-organismos considerados indicadores de contaminação em águas minerais são coliformes totais a 35°C e coliformes fecais ou termotolerantes a $44,5^{\circ}\text{C}$, *Escherichia coli*, *Clostridium* sulfito redutores a 46°C , *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e a contagem de bactérias heterotróficas (BRASIL, 2005).

Os coliformes fecais, denominação utilizada durante muitos anos, ou coliformes termotolerantes, são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais, caracterizados pela presença da enzima β -galactosidase e pela capacidade de fermentar a lactose com produção de gás no prazo de 24 h a $44,5^{\circ}\text{C}$. *E. coli* e algumas estirpes de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais (CONAMA, 2005).

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2$ °C, em 24 h, tendo como principal representante a *E. coli*, de origem exclusivamente fecal. A *E. coli* é um espécie bacteriana do grupo coliforme que fermenta lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2$ °C em 24 h, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas B-galactosidase e B-glucoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (ANDRADE, 2008).

Os coliformes fecais, mais especificamente *E. coli*, fazem parte da microbiota intestinal do homem e outros animais de sangue quente. Estes micro-organismos quando detectados em uma amostra de água fornecem evidência direta de contaminação fecal recente, e por sua vez podem indicar a presença de patógenos entéricos. A análise da água é uma importante ferramenta utilizada por especialistas em saúde pública para a prevenção de inúmeras doenças associadas à ingestão de água (POPE et al., 2003).

A qualidade bacteriológica é extremamente importante e a *E. coli* é indicador de contaminação fecal do trato intestinal de animais de sangue quente, onde contém um grande número de bactérias que são eliminadas com as fezes. A presença das bactérias do grupo dos coliformes na água de um rio significa que esse rio recebeu matérias fecais, ou esgotos (DEBERDT, 2003).

A contagem de *E. coli* tem sido extensivamente utilizada nos monitoramentos da qualidade das águas e é considerada indicador específico de qualidade de água destinada a potabilidade e balneabilidade (LEBARON et al., 2005). O padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano deve ser ausência de *E. coli*, em 100 ml de amostra da água tratada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Em 20 % das amostras de água analisadas quanto a coliformes totais (a 35 °C) nos sistemas de distribuição, exige-se que seja realizada a contagem de bactérias heterotróficas, que não deve exceder $5,0 \times 10^2$ UFC·mL⁻¹. A contagem de bactérias heterotróficas consiste na determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriado, como o agar para contagem-padrão, sob condições preestabelecidas de incubação, ou seja, $35,0 \pm 0,5$ °C por 48 h (CONAMA, 2005).

Escherichia fergusonii está associada à doença em indivíduos de origem humana. As manifestações clínicas de *E. fergusonii* infecções em humanos incluem bacteremia, infecções do trato urinário e diarreia. A descrição original da espécie *E. fergusonii* foi baseada em isolados recuperados a partir de uma vasta gama de fontes humanas, incluindo o sangue, urina, fezes e uma ferida abdominal (FARMER et al. , 1985). Outros estudos isolaram *E. fergusonii* de infecções do trato urinário (SAVINI et al., 2008, BOURS et al. , 2010 e LAGACÉ - WIENS et al. , 2010).

Este micro-organismo é gram-negativo da família das Enterobacteriaceae. *E. fergusonii* não formam esporos, são predominantemente móveis, possuindo um diâmetro em torno de 0,8-1,5 μm , e possuem flagelos peritríqueos. São anaeróbios facultativos obtendo energia a partir de oxidação e reações de redução de fontes orgânicas. Cepas de *E. fergusonii* são oxidase negativa e catalase positiva (SAVINI et al., 2008).

Os enterococos são constituintes normais da microbiota gastro-intestinal de seres humanos e outros animais (WILLEMS et al., 2009). Embora apenas ocasionalmente causem infecções em indivíduos saudáveis, esses micro-organismos gram-positivos, podem provocar infecções que são normalmente difíceis de se tratar devido ao número de antibióticos aos quais estes organismos são resistentes. *Enterococcus faecium* é uma bactéria resistente a drogas que, em alguns casos, causa a meningite, inflamação e infecção das membranas que revestem o cérebro e a medula espinhal. Se não for tratada, a meningite pode resultar em sintomas cada vez mais dolorosos e culminar em morte (WILLEMS, et al., 2009).

As técnicas de detecção de micro-organismos são práticas e vários são os métodos disponíveis, dentre eles, contagem em placas, tubos múltiplos, contagem em membranas filtrantes e substratos cromogênicos, o problema é o tempo das análises que geralmente duram de 24 a 48 h.

O controle microbiológico da água está intimamente relacionado à concentração de cloro residual livre (CRL), e, normalmente, considera-se que uma água contendo de 0,2 a 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRL é segura dentro desse ponto de vista. No entanto, não se elimina a necessidade de realizar as análises microbiológicas, para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento (CONAMA, 2005).

4. CONCLUSÃO

Mediante as características vistas acima, os PDAs podem ser considerados sistemas promissores para o desenvolvimento de sensores colorimétricos para a identificação simples e rápida de compostos de interesse como, os trihalometanos e micro-organismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). Panorama das águas superficiais no Brasil. Brasília: Editoração Eletrônica; 2005.

ANDRADE, N.J.; **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Livraria Varela, 2008.

BATTERMAN S.; ZHANG L.; WANG S.; FRANZBLAU A. Partition coefficients for the trihalomethanes among blood, urine, water, milk and air. **The Science of the Total Environment**, v. 284, p.237-347, 2002.

BOURS, P.H.A., POLAK, R., HOEPELMAN, A.I.M., DELGADO, E., JARQUIN, A., MATUTE, A.J.,. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 770–774, 2010.

BRASIL - MS. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 275. Aprova Regulamento Técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. 22 de setembro de 2005.

BOULLANGER, P.; LAFON, D.; BOUCHU , N.; JIANG, L.; LIU, T.; LU,W.; GUO, C.X.; LI,J. The use of glycolipids inserted in color-changeable polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition. **Comptes Rendus Chimie**, v.11, p.43-60, 2008.

CAMILLOTO, G. P. **Termodinâmica de interação entre lactato e vesículas nanoestruturadas de polidiacetileno**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.

CAMPILLO, N. et al. Purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection for volatile halogenated organic compounds determination in water and beverages. **Journal of Chromatography A**, v.1035, p. 1-7, 2004.

CARLOS, E. A. et al. Determinação Simultânea de trihalometanos e agrotóxicos em água por cromatografia Gasosa. **Química Nova**, v. 34, p. 272-278, 2011.

CARPICK, R.W.; SASAKI, D.Y.; MARCUS, M.S.; ERIKSSON, M.A.; BURNS, A.R. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter** , v.16, p. 679697, 2004.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPHOL R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal Colloid Interface Science**, v.15, p. 360:565-73, 2011.

CHAE, S.K.; PARK, H.; YOON, B., LEE, S., KIM, J.-M. Polydiacetylene Supramolecules in Electrospun Microfibers: Fabrication, Micropatterning, and Sensor Applications. **Advanced Materials**, v. 19, p. 521–524, 2007.

CHEN, X.; ZHOU, G.; PENG, X.; YOON, J. Biosensors and chemosensors based on the optical responses of polydiacetylenes. **Chemical Society Revist**, v. 41, p. 4610-4630, 2012.

CHEN, X.; YOON, J. A thermally reversible temperature sensor based on polydiacetylene: Syntheses and thermochromic properties. **Dyes and Pigments**, v.89, n.3, p.194-198, 2011.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº357, de 17 de março de 2005.

DEBERDT, Jean André. **Análise da água**. Programa pró-ciência. Disponível em: www.educar.sc.usp.br/biologia. Acesso em 11 de setembro de 2003.

DEI, S.; MATSUMOTO, A.; MATSUMOTO, A.; Thermochromism of Polydiacetylenes in the Solid State and in Solution by the Self-organization of Polymer Chains Containing no Polar Group. **Macromolecules**, v.41,p. 2467, 2008.

FANTUZZI G.; RIGHI E.; PREDIERI G.; CEPPELLI G.; GOBBA F.; AGGAZZOTTI G. Occupational exposure to trihalomethanes in indoor swimming pools. **The Science of Total Environment**, v.264, p.257- 258, 2001.

FARMER JJ, 3RD; FANNING, GR; DAVIS, BR; O'HARA, CM; RIDDLE, C; HICKMAN-BRENNER, FW; ASBURY, MA; LOWERY VA, 3RD; BRENNER, DJ. "Escherichia fergusonii and Enterobacter taylorae, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens." **Journal of clinical microbiology**, v.21, p. 77–81, 1985.

GARCIA, V. M. N. e MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. **Biosystems Engineering**, v. 84, p. 1-12, 2003.

HOLOPAINEN, J.M., METSO, A.J., MATTILA, J.P., JUTILA, A., KINNUNEN, P.K.J. Evidence for the Lack of a Specific Interaction between Cholesterol and Sphingomyelin. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 1510 1520, 2004.

JAWORSKI, J.; YODOYAMA, K.; ZUEGER, C.; CHUNG, W-J.; LEE, S-W.; MAJUDAR, A. Polydiacetylene incorporated with peptide receptors for the detection of trinitrotoluene explosives. **Languimir**, v.27, n.6, p 3180–3187, 2011.

KERRY, J.P., OGRADY, M.M., HOGAN, S.A. Past, current and potencial utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and musclebased products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113 130, 2006.

KIM, K.W.; CHOI, H.; LEE, G.S.; AHN, D.J.; OH, M,K.; Effect of phospholipid insertion on arrayed polydiacetylene biosensor. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p. 213-217, 2008.

KIM, J. M.; LEE, Y.B.; YANG, D.H.; LEE, J, S.; LEE, G, S.; AHN, J. D.A Polydiacetylene-Based Fluorescent Sensor Chip.**Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 17580–17581, 2005.

KOH, J.J.; LIU, S.; ZENG, W.; ZOU, H.; WANG, L.; SURESH, V.; BEUERMAN, R.; CAO, D. Electron donating group substituted and α -d-mannopyranoside directly

functionalized polydiacetylenes as a simplified bio-sensing system for detection of lectin and *E. coli*. **Sensor and Actuators B**, v.178, p.563-571, 2013.

KOLUSHEVA, S., SHAHAL, T., JELINEK, R. Cation-selective color sensors composed of ionophore phospholipid polydiacetylene mixed vesicles. **Journal of American Chemical Society**, v. 122, p. 776-780, 2000.

LAGACE' -WIENS, P.R.S., BAUDRY, P.J., PANG, P., HAMMOND, G.,. First description of an extended-spectrum-b-lactamase producing multidrug resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2301–2302, 2010.

LEE, J.; YARIMAGA, C.; LEE, C. H.; CHOI, Y-K.; KIM, J-M. Network Polydiacetylene films: Preparation, patterning and sensor applications. **Advanced Functional Materials**, v.21, n.6, p.1032-1039, 2011.

LEE, S. C.; GUO, H.; LAM, S.M.J.; LAU, S. L. A. Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. **Environmental Research**, v. 94, p. 47, 48, 55, 2004.

LEE., D.C., SAHOO, S.K., CHOLLI, A.L., SANDMAN, D.J. Structural Aspects of the Thermochromic Transition in Urethane-Substituted Polydiacetylenes **Macromolecules**, v. 35, p. 4347-4355, 2002.

LEBARON, P., et al. *An operational method for the real-time monitoring of E. coli numbers in bathing waters*. **Marine Pollution Bulletin**. v.50, p. 652-659, 2005.

LINDSELL, W.E., MURRAY, C., PRESTON, P.N., WOODMAN, T.A.J. Synthesis of 1,3-diynes in the purine, pyrimidine, 1,3,5-triazine and acridine series. **Tetrahedron**, v. 56 , p. 1233 1245, 2000.

MA, B.; FAN, Y.; ZHANG, L.; KONG, X.; LI, Y. and LI, J. Direct colorimetric study on the interaction of *Escherichia coli* with mannose in polydiacetylene Langmuir-Blodgett films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. vol. 27, no. 2-3, p, 209-213, 2002.

MEDEIROS, H.S. **Vesícula de polidiacetileno para detecção de triclorometano em água potabilizada (2011)**. Tese (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa), Viçosa, 2011.

OESTE, C.L.; SECO, E.; PATTON, W.F.; BOVA, P.; PÉREZ-SALA, D. Interactions between autophagic and endo-lysosomal markers in endothelial cells. **istochemistry and Cell Biology**, v.139,p. 659-670, 2013.

OLIVEIRA , T.V.; SOARES, N. F.F.; SILVA, D.J.; ANDRADE, N.J.; MEDEIROS, E.A.A.; BADARÓ, A.T. Development of pda/phospholipids/lysine vesicles to detect Pathogenic bactéria. **Sensors and Actuators B**, v. 18, p. 385–392, 2013.

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. A. F; OLIVEIRA, T. V.; MEDEIROS FILHO, E. A. Behaviour of polydiacetylene vesicles under different conditions of temperature, pH and chemical components of Milk. **Food Chemistry**,v.135, p. 1052-1056, 2012.

OKADA, S., PNG, S., SPEVAK, W., CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Accounts Chemistry Research**, v. 31, p. 229-239, 1998.

PATTANATORNCHAI,T.; CHAROENTHAI, N.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPHOL, R. Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 45–53, 2013.

PIRES, A.C.S., SOARES, N.F.F., da SILVA, L.H.M., da SILVA, M.C.H., MAGESTE, A.B., SOARES, R.F., TEIXIERA, A.V.N.C., ANDRADE, N.J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 13365-13371, 2010a.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; SILVA, L.H.M.; ANDRADE, N.J.; SILVEIRA, M.F.A.; CARVALHO, A.F. Polydiacetylene as a biosensor: Fundamentals and applications in the food industry. **Food Bioprocess Tech.**, v.3, p. 172-181, 2010b.

POPE, M.L; et al. Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on Escherichia coli Densities in Surface Water Samples. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, n.10, p. 6201–6207, 2003.

RANGIN, M. e BASU, J. Lipopolysaccharide Identification with functionalized polydiacetylene liposome sensors. **Journal of America Chemistry Society**, v. 126, p. 5038–5039, 2004.

REPPY, M. and PINDZOLA, B.. Biosensing with polydiacetylene materials: Structures, optical properties and applications. **Chemical Communications**, vol. 4317, no. 42, p. 4317-4338, 2007.

ROHDEN, R; et al. Monitoramento microbiológico de águas subterrâneas em cidades do Extremo Oeste de Santa Catarina. **Ciência saúde coletiva**, v.14, n.6, 2009.

SAVINI, V., CATAVITELLO, C., TALIA, M., MANNA, A., POMPETTI, F., FAVARO, M., FONTANA, C., FEBBO, F., BALBINOT, A., DI BERARDINO, F., DI BONAVENTURA, G., DI ZACOMO, S., ESATORRE, F., D'ANTONIO, D.,. Multidrug-resistant Escherichia fergusonii: a case of acute cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p.1551–1552, 2008.

SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, n.1, v. 121, p. 51-75, 2006.

SHIN, M.J.; BYUN, D.H.; KIM, J.D. Sensitivity limitation of the sensor fabricated with polydiacetylene. **J. Ind. Eng. Chem.**, v.23, p. 279–284, 2015.

SILVA, RC.S.; ARAUJO, T.M. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Revista Ciência & Saúde Coletiva.** v. 8, n. 4, jan., 2004

SONG, J; CHENG, Q.; ZHU, S.; STEVES, R.C. Smart materials for biosensing devices: cell-mimicking supramolecular assemblies and colorimetric detection of pathogen agents. **Biomedical Microdevices**, v. 3, n. 4, p. 213-221, 2002.

SU, L., WENZHAO, J. HOUB, C., LEIA, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 17881799, 2011.

SUN, X.; CHEN, T.; HUANG, S.; LI, L.; PENG, H. Chromatic polydiacetylene with novel sensitivity. **Chem. Soc. Rev.**, v.39, p. 4244-4257, 2010.

SU, Y.L.; LI, J.R.; JIANG, L. and CAO, J. Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli*. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 284, no 1, p. 114-119, 2005.

SU, Y.L.; LI, J.R.; JIANG, L. Chromatic immunoassay base dopolydiacetylene **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 38, p. 29-33, 2004.

VAN BREMEM, J. WATER QUALITY. International Course in Sanitary Engineering. Delft: IHE/International Institute for Infrastructural. **Hydraulic and Environmental Engineering**, Mimeo, 1984.

VILLALOBOS, P.; CHÁVEZ, M. I.; OLGUÍN, Y.; SÁNCHEZ, E.; VALDÉS, E.; GALINDO, R.; YOUNG, M.E. The application of polymerized lipid vesicles as colorimetric biosensors for real-time detection of pathogens in drinking water. **Electronic Journal of Biotechnology** , vol 15-issue1-fulltext-5, 2012.

WILLEMS RJ, VAN SCHAİK W: Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. **Future Microbiol.**, v.4, n. 9, p. 1125-1135, 2009.

WU, S.; NIU, L.; SHEN, J.; ZHANG, Q.; BUBECK, C. Aggregation-induced reversible thermochromism of novel azo chromophores-functionalized polydiacetylene cylindrical micelles. **Macromolecules**, v. 42, p.362-367, 2009.

WUT, J.; ZAWISTOWSKI, A.; EHRMANN, M.; YI, T.; SCHMUCK, C. Peptide functionalized Polydiacetylene Liposomes Act as a fluorescent turn-on sensor for bacterial lipopolysaccharide. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, n.25, p.9720-9723, 2011.

YAM, K.L.; TAKHISTOV, P.T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.R1-R10, 2005.

ZHANG, L.G.; FAN, Y.; MA, B.L.; XU, X.Y.; KONG, X.G.; SHEN, D.Z.; LI, Y.J. Colorimetric transition process of polydiacetylene/mannoside derivative Langmuir-Schaefer film by binding Escherichia jm 109. **Thin Solid Films**, v. 419, p. 194-198, 2002.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA, pH E FORÇA IÔNICA NA ESTABILIDADE E NA MUDANÇA COLORIMÉTRICA DE VESÍCULAS DE POLIDIACETILENO

1. RESUMO

Uma das alternativas promissoras para auxiliar no controle da qualidade de alimentos são os biossensores e um dos materiais com grande potencial para utilização como sensores são os polidiacetilenos. Seu grande potencial para uso como sensor colorimétrico se deve principalmente às suas propriedades colorimétricas únicas, como a capacidade de mudança da coloração do azul para o vermelho diante de alguns estímulos como estresse mecânico, presença de solventes, mudanças no pH, alterações na temperatura e interação com algumas moléculas. Este estudo avaliou o comportamento termodinâmico de vesículas de polidiacetilenos para aplicação, como sensores colorimétricos. Foram produzidas três diferentes vesículas: 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA) e TRCDA+PCDA com adição de fosfolipídeos e essas colocadas em diferentes condições de temperatura (25 a 50 °C), pH (5 a 9) e força iônica (0 a 100 mmol·L⁻¹ de NaCl). Em cada situação as vesículas foram avaliadas em relação ao tamanho, resposta colorimétrica e ao potencial zeta. As modificações das condições do meio induziram a transição colorimétrica das vesículas de PDA, sendo que a sensibilidade e a porcentagem de RC foram dependentes da composição das suspensões vesiculares e da condição termodinâmica estudada. Os resultados mostraram que os valores de pH 8 temperatura de 45 °C e a concentração de acima de 50 mmol·L⁻¹ de NaCl são os valores mínimos para que ocorra a transição colorimétrica do azul para o vermelho para as três vesículas.

2. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos e os órgãos de fiscalização vêm buscando novos métodos, que sejam cada vez mais rápidos e eficientes para garantir o controle dos processos de produção e a segurança dos produtos. Além disso, existe uma pressão crescente por parte dos consumidores que estão cada vez mais conscientes em relação à qualidade e segurança dos alimentos.

As técnicas disponíveis para análise de alimentos são, em sua maioria, complexas e demoradas e, ou, de alto custo. Uma alternativa promissora para atender a esta necessidade são os sensores colorimétricos que podem ser utilizados em qualquer fase do processamento, durante a vida útil até o momento de consumo dos alimentos. Neste sentido, diversos materiais têm sido estudados para atuarem como sensores colorimétricos, a fim de aperfeiçoar os processos de análise nos alimentos. O desenvolvimento de sensores utilizando polímeros conjugados eficientes como matrizes de sensoriamento tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Especialmente, os sensores de polidiacetilenos para a detecção de espécies biologicamente e quimicamente importante têm sido intensamente investigados, devido à sua resposta quanto à mudança das propriedades colorimétricas.

Os polidiacetilenos são polímeros alternados eno-ino formados pela adição 1-4 de monômeros diacetilênicos sob radiação ultravioleta, apresentando coloração azul. Esses polímeros exibem propriedades colorimétricas próprias, podendo mudar da cor azul para vermelho após algum estímulo externo, tais como pH, temperatura e interação com diversas moléculas.

O termocromismo, isto é a transição colorimétrica induzida pelo aumento da temperatura, é uma das áreas mais estudadas para filmes e vesículas de PDA. Oliveira et al. (2012) avaliaram esses dois parâmetros em vesículas formadas por PCDA e dirimistioilfosfatidilcolina. Em temperaturas de refrigeração, 5 °C e 12 °C, não foi observado transição de cor, tampouco formação de agregados por 60 dias de armazenamento. Entretanto, a estocagem em temperaturas ambientes de 20 °C e 25 °C, por 60 dias, reduziu pela metade a intensidade da coloração azul. Essa redução de intensidade da cor azul foi atribuída à formação de agregados, devido à menor estabilidade dessas partículas em temperaturas ambientes. Já em temperaturas elevadas (30 °C, 60 °C e 90 °C) proveniente de aquecimento por 10 min, a transição

de cor foi observada. Os autores verificaram aumento na intensidade da coloração vermelho correspondente ao comprimento de onda a 540 nm. Essa transição de cor foi irreversível, e a resposta colorimétrica foi maior e linear em relação ao aumento da temperatura.

No mesmo estudo, também avaliaram a mudança colorimétrica devido à variação do pH. Em pH menor que 4,0 foi observado formação de agregados e turbidez no meio, o que levou também à redução na intensidade da cor azul. Camilloto (2012) observou o mesmo resultado em vesícula de PCDA em pH 2,0 observando a floculação da vesícula. Este resultado pôde ser explicado pelo deslocamento do equilíbrio de ionização dos grupos carboxílico presentes na superfície da vesícula, favorecendo a formação de vesículas com grupos carboxílicos não ionizados, o que neutraliza a superfície vesicular. Esta neutralização rompe a repulsão eletrostática entre as nanoestruturas o que permite a aproximação e agregação das mesmas com formação de grandes flocos (Oliveira *et al.* 2012).

Essa transição espectrofotométrica pode ser detectável visualmente e tem sido explorada em diversos estudos para desenvolvimento de sensores colorimétricos de compostos de interesse.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de determinadas condições sobre o comportamento das vesículas de polidiacetilenos, como sensores colorimétricos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir vesículas de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA com adição de fosfolipídeos para aplicação como biossensor;

- Quantificar a mudança colorimétrica das vesículas de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA nas diferentes condições de temperatura, pH e força iônica;
- Selecionar a condição de pH, temperatura e força iônica que favoreça a mudança de cor.
- Avaliar o tamanho das vesículas nas diferentes condições de temperatura, pH e força iônica;
- Avaliar o potencial zeta das vesículas nas diferentes condições de temperatura, pH e força iônica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Monômeros de 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 97 % m/m (Sigma®), 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA) ≥98,0 % grau cromatográfico (Sigma®), esfingomielina (Aldrich), colesterol (Aldrich), clorofórmio grau-HPLC (Merck®), água deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®), foram utilizados para produção dos sensores colorimétricos. O NaOH 0,1 N foi usado para ajustar o pH e o NaCl para o teste de força iônica.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Embalagens, ambos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa - MG.

4.2. Produção das nanovesículas a base de PDA

O sensor colorimétrico foi produzido de acordo com a metodologia proposta por Pires et al. (2011). Na produção das vesículas, foram utilizados os PDAs 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA). Para o preparo das vesículas de PDA/ES/CO, 1 mM de esfingomielina e de colesterol foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. Paralelamente, solução de PDA 1 mM foi preparado em 2 mL de DMSO e

aquecida a 80 °C durante 15 min e então adicionadas ao filme lipídico formado por ES e CO. O volume completado para 10 mL com água Milli-Q. A suspensão foi levada ao disruptor de células R2D091109, e em seguida filtrada em filtro PVDF (Millipore®). Em seguida estocada a 4 °C por no mínimo 10 h. As suspensões foram mantidas sob refrigeração (10 ± 2 °C) até o momento das análises do experimento.

Utilizando o PCDA e o TRCDA e com os fosfolipídios ES + CO, foram produzidas três vesículas diferentes: PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA.

4.3. Modificações nas diferentes condições de temperatura, pH e força iônica das suspensões vesiculares de PDA

A condição inicial das três suspensões vesículas é de pH 4,5 aproximadamente, temperatura de armazenamento de $\pm 10^{\circ}\text{C}$ e sem adição de NaCl. A alteração das condições de temperatura, pH e força iônica das suspensões foi feita de forma separada para cada situação e como se descreve a seguir.

O estudo do comportamento das vesículas em diferentes temperaturas foi realizado na faixa de 25 a 50 °C (variando de 5 em 5 °C). Foram colocados 2 mL de cada suspensão em tubos de ensaio e imergidos em banho-maria permanecendo por 10 min em cada temperatura estudada. Após permanecerem os 10 min na temperatura desejada, as vesículas foram analisadas em relação à RC, tamanho e potencial zeta.

No segundo estudo, foram feitas variações nos valores de pH das vesículas de PDA de 5 a 9 e variando de 1 em 1. Foram colocados 2 mL de cada suspensão em tubos de ensaio e adicionou-se NaOH 0,1 M até atingir-se os valores de pH desejados. Após o ajuste do pH as vesículas foram analisadas em relação a RC, tamanho e potencial zeta. Todas as análises foram realizadas em temperatura de 25 °C.

Por fim, o estudo da força iônica na sensibilidade das vesículas de PDAs com a adição de diferentes concentrações de NaCl e 0, 30, 50, 70 e 100 mmol.L⁻¹ nas suspensões. Foram utilizados 2 mL de suspensão e adicionados NaCl nas

concentrações desejadas e agitadas até sua homogeneização. Os tratamentos permaneceram armazenados à temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Os tratamentos foram analisados nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 h ao tamanho, resposta colorimétrica e potencial zeta.

4.4. Resposta Colorimétrica (RC)

Para avaliar o espectro UV-Vis das suspensões, 1,5 mL de cada vesícula nas condições trabalhadas citadas no item anterior, foram diluídas em água deionizada e colocada em cubeta de quartzo e analisada no equipamento Shimadzu UV-2550, em uma faixa de comprimento de onda de 400 nm – 700 nm. As leituras foram feitas a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Para medir a mudança de cor, de azul para vermelho, calcula-se a Resposta Colorimétrica (RC), como parâmetro semi-quantitativo da alteração das propriedades crômicas do polidiacetileno, conforme Charych et al. (1993):

$$RC = \{(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a - [(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_d (A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a]\} \times 100$$

Em que: A_{azul} = absorvância a 640 nm e A_{vermelho} = absorvância 540 nm; a e d valores calculados antes e depois da mudança de cor, respectivamente.

4.5. Medidas de tamanho por espalhamento dinâmico de luz e do potencial zeta.

Avaliação do raio hidrodinâmico dos PDAs e sua carga superficial em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de NaCl, foram realizadas utilizando o equipamento de espalhamento dinâmico de luz.

O tamanho e o potencial zeta das suspensões foram medidas a 25°C , com a utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS90, Malvern. Cerca de 1 mL de suspensão vesicular pura foi colocada em cubeta de quartzo e realizada a leitura de tamanho e posteriormente a leitura do potencial zeta. Os resultados de cada amostra foram obtidos pelas médias das três leituras realizadas pelo equipamento.

No caso da variação do pH e da força iônica as leituras foram feitas em temperatura de 25 °C no equipamento (Zetasizer Nano ZS90, Malvern), já para avaliação da temperatura, a leitura foi realizada na mesma temperatura do banho-maria.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises do experimento foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 6 diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de NaCl, e 3 tipos de vesículas, realizados em três repetições. Os resultados de RC (%), tamanho (nm) e potencial zeta (mV) foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 0,05 de probabilidade, com o auxílio do programa Minitab

6. RESULTADOS

6.1. Influência da temperatura nas vesículas de PDAs

A RC expressa a porcentagem das moléculas de PDAs que apresentam a transição de azul para vermelho. A transição da cor azul para vermelho pode ser observada neste estudo a partir de 10 % de resposta colorimétrica, de acordo com as observações no espectrofotômetro e análises visuais.

As porcentagens em função da temperatura para as três vesículas apresentaram um comportamento semelhante: aumentaram sua RC com o aumento da temperatura como mostra a Figura 1. A transição de cor por ação da temperatura é chamado de termocromismo. Vários trabalhos científicos relatam sobre essa transição e têm-se dedicado ao entendimento dos mecanismos envolvidos. Alguns autores sugerem que o termocromismo pode estar associado à redução do comprimento da estrutura conjugada ou à mudança conformacional dos grupos pendentes nas cadeias laterais das vesículas (KOLUSHEVA et al., 2000).

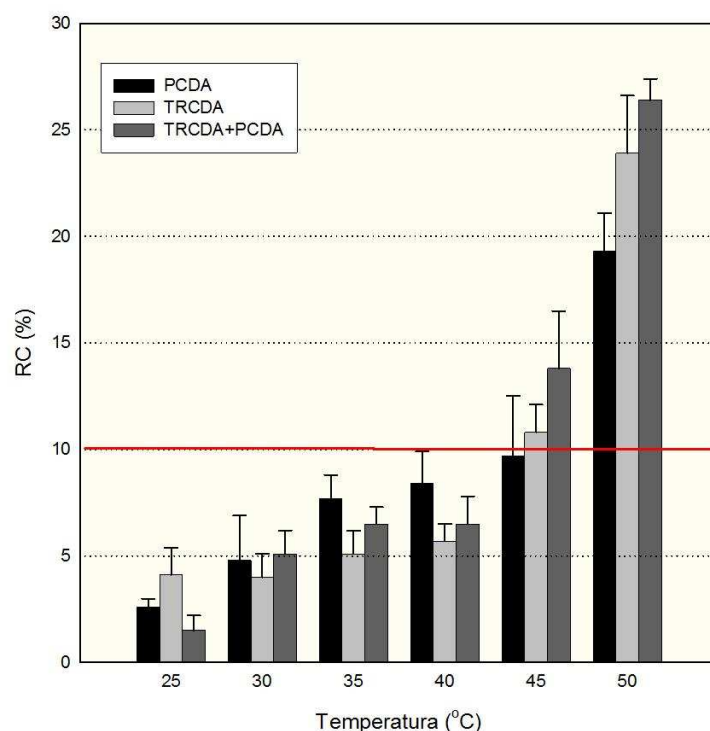


Figura 1. Valores da RC (%) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes temperaturas.

Nos três tipos de suspensões estudadas, nas temperaturas de 25 °C a 40 °C, não ocorreu alteração da cor, permanecendo no azul. A partir de 45 °C, observa-se visualmente a transição colorimétrica do azul para o vermelho, apresentando valores de RC acima de 10 %.

A mistura dos dois monômeros de diacetilenos TRCDA+PCDA foi a que apresentou uma maior sensibilidade ao aumento de temperatura, havendo uma transição completa a partir de 45 °C para a cor vermelha e possuindo também uma maior RC média em relação às outras vesículas (Figura 1).

Para PCDA, observa-se que as suspensões 25 °C e 50 °C diferem entre si ($p \leq 0,05$) e das demais temperaturas (Figura 1). A partir 45 °C percebe-se a transição colorimétrica do azul para o roxo, que se totaliza aos 50 °C com a cor vermelha. Já para TRCDA, verifica-se que nas temperaturas antecederem os 40 permaneceram na cor azul e que acima disso apresentou mudança de coloração para o roxo e vermelho a partir dos 50 °C.

Como o comprimento da cauda de hidrocarbonetos do TRCDA é menor, pode ter levado a uma diminuição das forças de interações de dentro das bicamadas das vesículas em relação as do PCDA, causando um maior rearranjo desse segmento. A junção dos dois PDAs refletiu em uma transição colorimétrica em um tempo menor e de maior magnitude em comparação ao PCDA sozinho (CHAROETHAI, 2011).

As RC das vesículas TRCDA e TRCDA+PCDA foram maiores devido a provável pontecialização da transição colorimétrica proporcionada pela cadeia mais curta do TRCDA. Verificou-se também, que com o efeito do aumento da temperatura nas três suspensões estudadas não demonstraram reversibilidade na coloração após o estímulo, permanecendo na mesma cor após a mudança de cor.

A transição termocrômica de vesículas de PDA foi avaliada no intervalo entre 20 °C e 90 °C por Potisatityuenyong et al., (2008). Observou-se que com o aumento da temperatura houve deslocamento hipsocrômico, do pico de máxima absorção referente à cor azul, que foi associado à movimentação das cadeias do polímero. Além disso, em temperaturas intermediárias, a suspensão vesicular adquiriu também coloração roxa que demonstrou ser reversível quando foram realizados ciclos de aquecimento/resfriamento das vesículas.

Os três tipos de vesículas diferem entre si ($p \leq 0,05$), sendo a mistura entre os dois diacetilenos o que obteve menor tamanho (Figura 2). O tamanho das vesículas de PDA aumenta a relação área/volume da interface, favorecendo essa transição colorimétrica (KOH et al., 2013).

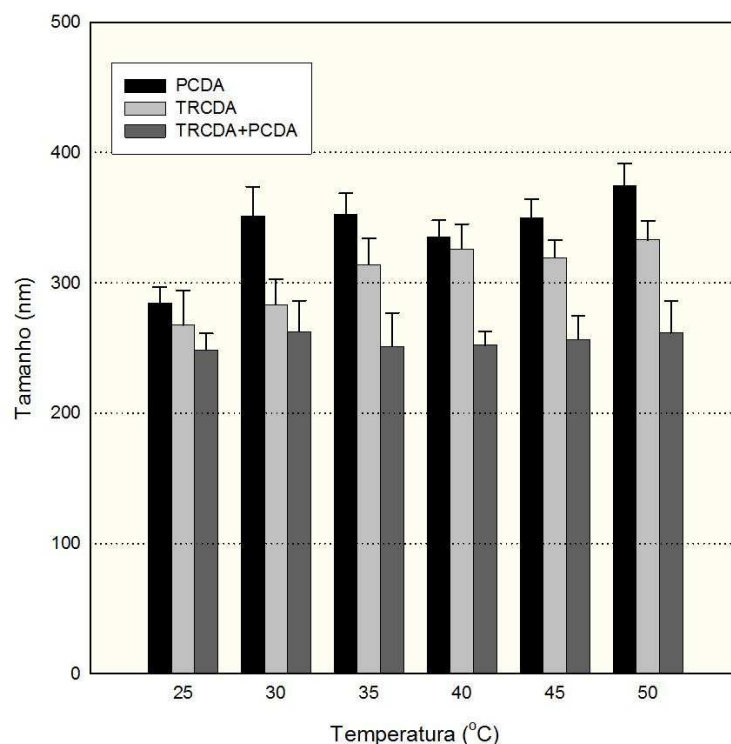


Figura 2. Valores do diâmetro hidrodinâmico (nm) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes temperaturas.

Para PCDA, o tamanho da vesícula de PCDA a 25 °C difere significativamente dos demais tamanhos ($p \leq 0,05$). De acordo com o teste de médias, o tamanho das vesículas nas temperaturas de 30 a 50 °C não diferem entre si. Considerando-se a hipótese da mudança conformacional das cadeias do PDA, o aumento da temperatura causa uma perturbação nas vesículas à base de PDA, promovendo uma movimentação de todos os segmentos da cauda alquila incluindo, a cabeça polar e espinha dorsal conjugada, resultando em rearranjo segmentar e consequentemente num aumento no tamanho da vesícula (YOON, ET AL., 2009; Lee, et al., 2002).

Os polidacetilenos TRCDA e PCDA possuem a mesma cabeça carboxílica, mas o comprimento da cauda de hidrocarbonetos do TRCDA menor, com duas cadeias de hidrocarboneto a menos. E isto afeta as forças de interações dentro das bicamadas das vesículas, onde a interação entre os grupos carboxílicos da cabeça é muito mais fraca, com a diminuição do comprimento da cadeia apolar podendo

acarretar em uma menor estabilidade em comparação ao PCDA (CHAROETHAI, 2011).

As análises de potencial zeta das vesículas sintetizadas neste trabalho apresentaram valores sempre negativos em todas as temperaturas, o que indica que essas vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas nas condições testadas (Figura 3). O potencial zeta de partículas em suspensão constitui uma propriedade termodinâmica das partículas como resposta à ação de um campo elétrico aplicado.

O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico utilizado para estimar a carga presente em superfícies de partículas coloidais indicando assim, a estabilidade desses sistemas e possíveis interações de partículas com outras moléculas no meio (ATTARD, et al.2000; HEURTAULT, et al. 2003). Nota-se pela Tabela 3 os valores do potencial zeta das vesículas PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA incubadas nas temperaturas de 25 °C a 50 °C.

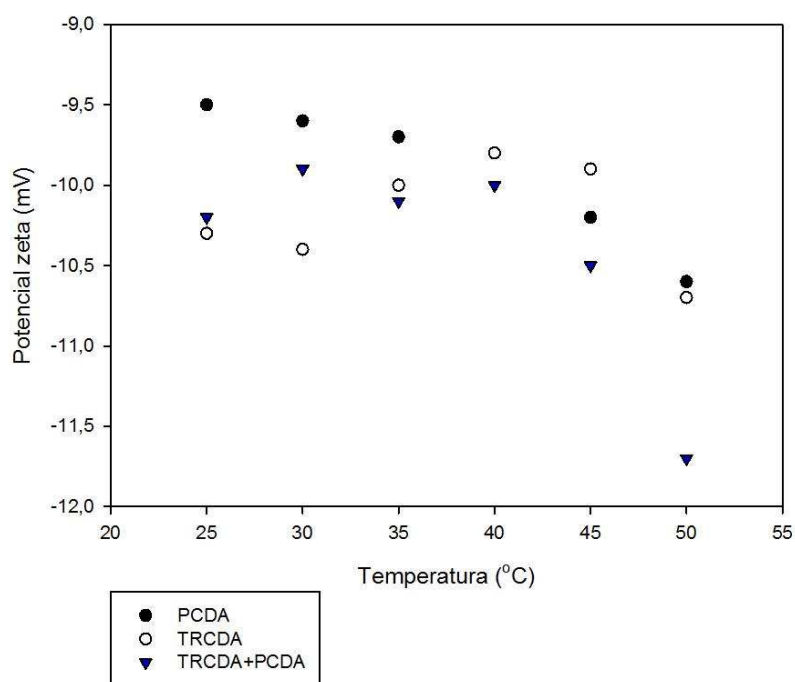


Figura 3. Valores do Potencial zeta (mV) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes temperaturas.

As médias não diferem entre si ($p \geq 0,05$) para os três tipos de vesículas com relação aos valores de potencial zeta. Conclui-se que a quantidade de energia fornecida pela mudança de temperatura testada não foi suficiente para provocar mudanças consideráveis na quantidade de cargas externas, justificando assim as pequenas variações no potencial zeta.

6.2. Influência do pH no comportamento das vesículas a base de PDA

A transição colorimétrica na faixa de pH testada, pode ser observada na Figura 4, as suspensões à medida que se aumentou o pH modificaram sua coloração de azul, passando pelo roxo e finalmente para o vermelho.

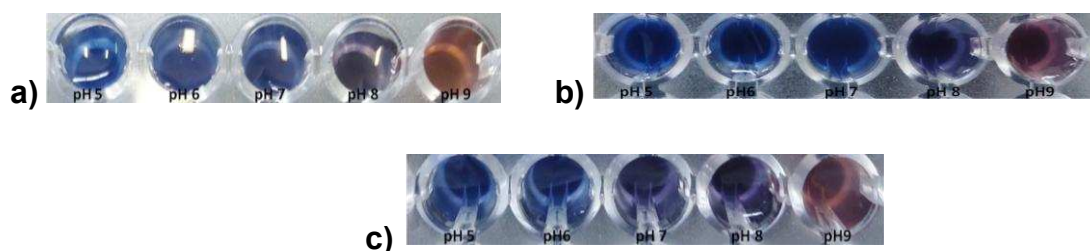


Figura 4. Variação visual na cor das suspensões de vesículas a) PCDA; b) TRCDA+PCDA e c) TRCDA em diferentes valores de pH.

À medida que ocorre o aumento do pH há um aumento da RC para todos os tipos de vesículas. As outras suspensões de TRCDA e PCDA tiveram uma sensibilidade maior à mudança de pH em relação aos dois PDAs juntos, passando do azul para o roxo nos valores de pH 6 e 8 e a partir do pH 9, quando tornou-se de cor vermelha. Já para a suspensão de TRCDA+PCDA, só vai haver transição para o vermelho nos valores 8 e 9.

Por meio de análises usando espectrofotometria UV-Vis, observa-se que o aumento do pH de 6 para 7, mediante a adição de solução de NaOH 0,01 M ocasiona um aumento gradual do pico a 540 nm no espectro de absorção das vesículas de PCDA e TRCDA, comprimento de onda responsável pela cor vermelha, e diminuição

do pico a 640 nm, comprimento de onda responsável pela cor azul. É nesta fase que começa a absorção de prótons carboxílicos pela adição de íons OH^- , provocando o aumento sistemático do grupo carboxilato carregado negativamente, resultando no rearranjo parcial de segmentos de PDA (SONG et al., 2002). Para vesículas de TRCDA+PCDA isso ocorreu a partir do pH 8 (Figura 5).

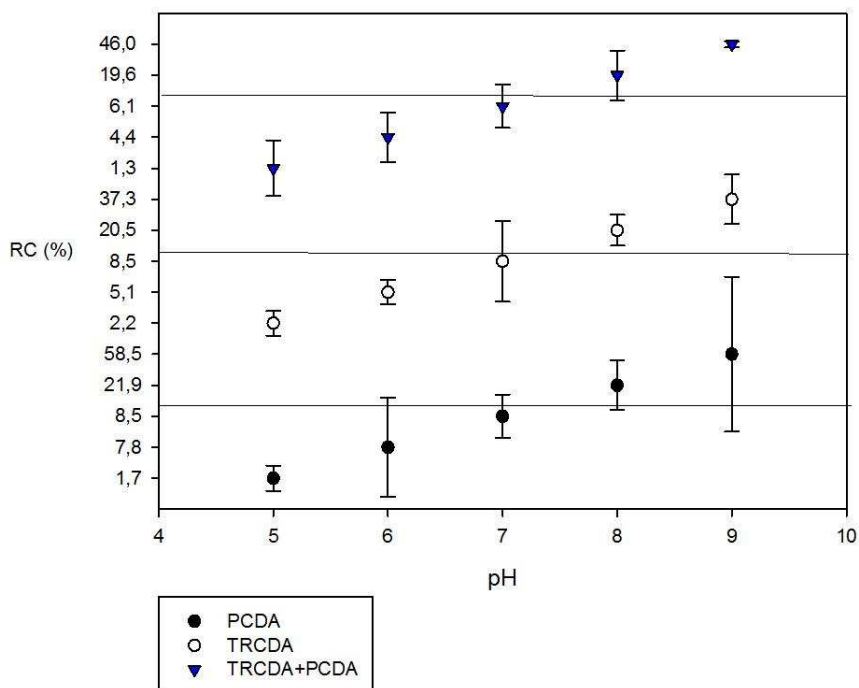


Figura 5. Valores da Resposta Colorimétrica (%) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes valores de pH.

Entre o pH 8 e 9, observa-se (Figura 5) uma brusca alteração nos picos de 540 nm e 640 nm, acarretando um aumento acentuado de valor de % RC. Na cor vermelha prevalece a presença de grande quantidade de grupo carboxilato que provoca o total rearranjo segmentar em todas as suspensões estudadas.

De acordo com Charoethai et al. (2011), a vesícula de TRCDA apresenta cadeias laterais mais curtas que as cadeias do PCDA, o que provoca interações de dispersão fracas inter e intra-cadeias nas bicamadas, que por sua vez resulta em uma transição de cor maior após exposição ao estímulo de pH. Esta observação indica

que a vesícula TRCDA requer uma força iônica repulsiva mais fraca na superfície da vesícula para induzir transição, em relação ao sistema da PCDA. É importante notar que o pH inicial e da concentração molar das vesículas de TRCDA, PCDA e TRCDA+PCDA são os mesmos.

Verificou-se, também que mesmo depois do estudo do efeito do pH, as suspensões de PDAs não demonstraram cromismo reversível, permanecendo na mesma cor após a mudança colorimétrica. Ahn et al. (2003) reportaram o efeito da temperatura e pH sobre o termocromismo reversível de filmes moleculares contendo PDA. Verificou-se que o filme produzido apenas com PDA não mostrou cromismo reversível após o estímulo da alteração do pH. De acordo com os autores, as ligações de H entre o PDA polimerizado não são fortes o suficiente para manter a organização molecular requerida para o cromismo reversível.

Na Figura 6, observam-se os valores do diâmetro hidrodinâmico das suspensões vesicular em diferentes pHs. Verificou-se que o diâmetro hidrodinâmico das vesículas variou em função da composição e da condição termodinâmica do meio (pH). A interação do tipo de suspensão e o pH foi significativa ($p \leq 0,05$). Portanto, as suspensões de vesículas de PDA sofrem interação com o pH. O tamanho vai depender do tipo da vesícula e do valor de pH em que se encontra.

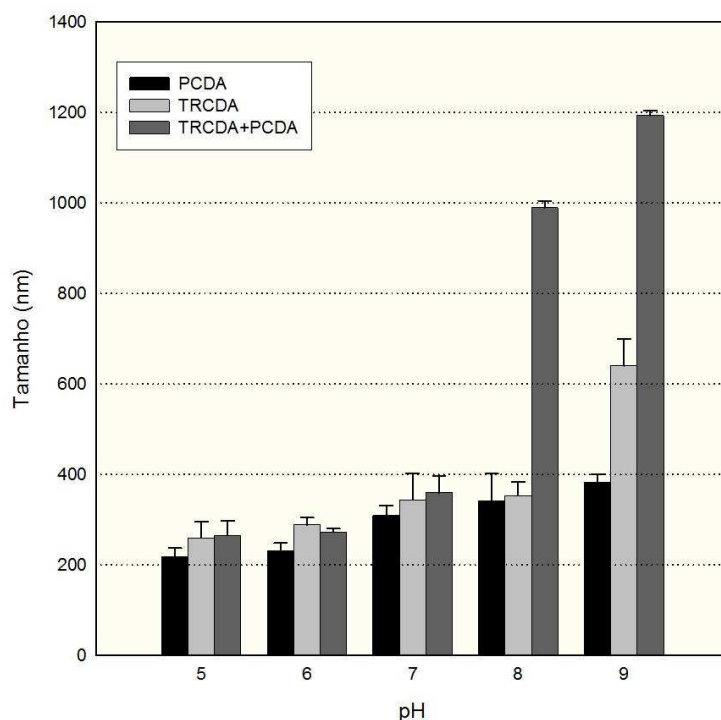


Figura 6. Valores do tamanho (nm) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes pHs.

À medida que o pH aumenta, devido a interação ser positiva, o tamanho da vesícula também irá aumentar. A combinação dos dois polidiacetilenos é a que obteve o maior aumento no tamanho do diâmetro hidrodinâmico com o aumento do pH. Provavelmente, as hidroxilas adicionadas para aumentar o pH das suspensões, promoveram o aumento do tamanho das vesículas. Isso está relacionado com uma maior ionização dos grupos carboxílicos dos polidiacetilenos, consequentemente havendo uma desestabilização na superfície vesicular e, também, no interior hidrofóbico da vesícula, deixando-a menos estável, isto é, com um maior conteúdo de energia (YOON, ET AL., 2009; Lee, et al., 2002). O tamanho da vesícula é aumentado buscando reduzir seu conteúdo de energia, tornando-a, portanto, mais estável.

Na Figura 7, os valores do potencial zeta da suspensão de PCDA diferiram entre si ($p \leq 0,05$), sendo que para os valores de pH até 6,0 diferem dos valores de pH até 8,0, que diferem do pH 9,0. No caso das suspensões de TRCDA e TRCDA+PCDA, as médias diferiram entre si ($p \leq 0,05$). Pelo teste de médias, o potencial zeta em pH 5,0, diferiu do potencial zeta dos valores até pH 8,0, que diferiram do pH 9,0.

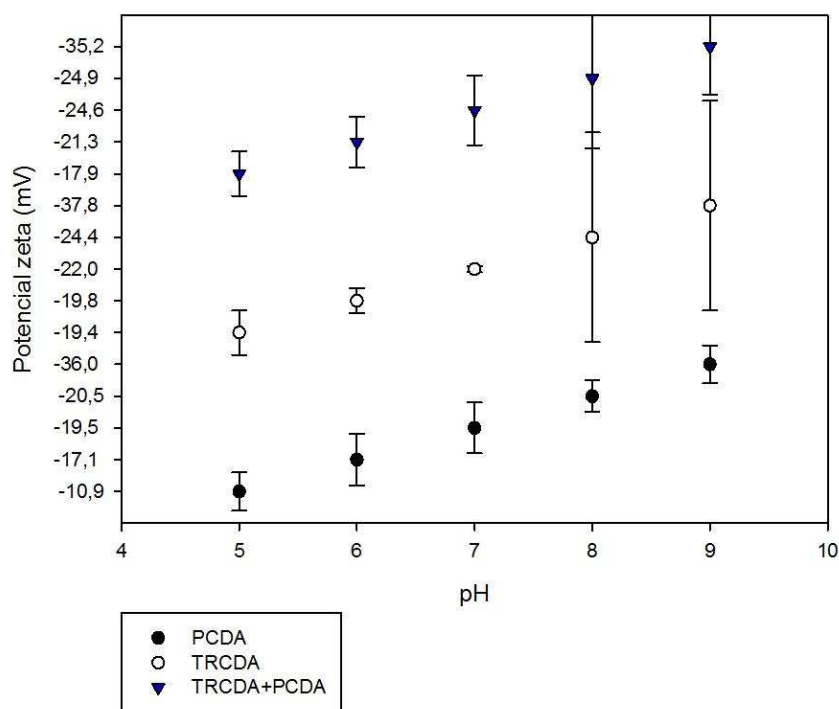


Figura 7. Valores do Potencial zeta (mV) das suspensões vesiculares de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA em diferentes pHs.

Entre o pH 5 e 9, o potencial zeta em todas as suspensões vesiculares diminuiu, aumentando o número de cargas negativas em sua superfície. Esse aumento de cargas negativas pode ser atribuído ao acréscimo de OH^- que leva à quebra de ligações de hidrogênio na superfície das vesículas. Essa reação ácido-base também transforma o grupo carboxílico para carboxilato, possuindo a carga negativa (SONG et al., 2002), podendo explicar o aumento das cargas negativas com o aumento do pH.

6.3. Influência da força iônica no comportamento das vesículas à base de PDA

Ao adicionarmos o NaCl nas suspensões de vesículas de PDA em meio aquoso ocorreu um aumento do pH ao longo do tempo, podendo ser visto na Figura 8. O aumento do pH das suspensões vesiculares em função do aumento da concentração de NaCl pode estar relacionado à hidrólise do sal, que no caso as

constantes de ionização são equivalentes, formam ácido e base forte que permanecem totalmente dissolvidos, com os seus íons livres em solução, resultando em uma solução próximo da neutralidade, o que explica o aumento do pH e a estabilização do valor com o passar do tempo.

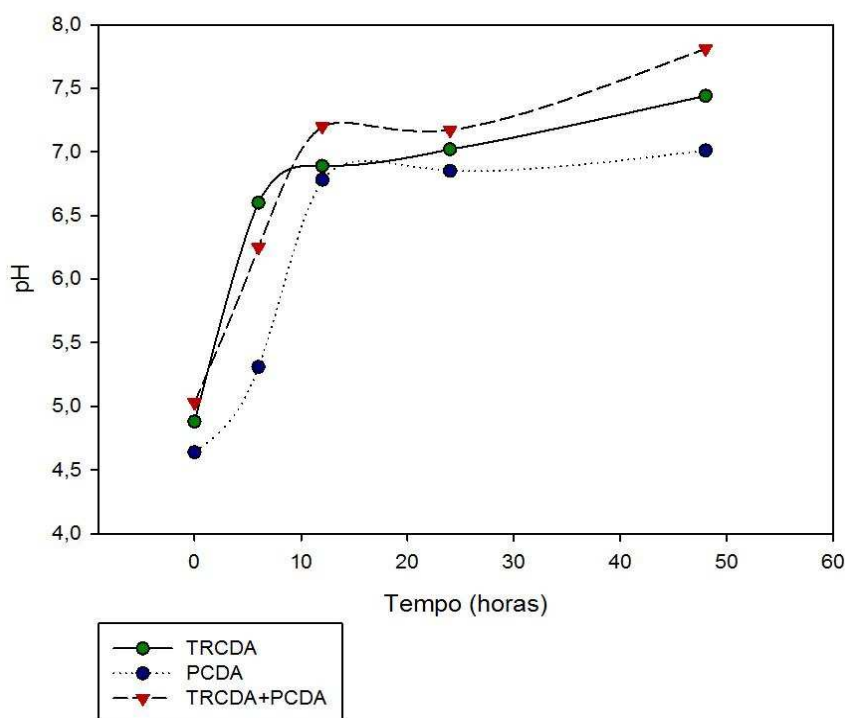


Figura 8. Valores do pH das suspensões após a adição de NaCl.

A força iônica está relacionada à concentração total de eletrólitos e influencia a atividade dos íons em solução. Os compostos iônicos, quando dissolvidos na água, dissociam-se em íons. A concentração total de eletrólitos em solução afeta propriedades importantes, tais como a dissociação e a solubilidade de vários sais.

O estudo das vesículas de PDA contendo 70 e 100 mmol·L⁻¹ de NaCl não foi realizado, pois nesta concentração ocorreu a floculação da vesícula, como mostra a figura 9. Isso sugere a ocorrência de um deslocamento do equilíbrio de ionização dos grupos carboxílicos presentes na superfície da vesícula pela grande quantidade do sal presente. Isso favorece a formação de vesículas com grupos carboxílicos não ionizados o que neutraliza a superfície vesicular. Esta neutralização diminui a

repulsão eletrostática entre as nanoestruturas o que permite a aproximação e agregação das mesmas com formação de grandes flocos.



Figura 9. Flocculação da vesícula TRCDA+PCDA contendo concentração de $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl.

A adição de NaCl influenciou na RC da vesícula ($p \leq 0,05$). As suspensões dos PDAs controles ($0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) apresentaram uma menor RC em relação as demais vesículas adicionadas com o sal, chegando a um valor máximo de $5,3\% \pm 0,8$ para a de TRCDA, permanecendo na cor azul Figura 10.

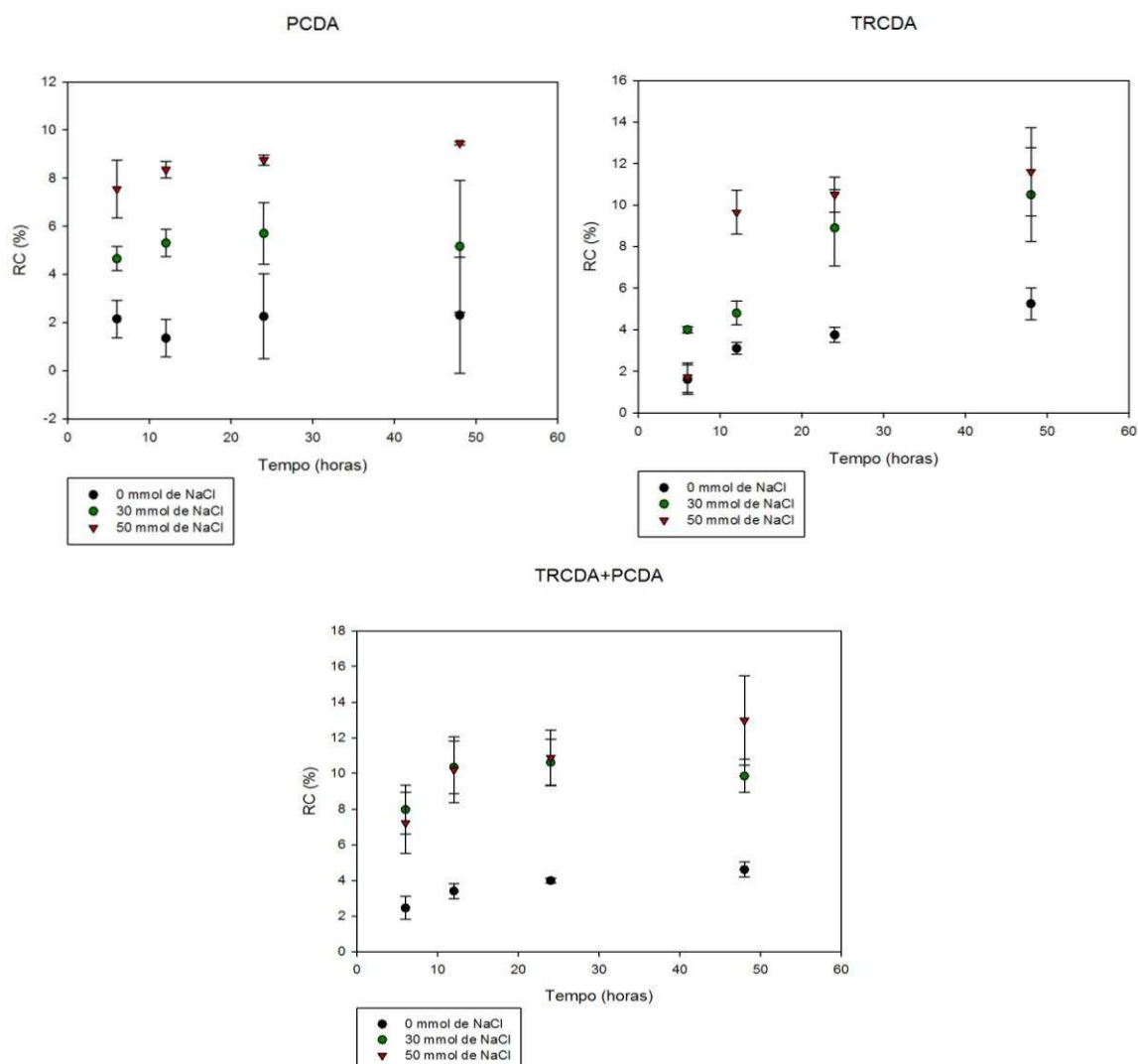


Figura 10. Resposta colorimétrica das vesículas de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA para as diferentes concentrações de NaCl em função do Tempo.

O tempo de incubação foi significativo ($p \leq 0,05$), influenciando na RC das suspensões. No tempo de 12 h foi possível ver diferença na RC das vesículas. As suspensões controles mantiveram na cor azul ao longo de todo estudo, já com a presença de NaCl as suspensões de PCDA e TRCDA após as 12 h passaram de azul para roxo permanecendo assim até o final, para ambas vesículas.

De acordo com Potisatityuenyong et al. (2008), o espectro eletrônico associado à coloração roxa da suspensão vesicular é uma combinação entre os

espectros eletrônicos das vesículas que ainda estão na forma azul e os espectros eletrônicos das vesículas que já se alteraram para a cor vermelha.

Para a suspensão de TRCDA+PCDA após as 12 h passaram de azul para roxo e atingindo a cor vermelha após 48 h, com uma RC de $13 \% \pm 2,5$. O aumento da RC pode ser indicado pelo deslocamento do equilíbrio de ionização do grupo carboxílico na superfície das vesículas de PDAs, favorecendo a ionização dos mesmos, o que impede a formação de ligações de hidrogênio na superfície. A redução da densidade de ligações de hidrogênio desestabiliza a superfície da vesícula. Bem como a reação de neutralização com íons OH^- que altera a interação entre as cabeças hidrofílicas da superfície. Os íons OH^- retiram os prótons dos grupos carboxílicos levando ao rompimento das ligações de hidrogênio na superfície das vesículas, causando a desestabilização das mesmas (KEW E HALL et. al, 2006). Ambos os processos são predominantes neste caso, permitindo assim uma maior transição de cor, aumentando, assim, a resposta colorimétrica.

Na Figura 11 estão os valores de diâmetro hidrodinâmico das diferentes vesículas adicionadas de NaCl (0, 30 e 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Observou-se que o diâmetro das vesículas variou em função do aumento da força iônica do meio. De acordo com o design fatorial somente a quantidade de NaCl foi significativo ($p \leq 0,05$). O tamanho das vesículas adicionadas de NaCl se diferem da vesícula controle ($p \leq 0,05$).

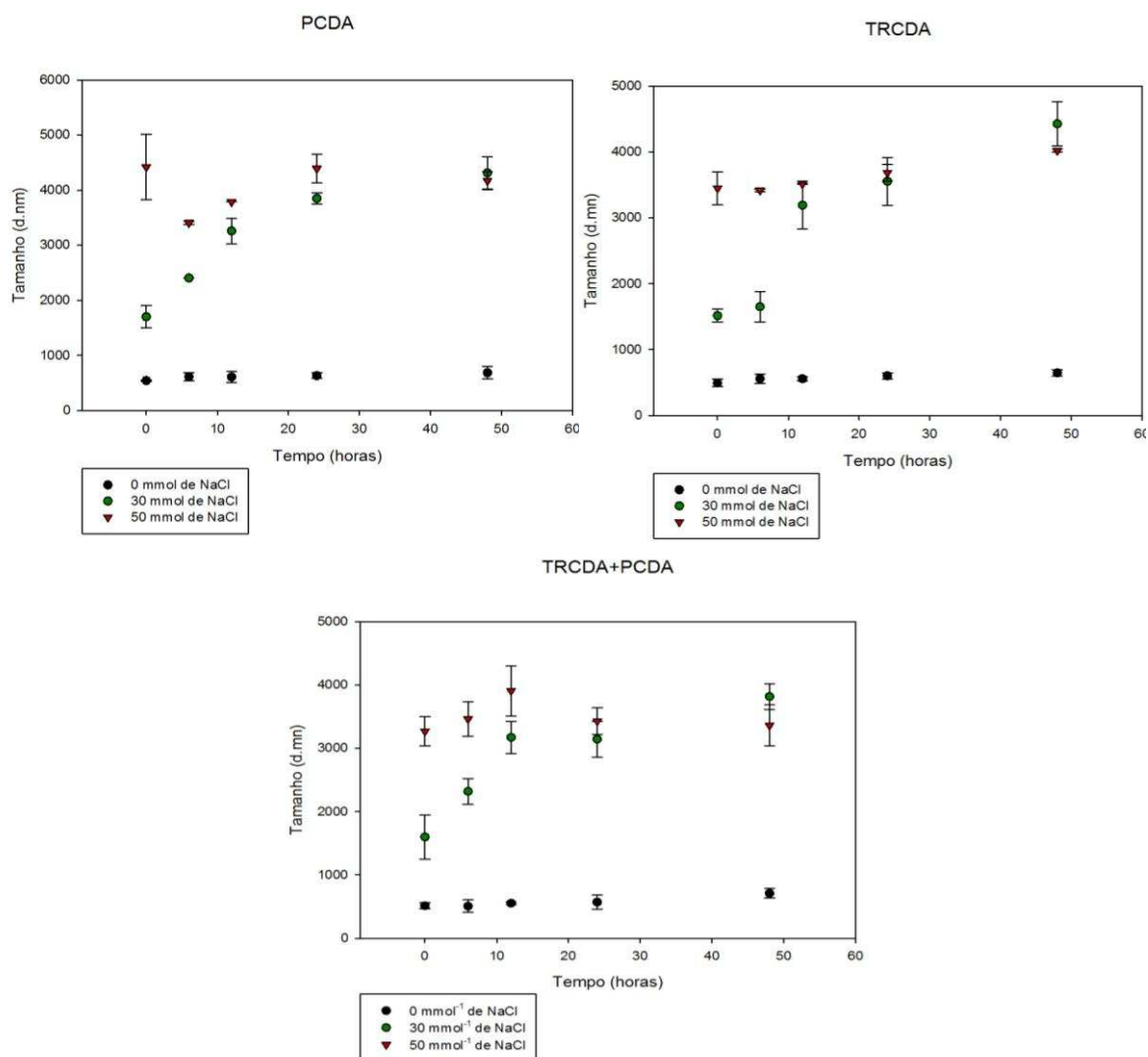


Figura 11. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico das vesículas de TRCDA, TRCDA+PCDA e PCDA para as diferentes concentrações de NaCl em função do Tempo.

O aumento da concentração de NaCl provocou um aumento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo este efeito um pouco mais pronunciado na suspensão de PCDA contendo 50 mmol·L⁻¹. Provavelmente, o crescimento das vesículas está relacionado à desestruturação da superfície das mesmas. Um mecanismo que pode estar envolvido no crescimento das vesículas é o crescimento vesicular por coalescência. Este mecanismo ocorre pela neutralização das cargas da superfície das vesículas pelo Na⁺ do sal, rompendo a repulsão eletrostática entre as vesículas que inicialmente apresentavam superfície carregada negativamente. A

ausência ou a diminuição de carga na superfície vesicular permite a aproximação e colisão das vesículas, que podem se unir por coalescência, resultando em vesículas maiores.

Para o potencial zeta a interação foi não significativa ($p \geq 0,05$), portanto segue-se com a avaliação individual dos fatores. Os três tipos de vesículas diferem entre si ($p \leq 0,05$), somente em relação ao potencial zeta, sendo que à medida que se adicionou NaCl, menos negativo é o potencial da vesícula, indicando que o Na^+ interagiu ionicamente com as carboxilas do PDA, reduzindo a sua eletronegatividade. As suspensões contendo NaCl em sua composição obtiveram os maiores aumentos nos valores do potencial zeta (Figura 12).

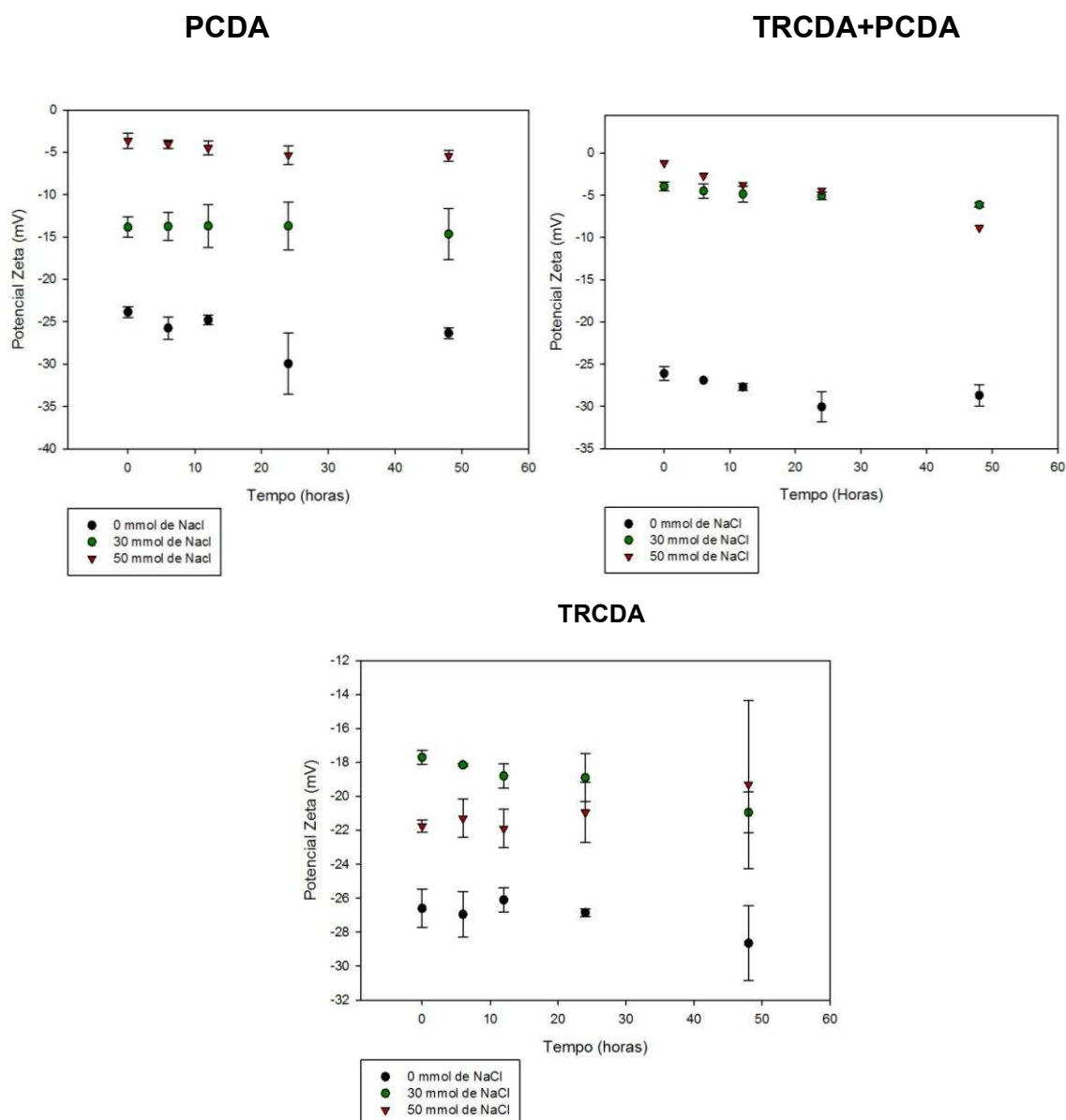


Figura 12. Pontencial zeta das vesículas de PCDA, TRCDA+PCDA e TRCDA para as diferentes concentrações de NaCl em função do Tempo.

Pela Figura 12 podemos notar que quanto maior foi força iônica maior foi o potencial zeta apresentado elas três suspensões, isso pode ter sido causado pela adição do Na^+ presente no sal que, consequentemente em maiores concentrações, neutralizou um maior número de cargas negativas das vesículas.

Se analisarmos os resultados do tamanho e do potencial zeta, vemos que quanto maior o diâmetro hidrodinâmico menos negativo é o potencial encontrado na suspensão. Provavelmente, isso pode estar relacionado com a possível neutralização

das cargas da superfície das vesículas pelo Na^+ , rompendo a repulsão eletrostática entre as vesículas que inicialmente apresentavam superfície carregada mais eletronegativa. Essa diminuição de cargas negativas pode ter permitido a aproximação e colisão das vesículas, que podem se unir por coalescência, resultando em vesículas maiores.

7. CONCLUSÃO

As vesículas de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA foram sensíveis, sendo que os valores de RC, tamanho e potencial zeta variaram em função da intensidade do aumento da temperatura, pH e força iônica.

Os tratamentos controles permaneceram na cor azul não havendo transição colorimétrica mostrando que as mudanças de cor foram causadas pela mudança termodinâmica do meio.

Os valores de pH 8 temperatura de 45 °C e a concentração de acima de 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl foram as condições mínimas em que ocorreu a transição colorimétrica para todas as suspensões de vesículas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, D.J., CHAE, E.H., LEE, G.S., SHIM, H.Y., CHANG, T.E., AHN, K.D., KIM, J.M. Colorimetric reversibility of polydiacetylene supramolecules having enhanced hydrogen-bonding under thermal and pH stimuli. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 8976-8977, 2003.

ATTARD, P.; ANTELM, D.; LARSON, I. Comparison of the zeta potential with the diffuse layer potential from charge titration. **Langmuir**, v.16, p. 1542–1552, 2000.

CAMILLOTO, G. P. **Termodinâmica de interação entre lactato e vesículas nanoestruturadas de polidiacetileno**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPHOL R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal Colloid Interface Science**, v.15, p. 360:565-73, 2011.

CHARYCH, D. H.; NAGY, J. O.; SPEVAK, W. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by polymerized bilayer assembly. **Science**, v. 261, p. 585-588, 1993.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v.24, p. 4283– 4300, 2003.

KEW, S.J.; HALL, A.H. Structural effect of polymerisation and dehydration on bolaamphiphilic polydiacetylene assemblies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 2039-2047, 2006.

KOH, J.J.; LIU, S.; ZENG, W.; ZOU, H.; WANG, L.; SURESH, V.; BEUERMAN, R.; CAO, D. Electron donating group substituted and α -d-mannopyranoside directly functionalized polydiacetylenes as a simplified bio-sensing system for detection of lectin and *E. coli*. **Sensor and Actuators B**, v.178, p.563-571, 2013.

KOLUSHEVA, S., SHAHAL, T., JELINEK, R. Cation-selective color sensors composed of ionophore phospholipid polydiacetylene mixed vesicles. **Journal of American Chemical Society**, v. 122, p. 776-780, 2000.

LEE., D.C., SAHOO, S.K., CHOLLI, A.L., SANDMAN, D.J. Structural Aspects of the Thermochromic Transition in Urethane-Substituted Polydiacetylenes **Macromolecules**, v. 35, p. 4347-4355, 2002.

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. A. F; OLIVEIRA, T. V.; MEDEIROS FILHO, E. A. Behaviour of polydiacetylene vesicles under different conditions of temperature, pH and chemical components of Milk. **Food Chemistry**, v.135, p. 1052-1056, 2012.

POTISATITYUENYONG, A.; ROJANATHANES, R.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions po polydiacetylene vesicles. **Langmuir**, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

YOON, J.; KIM, J.M. Recent conceptual and technological advances in polydiacetylene-based supramolecular chemosensors **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.209, p. 2194-2203, 2009.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DO SENSOR COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE TRIHALOMETANOS EM ÁGUA PARA CONSUMO

1. RESUMO

Durante o processo de desinfecção da água são formados subprodutos carcinogênicos e prejudiciais a saúde do consumidor, chamados de trihalometanos (THMs). Dentre os THM, encontram-se o triclorometano (TCM), diclorobrometano (DCBM), dibromclorometano (DBCM) e bromofórmio (BM) formados pela reação do cloro com ácidos originários da decomposição de matéria orgânica, como os ácidos húmicos e fúlvicos. A detecção desses compostos na água normalmente é realizada por métodos cromatográficos que além do alto custo da análise exige pessoal bem treinado. Os PDAs vêm recebendo muita atenção devido a sua característica ótica de mudança de cor quando ocorre interações intermoleculares, por exemplo, com diferentes substâncias químicas. Por isso essa pesquisa utilizou vesículas de polidiacetileno como sensor colorimétrico para detectar trihalometanos em água potabilizada para consumo humano. Foram desenvolvidas três diferentes vesículas: PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA com adição de fosfolipídeos. As condições para as análises foram de pH 7, temperatura de 40 °C e a concentração de 50 mmol·L⁻¹ de NaCl, afim de aumentar a sensibilidade do sensor na presença dos THMs. A presença do TCM, DCBM e DBCM provocaram a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo que a interação entre os THMs vai depender da composição das vesículas, do tempo de contado e da concentração do THM. O BM não induziu a mudança de cor em nenhuma das vesículas testadas. Estes resultados apontam a potencialidade do uso destas nanoestruturas como sensores para identificação de THM em água para consumo humano.

2. INTRODUÇÃO

A demanda por água de boa qualidade tem-se acentuado muito nos últimos anos, devido ao crescimento populacional. Tanto nas bacias hidrográficas rurais quanto nas urbanas, ocorrem atividades humanas indevidas, que alteram as características, o equilíbrio e a dinâmica dos recursos naturais.

Muitos desses contaminantes levantam uma preocupação considerável tanto nos aspectos toxicológicos, físico-químicos e microbiológicos, especialmente quando estão acima dos valores de referência baseados em saúde humana.

A cloração é o processo de desinfecção de água para consumo humano, mais usado em todo o mundo, devido sua eficácia e seu preço relativamente baixo. A reação do cloro com alguns compostos da matéria orgânica em decomposição, particularmente os ácidos fúlvicos e húmicos, leva à formação dos trihalometanos (THM). Dentre os THM formados, encontram-se o clorofórmio (CHCl_3), diclorobromometano (CHBrCl_2), clorodibromometano (CHBr_2Cl) e bromofórmio (CHBr_3) que, mesmo em baixas concentrações, podem ser tóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e possivelmente mutagênicos. O limite máximo permitido no Brasil para soma das concentrações THM é de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de acordo com a Portaria 2914 do Ministério da Saúde, de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011).

Os estudos efetuados com THM mesmo em pequenas concentrações têm confirmado o potencial cancerígeno destas substâncias, revelando efeitos mutagênicos em diferentes espécies animais. Em relação ao homem, o efeito destas substâncias apresenta diferenças de atuação mais quantitativas que qualitativas, devido aos fenômenos biológicos de absorção, assimilação, excreção, desintoxicação e expressão genéticas (LEE et al., 2004).

Carlos et al. (2011), determinaram a presença dos trihalometanos, clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio em amostras de água destinada ao consumo humano e água superficial do município de Viçosa, MG. As amostras de água tratada apresentaram contaminação pelos trihalometanos clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano. Para todas as amostras analisadas os valores máximos de concentração de clorofórmio,

bromodiclorometano e dibromoclorometano encontrados foram $4,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $3,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A soma da concentração dos trihalometanos foi menor do que $9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em todas as amostras analisadas, valor menor do que o VMP estabelecido pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde.

Su et al. (2004) avaliaram o efeito da adição de etanol e 1-pentanol em vesículas de PDA. A resposta colorimétrica foi maior para vesículas adicionadas de 1-pentanol em função da sua maior hidrofobicidade comparado ao etanol. Os domínios hidrofóbicos da cadeia de PDA solubiliza moléculas mais hidrofóbicas. Ao contrário, moléculas mais hidrofílicas se dissolvem melhor na água do que nos domínios hidrofóbicos não alterando, assim, a conformação do PDA levando o sistema a uma menor resposta colorimétrica

Normalmente, a análise dos trihalometanos é feita por cromatografia gasosa (CG) empregando o detector por captura de elétrons, que é seletivo para compostos que apresentam halogênios em sua estrutura. Como técnica analítica, a CG depende da qualidade do preparo da amostra, solventes e equipamentos de alto custo como o cromatógrafo. Esses fatores têm levado ao desenvolvimento de novos métodos, em que as principais vantagens são: rapidez nos resultados, praticidade e baixo custo possibilitando a realização de um número maior de análise.

Recentemente, métodos que permitam a identificação simples e rápida desses contaminantes têm sido estudados com intuito de desenvolver sensores que podem apresentar de diversas formas. Pesquisas têm demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de PDA para atuarem como moléculas receptoras de moléculas alvo, permitindo uma identificação simples e rápida de compostos de interesse. Dessa forma, o uso de sensores colorimétricos, como as vesículas de PDA, torna-se uma alternativa às técnicas convencionais como cromatografia.

Alguns solventes têm sido associados à transição colorimétrica de vesículas e filmes de PDA. Chae et al., (2007) estudaram fibras estabilizadas com polímeros embebidas com diferentes estruturas de PDA que foram submetidas à exposição em diferentes solventes como clorofórmio, etil acetato e n-hexano. Observou-se que tanto o tipo de PDA quanto o de solvente influenciou na resposta colorimétrica das

fibras. A alteração da cor de azul para vermelho foi atribuída ao solvatocromismo, consequente da perturbação do sistema provocada pela interação entre solvente e PDA.

Polímeros conjugados vêm sendo considerados grandes promissores no desenvolvimento de sensores colorimétricos, uma vez que possuem sensibilidade à estímulos externos, e podem apresentar mudanças significativas nas propriedades estrutural, química e física em resposta à flutuações nas condições ambientais, como por exemplo, temperatura, massa, luz, pH, estado de oxidação entre outros (SONG et al., 2002).

O estudo da interação de alguns desses fatores com pH, temperatura e força iônica, seria interessante para maior compreensão das suas influências na estabilidade e na transição colorimétrica de vesículas a base de PDA na identificação de compostos de interesses. Por isso, o uso de sensores colorimétricos pode ser uma alternativa simples, prática e rápida para detecção de compostos químicos carcinogênicos em água potabilizada, que possam causar danos à saúde do consumidor.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Utilizar vesículas de polidiacetileno como sensor colorimétrico para detectar Trihalometanos em água potabilizada para consumo humano.

3.2. Objetivos específicos

- Utilizar as vesículas produzidas nas melhores condições para aumentar a sensibilidade das mesmas, na presença de contaminantes.
- Avaliar a especificidade das vesículas de PCDA, TRCDA e PCDA/TRCDA na detecção dos quatros principais trihalometanos em água potabilizada;

- Quantificar a resposta colorimétrica (RC) das vesículas na ausência e na presença de trihalometanos durante o tempo de contato.
- Avaliar o potencial zeta das vesículas na ausência e na presença de trihalometanos.
- Determinar o limite de detecção das vesículas para indicação colorimétrica de trihalometanos em água potável.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Monômeros de 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA) 97,0 % m/m (Sigma®), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA) ≥98,0 % grau cromatográfico (Sigma®), esfingomielina (ES) (Aldrich), colesterol (CO) (Aldrich), clorofórmio grau-HPLC (Merck®), água Milli-Q (>18MΩ), dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®), foram utilizados para produção dos sensores. O NaOH 0,1 N foi usado para ajustar o pH e o NaCl para alterar a força iônica.

Como contaminantes, foram utilizados os trihalometanos: triclorometano CHCl_3 (Sigma®), diclorobromometano CHBrCl_2 (Sigma®), dibromoclorometano CHBr_2Cl (Sigma®), bromofórmio CHBr_3 (Sigma®).

4.2. Produção das nanovesículas a base de PDA

O sensor colorimétrico foi produzido de acordo com a metodologia proposta por Pires et al. (2011). Na produção das vesículas, foram utilizados os PDAs 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA) e 10,12-ácido tricosadinóico (TRCDA). Para o preparo das vesículas de PDA/ES/CO, 1 mM de esfingomielina (ES), colesterol (CO) foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. Paralelamente, solução de PDA 1 mM foi preparado em 2 mL de DMSO e aquecidas a 80 °C durante 15 min e então adicionadas ao filme lipídico formado por ES e CO. O volume completado para 10 mL com água Milli-Q. A

suspensão foi levada ao desruptor de células R2D091109, e em seguida filtrada em filtro PVDF (Millipore®). Em seguida estocada a 4 °C por no mínimo 10 h. As suspensões foram mantidas sob refrigeração (10 ± 2 °C) até o momento das análises do experimento.

Utilizando os PDAs 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA) e os fosfolipídios ES + CO foram produzidas três vesículas diferentes: PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA.

4.3. Detecção de trihalomentanos em água potabilizada

Após a determinação dos valores de temperatura, pH e força iônica mínimos de transição colorimétrica no capítulo 1 desta tese, selecionaram-se os valores de pH 7 e temperatura de 40 °C e foi utilizado $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl nas vesículas já sintetizadas. Essas modificações foram feitas para deixar as vesículas em condições de maior sensibilidade a presença dos THMs e facilitar sua mudança de cor.

Antes da adição das soluções com THMs foi ajustado o pH para 7 com NaOH 0,01 N e adicionados $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl. Para simular as concentrações de TCM, DCBM, DBCM e BM em água, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: $0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e $5000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de cada THM em água deionizada esterilizada, separadamente. Foi adicionado nos tubos um volume de 1:1 de suspensão vesicular para solução de THM e depois colocados em banho-maria a 40 °C. Amostras em retiradas de tempos e tempos para serem avaliadas quanto a resposta colorimétrica (RC) e ao potencial zeta.

4.4. Resposta Colorimétrica (RC)

Para avaliar o espectro UV-Vis das suspensões, 1,5 mL de cada tratamento foi colocada em cubeta de quartzo e analisada no equipamento Shimadzu UV-2550, à temperatura ambiente em uma faixa de comprimento de onda de 400 nm – 700 nm. A resposta colorimétrica (RC) é um parâmetro que tem sido amplamente

utilizado para mensurar a porcentagem de moléculas de polidiacetileno que apresentou transição espectrofotométrica em decorrência de algum estímulo. A RC é calculada por meio da obtenção do espectro eletrônico da suspensão polidiacetilênica na ausência e na presença da molécula de interesse.

Para medir a mudança de cor, de azul para vermelho, calcula-se a Resposta Colorimétrica, como parâmetro semi-quantitativo da alteração das propriedades crômicas do polidiacetileno conforme Charych et al. (1993):

$$RC = \{(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a - [(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_d (A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a]\} \times 100$$

Em que: A_{azul} = absorvância a 640 nm e A_{vermelho} = absorvância 540 nm; a e d valores calculados antes e depois da mudança de cor, respectivamente.

As vesículas foram analisadas antes e após a o contato com os Trihalometanos: triclorometano (TCM), diclorobromometano (DCBM) dibroclorometano (DBCM), bromofórmio (BM).

4.5. Medidas de tamanho por Espalhamento dinâmico de luz e do Potencial Zeta.

Avaliação da variação do diâmetro hidrodinâmico dos PDAs e de sua carga superficial com e sem a adição de trihalometanos, foram realizadas pela utilização do equipamento de espalhamento dinâmico de luz.

O tamanho e o potencial zeta das suspensões foram medidas a 25 ° C, com a utilização do equipamento Zetasizer Nano ZS90, Malvern. Cerca de 1 mL de suspensão vesicular pura foi colocada em cubeta de quartzo e realizada a leitura de tamanho e posteriormente a leitura do potencial zeta. Os resultados de cada amostra foram obtidos pelas médias das três leituras realizadas pelo equipamento.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises do experimento foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro trihalometanos, cinco concentrações e três tipos de vesículas, o estudo foi conduzido em três repetições. Os resultados de RC (%), e potencial zeta (mV) foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 0,05 de probabilidade, com o auxílio do programa Minitab.

6. RESULTADOS E DISCURSÃO

6.1. Identificação de triclorometano em água por vesículas de PDA

As suspensões controle de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA após o ajuste de pH, adição de NaCl e submetidos à temperatura de 40 °C continuaram apresentando coloração azul intenso, com pico máximo de absorção entre 637 nm e 640 nm, com um ombro vibrônico entre 540 nm e 545 nm.

A transição da cor azul para vermelho pode ser observada neste estudo a partir de 10% de resposta colorimétrica, de acordo com as observações no espectrofotômetro e análises visuais. Para melhor visualização os resultados nos gráficos estão destacados a porcentagem de 10% para facilitar a visualização e compreensão dos dados.

A suspensão vesicular que obteve a maior transição de cor e um tempo menor de estudo foi aquela que continha os dois PDAs juntos (TRCDA+PCDA), nas quais ocorreu transição colorimétrica para todas as concentrações de TCM, exceto o controle (Figura 1). Com o TCM, a mudança de azul para vermelho, ocorreu após 60 min para todas as concentrações, com exceção do controle. Após a adição da água contaminada com diferentes concentrações de TCM, observou-se uma redução no pico máximo de absorção referente à cor azul (640 nm) e aumento do pico máximo de absorção na região do vermelho (540 nm).

A RC expressa à porcentagem das moléculas de PDAs que apresentam a transição de azul para vermelho. A alteração da cor azul para vermelho pode ser

atribuída ao solvatocromismo, consequência da perturbação do sistema provocada pela interação entre solvente TCM e as moléculas do TRCDA. Como o TCM é hidrofóbico, a interação solvente e PDA ocorrem na cauda do hidrocarboneto apolar do polidiacetileno, no interior da vesícula.

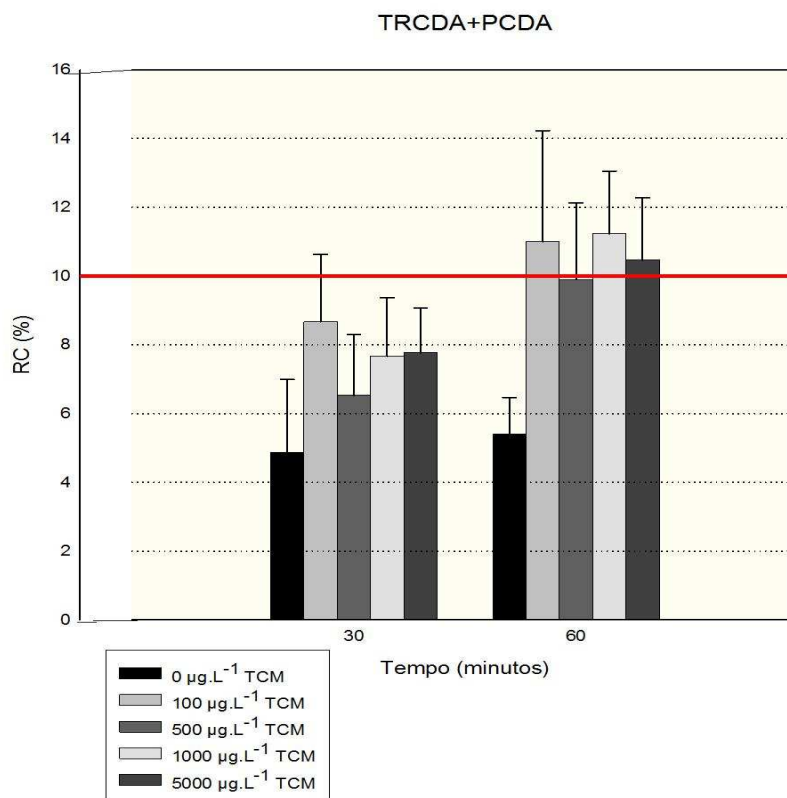


Figura 1. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA+PCDA para as diferentes de concentrações de TCM em função do tempo.

Os tempos diferem estatisticamente entre si, sendo 60 min o tempo mínimo para a mudança de cor do azul para o vermelho em todas as concentrações. Aos 60 min a mudança de cor ocorreu para todas as concentrações de TCM, mostrando que sua presença foi que estimulou transição colorimétrica.

A presença de TCM influenciou na RC da suspensão de TRCDA+PCDA, a concentração de 0 µg.L⁻¹ diferiu das demais concentrações do trihalometano e que a concentração mínima testada de 100 µg.L⁻¹ foi capaz de mudar de cor para o vermelho com 60 min. Valor importante, já que é o VMP de THM em água, segundo a legislação.

Observa-se que os comportamentos de transição de cor de vesículas de PDA dependem em grande parte de suas estruturas moleculares. O encurtamento da cauda pela presença do TRCDA junto ao PCDA provocou uma RC maior, isso pode ser atribuído por uma possível diminuição das forças de interação inter e intramoleculares dentro da bicamada vesicular, devido ao menor tamanho da cadeia de hidrocarboneto do TRCDA.

A maior resposta colorimétrica na presença do TCM foi observada na vesícula de TRCDA+PCDA, mostrando que a junção dos dois polidiacetilenos potencializou a interação e sensibilidade do sensor colorimétrico, com um aumento da transição colorimétrica em concentrações mais baixas do contaminante e em um tempo menor de contato. Outro fator importante é a concentração de PDA que foi de 2 mM em de cada PDA, logo se tem um número mais de moléculas de PDA para interagir com o TCM.

Os valores da RC de todas as suspensões mostram potencial para aplicação de vesículas de PDA como sensores para detecção de TCM em água potabilizada. As suspensões de TRCDA e TRCDA+PCDA foram capazes de mudar de cor do azul para o vermelho na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, valor máximo permitido pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde. A diferença entre elas foi o tempo de viragem de cor, que no caso da vesícula de TRCDA+PCDA foi a que obteve a RC em um tempo menor de 60 min de contato com o TCM.

Pode-se observar na Figura 2, que à medida que se aumenta a concentração de TCM aumenta-se também a RC, tendo valor máximo na concentração $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para a suspensão de PCDA. As concentrações até $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ permaneceram na cor azul durante todo tempo estudado, já as concentrações de 1000 e $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ deferiram das demais obtendo um maior aumento na RC.

A concentração de $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentou RC média de $9,8 \% \pm 2,0$ a partir de 240 min, ocorrendo à mudança da cor roxa para a vermelha. De acordo com Potisatityuenyong et al. (2008), o espectro eletrônico associado à coloração roxa da suspensão vesicular é uma combinação entre os espectros eletrônicos das vesículas que ainda estão na forma azul e os espectros eletrônicos das vesículas que já se alteraram para a cor vermelha. Isso significa que as vesículas de PCDA interagiram

com as moléculas de TCM aumentando a RC, sendo a concentração $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ é a mínima para promover a transição colorimétrica.

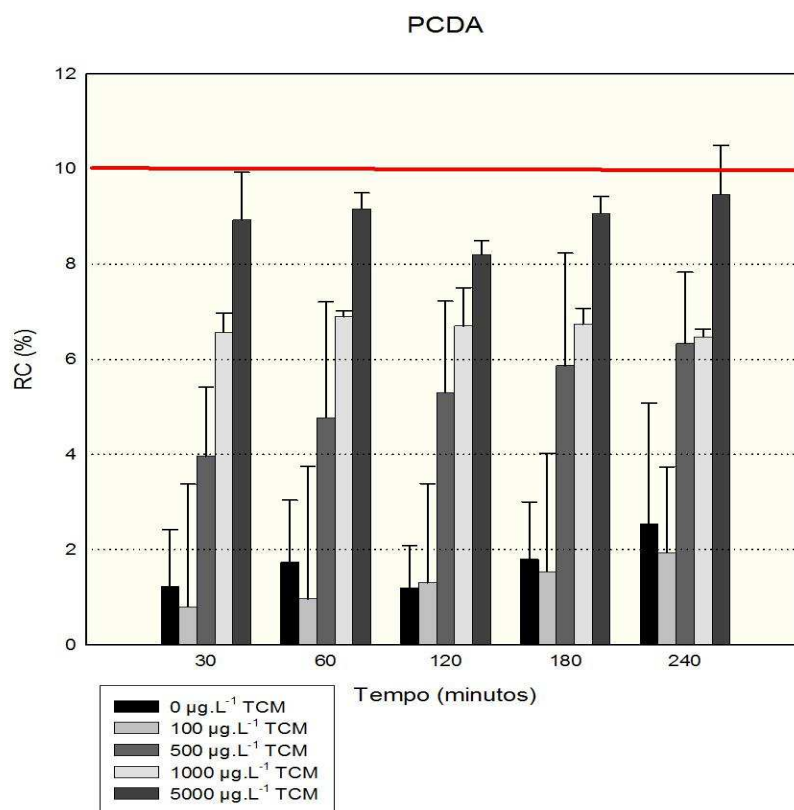


Figura 2. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de PCDA para as diferentes de concentrações de TCM em função do tempo.

Alguns estudos realizados anteriormente, como o de Pires e al. (2010) e Medeiros (2011) mostram que vesículas de PCDA conseguem promover mudança de cor na presença do TCM. No estudo de Pires et al. (2010) mostraram a termodinâmica de transição colorimétrica das vesículas de polidiacetileno induzida por diferentes solventes. Foram avaliadas vesículas PCDA e vesículas de PCDA + CO + ES. A adição de CHCl_3 , CH_2Cl_2 e CCl_4 causaram transição colorimétrica em ambas as vesículas, porém foi utilizados os solventes puros nas vesículas, ou seja uma concentração muito maior que deste estudo, no qual o TCM foram diluídos em água para simular a contaminação.

Para a suspensão de TRCDA as concentrações de TCM aumentaram a RC ao longo do tempo de estudo, levando a mudança colorimétrica total de azul para

vermelho das suspensões contendo TCM, exceto para o controle em que permaneceu na coloração azul.

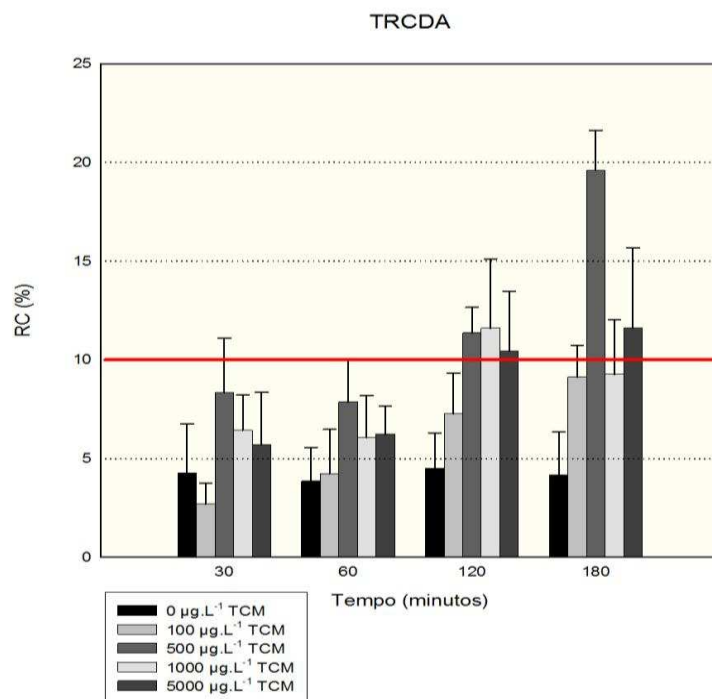


Figura 3. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA para as diferentes de concentrações de TCM em função do Tempo.

A partir 120 min ocorreu a transição colorimétrica para todas as concentrações de TCM, sendo mínimo para mudança de cor para concentrações. A suspensão de TRCDA apresentou mudança de cor para a presença de TCM durante o tempo de 30 min de incubação (Figura 3), havendo mudança de cor de azul para roxo a partir de 500 µg.L⁻¹ com média de 8,3 % ± 2,8. Após 120 min, houve mudança de cor azul para vermelha nas maiores concentrações. Com RC média de 9,1 % ± 1,6, a concentração de 100 µg.L⁻¹ passou a suspensão da coloração azul para coloração roxa, após os 120 min. Ressalte-se que este é o valor máximo permitido pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde.

Em outro trabalho, o solvatocromismo de agregados de PDA em solução também foi avaliado. PDAs contendo monômeros com diferentes comprimentos de cadeias foram utilizados. Em clorofórmio, o PDA apresentou coloração amarela,

entretanto, quando o clorofórmio foi misturado com hexano houve transição colorimétrica (DEI et al., 2008).

6.2. Determinação de diclorobrometano (DCBM) em água por vesículas de PDA

Para o DCBM em água, a suspensão de vesícula que obteve a maior RC e em um tempo menor foi a que continha os PDAs juntos. A concentração aumentou os valores de RC aumentando a porcentagem tendo seu pico máximo na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DCBM. Para todas as concentrações acima de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DCBM houve transição colorimétrica do azul para o vermelho. O que nos mostra que os domínios hidrofóbicos da cadeia de PDA interagiram com as moléculas mais do DCBM que são hidrofóbicas, alterando assim, a conformação do PDA levando o sistema a uma mudança de cor (SU, et al.2011).

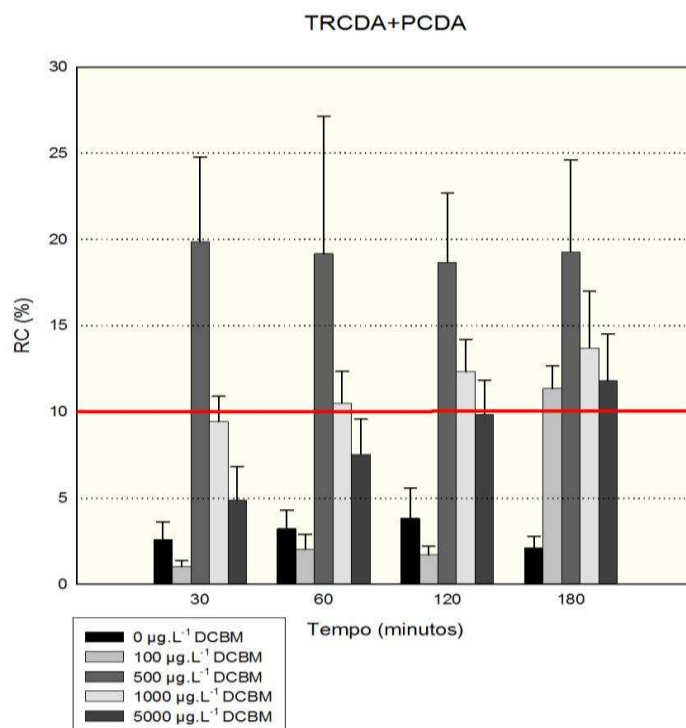


Figura 4. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA+PCDA para as diferentes de concentrações de DCBM em função do tempo.

A partir de 180 min temos a transição colorimétrica para todas as concentrações estudadas inclusive para a concentração de VMP de THM em água que é $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DCBM, segundo a Portaria 2914 de 2011 do MS (BRASIL, 2011).

A vesícula com os dois PDAs obtiveram maior RC contendo DCBM. Ressalte-se que o controle permaneceu na cor azul. Isso é importante, pois mostra que a mudança de cor é atribuída à presença do DCBM. Charoenthai et al. (2011) observaram forte influência da cabeça hidrofílica e do comprimento da cauda hidrofóbica na resposta colorimétrica das vesículas para temperatura, solventes e pH. Cadeias menores (TRCDA) apresentaram interações de dispersão inter e intramoleculares mais fracas quando comparadas às cadeias de PCDA. Isto resulta em uma transição colorimétrica mais rápida após a exposição ao estímulo e que pode ter ocorrido no caso da vesícula de TRCDA+PCDA. A presença de um PDA de cadeia menor potencializou a sensibilidade do PCDA puro, melhorando a capacidade de interação e consequentemente aumentando a RC. Outro fator importante é a concentração de PDA que foi de 2 mM um de cada PDA, logo se tem um número mais de moléculas de PDA para interagir com o THM.

Na Figura 5 observa-se a porcentagem da RC da suspensão de PCDA na presença do DCBM. Para a suspensão de PCDA, tanto o tempo quanto à concentração de DCBM tiveram influência na RC ($p \geq 0,05$), separadamente. Após o tempo de 240 min ocorreu a interação do DCBM com a parte hidrofóbica das vesículas de PCDA promovendo a mudança de cor da suspensão.

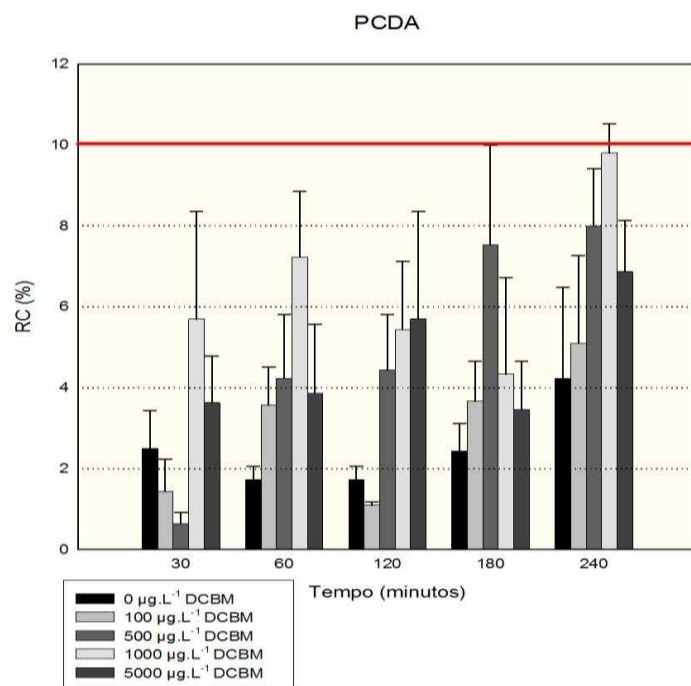


Figura 5. Resposta Colorimétrica (RC) das vesículas de PCDA com as concentrações de DCBM em função do tempo.

A transição colorimétrica foi perceptível somente para a concentração de 1000 µg.L⁻¹ de DCBM após 240 min, havendo mudança de cor de azul para vermelho, como pode ser visto na Figura 5, onde a média foi de 9,8 % ± 0,7. As demais concentrações tiveram um aumento na porcentagem de RC mais não foi o suficiente para promover a mudança de cor, permanecendo azuis durante o estudo. Logo a concentração de mínima de DCBM capazes de interagir com as vesículas de PCDA é de 1000 µg.L⁻¹ a partir 240 min de contato.

A suspensão de TRCDA não apresentou transição colorimétrica para nenhuma das concentrações testadas de DCBM após 240 min, como mostra a Figura 6. A RC média para todas as concentrações ficaram abaixo da linha vermelha do gráfico (10 % de RC) que é a porcentagem mínima para ocorrer a transição de cor de azul para vermelho, não alterando, portanto sua coloração azul. As concentrações de DCBM usadas durante o tempo de estudo não foram suficientes para que as moléculas de TRCDA interagissem com o DCBM presente na água e assim mudar de cor.

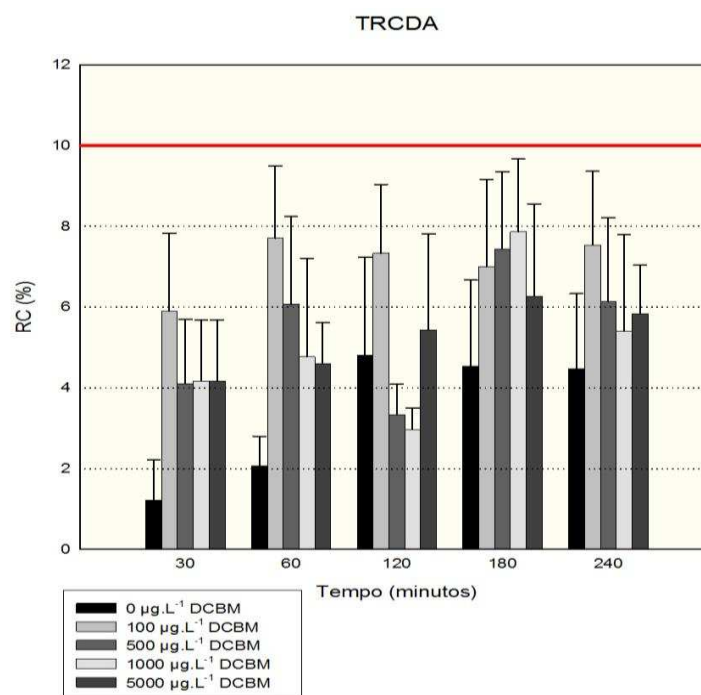


Figura 6. Resposta Colorimétrica (RC) das vesículas de TRCDA com as concentrações de DCBM em função do tempo.

Para a suspensão de TRCDA a interação tempo e concentração foi significativa ($p \geq 0,05$). Mesmo que a concentração e o tempo tenham influenciado no aumento da RC, esse não foi o suficiente para que as moléculas do PDA interagissem com as do DCBM e mudassem de cor (Figura 6).

6.3. Identificação de dibromoclorometano (DCBM) em água por vesículas de PDA

A vesícula de TRCDA+PCDA foi mais sensível à presença do contaminante quando comparada com as outras vesículas, possuindo uma maior interação entre as moléculas dos PDA e o DCBM levando a uma mudança de cor. Na suspensão de TRCDA+PCDA após 240 min observou mudança de cor nas concentrações de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, indo do azul para o vermelho para a primeira e azul para roxo para a última (Figura 7).

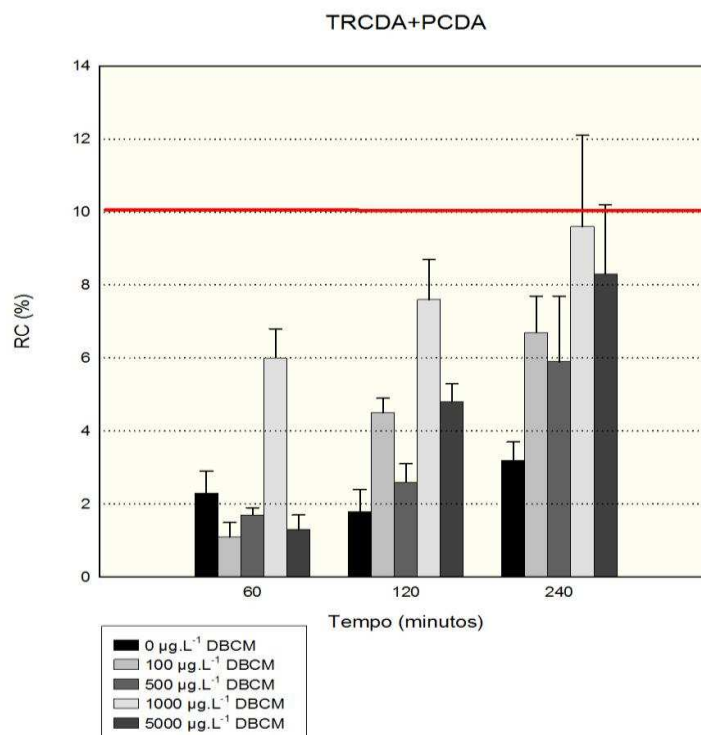


Figura 7. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA+PCDA para as diferentes de concentrações de DBCM em função do Tempo.

Após o tempo de 240 min começou haver então a transição de cor das vesículas de TRCDA+PCDA com o DBCM com uma RC acima dos 10%, porcentagem que ocorre a transição de cor do azul para vermelho. Mostrando mais uma vez que a junção dos dois PDAs potencializou a sensibilidade e interação da vesícula com o THM resultando em uma RC maior após a exposição ao estímulo.

Na figura 8 estão os valores da RC para as vesículas de TRCDA e PCDA e podemos observar que durante os 240 min de estudo as vesículas permaneceram azuis na presença do DBCM.

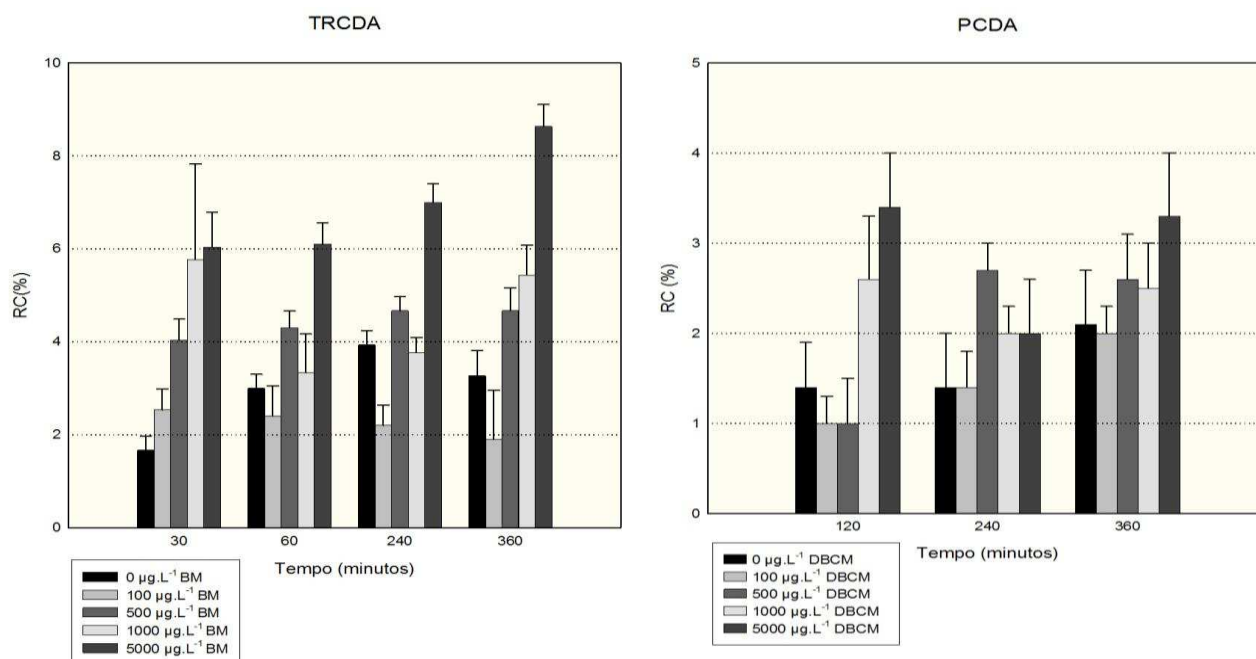


Figura 8. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA, PCDA para as diferentes de concentrações de DBCM em função do Tempo.

Com o tempo houve aumento da RC para todas as concentrações de DBCM (Figura 8), porém não foi suficiente para que houvesse transição colorimétrica das suspensões de TRCDA e PCDA. Nem o tempo de estudo e nem as concentrações foram o suficientes para que as moléculas do PDA interagissem com as do DBCM e mudassem de cor. A quantidade de DBCM necessário para induzir a transição das vesículas de TRCDA e PCDA provavelmente deve ser muito maior que $5000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de DBCM, já que em pré-testes foram adicionados concentrações puras do THM e foi observada a mudança de cor. Mas como o alvo da pesquisa seria a identificação do composto em água potabilizada foram escolhidas concentrações mais baixas.

6.4. Identificação de Bromofórmio (BM) em água por vesículas de PDA

Na Figura 10, observam-se os valores de RC para as vesículas de TRCDA, PCDA e TRCDA+PCDA na presença de BM. A interação entre concentração de BM

e tempo foi significativa ($p \leq 0,05$), mostrando que quanto maior é o tempo e maior é a concentração de BM adicionada, maior a porcentagem de RC.

A adição de água contaminada com BM em vesículas à base de PDA aumentou a RC ao longo do tempo de estudo, mas não foram suficientes para promover a transição colorimétrica. A RC é um parâmetro utilizado para mensurar a porcentagem de moléculas de polidiacetileno que apresentou transição espectrofotométrica em decorrência de algum estímulo, neste caso a presença de BM ou as concentrações estudadas não foram capazes de promover a mudança de cor do azul para vermelho.

É importante ressaltar que o controle de todas as suspensões de TRCDA+PCDA, PCDA e TRCDA (vesícula com $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de THM) não apresentaram mudança de cor. Fator importante, visto que comprova que a mudança de cor é atribuída à presença do THM e não pelas condições de pH, temperatura e força iônica utilizadas nesta etapa do estudo. Lembrando que para o estudo de cada THM foi feito um controle pra todos os tipos de suspensões de vesícula.

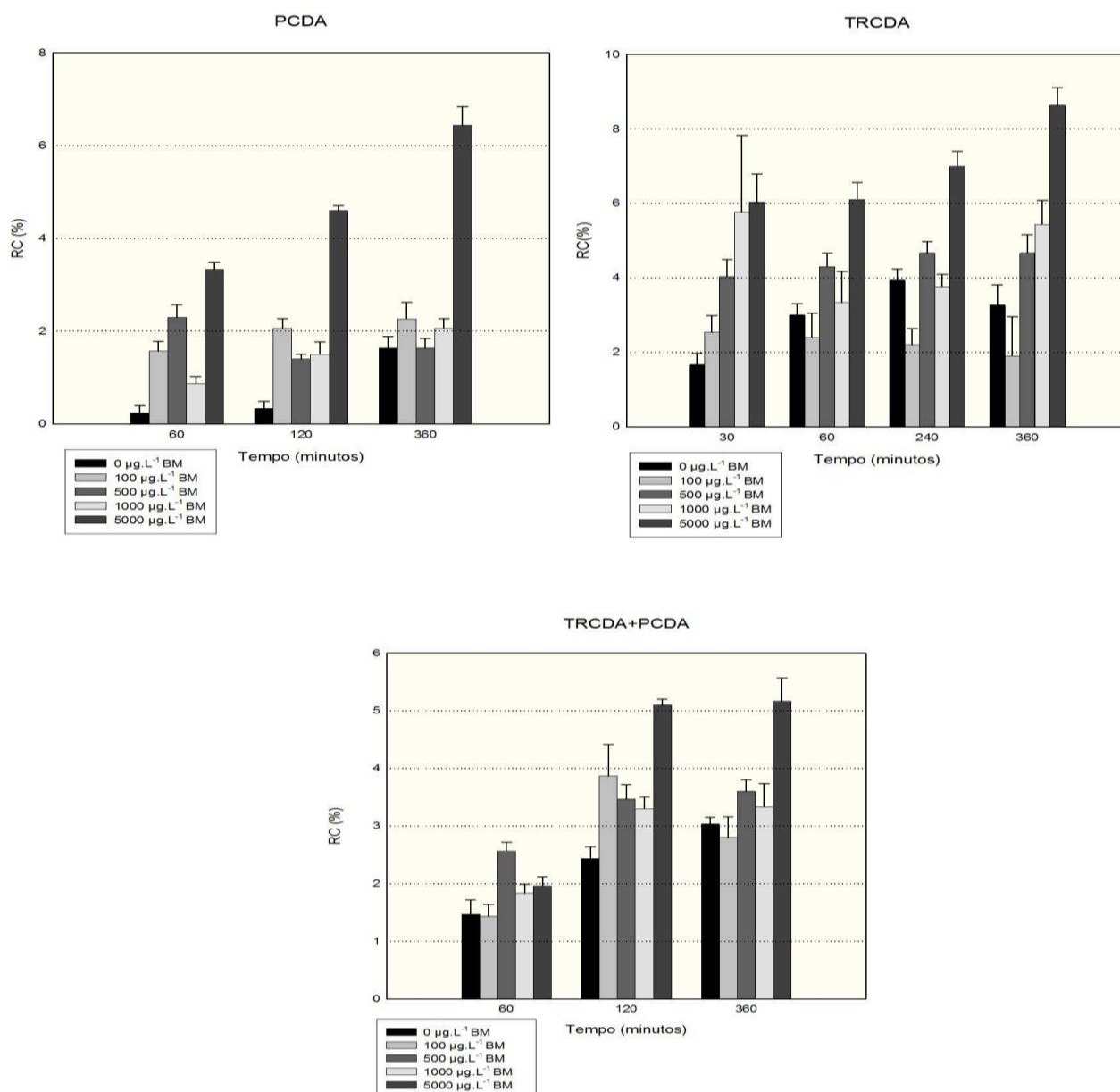


Figura 10. Variação da resposta colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas de TRCDA, PCDA e TRCDA+PCDA para as diferentes concentrações de BM em função do tempo.

A análise dos THM em água potabilizada geralmente é feita por cromatografia gasosa (CG) empregando o detector por captura de elétrons, que é seletivo para compostos que apresentam halogênios em sua estrutura. Como técnica analítica, a CG depende da qualidade do preparo da amostra, solventes e equipamentos de alto custo como o cromatógrafo.

Com aplicação dos sensores colorimétricos à base de vesículas de PDA, seria aumentado o acesso a análise desses compostos carcinogênicos e a possibilidade de indicação de possível presença e até mesmo da sua quantidade aproximada em água para consumo. Com isso, poderiam ser empregadas em análises de controle de qualidade de água em estações de tratamento de água, indústrias e até mesmo na casa dos consumidores, como forma de prevenção e controle dos THM.

6.5. Determinação do potencial zeta das suspensões na presença dos THM ao longo do tempo.

A avaliação do potencial zeta foi feita nas suspensões de PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA (pH 7 e 50 mmol.L⁻¹ de NaCl), em contato com água contaminada com TCM no momento de adição e ao longo do tempo de incubação à temperatura de 40 °C em banho-maria. De modo geral a carga superficial inicial das vesículas foi negativa para todas as vesículas e permaneceu assim, mesmo com a presença dos THMs. Logo a presença dos THMs e sua interação não foram capazes de mudar a carga superficial vesicular durante o tempo análise, permanecendo na faixa de -16,9 ± 1,5 mV a - 24,3 ± 2,6 mV.

O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico utilizado para estimar a carga presente em superfícies de partículas coloidais indicando assim, a estabilidade desses sistemas e possíveis interações de partículas com outras moléculas no meio (HEURTAULT, et al. 2003, ATTARD, et al.2000;)

O comportamento dos três tipos de vesículas (PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA) com os quatros tipos de THM (TCM, DCBM, DBCM, BM) foram semelhante. Tanto o tempo de estudo quanto à concentração de THM adicionada nas suspensões influenciou o potencial zeta das vesículas de PDA. Com tudo não foi o suficiente para alterar a eletronegatividade das cargas da superfície das vesículas. Porém os valores do potencial zeta das suspensões que tiveram contato com os THMs diminuíram com a presença de THMs, ficando mais eletronegativo em relação aos tratamentos controles. Mostrando mais uma vez que os THMs interagiram com as cadeias de hidrocarboneto dos PDAs, levando em alguns casos a mudança colorimétrica das suspensões.

7. CONCLUSÃO

A presença do TCM, DCBM e DBCM provocaram a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo a interação entre os THMs foi dependente da composição das vesículas. Nenhuma das três suspensões conseguiu mudar de cor com a presença do BM, permanecendo azuis durante todo tempo.

A presença dos THMs não mudou a carga superficial das vesículas, permanecendo sempre negativo os valores do potencial zeta.

A vesícula de TRCDA+PCDA conseguiu identificar três dos quartos THMs estudados. Isso significa que os THM interagiram com as moléculas dos PDAs, e que a junção dos dois PDA potencializou a sensibilidade e capacidade de transição colorimétrica.

É importante ressaltar a diferença no tempo de identificação dos THMs em água, pois isso mostra que mesmo que a vesícula consiga avaliar a mudança de cor do azul para o vermelho para diferentes THM, os tempos podem ajudar a diferenciar a presença ou não de cada contaminante na água, e também a concentração esperada dos contaminantes em água potável. Estes resultados apontam a potencialidade do uso destas nanoestruturas como sensores para detecção desses compostos em água para consumo humano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTARD, P.; ANTELM, D.; LARSON, I. Comparison of the zeta potential with the diffuse layer potential from charge titration. **Langmuir**, v.16, p. 1542–1552, 2000.

BRASIL - MS. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

CARLOS, E. A. et al. Determinação Simultânea de trihalometanos e agrotóxicos em água por cromatografia Gasosa. **Química Nova**, v. 34, p. 272-278, 2011.

CHAE, S.K.; PARK, H.; YOON, B., LEE, S., KIM, J.-M. Polydiacetylene Supramolecules in Electrospun Microfibers: Fabrication, Micropatterning, and Sensor Applications. **Advanced Materials**, v. 19, p. 521–524, 2007.

CHAROENTHAI, N., PATTANATORNACHAI, T., WACHARASINDHU, S., SUKWATTANASINITT, M., TRAIPHOL, R. Role of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, p. 565-573, 2011.

CHARYCH, D.; CHENG, Q.; REICHERT, A.; KUZIEMKO, G.; STROH, M.; NAGY, J.O.; SPEVAK, W.; STEVES, R.C.; A `litmus test` for molecular recognition using artificial membranes. **Chemistry and Biology**, v.3, p. 113-120, 1996.

DEI, S.; MATSUMOTO, A.; MATSUMOTO, A.; Thermochromism of Polydiacetylenes in the Solid State and in Solution by the Self-organization of Polymer Chains Containing no Polar Group. **Macromolecules**, v.41,p. 2467, 2008.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v.24, p. 4283– 4300, 2003.

LEE, S. C.; GUO, H.; LAM, S.M.J.; LAU, S. L. A. Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. **Environmental Research**, v. 94, p. 47, 48, 55, 2004.

MEDEIROS, H.S. **Vesícula de polidiacetileno para detecção de triclorometano em água potabilizada (2011)**. Tese (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa), Viçosa, 2011.

PIRES, A.C.S., SOARES, N.F.F., da SILVA, L.H.M., da SILVA, M.C.H., MAGESTE, A.B., SOARES, R.F., TEIXIERA, A.V.N.C., ANDRADE, N.J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 13365-13371, 2010.

POTISATITYUENYONG, A.; ROJANATHANES, R.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions po polydiacetylene vesicles. **Langmuir**, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

SONG, J; CHENG, Q.; ZHU, S.; STEVES, R.C. Smart materials for biosensing devices: cell-mimicking supramolecular assemblies and colorimetric detection of pathogen agents. *Biomedical Microdevices*, v. 3, n. 4, p. 213-221, 2002.

SU, Y.L; LI, J.R.; JIANG, L. Chromatic immunoassay base dopolydiacetylene **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 38, p. 29-33, 2004.

SU, L., WENZHAO, J. HOUB, C., LEIA, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 17881799, 2011.

CAPÍTULO 4

APLICAÇÃO DE VESÍCULAS DE PDA COMO BIOSSENSORES COLORIMÉTRICOS PARA A DETECÇÃO DE *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii*

1. RESUMO

A poluição da água é um dos problemas mais graves e de longo alcance do mundo. Mesmo em países desenvolvidos, o acesso a água potável não contaminada não é absoluta, e as doenças infecciosas ocorrem. A qualidade da água é um fator importante na indústria de alimento, pois ela utilizada tanto como consumo direto ou como matéria prima. E controle de sua qualidade garante uma melhor qualidade de vida e saúde dos consumidores. O desenvolvimento de sensores utilizando polímeros conjugados eficientes como matrizes de sensoriamento, tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Especialmente, os sensores de PDA para a detecção de espécies biologicamente importante, têm sido intensamente investigadas devido à sua resposta quanto a mudança das propriedades colorimétricas. Neste estudo, vesículas de polidiacetileno foram usadas para detectar a presença de *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii* em água potabilizada para consumo humano. Foram desenvolvidas três diferentes vesículas: PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA com adição de fosfolipídeos, na forma de suspensão vesicular e também vesícula adicionada no meio de cultura em placas de petri. Nos resultados nenhuma vesícula foi capaz de detectar *E. faecium* e das vesículas a que obteve melhor resposta colorimétrica para *E. fergusonii* foi a com os dois PDAs. A suspensão de vesículas contendo TRCDA+PCDA foi que apresentou mudança de cor somente para *E. fergusonii*, com o tempo de 12 h de incubação a 35 °C, em todas as concentrações estudadas e também nas placas de petri apresentou transição colorimétrica, porém no tempo de 8 h/ 35 °C. Podemos concluir, que tanto sensor em suspensão de vesícula quanto nas vesículas em meio de cultura,

possuem um grande potencial como aplicação com sensor colorimétrico para indicar *E. fergusonii* em água par consumo humano.

2. INTRODUÇÃO

A demanda por água de boa qualidade tem-se acentuado muito nos últimos anos, devido ao crescimento populacional. Tanto nas bacias hidrográficas rurais quanto nas urbanas, ocorrem atividades humanas indevidas, que alteram as características, o equilíbrio e a dinâmica dos recursos naturais.

Muitos dos contaminantes da água levantam uma preocupação considerável no aspecto microbiológico, especialmente quando estão acima dos valores permitidos pela Portaria 2914/ 2011 do MS. Embora nos últimos anos tenha havido progressos substanciais no controle da qualidade da água potável, o acesso à água potável ainda é um problema pertinente em saúde pública. Mesmo em países desenvolvidos, o número de casos de surtos de doenças por contaminação de bactérias patogênicas na água potável tem provado ser um problema recorrente (Hodgson e Manus, 2006).

Os métodos validados pelas autoridades de saúde os quais são baseados na detecção de micro-organismos indicadores causadores de doenças que estão atualmente sendo revista, desde o acontecimento de surtos de doenças entéricas importantes. Métodos alternativos têm surgido para resolver dois problemas principais: a resposta precoce na detecção, tornando-se alerta a doses mínimas de bactérias infecciosas e a disponibilidade de dispositivos de alta tecnologia adequadas para aplicação com um maior acesso e disponibilidade.

Métodos que permitam a identificação simples e rápida desses contaminantes têm sido estudados como intuito de desenvolver sensores que se podem apresentar de diversas formas.

Por causa das propriedades emissivas e à reposta ambiental crônica, compostos como polidiacetileno, têm sido particularmente atrativos para aplicação em biossensores, permitindo investigar variações ambientais tais como: mudança de pH, detectar a presença de compostos químicos, mudanças térmicas, estresse mecânico, além de presença de micro-organismos.

Pesquisas têm demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de PDA para atuarem como moléculas receptoras de moléculas alvo, permitindo uma identificação simples e rápida de compostos de interesse. Dessa forma, o uso de sensores colorimétricos, como as vesículas de PDA, torna-se uma alternativa às técnicas convencionais, como cromatografia, contagem padrão em placa e outras.

A água contém, geralmente, diversos constituintes, os quais provêm do próprio ambiente natural ou foram introduzidos a partir de atividades humanas, como por exemplo, a agricultura e a indústria. Para qualificar uma água potável, são determinados diversos parâmetros, os quais representam as suas características físicas, químicas e biológicas. Esses parâmetros são indicadores da qualidade da água e constituem impurezas quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinado uso.

Por isso, o uso de sensores colorimétricos pode ser uma alternativa simples, prática e rápida para detecção de micro-organismos em água potabilizada para consumo humano, avaliando sua qualidade microbiológica.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Utilizar vesículas de polidiacetileno para detectar a presença dos micro-organismos *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii* em água potabilizada para consumo humano.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir suspensões de vesículas de PCDA, TRCDA E PCDA/TRCDA com adição de fosfolipídeos para aplicação como biossensor;
- Avaliar a especificidade das vesículas de PCDA, TRCDA e PCDA na detecção dos micro-organismos em água potabilizada;

- Avaliar o potencial zeta, tamanho e resposta colorimétrica das vesículas na ausência e na presença dos micro-organismos;
- Determinar o valor de detecção das vesículas para indicação colorimétrica dos micro-organismos em água;
- Desenvolver placas de petri contendo agar mais a suspensão de vesículas, para identificação dos micro-organismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e micro-organismos

Monômeros de 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA) 97,0 % m/m (Sigma®), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA) ≥98,0 % grau cromatográfico (Sigma®), esfingomielina (Aldrich), colesterol (Aldrich), clorofórmio grau-HPLC (Merck®), água deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) foram utilizados para produção dos biossensores. Para as análises microbiológicas foram utilizados os meios de cultura PCA e BHI (Difco™).

Neste estudo, foram utilizados os micro-organismos *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii*, isolados da água potável e água purificada do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (TEODORO, 2013).

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Higiene Industrial Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Embalagens, ambos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa - MG.

4. 2. Preparo das suspensões microbianas

As culturas de *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii*, previamente mantidas em tubos *Eppendorf* de 1 mL contendo BHI (Difco™) à temperatura de - 80 °C, foram ativadas por duas repicagens consecutivas em BHI e incubada a 37 °C por 24 h até atingir a população de 10^8 UFC·mL⁻¹.

Para simular as concentrações de cada micro-organismo na água, foram feitas diluições em água deionizada esterilizada até atingir as concentrações de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC·mL⁻¹ para cada bactéria, separadamente.

4.3. Produção das nanovesículas a base de PDA

O sensor colorimétrico foi produzido de acordo com a metodologia proposta por Pires et al. (2011). Na produção das vesículas, foram utilizados os PDAs 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA). Para o preparo das vesículas de PDA/ES/CO, 1 mM de esfingomielina (ES), colesterol (CO) foram solubilizados em 10 mL de clorofórmio, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. Paralelamente, solução de PDA 1 mM foi preparado em 2 mL de DMSO e aquecidas a 80 °C durante 15 min e então adicionadas ao filme lipídico formado por ES e CO. O volume foi completado para 10 mL com água Milli-Q. A suspensão foi levada ao disruptor de células R2D091109 e, em seguida, filtrada em filtro PVDF (Millipore®). Em seguida estocada a 4 °C por no mínimo 10 h. As suspensões foram mantidas sob refrigeração (10 ± 2 °C) até o momento das análises do experimento.

Utilizando os PDAs 10,12-ácido pentacosadinóico (PCDA), 10, 12- ácido tricosadinóico (TRCDA) e os fosfolípidos ES + CO foram produzidas três vesículas diferentes: PCDA, TRCDA, TRCDA+PCDA.

4.4. Resposta Colorimétrica (RC)

Para avaliar a interação entre as suspensões com as diferentes concentrações de micro-organismos, utilizou-se espectro UV-Vis. Foram colocadas 1,5 mL de amostra em cubeta de quartzo e analisada no equipamento Shimadzu UV-2550, à temperatura ambiente em uma faixa de comprimento de onda de 400 nm – 700 nm. A resposta colorimétrica (RC) é um parâmetro que tem sido amplamente utilizado para mensurar a porcentagem de moléculas de polidiacetileno que ocorreram transição espectrofotométrica em decorrência de algum estímulo. A RC é calculada por meio da obtenção do espectro eletrônico da suspensão polidiacetilênica na ausência e na presença da molécula de interesse.

Para medir percentagem de conversão da cor azul para vermelho, calcula-se a Resposta Colorimétrica, como parâmetro semi-quantitativo da alteração das propriedades crômicas do polidiacetileno conforme Charych et al. (1993):

$$RC = \{(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a - [(A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_d (A_{\text{azul}}/A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}})_a]\} \times 100$$

Em que: A_{azul} = absorvância a 640 nm e A_{vermelho} = absorvância 540 nm; a e d valores calculados antes e depois da mudança de cor, respectivamente.

As vesículas foram avaliadas antes e após a presença dos micro-organismos.

4.5. Medidas de tamanho por Espalhamento dinâmico de luz e do Potencial

Zeta

O tamanho e o potencial zeta das suspensões foram medidas a 25 ° C, com a utilização do equipamento de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS90, Malvern). Cerca de 1 mL de suspensão vesicular pura foi colocada em cubeta de quartzo e realizada a leitura de tamanho e posteriormente a leitura do potencial zeta. Os resultados de cada amostra foram obtidos pelas médias das três leituras realizadas pelo equipamento.

4.6. Detecção de micro-organismos em água potabilizada

Foi adicionado nos tubos um volume de 1:1 de suspensão vesicular e amostras de água contendo inóculo bacteriano e depois incubadas em BOD a 37 °C, que é a temperatura ótima de multiplicação dos micro-organismos testados. Amostras de cada tipo de suspensão de PDA contendo as águas contaminadas foram retiradas de tempos em tempos para serem avaliados quanto a RC, o tamanho e o potencial zeta.

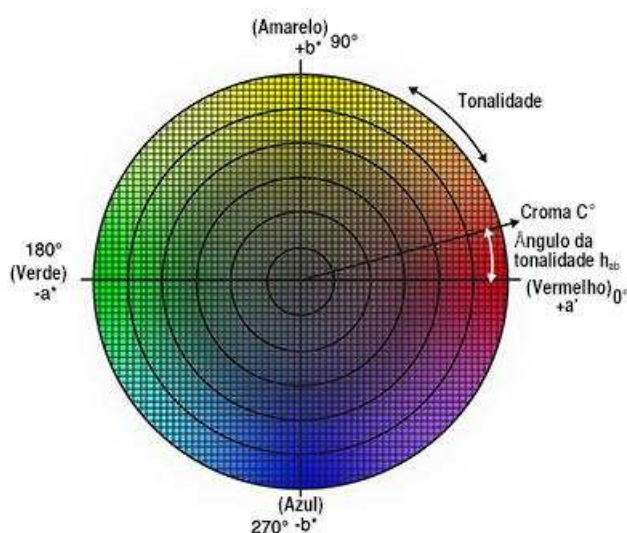
4.7. Avaliação da RC de vesículas de PCDA, TRCDA e PCDA/TRDCA em gel vesicular a base de PCA, na detecção microbiana

A suspensão das vesículas prontas e irradiadas (item 4.3) foi adicionada em placas contendo PCA previamente preparado, à temperatura de 40 °C. A mistura numa proporção de 2:1 de PCA/vesícula foi vertida em placas de Petri esterilizada.

Volumes de 0,1 mL diferentes concentrações de *E. faecium* e *E. fergusonii* preparadas em água esterilizada (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 UFC·mL⁻¹) foram adicionados em ao gel vesicular de PDA. Como controle foi utilizado 0,1 mL de água deionizada esterilizada. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h, sendo que a cada 6 h foi realizada uma análise colorimétrica em espectrômetro de ColorQuest XE para obtenção dos parâmetros a^* e b^* , visando avaliar a transição colorimétrica. Disponível no Laboratório de Embalagens do departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Valores do ângulo de tonalidade e da diferença total (global) de cor (ΔE^*) foram avaliados segundo RAMOS e GOMIDE, 2009.

Gráfico 1: Ângulo de tonalidade (RAMOS e GOMIDE, 2009)



5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises do experimento foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois micro-organismos, seis concentrações diferentes de bactérias e três tipos de vesículas, em três repetições. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância ao nível de 0,05 de probabilidade e teste de média Tukey, quando se aplica, com o auxílio do programa Minitab.

6. RESULTADOS E DISCURSÕES

6.1. Avaliação das suspensões de vesículas de PDA na presença de micro-organismos

A maior porcentagem de RC foi observada na suspensão da vesícula de TRCDA+PCDA na presença dos micro-organismos, mostrando que a associação dos dois polidiacetilenos potencializou a interação e sensibilidade do sensor colorimétrico. Houve aumento da transição colorimétrica em concentrações mais baixas do contaminante e em um tempo menor de contato.

Houve interação significativa entre o tipo de micro-organismo e o tempo ($p \geq 0,05$), mostrando que a bactéria e o tempo de contato influenciaram na mudança de cor do sensor à base de TRCDA+PCDA.

Por meio de análises usando espectrofotometria UV-Vis, observou-se que o aumento da concentração de *E. fergusonii*, em água (10^2 UFC·mL⁻¹ para 10^6 UFC·mL⁻¹) ocasionou um aumento gradual do pico a 540 nm no espectro de absorção da suspensão de TRCDA+PCDA, o comprimento de onda no qual, responsável pela cor vermelha. Consequentemente, uma diminuição no pico a 640 nm, comprimento de onda responsável pela cor azul.

Para a maior concentração de 10^6 UFC·mL⁻¹ de *E. fergusonii*, observa-se a transição colorimétrica do azul para o vermelho, apresentando RC média de

10,5 % $\pm$ 1,0 após 6 h de incubação a 35 °C. As demais concentrações contendo o micro-organismo, apresentaram mudança de cor após 12 h de incubação a 35 °C, como pode ser observados na Figura 1. Esses resultados são perceptíveis visualmente sem utilização de técnicas analíticas (Figura 1).

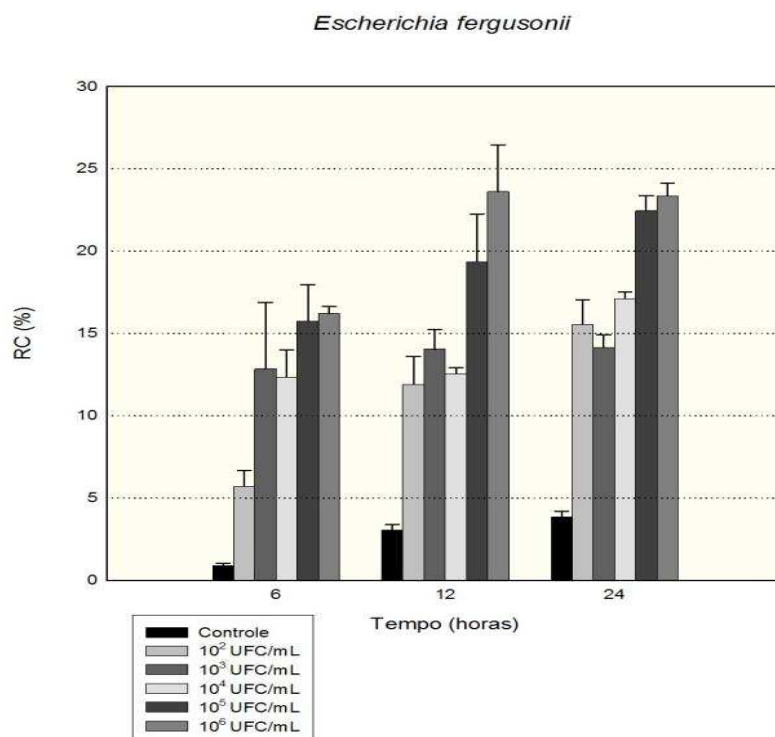


Figura 1. Valores da Resposta Colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas TRCDA+PCDA na presença água inoculada com *Escherichia fergusonii*, em diferentes concentrações ao longo do tempo.

Como biossensor colorimétrico com TRCDA+PCDA poderia ser aplicado para detectar a presença de bactérias patogênicas como a *E. fergusonii* em água para consumo, sendo que ele iria conseguir detectar a concentração de 10³ UFC·mL⁻¹ a partir de 6 h e contendo 10² UFC·mL⁻¹ a partir de 12 h. Esse valor é importante já que é menor do que o exigido pela portaria 2914/2011, onde o valor máximo permite para contagem de bactérias heterotróficas é de 5,0x10² UFC·mL⁻¹ (BRASIL, 2011). A contagem de bactérias heterotróficas consiste na determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura

apropriado, como o ágar para contagem-padrão, em condições preestabelecidas de incubação, ou seja, $35,0 \pm 0,5$ °C por 48 h (CONAMA, 2005).

A interação entre bactéria e vesícula pode ter sido intermediada pelos flagelos, fimbria e ou pili frequentemente presentes no gênero *Escherichia*, e em outras bactérias gram-negativas (Su et al, 2005). De acordo com os autores, a presença do colesterol e a esfingomielina favorece a transição colorimétrica, uma vez que eles auxiliam na interação da bactéria com o polidiacetileno. Estas mudanças provocam uma transição colorimétrica rápida do polímero do azul para o vermelho, passando a absorver a luz no comprimento de onda de 540 nm (SONG et al., 2002).

Boullanger et al. (2008) desenvolveram vesículas de PDA incorporadas com glicolipídios e observaram que na presença *E. coli* são capazes de se ligar ao glicolipídio. Esse reconhecimento na interface vesicular resultou na mudança de cor de azul para vermelho.

Pires et al. (2011) sintetizaram vesículas de ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) contendo N-[(2-tetradecanamida)-etil]-ribonamida (TDER) para determinar a resposta colorimétrica induzida por bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *E. coli*). A adição dos sobrenadantes bacterianos causou uma transição colorimétrica nas vesículas de PCDA/TDER, mesmo em baixas concentrações, indicando que a interação química ocorre entre as vesículas e os substratos bacterianos. Os substratos de *S. aureus* induziram uma maior mudança de cor quando comparados aos substratos de *E. coli*. As vesículas de PCDA/TDER mostraram grande potencial para serem utilizados como biossensor pra detectar patógenos.

Para os tratamentos, com *E. faecium* (Figura 2), não foi observado visualmente a mudança de cor para nenhuma das concentrações incubadas a 35 °C, permanecendo azul durante as 24 h de estudos. Pode-se concluir que neste período não houve interação entre as moléculas de PDA e micro-organismo ou que a interação não foi suficiente para causar uma perturbação nas vesículas e promover um rearranjo de suas cadeias, levando assim a uma mudança de cor.

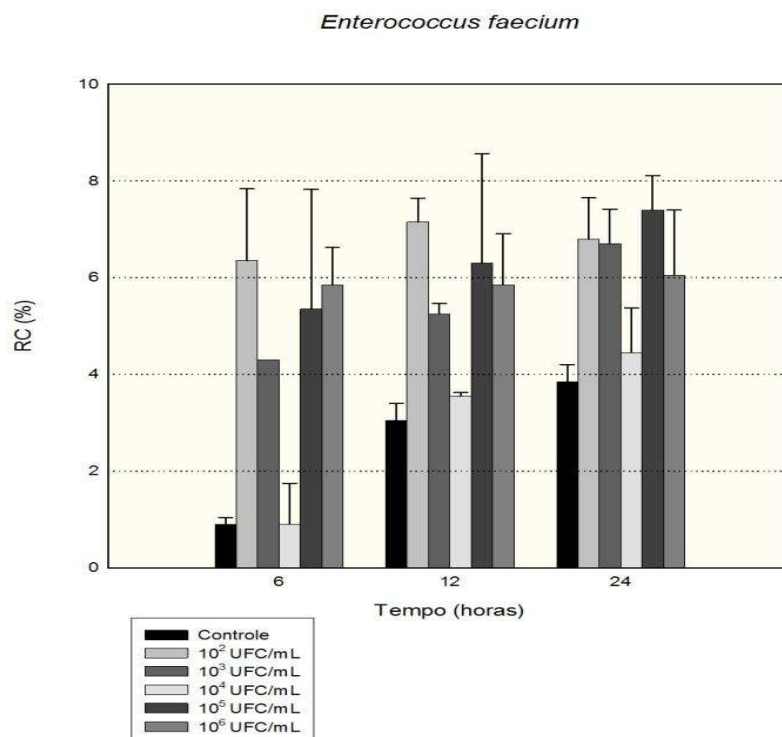


Figura 2. Valores da Resposta Colorimétrica (RC) da suspensão de vesículas TRCDA+PCDA na presença água inoculada com *Enterococcus faecium* em diferentes concentrações ao longo do tempo.

Analisando o tempo de 12 h de incubação (Figura 3), pode-se comparar a RC das vesículas para os dois micro-organismos e para a vesícula controle. Nota-se pelos valores de RC que, para todas as concentrações de *E. fergusonii*, que a média foi maior que 10 %, valores nos quais se pode observar visualmente, a transição colorimétrica para o vermelho. O contrário do que se observou para o *E. faecium*, que apresentou valores bem abaixo de 10 %, não apresentando mudança de cor.

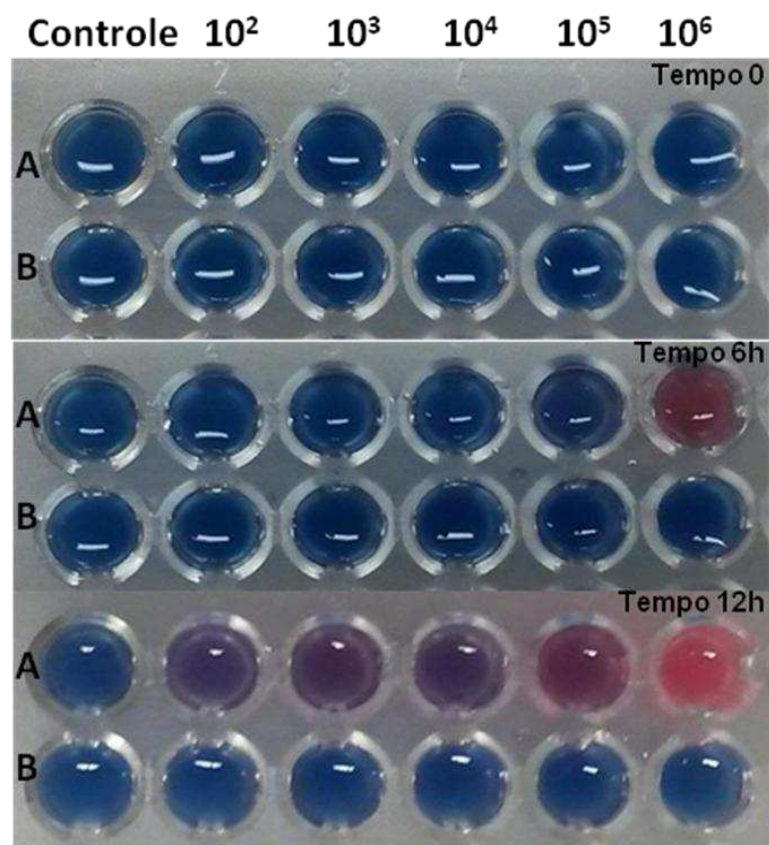


Figura 3. A) Vesícula TRCDA+PCDA com as diferentes concentrações de *Escherichia fergusonii* durante 12 h de incubação e B) Vesícula TRCDA+PCDA com as diferentes concentrações de *Enterococcus faecium* durante 12 h de incubação.

Observa-se na Figura 3, no tempo de 6 h de incubação pode-se visualizar a cor vermelha para o inóculo de 10^6 UFC·mL⁻¹ de *E. fergusonii* e após 12 h em temperatura de 35 °C tem-se a mudança de todas as concentrações de inóculo bacteriano a partir de 10^2 UFC·mL⁻¹. Durante todo o tempo de incubação os tratamentos contendo *E. faecium*, como podem ser observados permaneceram azuis, inclusive os controles com apenas água deionizada esterilizada.

Mostrando claramente e visualmente a sensibilidade e a especificidade da vesícula a base de TRCDA+PCDA para detecção do micro-organismo *E. fergusonii* em níveis a partir de 10^2 UFC·mL⁻¹, com grande potencial para fabricação e aplicação de biossensor para avaliação da qualidade de água para consumo humano.

A Figura 4 ilustra a transição colorimétrica de vesículas de TRCDA com as soluções de 10^6 UFC·mL⁻¹ de *E. faecium* e 10^6 UFC·mL⁻¹ de *E. fergusonii*, respectivamente. Foi verificada apenas uma transição de cor do azul para roxo para a bactéria *E. fergusonii* com uma RC média de $8,9 \% \pm 1,2$. Isso significa que de alguma forma, a presença do micro-organismo promoveu modificações da estrutura do TRCDA, fazendo com que ocorresse a mudança para a cor roxa. O espectro eletrônico associado à coloração roxa da suspensão vesicular é uma combinação entre os espectros eletrônicos das vesículas que ainda estão na forma azul e os espectros eletrônicos das vesículas que já se alteraram para a cor vermelha (POTISATITYUENYONG et al., 2008).

A porcentagem de RC para *E. faecium* foi de $4,4 \% \pm 0,8$, valores bem abaixo de 10 % no qual não se observa mudança colorimétrica, isso indica que as moléculas do TRCDA não conseguiram interagir com bactéria ao ponto de ocorrer uma perturbação em sua estrutura e promovesse a mudança de cor.

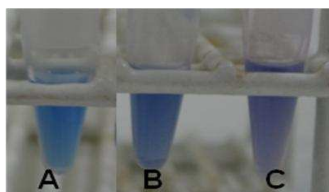


Figura 4. Suspensão de Vesículas de PCDA com: A) Controle inoculado com 100 μ L de BHI; B) inoculado com 100 μ L de 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Enterococcus faecium* durante 24 h de incubação a 35 °C; C) inoculado com 100 μ L de 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Escherichia fergusonii* durante 24 h de incubação a 35 °C.

Depois de se inocular nas vesículas PCDA as água contendo as bactérias, não foi observado transição colorimétrica durante 24 h de incubação a 35 °C. Durante esse período a RC das vesículas aumentaram muito pouco sendo insuficiente para haver alteração de cor. Isto nos indica que o PCDA tem uma baixa sensibilidade para as bactérias ou, em outras palavras, os compostos libertados a partir das células bacterianas não foram suficientes para alterar a conformação das cadeias poliméricas PCDA e fazer com que a transição espectrofotométrica (Figura 5).

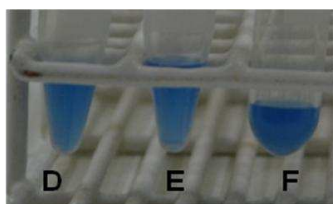


Figura 5. Suspensão de Vesículas de PCDA com: D) Controle inoculado com 100 μL de BHI, E) inoculado com 100 μL de $10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Escherichia fergusonii* durante 24 h de incubação a 35 °C, F) inoculado com 100 μL de $10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Enterococcus faecium* durante 24 h de incubação a 35 °C.

A vesícula de TRCDA teve uma maior RC em relação a PCDA na presença das bactérias, o que pode ser explicado pela sua menor estrutura. Os monômeros TRCDA e PCDA possuem mesma cabeça carboxílica, mas o comprimento da cauda de hidrocarbonetos do TRCDA é mais curta, com duas cadeias de hidrocarboneto a menos. Isto afeta as forças de interações dentro das bicamadas das vesículas, indicando um maior rearranjo desse segmento (CHAROETHAI, 2011). Isso faz com que o TRCDA apresente uma transição colorimétrica com maior magnitude em comparação ao PCDA. Essa melhor performance do TRCDA em relação ao PCDA pode ser observado na Figura 6.

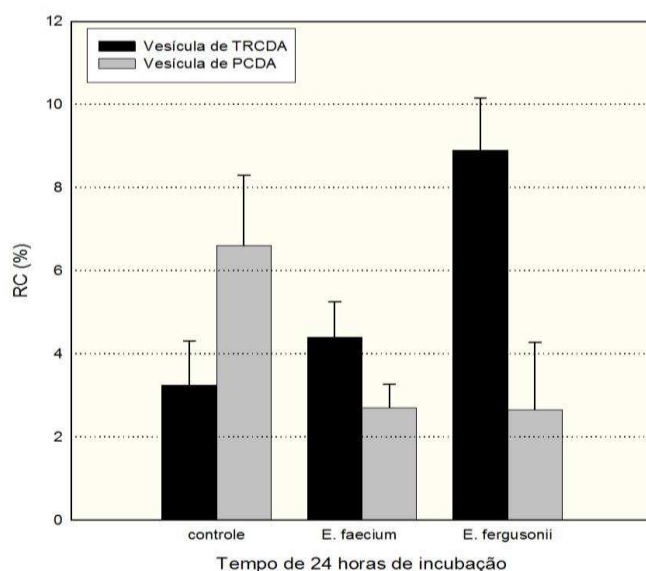


Figura 6. Variação da resposta colorimétrica (RC) das suspensões de vesículas de PCDA e de TRCDA inoculadas com 100 μL de $10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Enterococcus faecium* e *Escherichia fergusonii* e o controle após 24 horas a 35 °C.

A porcentagem de RC é uma ferramenta que permite a quantificação das transições colorimétricas, fornecendo proporção de vesículas que estão sob a forma azul em relação a estruturas que mudaram pra forma vermelha (POTISATITYUENYONG et al. 2008).

Deve-se ressaltar a ausência de mudança de cor das vesículas controles de TRCDA e PCDA, mostrando que tanto a água deionizada e quanto a temperatura de incubação de 35 °C não foram capazes de alterar a cor das vesículas, o que indica que quando ocorreu mudança de cor nas suspensões vesiculares, está foi causada pelo reconhecimento dos polidiacetilenos com substratos bacterianos

6.2. Avaliação do tamanho das vesículas de PDA na presença dos micro-organismos em água

Para avaliar as características estruturais das suspensões de vesículas, o tamanho médio foi medido por dispersão de luz, somente para a vesícula que houve a transição completa de cor do azul para o vermelho que neste caso foi a de TRCDA+PCDA.

De acordo com as Tabelas 1 e 2, verificou-se que em todos os tratamentos contendo micro-organismos, houve um aumento no raio hidrodinâmico, comparando com o tratamento controle. Provavelmente o aumento está relacionado à desestruturação da superfície das mesmas. Com uma maior ionização dos grupos carboxílicos dos polidiacetilenos ocorre uma desestabilização na superfície vesicular e, conseqüentemente, no interior hidrofóbico da vesícula, deixando-a menos estável, isto é, com um maior conteúdo de energia. O tamanho da vesícula é aumentado buscando reduzir seu conteúdo de energia, tornando-a, portanto, mais estável.

Tabela 1. Valores do Diâmetro Hidrodinâmico (nm) da suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES na presença água inoculada com *Escherichia fergusonii* em diferentes concentrações ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Controle	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)				
		10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
		UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹
0	338,9 ± 23,2	1404 ± 44,3	1792 ± 34,5	962,3 ± 21,1	982,1 ± 42,1	1219 ± 42,3
6	462,1 ± 12,6	1316 ± 56,9	1589 ± 56,2	1005 ± 22,1	824,8 ± 35,5	1023 ± 34,5
12	542,8 ± 34,7	1141 ± 54,0	1115 ± 68,7	838,8 ± 47,9	939,8 ± 71,2	1302 ± 29,9
24	620,8 ± 24,3	1157 ± 33,2	1462 ± 87,3	880,4 ± 68,4	983,9 ± 23,1	929,1 ± 39,5

Tabela 2. Valores do Diâmetro Hidrodinâmico (mm) da suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES na presença água inoculada com *Enterococcus faecium* em diferentes concentrações ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Controle	Diâmetro Hidrodinâmico (mm)				
		10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
		UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹	UFC·mL ⁻¹
0	338,9 ± 44,6	580,4 ± 30,2	725,5 ± 26,4	497,5 ± 89,4	959 ± 17,9	1139 ± 11,9
6	462,1 ± 35,7	712,5 ± 20,7	724 ± 29,8	777,7 ± 34,8	1039 ± 28,3	1215 ± 28,4
12	542,8 ± 57,2	864,2 ± 22,4	827 ± 32,1	867,5 ± 23,6	922,4 ± 19,9	1449,4 ± 23,1
24	620,8 ± 20,1	1147 ± 34,9	879,5 ± 34,9	904,9 ± 22,1	1173 ± 36,0	1646,2 ± 10

A interação foi significativa ($p \geq 0,05$) entre o tipo de bactéria e o tempo de contato. Logo o micro-organismo influenciou concomitantemente com o tempo no tamanho das vesículas, que apresentaram maiores tamanhos na concentração 10^3 UFC·mL⁻¹ de *E. fergusonii* no tempo inicial (1792 mm ± 34,5) e 6 horas (1589 mm ± 56,2)) e o 10^2 UFC·mL⁻¹ de *E. fergusonii* e no tempo inicial (1404 mm ± 44,3).

Enquanto que os menores tamanhos foram na presença de 10^2 UFC·mL⁻¹ de *E. faecium* no tempo inicial de $580,4 \text{ mm} \pm 30,2$. As demais concentrações dos micro-organismos e os tempos encontram-se em tamanhos intermediários.

6.3. Avaliação do potencial zeta das vesículas de PDA na presença dos micro-organismos em água

As análises do potencial zeta da suspensão de vesículas foram realizadas somente para a vesícula em que houve a transição completa de cor do azul para o vermelho que neste caso foi a TRCDA+PCDA.

A suspensão de vesículas TRCDA+PCDA apresentaram valores sempre negativos de potencial zeta em todas as concentrações, mostrando que essas vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas nas condições testadas (Figuras 7 e 8). O potencial zeta de partículas em suspensão constitui uma propriedade termodinâmica das partículas como resposta à ação de um campo elétrico aplicado. A presença de cargas na superfície externa e a sua magnitude influenciam os processos dinâmicos das estruturas na suspensão.

O potencial zeta dos tratamentos não variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Observa-se que valores do potencial zeta da suspensão incubada à temperatura de 35 °C apresentaram pequenas variações em módulo nos valores em cada concentração dos micro-organismos estudados. Observou-se que o controle permaneceu dentro da faixa de estabilidade $-39,3 \text{ mV} \pm 1,4$ a $-30,5 \text{ mV} \pm 0,3$. O potencial zeta é um indicador útil do valor da carga da superfície da vesícula e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões

O tratamento controle durante o estudo ocorreu uma diminuição das cargas negativas, já os tratamentos contendo *E. faecium* houve um aumento das cargas negativas na superfície externa, mostrando que os substratos bacteriano contribuiu para aumentar negativamente o potencial zeta. Quanto maior o potencial zeta provavelmente mais estável será a suspensão, ou seja as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

Para os tratamentos com as concentrações de *E. faecium* (Figura 7), os valores permaneceram dentro da faixa de estabilidade ou bem próximo, não afetando a estabilidade da suspensão já que, não houve uma interação da vesícula com micro-organismo permanecendo a vesícula na coloração azul durante todo o tempo de estudo.

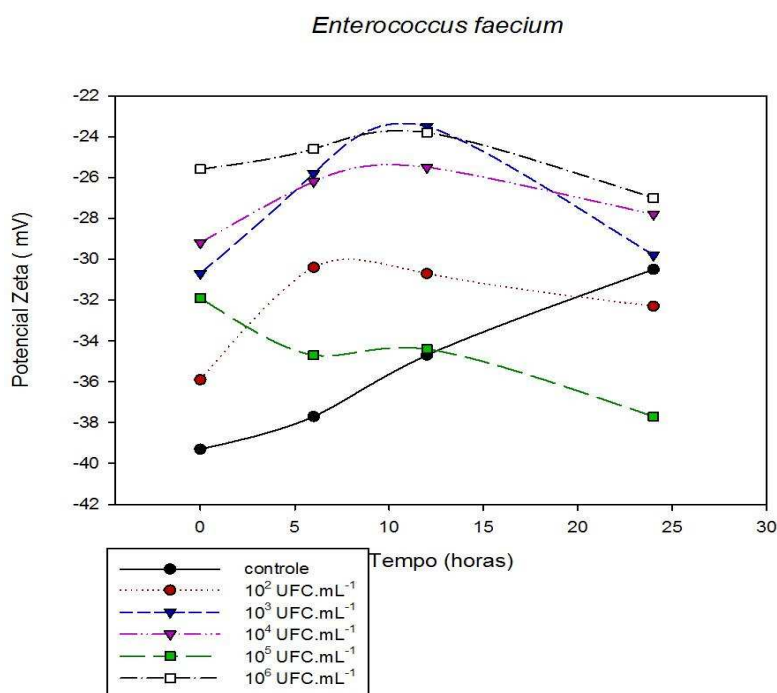


Figura 7. Pontencial Zeta da suspensão de vesículas de TRCDA+PCDA na presença água contaminada com *Enterococcus faecium* em diferentes concentrações ao longo do tempo.

A interação das vesículas com *E. fergusonii*, promoveu a transição colorimétrica do azul para o vermelho, isso por sua vez alterou o potencial da suspensão, levando-o a uma faixa de instabilidade da suspensão. Os valores negativos significam que a suspensão vesicular apresentou predominância de cargas negativas na superfície externa (Figura 8).

Escherichia fergusonii

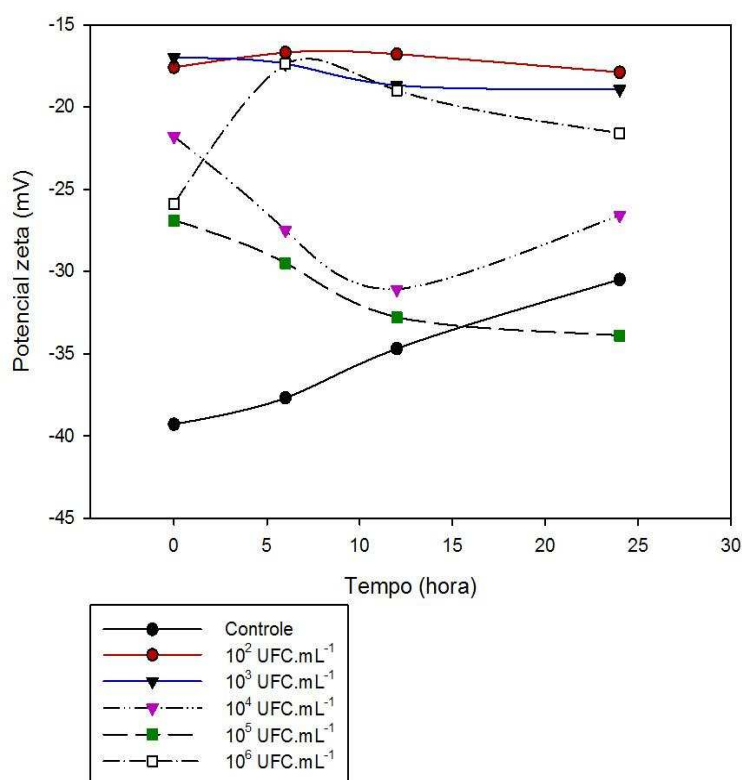


Figura 8 . Potencial zeta da suspensão de vesículas de TRCDA+PCDA na presença água contaminada com *Escherichia fergusonii* em diferentes concentrações ao longo do tempo.

Os valores estão dentro da faixa de ± 30 mV que é considerada a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis, uma região onde a repulsão eletrostática é menor, podendo haver uma maior agregação entre as vesículas (Zetasizer Nano Series, 2004). As vesículas com pouca ou nenhuma carga possuem pouca resistência à tendência natural de se agregarem. Com a formação de pequenos aglomerados que, por sua vez, se agregam em flocos maiores que liquidam rapidamente ou formam uma matriz interligada são capazes de alterar as características físicas da suspensão. Ao adicionar a suspensão contendo *Escherichia fergusonii*, ocorreu uma modificação no ambiente da suspensão alterando as cargas superficiais do sistema coloidal. Com isso ocorreu uma diminuição da força de resistência, promovendo agregação das partículas, consequentemente, aumentando o tamanho das vesículas (tabela 1).

Verificou-se com este estudo, que a adição da água deionizada à suspensão vesicular biossensora não induziu a transição colorimétrica, enquanto a presença da suspensão bacteriana com *E. fergusonii* levou à alteração da cor de azul para rosa, indicando que as vesículas de TRCDA+PCDA reconheceram o micro-organismo. Esses resultados mostram que a suspensão de vesícula TRCDA+PCDA obteve uma especificidade para a bactéria *E. fergusonii*, em relação aos micro-organismos testados. Essa especificidade é uma importante característica para um sensor para qualidade de água, que é o objetivo de desenvolvimento desse estudo.

Esses resultados mostram que a suspensão de vesícula TRCDA+PCDA/CO/ES obteve uma especificidade para a bactéria *E. fergusonii*, em relação aos micro-organismos testados. Essa especificidade é uma importante para que ao realizarmos a análise de uma amostra de água, se essa amostra estiver contaminada com esse micro-organismo, conseguiremos detectar com a suspensão de vesículas e poderemos afirmar que possivelmente seja *E. fergusonii*.

6.4. Avaliação da mudança de cor das vesículas em meio de cultura

Depois de se inocular nos géis de vesículas de PCDA e de TRCDA as amostras de água com as bactérias, não se observou uma transição colorimétrica durante 24 h de incubação a 35 °C. Isto nos indica que o PCDA e o TRCDA estando separados e em meio de cultura tiveram uma baixa sensibilidade às bactérias, ou em outras palavras, os compostos libertados a partir das células bacterianas não foram suficientes para alterar a conformação das cadeias poliméricas dos PDAs e fazer que ocorresse a transição espectrofotométrica (Figura 9).

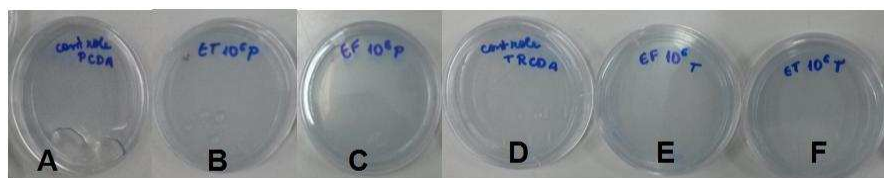


Figura 9. Placas contendo PCA+suspensão vesicular + inóculo após 24 h de incubação. A) controle PCDA com adição de água esterilizada; B) PCDA contendo 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Enterococcus faecium*; C) PCDA contendo 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Escherichia fergusonii*; D) controle TRCDA com adição de água esterilizada; E) TRCDA contendo 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Escherichia fergusonii*; F) TRCDA contendo 10^6 UFC·mL⁻¹ de *Enterococcus faecium*.

Através do ângulo de tonalidade (h^*), pode-se estimar a posição de uma amostra no sólido de cor. Esse ângulo é definido pela fórmula: $h^* = \arctan(b^*/a^*)$. O sólido de cor é dividido em quadrantes sendo que a cor verde (100° a 200°) e o vermelho (330° a 25°) (RAMOS e GOMIDE, 2009). Os valores do ângulo de tonalidade tanto do controle quanto com os micro-organismos foram acima de 180°, ficando dentro do quadrante da cor verde (100° a 200°) desde o tempo inicial (0h) até o tempo final (24 h), não ocorrendo transição colorimétrica (RAMOS e GOMIDE, 2009).

A mudança ou a percepção das cores pode ser ainda avaliada pela diferença total (global) de cor (ΔE) (RAMOS e GOMIDE, 2009), ocorrida após um tratamento ou um estímulo, sendo definida como:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Com um $\Delta E \geq 2$ para as vesículas controle de PCDA e TRCDA e também para cada uma delas com os micro-organismos, confirma mais uma vez que não ocorrendo transição colorimétrica (RAMOS e GOMIDE, 2009).

Para as placas de PCA+suspensão de vesículas incubadas com diferentes concentrações de *E. fergusonii*, ocorreu mudança de cor ao longo do tempo de incubação. Pode ser visto, pelos resultados de h^* e ΔE (Figura 10 e Tabela 3) que o

ângulo de tonalidade passou do quadrante da cor verde (100° a 200°) para o quadrante pertencente a cor vermelha (330° a 25°) (RAMOS e GOMIDE, 2009). Essa mudança de cor ocorreu em todas as concentrações do micro-organismo só que com tempos diferentes, sendo a concentração de 10^6 UFC·mL⁻¹ após 8 h de incubação com h^* de $1,30^{\circ}$ (Figura 10); 10^5 UFC·mL⁻¹ e 10^4 UFC·mL⁻¹ após as 12 h com h^* de $1,32^{\circ}$ e $1,35^{\circ}$, respectivamente e 10^3 UFC·mL⁻¹ e 10^2 UFC·mL⁻¹ após as 22 h com h^* de $1,38^{\circ}$ e $1,40^{\circ}$, respectivamente.

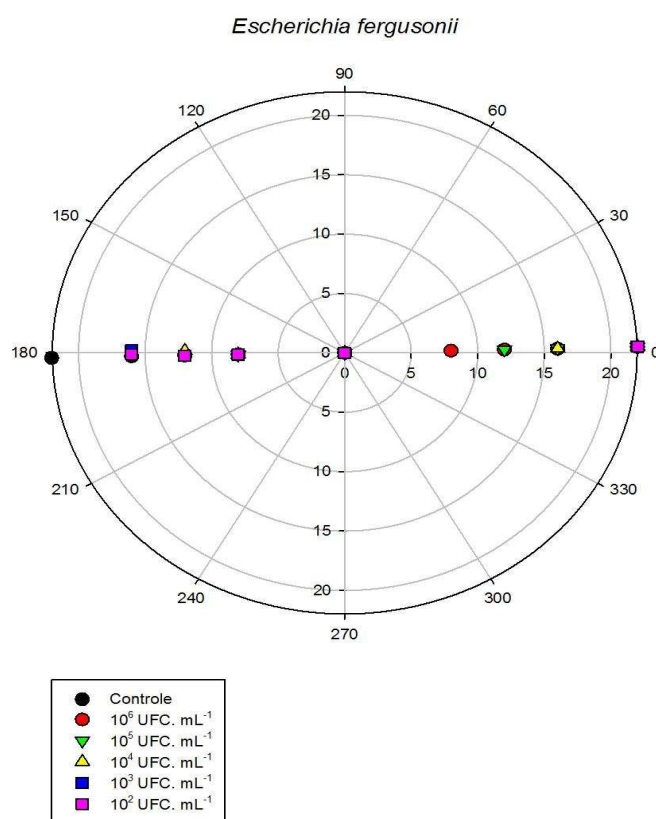


Figura 10. Valores do ângulo de tonalidade (h^* em grau) das placas de PCA+ suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES inoculadas com água contaminada com *Escherichia fergusonii* e controle em diferentes concentrações, incubadas por 35 °C durante 22 h.

A transição colorimétrica do verde para o vermelho das placas contendo *E. fergusonii*, pôde ser percebida sem a utilização de métodos analíticos, mas também foi verificada através do ΔE . Sendo os valores após a mudança de cor para vermelho ficando na faixa de percepção muito clara (3,0 a 6,0) à percepção bastante clara (6,0 a 12,0) segundo a tabela (RAMOS e GOMIDE, 2009) sendo que valores maiores

que 5 são considerados facilmente perceptíveis aos olhos humanos. Fator importante já que é objetivo da pesquisa é o desenvolvimento de um método colorimétrico, que neste caso não precisaria do uso de um equipamento sofisticado ou de uma pessoa treinada.

Tabela 3. Valores da diferença total (global) de cor (ΔE^*) das placas de PCA mais suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES inoculadas com água contaminada com *Escherichia fergusonii* em diferentes concentrações, incubadas por 35° C durante 22 h.

Tempo (horas)	Controle	ΔE				
		10 ² UFC·mL ⁻¹	10 ³ UFC·mL ⁻¹	10 ⁴ UFC·mL ⁻¹	10 ⁵ UFC·mL ⁻¹	10 ⁶ UFC·mL ⁻¹
0	0	0,3	0,62	0,8	0,55	0,57
8	0,05	0,69	1,34	0,71	1,81	9,6
12	0,93	3,1	3,5	3,36	9,31	9,01
16	1,35	9,59	2,98	8,94	8,65	8,7
22	1,67	8,9	9,68	9,16	9,08	8,86



Figura 11. A) placa controle com PCA+ suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES com adição de água esterilizada e B) placa PCA+ suspensão de vesículas TRCDA+PCDA/CO/ES contendo 10⁶ UFC·mL⁻¹ de *Escherichia fergusonii* após 8h de incubação.

Esses resultados mostram que a vesícula TRCDA+PCDA/CO/ES em ágar PCA obteve uma especificidade em relação à bactéria *E. fergusonii*, provavelmente com a multiplicação do micro-organismo no meio de cultura ocorreu uma interação através da formação de pili e flagelos, promovendo uma modificação estrutural do

PDA, levando a mudança de cor. Essa especificidade é uma importante característica para um sensor.

A partir dos resultados descritos acima e em estudos publicados por outros autores (MA et al 2002; SILBERT et al 2006), podemos dizer que a transição de cor azul-vermelho observado na matriz de agar, provavelmente está relacionada diretamente com a difusão de substâncias secretadas pelas bactérias durante a multiplicação.

Vilalobos et al, (2012) viram que transições de cor de azul para vermelho foram causadas pela multiplicação bacteriano a 35°C de *E. coli* em agar. Os resultados mostraram que as vesículas TRCDA/DMPC/Triptofano reagiram em 4 h utilizando uma concentração de 10^{11} UFC · mL⁻¹ de *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Tanto para o controle de TRCDA+PCDA e para os tratamentos com *E. faecium* os valores foram acima de 180° (Figura 12), ficando dentro do quadrante da cor verde (100° a 200°) desde o tempo inicial (0 h) até o tempo final (24 h), não ocorrendo transição colorimétrica (RAMOS e GOMIDE, 2009). A cor verde das placas se dá pela combinação do meio de cultura PCA que é de cor amarela e a vesícula TRCDA+PCDA da cor azul e que quando se misturam ficam com a tonalidade verde.

Pelo gráfico (Figura 12), em graus, percebe-se que não ocorre mudança de cor durante as 22 h de estudo. Os pontos ficaram no mesmo lugar, durante os tempos de leitura.

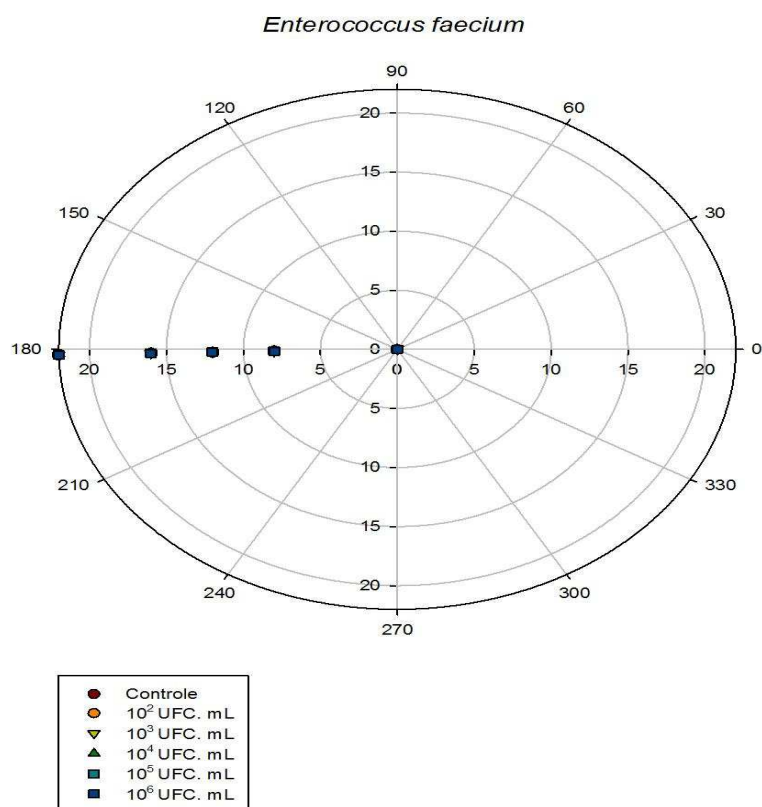


Figura 12. Valores do ângulo de tonalidade (h^* em graus) das placas de PCA+ suspensão de vesículas TRCDA+PCDA inoculadas com água inoculada com *Enterococcus faecium* e controle em diferentes concentrações, incubadas por 35 °C durante 22 h.

O ΔE causado pela interação vesícula e micro-organismo, foi de 0,26 a 1,56, estando na faixa de 0,2 a 1,5 que é muito pouco perceptível ou pouco perceptível, pela análise subjetiva da diferença da cor (RAMOS e GOMIDE, 2009). Mostrando mais uma vez a não alteração de cor ao longo do tempo e a pouca interação do *E. faecium* e as moléculas de PDA (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da diferença total (global) de cor (ΔE^*) das placas de PCA+ suspensão de vesículas TRCDA+PCDA inoculadas com água contaminada com *Enterococcus faecium* e controle em diferentes concentrações, incubadas por 35 °C durante 22 h.

Tempo (horas)	Controle	ΔE				
		10^2 UFC·mL ⁻¹	10^3 UFC·mL ⁻¹	10^4 UFC·mL ⁻¹	10^5 UFC·mL ⁻¹	10^6 UFC·mL ⁻¹
0	0	1,52	0,89	0,49	1,05	0,87
8	0,05	2,19	2,4	1,17	1,56	1,62
12	0,93	1,12	0,83	0,14	1,28	0,96
16	1,35	1,05	0,6	0,26	1,09	1,22
22	1,67	1,22	0,7	0,37	1,51	0,98

A suspensão de vesícula com TRCDA+PCDA adicionada ao meio de cultura obteve uma maior sensibilidade e uma resposta à transição de cor em relação a suspensão vesícula com TRCDA+PCDA pura, provavelmente foi devido a maior quantidade de vesícula presente na placa (10 vezes maior) em relação a do sensor em suspensão e também outro fator que se deve considerar é a presença do meio de cultura nas placas que oferece nutriente e condições de crescimento dos micro-organismos. Sendo que para ambos os casos em que se encontra a suspensão de vesícula, foram mais rápidos que os métodos tradicionais de identificação de micro-organismos em água, tais como NMP ou placa de contagem de agar.

7. CONCLUSÕES

A suspensão de vesículas contendo PCDA não houve transição colorimétrica para ambos os micro-organismos testados durante todo tempo de incubação nenhuma das concentrações estudadas. Já a suspensão com TRCDA foi verificada apenas uma transição de cor do azul para roxo para a bactéria *E. fergusonii*.

A suspensão de vesícula TRCDA+PCDA obteve uma RC maior para *Escherichia fergusonii* do que para *Enterococcus faecium*, havendo transição colorimétrica apenas para primeira bactéria, com o tempo de 12 h de incubação a 35 °C, em todas as concentrações estudadas, sendo mais rápido que os testes convencionais.

Quanto ao tamanho das vesículas, verificou-se que em todos os tratamentos contendo micro-organismo, aumentaram o diâmetro hidrodinâmico, mediante a presença de micro-organismo, comparando com o tratamento controle. A adição da água com as bactérias alterou os valores do potencial zeta da suspensão de vesículas, porem os valores continuaram sendo negativos.

A suspensão de vesícula de TRCDA+PCDA em meio de cultura também obtiveram mudança de cor de verde para vermelho na presença de *Escherichia fergusonii* com um tempo mínimo de 8 h e não mudou de cor para o micro-organismo *Enterococcus faecium* durante 22 h de incubação a 35 °C.

Podemos concluir, que a vesícula de TRCDA+PCDA tanto como sensor na forma de suspensão quanto em meio de cultura, possuem um grande potencial como aplicação com biossensor colorimétrico para indicar *Escherichia fergusonii* em água para consumo humano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). Panorama das águas superficiais no Brasil. Brasília: Editoração Eletrônica; 2005.

ANDRADE, N.J.; **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Livraria Varela, 2008.

ALVES, R.B. **Qualidade e diversidade microbiana da água obtida pela sistema de purificação intalado no prédio dos Laboratórios de Qualidade e Segurança de Alimentos** (2013). Tese (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa), Viçosa, 2013.

ARIZA-CARMONA, L.; MARTÍN-ROMERO, M. T.; GINER-CASARES, J. J.; PEREZ-MORALES, M.; CAMACHO, L. Elastic nanocomposite structures formed by polyacetyllene-hemicyanine mixed films at the air-water interface.**The journal of physical chemistry**, v. 117, p.218-238, 2013.

BOULLANGER, P.; LAFON, D.; BOUCHU , N.; JIANG, L.; LIU, T.; LU,W.; GUO, C.X.; LI,J. The use of glycolipids inserted in color-changeable polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition. **Comptes Redus Chimie**, v.11, p.43-60, 2008.

BOURS, P.H.A., POLAK, R., HOEPELMAN, A.I.M., DELGADO, E., JARQUIN, A., MATUTE, A.J.,. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 770–774, 2010.

BRASIL - MS. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 275. Aprova Regulamento Técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. 22 de setembro de 2005.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTA NASINITT, M.; TRAIPHOL R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal Colloid Interface Science**, v.15, p. 360:565-73, 2011.

CHARYCH, D. H.; NAGY, J. O.; SPEVAK, W. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by polymerized bilayer assembly. **Science**, v. 261, p. 585-588, 1993.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução n°357, de 17 de março de 2005.

DEBERDT, Jean André. **Análise da água**. Programa pró-ciência. Disponível em: www.educar.sc.usp.br/biologia. Acesso em 11 de setembro de 2003.

EGWARI, L; ABOABA, O. O. *Environmental impact on the bacteriological quality of domestic water supplies in Lagos, Nigeria*. **Rev Saúde Pública** ; v. 36, n. 4, p.513-20, 2002.

FARMER JJ, 3RD; FANNING, GR; DAVIS, BR; O'HARA, CM; RIDDLE, C; HICKMAN-BRENNER, FW; ASBURY, MA; LOWERY VA, 3RD; BRENNER, DJ. "Escherichia fergusonii and Enterobacter taylorae, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.". **Journal of clinical microbiology**, v.21, p. 77–81, 1985.

HODGSON, K. and MANUS, L. . A drinking water quality framework for South Africa. Water SA, vol. 32, no. 5, 2006.

HOLOPAINEN, J.M., METSO, A.J., MATTILA, J.P., JUTILA, A., KINNUNEN, P.K.J. Evidence for the Lack of a Specific Interaction between Cholesterol and Sphingomyelin. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 1510 1520, 2004.

JUNIOR, R.L.A. Água de abastecimento – **Rotina de sua inspeção**. Curso preparatório para concurso de Fiscal Agropecuário. Rio Janeiro. 2004.

KOH, J.J.; LIU, S.; ZENG, W.; ZOU, H.; WANG, L.; SURESH, V.; BEUERMAN, R.; CAO, D. Electron donating group substituted and α -d-mannopyranoside directly functionalized polydiacetylenes as a simplified bio-sensing system for detection of lectin and *E. coli*. **Sensor and Actuators B**, v.178, p. 563-571, 2013.

Lagace´ -Wiens, P.R.S., Baudry, P.J., Pang, P., Hammond, G.,. First description of an extended-spectrum-b-lactamase producing multidrug resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2301–2302, 2010.

LINDSELL, W.E., MURRAY, C., PRESTON, P.N., WOODMAN, T.A.J. Synthesis of 1,3-diynes in the purine, pyrimidine, 1,3,5-triazine and acridine series. **Tetrahedron**, v. 56 , p. 1233 1245, 2000.

LEBARON, P., et al. *An operational method for the real-time monitoring of E. coli numbers in bathing waters*. **Marine Pollution Bulletin**. v.50, p. 652-659, 2005.

MA, B.; FAN, Y.; ZHANG, L.; KONG, X.; LI, Y. and LI, J. Direct colorimetric study on the interaction of *Escherichia coli* with mannose in polydiacetylene Langmuir-Blodgett films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. vol. 27, no. 2-3, p, 209-213, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS, N. 518/2004. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

OLIVEIRA , T.V.; SOARES, N. F.F.; SILVA, D.J.; ANDRADE, N.J.; MEDEIROS, E.A.A.; BADARÓ, A.T. Development of pda/phospholipids/lysine vesicles to detect Pathogenic bactéria. **Sensors and Actuators B**, v. 18, p. 385–392, 2013.

OKADA, S., PNG, S., SPEVAK, W., CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Accounts Chemistry Research**, v. 31, p. 229-239, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. The world health report 2007: a safer future: global public health security in the 21st century. Genebra, Suécia, 2007.

PATTANATORNCHAI, T.; CHAROENTHAI, N.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAPHOL, R. Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 45–53, 2013.

PATTANATORNCHAI, T.; CHAROENTHAI, N.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPHOL, R. Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 45–53, 2013.

PIRES, A. C. dos S.; SOARES, N. de F. F.; SILVA, L. H. M. da; SILVA, M. C. H.; ALMEIDA, M. V. de; HYARIC, M. L.; ANDRADE, N. J. de; SOARES, R. F.; MAGESTE, A. B.; REIS, S. G. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 153, p. 17-23, 2011.

POPE, M.L; et al. Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on Escherichia coli Densities in Surface Water Samples. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, n.10, p. 6201–6207, 2003.

POTISATITYUENYONG, A.; ROJANATHANES, R.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions po polydiacetylene vesicles. **Langmuir**, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

RAMOS, E. M., e GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes - Fundamentos e Metodologias**, Editora UFV, 2009.

REICHERT, A.; NAGY, J.O.; SPEVAK, W.; CHARYCH, D. Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic acid bind and colorimetrically detect Influenza virus. **Journal of American Chemistry Society**, v. 117, p. 829-830, 1995.

ROHDEN, R; et al. Monitoramento microbiológico de águas subterrâneas em cidades do Extremo Oeste de Santa Catarina. **Ciência saúde coletiva**, v.14, n.6, 2009.

SAVINI, V., CATAVITELLO, C., TALIA, M., MANNA, A., POMPETTI, F., FAVARO, M., FONTANA, C., FEBBO, F., BALBINOT, A., DI BERARDINO, F., DI BONAVENTURA, G., DI ZACOMO, S., ESATORRE, F., D'ANTONIO, D.,. Multidrug-

resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p.1551–1552, 2008.

SILBERT, L.; SHLUSH, I.B.; ISRAEL, E.; PORGADOR, A.; KOLUSHEVA, S. and JELINEK, R. Rapid chromatic detection of bacteria by use of a new biomimetic polymer sensor. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 72, no. 11, p. 7339-7344, 2006.

SONG, J; CHENG, Q.; ZHU, S.; STEVES, R.C. Smart materials for biosensing devices: cell-mimicking supramolecular assemblies and colorimetric detection of pathogen agents. **Biomedical Microdevices**, v. 3, n. 4, p. 213-221, 2002.

SU, Y.L.; LI, J.R.; JIANG, L. and CAO, J. Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli*. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 284, no 1, p. 114-119, 2005.

VILLALOBOS, P.; CHÁVEZ, M. I.; OLGUÍN, Y.; SÁNCHEZ, E.; VALDÉS, E.; GALINDO, R.; YOUNG, M.E. The application of polymerized lipid vesicles as colorimetric biosensors for real-time detection of pathogens in drinking water. **Electronic Journal of Biotechnology** , vol 15-issue1-fulltext-5, 2012.

WILLEMS RJ, VAN SCHAİK W: Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. **Future Microbiol.**, v.4, n. 9, p, 1125-1135, 2009.

ZHU, L.; XU, Q.; JIANG, L.; HUANG, H.; LI, S. Polydiacetylene-Based High-Throughput screen for surfactin producing of *Bacillus subtilis*. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-9, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

As vesículas de PCDA, TRCDA e TRCDA+PCDA foram sensíveis as diferentes condições testadas, sendo os valores de pH 8 temperatura de 45 °C e a concentração de acima de 50 mmol·L⁻¹ de NaCl, foram as condições mínimas em que ocorreram a transição colorimétrica para todas as suspensões de vesículas.

A presença do TCM, DCBM e DBCM provocaram a transição colorimétrica das vesículas polidiacetilênicas, sendo a suspensão TRCDA+PCDA a que conseguiu identificar três dos quartos THMs estudados.

Dos micro-organismos somente *Escherichia fergusonii* foi a que provocou a transição colorimétrica das vesículas, sendo que tanto a suspensão pura quanto suspensão de vesícula em meio de cultura de TRCDA+PCDA foi a obteve a maior RC e a que mudou de cor com todas as concentrações estudadas da bactéria, em um tempo menor de análise que os testes convencionais.

Mediante os resultados acima, os PDAs podem ser considerados sistemas promissores para o desenvolvimento de sensores colorimétricos para a identificação simples e rápida de compostos de interesse. Muitas pesquisas e estudos devem ser feitos para entender melhor o comportamento dos sensores de PDA e melhorar a sua especificidade.