BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO POR LEVEDURAS
Saccharomyces cerevisiae

DANIELE TOLEDO DEL RIO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de concentração: Microbiologia
Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Maio – 2004

BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO POR LEVEDURAS

Saccharomyces cerevisiae

DANIELE TOLEDO DEL RIO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Maio 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Del Rio, Daniele Toledo
Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* / Daniele Toledo Del
Rio. - - Piracicaba, 2004.
54 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Cádmio 2. Efluentes 3. Leveduras 4. Metal pesado 5. Saccharomyces 6. Toxicidade
Tratamento biológico da água I. Título

CDD 628.351

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À DEUS

" Meu pastor, meu caminho, minha luz e força...a FÉ, que sem
ela nada conquistaria...**AGRADEÇO.**"

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional e
especialmente pelo incentivo de minha mãe.

A memória de meu avô, a presença
marcante de minha avó e tia,
e ao carinho de meu irmão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À ESALQ - USP pelo suporte como instituição e todos os apoios fornecidos e, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo...(desde a Iniciação Científica), ambos foram fundamentais a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho, pela orientação e oportunidade.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes pelo apoio, incentivo, amizade, carinho e, acima de tudo pelos enriquecedores ensinamentos e pelo despertar a pesquisa.

Ao Prof. Flavio C. A. Tavares pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, principalmente na conclusão deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação, pelo incentivo e ensinamentos e, a Profa. Silvia M. G. Molina pela ajuda nas análises estatísticas.

A Profa. Dra. Roberta H.P. Valle e ao Prof. Júlio César Teixeira pelos ensinamentos básicos, pelo incentivo, amizade e modelo de profissionalismo, e a todos da UFLA, onde me formei. Aos amigos que lá conquistei e aos professores pelo incentivo, conhecimento e por acreditarem no potencial de seus alunos.

A Dra. Keila M. R. Duarte pelo apoio e auxílio na elaboração deste trabalho, bem como todos os outros pertinentes; Pelas tardes em família, as quais me acolheu em sua casa, e pelo inestimável carinho.

Ao Daniel Sarmiento e sua mãe, pelo apoio e atenção, principalmente nos momentos difíceis.

Aos amigos do laboratório de Genética de Leveduras, Ana Maria B. Giacomelli, Ana Carolina Gomes, Alessandra Rabalho, Alessandro Riffel, Carmo A. L. Poloni, Gildemberg A. Leal Jr., Luiz Fernando Romanholo, Marcus Venicius (Polé), Rodrigo S. Carvalho, Sarita P. Gobbo e as estagiárias, obrigada pelos cafés da

manhã, confraternizações e churrascos e, por compartilharem conhecimento, alegria e o espaço de trabalho, sem esquecer, os conselhos indispensáveis.

Aos colegas Funcionários do Departamento de Genética, Margarida (D. Meg), Vitor, Fernando, Macedonio, Valdir e Oberdã obrigada pela atenção e, a Glória pela ajuda e auxílio na revisão bibliográfica. E em especial às amigas Sarah e Giovana, que sempre tiveram grande paciência e carinho.

Ao Rock Seille pelo convívio, amizade, carinho e cuidados de irmão mais velho. Pelo apoio nas análises estatísticas e especialmente por tudo que fez nos momentos complicados, minha gratidão, amizade e carinho. Muito Obrigada!

A amiga Flávia, sempre presente apesar da distância.

A querida Rebeca, que deixou este caminho mais florido, feliz e divertido, meu carinho e amor....

Aos amigos queridos conquistados ao longo destes dois anos, em especial, a Nívea, Ticiane, Lígia, Mônica, Luiz (Viola), Edgard, Maurício, Solange, Jony, Bia, Priscila, Sr. Ferraz pelas farras, companhia e por estarem sempre comigo. E a todos aqueles que não foram nominalmente citados, mas estão presentes de alguma forma neste trabalho e em meu coração, obrigada pelo apoio.

E...

A minha família e a todos os momentos que deixei de viver com vocês, ao amor que irrestritamente me dedicam e, a suas orações e a Fé. Por acreditarem no meu potencial e por tudo que não consigo escrever, mas que sentimos. À tudo que foi ensinado, a educação, o caráter e o amor...ao meu pai e ao meu querido irmão...e as três mães que tenho (minha Mãe, minha avó Caty e minha tia Su) , obrigada e amo vocês !.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A Toxicidade do Cádmio.....	2
2.2 Importância da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.3 A Biossorção.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Leveduras.....	15
3.1.2 Sal de Cádmio.....	15
3.2 Métodos.....	15
3.2.1 Água.....	15
3.2.2 Vidrarias.....	16
3.2.3 Biomassa.....	16
3.2.4 Soluções de Sal de Cádmio.....	16
3.2.5 Avaliação da capacidade de biossorção de cádmio e tempo de residência.....	17
3.2.6 Determinação da massa de cádmio na solução.....	18
3.2.7 Determinação da massa de cádmio biossorvida pela biomassa.....	20

3.2.8 Determinação da bio sorção por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes pH.....	19
3.2.9 Determinação da quantidade de proteínas solúveis no sobrenadante.....	19
3.2.10 Delineamento Estatístico.....	20
3.2.11 Destino do material contaminado.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5 CONCLUSÕES.....	36
ANEXOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Procedimentos realizados para a montagem dos ensaios de bioissorção.....	17
2. Padrão de bioissorção de cádmio (mg) para a interação entre os níveis de tempo de residência e os tipos de biomassa.....	24
3. Médias de bioissorção de cádmio (mg) para a interação entre os níveis de concentração de cádmio e níveis de tipo e concentração de biomassa.....	27
4. Teores de cádmio adsorvido (mg Cd.g ⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mortas e concentração de 2,0 mg Cd.50mL ⁻¹	30
5. Teores de cádmio adsorvido (mg Cd.g ⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mortas e concentração de 4,0 mg Cd.50mL ⁻¹	31
6. Teores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g ⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> viva e concentração de 2,0 mg Cd . 50mL ⁻¹	32
7. Teores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g ⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> viva e concentração de 4,0 mg Cd.50mL ⁻¹	33
8. Concentrações de proteínas (μg.mL ⁻¹) em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> morta e concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50mL ⁻¹	34
9. Concentrações de proteínas (μg.mL ⁻¹) em ensaio utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> viva e concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50mL ⁻¹	35

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Análise de Variância.....	21
2. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Interação entre o tempo de residência e o tipo de biomassa - Teste de Tukey.....	22
3. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Interação entre o tempo de residência e o tipo de biomassa - Regressão Polinomial.....	23
4. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Interação entre o tipo e a concentração de biomassa e as concentrações de cádmio - Teste de Tukey.....	26
5. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Interação entre o tipo e a concentração de biomassa e as concentrações de cádmio - Regressão Polinomial.....	26

BIOSORÇÃO DE CÁDMIO POR LEVEDURAS

Saccharomyces cerevisiae

Autora: DANIELE TOLEDO DEL RIO

Orientador: Prof. Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

RESUMO

O aumento das atividades industriais intensificou os problemas com poluição ambiental por metais pesados e principalmente por cádmio, por ser dentre os metais pesados, muito utilizado em vários processos industriais e por ser extremamente tóxico em baixas concentrações, além de causar sérios problemas de saúde. Dentre vários processos utilizados na remoção de cádmio de efluentes industriais, um dos mais promissores é a biossorção que envolve a utilização de microrganismos na recuperação e remoção de metais de efluentes. *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos que apresentam grande capacidade de biossorção de metais pesados, além de ser um resíduo facilmente obtido em grandes quantidades como subproduto de processos industriais. Visando o tratamento de resíduos líquidos contaminados com cádmio, foram determinados alguns parâmetros ideais para a biossorção de cádmio de soluções artificiais com a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* vivas e mortas por calor. Dentre estes parâmetros foram estudados a concentração de biomassa, concentração do metal, pH e tempo de residência ideal para concentrações de sal entre 10 e 100 mg.L⁻¹. A recuperação do metal pode chegar a 100% e viabilizar o uso de biomassa morta e principalmente de reutilização de biomassa das indústrias alimentícias e alcooleira.

BIOSORPTION OF CADMIUM BY YEAST

Saccharomyces cerevisiae

Author: DANIELE TOLEDO DEL RIO

Adviser: Prof. Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

SUMMARY

The increase of the technological activities intensified the problems with environmental pollution with heavy metals and mainly with cadmium. The attention for this metal is due to the extensive use and for being extremely toxic at low dosages and causing serious problems of human health. Among several process used in the removal of cadmium of effluents one of the most promising it is the biosorption that involves the use of microorganisms in the recovery and removal of effluent metals. *Saccharomyces cerevisiae* is one of the organisms that show great capacity of biosorption of heavy metals, besides being easily obtained in great amounts as residue of industrial process. Seeking the treatment of polluted liquid residues with cadmium, we determined some ideal parameters for the biosorption of cadmium in artificial solutions with the use of viable and non-living (by heat) *Saccharomyces cerevisiae*. Among the parameters we studied the biomass concentrations, metal concentrations, pH and ideal time of residence for solutions in concentrations of salt between 10 – 100 mg Cd.L⁻¹. The recovery of the metal can arrive up to 100% and makes possible to use the died biomass and mainly the reuse of biomass from food and sugar-cane alcohol industries.

1 INTRODUÇÃO

Grandes proporções de metais pesados têm sido liberadas no ambiente juntamente com os resíduos industriais e efluentes contaminados pelas atividades industriais. O cádmio é um metal pesado, altamente tóxico, que está associado a diversos problemas de saúde, como osteomalácia, osteoporose, anormalidades nos órgãos reprodutivos, degradação do DNA, diminuição da fidelidade da duplicação e dos reparos no DNA, mutação gênica e anormalidades cromossômicas. Além de lesões dos tubos proximais dos rins, fígado e pulmões, podem ser esperados também pela intoxicação por cádmio, efeitos fetotóxicos e embriotóxicos.

Pesquisas recentes associaram o cádmio à hipertensão, câncer de próstata e supressão da função testicular, puberdade precoce, ruptura de sistemas enzimáticos complexos e a destruição dos eritrócitos. Demonstraram ainda que dietas ricas em gorduras saturadas e cádmio podem causar o câncer de mama.

A biossorção é uma nova tecnologia para a remoção e recuperação de metais pesados de efluentes industriais. "É um processo onde se utiliza sólidos de origem vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido" (Cossich et al.,2000).

A utilização de microrganismos como fungos e leveduras no tratamento de efluentes contaminados por metais pesados tem sido amplamente estudada por diversos pesquisadores, demonstrando sua alta capacidade de bioissorver metais pesados. Este trabalho teve por objetivo a utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* vivas e mortas por calor na biossorção de cádmio em meio aquoso.No Brasil, sendo essa levedura utilizada em grande escala na indústria alcooleira, esse resíduo pode ser facilmente obtido em grandes quantidades como subproduto desse processo industrial, tornando-se barato e com isso, viabilizando sua utilização no tratamento de efluentes industriais ou de laboratórios de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Toxicidade do Cádmio

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a rápida industrialização trouxeram graves problemas ambientais. Os resíduos industriais contendo metais pesados despejados desordenadamente constituem-se num grande risco à saúde e ao ambiente.

Os metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico superior a 5 g.cm^{-3} , sendo considerados "elementos traço" por serem naturalmente encontrados em poucas partes por milhão (ppm) (Mattiazzo-Prezotto, 1994). Diferem de outros agentes tóxicos porque não são sintetizados nem destruídos pelo homem. A atividade industrial visando a produção de novos compostos diminuiu significativamente a permanência desses metais nos minérios, alterando a distribuição desses elementos no planeta.

Dentre todas as espécies metálicas, o mercúrio, o chumbo e o cádmio estão em evidência. E entre eles, o cádmio é considerado um provável elemento carcinogênico ou altamente indutor de carcinogênese em humanos (Volesky, 1990; Adamis *et al.*, 2003). O cádmio foi descoberto em 1817 por Fredrich Stromeyer como impureza do carbonato de zinco, e que junto ao zinco e mercúrio pertencem a classe IIB da tabela periódica.

Em 2001, o cádmio foi o 7º classificado na lista "de Substâncias mais Perigosas" da CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act), juntamente com a EPA (Environmental Protection Agency) e ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), onde as substâncias são classificadas de acordo com sua toxicidade, potencial de risco à saúde e exposição destes aos organismos vivos. Entre as primeiras substâncias também se encontram o arsênico, chumbo e mercúrio.

A principal aplicação do cádmio (34% do total) está em revestimentos metálicos para a indústria automobilística, espacial e de telecomunicações. Outros 23% são para pigmentos com alta estabilidade térmica, usados principalmente em tintas, vernizes e cerâmicas. Outros usos estão nas indústrias de PVC (policloreto de vinila) e na estabilização de plásticos (Midio & Martins, 2000).

Também é utilizado nas indústrias de baterias e fungicidas e está presente em locais de mineração, sendo o cádmio associado principalmente a extração de zinco (Bem et al., 1997). Além de indústrias de celulares e equipamentos eletrônicos (Adamis et al, 2003), está presente em corretivos para acidez, fertilizantes fosfatados (Vallespin et al.,1999), resíduos de siderurgia, lixo urbano e lodo de esgoto (Oliveira, 1995) e curtumes (Jordão et al., 1999).

Os revestimentos de cádmio amplamente utilizados na proteção contra corrosão, apresentam propriedades excelentes, mas a sua elevada toxicidade gera motivação a realização de novas pesquisas em busca de substitutos alternativos para esse revestimento. Atualmente há uma associação entre órgãos de pesquisa (IPT e FINEP) e empresas públicas (Petrobrás e Cenpes), para identificar alternativas disponíveis comercialmente para a substituição dos revestimentos de cádmio (Fedumenti et al., 2003).

A toxicidade do cádmio foi primeiramente constatada no Japão, em área de mineração onde a água e o arroz eram os principais componentes da dieta dos habitantes desta localidade, e estavam contaminados com cádmio procedente da extração de zinco. Esta contaminação resultou no desenvolvimento da doença "Itai-Itai", (Volesky, 1990; Vallespin et al.,1999), onde a ingestão diária estava em torno de 150-250 μg de cádmio (Friberg et al, 1986). Os doentes apresentaram problemas ósseos, com fraturas múltiplas, osteomalácia em vários níveis de osteoporose, acompanhada de doenças renais severas e proteinúrias (WHO,1992; Kuboi et al, 1987). Estudos demonstraram que o arroz continha de 0,37 a 3,36 mg Cd.kg^{-1} de peso seco (Carruthers & Smith, 1979).

Os metais pesados exibem dois tipos de toxicidade, podendo ser aguda ou crônica. A dose letal (DL_{50}) estimada para camundongos e ratos em laboratório é de 60 e 5000 $\mu\text{g Cd.Kg}^{-1}$ de peso corporal, respectivamente. Os animais que ingeriram essas quantidades apresentaram sintomas de descamação do epitélio, necrose das mucosas gástricas e intestinais e distrofia do fígado, coração e rins (Jarup et al., 1998). Em casos de exposição

aguda, a morte do indivíduo pode ser esperada. Já em condições de exposição mais leve ocorre falência múltipla ou isolada de órgãos.

Estudos com administração oral repetitiva apresentaram nos animais efeitos característicos como lesão dos tubos proximais dos rins, mas outros efeitos podem ser esperados pela intoxicação por cádmio, como efeitos fetotóxicos e embriotóxicos, além da degradação do DNA, diminuição da fidelidade da duplicação e dos reparos no DNA, mutação gênica e anormalidades cromossômicas em células de mamíferos em cultura (Jarup *et al.*, 1998). Além da inibição da divisão celular e alterações nos cromossomos (Das *et al.*, 1997).

Pesquisas recentes associaram o cádmio à hipertensão, câncer de próstata e supressão da função testicular, ruptura de sistemas enzimáticos complexos (Adamis *et al.*, 2003) e a destruição dos eritrócitos (Ghosroy *et al.*, 1998), além de estar associado a distúrbios como puberdade precoce. Mason (1988) demonstrou que dietas ricas em gorduras saturadas e cádmio podem causar o câncer de mama.

A alimentação é portanto a principal fonte de contaminação, cerca de 70% da exposição ocorre via oral (Groten & van Bladeren, 1994). Esta contaminação pode ocorrer durante o uso águas contaminadas na irrigação ou pelo solo contaminado (Midio & Martins, 2000; Jarup *et al.*, 1998; Prasad, 1995; Tyler, 1990.).

O cádmio quando assimilado se distribui em todo o organismo, sendo encontrado em células sanguíneas, ou ligado a proteínas do soro plasmático como albumina e outras glicoproteínas, ou ligado a metaloproteínas (metalotioneínas) produzidas pelo fígado (Mattiazzo-Prezotto, 1994).

Vallespin *et al.* (1999) demonstraram que proteínas do leite podem favorecer a absorção de cádmio pelo intestino. Também observaram que a lactoferrina, outra proteína láctea tem ação inibitória em relação à absorção de cádmio. Outras proteínas também podem proteger o organismo da absorção de cádmio, entre elas a albumina e imunoglobulina A plasmática e metalotioneínas. As dietas ricas em fibras podem diminuir a absorção de cádmio, assim como ferro, zinco e ácido fítico. Turecki *et al.* (1994) sugerem que o ácido fítico formaria complexo insolúvel com cádmio e assim diminuiria absorção do mesmo.

Os níveis de cádmio encontrados em frutas, carnes e vegetais são usualmente inferiores a $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ peso seco, em particular nos rins e fígados de animais domésticos de 10-100 e 100-1000 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente. Em cereais foram encontrados níveis abaixo de

25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ peso seco. Em peixes os teores estão abaixo de 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, sendo encontrados apenas na pele altos níveis de cádmio, em torno de 200-1000 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Galal-Gorchev, 1991).

A ingestão diária de cádmio na dieta humana é estimada entre 10-35 ng por pessoa (Galal-Gorchev, 1991). Em países da Europa, EUA e Austrália, a ingestão diária por pessoas não fumantes e com residência em locais não contaminados é aproximadamente de 10-25 ng (WHO, 1992).

A Organização Mundial de Saúde considera a ingestão de cádmio temporária tolerável semanalmente de 7 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ peso corporal (WHO, 1989; WHO, 1993; JECFA, 2000).

Além de ocorrer em alimentos, o cádmio pode ser encontrado também como partículas finas e dispersas no ar, principalmente em ambientes próximos à indústria metalúrgica, devido à alta evaporação de resíduos. Em cidades européias foram detectados níveis elevados de cádmio por m^3 . Quatro cidades alemãs no ano de 1981 apresentavam aproximadamente 1-3 ng Cd.m^{-3} . Na mesma época na Holanda, os níveis encontrados foram de 0,7-2,0 ng. m^{-3} . Na Bélgica no ano de 1986 foram encontrados teores de cádmio de 10-60 ng. m^{-3} (Ros and Slooff, 1987). Nestas áreas a população não poderia ter contato com níveis acima de 0,8 $\mu\text{g.dia}^{-1}$ (WHO, 1989).

Estudos demonstram que tumores podem ser induzidos em ratos pela simples inalação de componentes orgânicos de cádmio (Jarup et al., 1998; Oldiges et al., 1989). Pessoas fumantes são expostas diariamente a teores 2-4 $\mu\text{g Cd.dia}^{-1}$, sendo que esta quantidade é encontrada em aproximadamente 20 cigarros (Ros and Slooff, 1987).

Já a concentração de cádmio em efluentes industriais é geralmente de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Friberg et al., 1986). Em 110 estações localizadas ao redor do mundo foram encontrados teores menores que 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em 1988 no Rio Rimao no Peru foi detectado a presença de cádmio em níveis aproximados de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 1989).

A contaminação da água potável pode acontecer como resultado da impureza de tubos galvanizados de zinco ou em soldas contendo cádmio, presentes nos reservatórios dos aquecedores e dos refrigeradores e torneiras. Na Suécia, nascentes próximas a solos ácidos foram encontradas concentrações de cádmio acima de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Friberg et al., 1986).

Os teores máximos permitidos das substâncias potencialmente prejudiciais presentes em diferentes tipos de águas foram estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (Resolução n.20, 1986), onde para águas classificadas entre as classes 1; 3; 5 e 7, utilizadas para o abastecimento doméstico, irrigação de hortaliças, de

pastagens e aquicultura, sejam respeitados os valores entre 0,001 a 0,01 mg Cd.L⁻¹. Os efluentes de indústrias ou outras atividades somente poderão ser lançados em corpos de água (como rios) desde que obedeçam ao valor máximo de 0,2 mg Cd.L⁻¹.

O cádmio pode ser determinado em vários tipos de amostras por espectrofotometria de absorção atômica usando aspiração direta do material líquido em chama ou por técnicas de espectrofotometria de forno (Ware, 1989). O limite mínimo de detecção 0,0007 µg Cd .mL⁻¹ de amostra.

Em geral o cloreto de cádmio (CdCl₂) e acetato de cádmio (CdC₄H₆O₄) são mais absorvidos e mais tóxicos que outros compostos (Mason, 1987). Sullivan et al. (1984) observaram que a acumulação corporal do cádmio ingerido na forma orgânica é maior quando comparada com o sal inorgânico.

No Brasil foi constatada apenas uma incidência de contaminação com metais pesados, ocorrida na cidade de Paulínia -SP, pela Empresa Shell Química do Brasil. Dos 166 moradores submetidos a exames, 53% apresentaram contaminação crônica e 56% das crianças revelaram altos índices de cobre, zinco, alumínio, cádmio, arsênico e manganês. Observou-se, também, a incidência de tumores hepáticos e de tireóide, alterações neurológicas, dermatoses, rinites alérgicas, disfunções gastro-intestinais, pulmonares e hepáticas.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental realiza monitoramento nas águas superficiais do Estado de São Paulo, onde das 27 substâncias estudadas, 11 se referem a análise de metais pesados. Os rios que apresentaram problemas de poluição com cádmio em 2000, foram os rios Capivari, Jundiá, Atibaia, Piracicaba, Piaçaguera, Mogi e o Alto e Médio Tietê (Gratão, 2003).

A toxicidade do cádmio também pode afetar o crescimento de plantas, redução da taxa de fotossíntese, provocar alterações nas atividades enzimáticas e metabólicas (Cobbet et al., 2000). Essa diminuição da atividade enzimática pode ser devida à alta afinidade do cádmio por grupos cisteína (SH) de proteínas, aos quais se ligam a elas inibindo a atividade das enzimas (Lagriffoul et al., 1998), ou alterando a síntese de aminoácidos.

Estudos demonstram que o cádmio é encontrado em várias partes da planta, não sendo imobilizado totalmente pelas raízes, sendo translocado para as folhas e frutos (Cardoso, 2000). A presença do cádmio induz a produção de enzimas ricas em cisteína, chamadas de fitoquelatinas, semelhantes às metalotioneínas. Esse sistema de defesa

oxidante, inclui componentes de baixo peso molecular, que são capazes remover e neutralizar radicais livres (Scandalios, 1993).

A competição de cádmio com o ferro nos sítios de adsorção na membrana causam manchas claras e amarelas nas folhas, denominadas, genericamente como clorose (Siedlecka e Krupa, 1999).

2.2 Importância da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares e importantes sistemas-modelo para a pesquisa básica na biologia de células eucarióticas.

Saccharomyces cerevisiae e espécies filogeneticamente próximas são as mais empregadas pelo homem, que as utilizam nas várias indústrias de fermentação alimentícia e de bebidas (Vicente, 1987; Gadd & White, 1993; Kapoor and Viraraghavan, 1995).

As principais características de acordo com Oura (1995) que tornam as leveduras microrganismos interessantes para processos industriais são:

- capacidade de desenvolvimento em substrato barato e facilmente disponível;
- facilidade de obtenção e de multiplicação;
- utilização de nutrientes nas suas formas mais simples;
- possibilidade de cultivo independente do ambiente;
- pequena exigência de água e de área;
- formação de produtos de valor nutritivo.

Outra vantagem do emprego de células de *Saccharomyces cerevisiae* é sua fácil utilização em procedimentos moleculares e seu completo seqüenciamento genético, o que possibilitaria estudos de sensibilidade a metais pesados e de controles da resposta celular (Adamis et al., 2003). Resultados obtidos em estudos desse tipo poderiam ser considerados equivalentes para células humanas, uma vez que aparentemente, os mecanismos moleculares envolvidos são muito semelhantes nesses dois tipos de organismos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de retirar metais pesados da água, podendo ser usada como bioacumulador desses metais, sendo uma ótima alternativa para a descontaminação ambiental (Bayhan et al., 2001). Segundo Oura (1995) quando

cultivadas em produtos químicos e resíduos industriais, são carreadoras de elementos tóxicos.

Durante os processos fermentativos industriais, a biomassa pode apresentar menor rendimento na presença de metais pesados, pois o íon metálico afeta diretamente o metabolismo celular. A célula em resposta à presença do metal pesado promoveria sua remoção do meio, com o acúmulo intracelular ou preso em proteínas extracelulares, podendo então ocasionar problemas de intoxicação alimentar (Kapoor and Viraraghavan, 1995).

Embora *Saccharomyces cerevisiae* tenha sido denominada "mediocre" (valores de bioadsorção medianos) como bioadsorvente de metais pesados (Volesky, 1994), o estudo com sua biomassa é justificada devido ao intenso uso em fermentações em larga escala nas indústrias alimentícias e na produção de álcool, e conseqüentemente na alta quantidade de resíduo não utilizável decorrente dessas atividades (Ashkenazy et al., 1999; Modak et al., 1996; Volesky & May-Phillips, 1995; Volesky et al., 1993; Huang et al., 1990; Mowll & Gadd, 1983; Nakajima et al., 1981; Norris & Kelly, 1977).

Em 1975 foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) estimulando o desenvolvimento da agroindústria canavieira e, em conseqüência, grandes quantidades de subprodutos da exploração da cana-de-açúcar passaram a ser produzidos (Carvalho, 2001). Dentre eles, a levedura de recuperação (*Saccharomyces cerevisiae*) é um subproduto de destaque, devido à possibilidade de reuso (Loviey & Coates, 1997).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é obtida, nas destilarias, depois de usada como fermento para a obtenção do álcool a partir da cana-de-açúcar. Ela pode ser considerada como um resíduo da produção do álcool. De cada litro produzido, sobram cerca de 30 gramas de levedura seca. A produção brasileira anual de álcool é de aproximadamente 15 bilhões de litros, o resíduo de biomassa está perto de 450 mil toneladas. O resíduo da centrifugação de vinho está em torno de 15 a 25 Kg de levedura seca para cada metro cúbico produzido (Carvalho, 2001).

De acordo com as informações de mercado dão conta que na safra 96/97 foram produzidos e comercializadas aproximadamente 25000 toneladas de levedura. Os valores estão ao redor de R\$ 300,00 a tonelada de levedura.

As leveduras possuem de 50 a 70% de proteína bruta (nitrogênio x 6,25) sendo que aproximadamente 20% do nitrogênio é não protéico, sendo derivados de ácidos nucleicos e outros constituintes. Os carboidratos representam 20 a 30% da matéria seca das células,

sendo na grande maioria polissacarídeos localizados na parede celular (15 a 20% de glicanas e mananas) e, em menor proporção, carboidratos de reserva energética (glicogênio e trealose) (Carvalho, 2001).

Além de leveduras, as bactérias, fungos e algas podem remover metais pesados e partículas radiativas de soluções líquidas (Muralleedharan et al., 1994), sendo ótimos bioissorventes.

As características mais procuradas num bioissorvente são capacidade de bioissorção, seletividade aos diferentes íons metálicos, fácil recuperação, compatibilidade com processo a ser realizado e principalmente baixo custo (Fourest & Volesky, 1996; Kapoor & Viraraghavan, 1995). Raramente um bioissorvente preencherá todos estes requisitos.

O conhecimento da estrutura química dos bioissorventes é essencial para modelar e prever seus desempenhos em ligar metais em sistemas de purificação de água. A efetividade global de um bioissorvente em remover metais depende também da faixa de concentração, pH da solução, cinética da reação, equipamento de sorção e composição do efluente (Volesky et al., 1993).

A identificação dos sítios de ligação em bioissorventes eficientes seria útil no processo de seleção de novos tipos de biomassa, bem como na tentativa de melhorar suas propriedades complexantes através de processos químicos, físicos, ou biológicos (Fourest & Volesky, 1996).

Saccharomyces cerevisiae apresenta parede celular rígida (Pelczar, 1981) e altamente complexa, que representa um sítio adicional de bioissorção, em relação às células desprovidas de parede (Brady et al., 1994). O seqüestro de íons metálicos pelas paredes celulares é constituído por duas fases, a primeira constitui uma ligação direta nos grupos funcionais e a segunda composta por uma interação físico-químico, que é chamada de fenômeno de adsorção (Kapoor & Viraraghavan, 1995).

A composição das paredes celulares das células microbianas pode ser influenciada pelas condições de cultura, o que resultam em variações consideráveis na capacidade de bioissorção (Gadd, 1990).

As paredes de bactérias, algas, fungos e leveduras são eficientes bioissorventes metálicos, onde as ligações covalentes e iônicas podem estar envolvidas na adsorção, como principais constituintes proteicos e polissacarídicos. Em várias espécies, a adsorção pode ser a maior proporção da retenção total ou bioissorção. Isto é especialmente verdadeiro

para metais pesados como chumbo e alumínio, e radioativos como urânio e tório (Gadd, 1990).

Além da parede celular, outros constituintes celulares são capazes de remover íons metálicos em solução. Brierová et al. (2002) observaram que vários constituintes celulares apresentavam teores diferentes de acúmulo de cádmio. Células de *S. cerevisiae* removeram 23% de cádmio, enquanto o citosol e proteínas extracelulares, removeram respectivamente 35 e 6%. Observaram, também, que a parede celular possui a maior capacidade de remoção, aproximadamente de 36%. A maioria das espécies estudadas apresentaram maior retenção de cádmio na parede e no citosol.

Células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* seqüestram íons metálicos por um mecanismo bifásico, consistindo numa rápida ligação superficial seguida de uma lenta absorção intracelular (Huang et al., 1990).

A bioissorção de metais por células vivas é um fenômeno que depende de fatores como, tempo de contato, pH da solução metálica, concentração inicial do íon metálico, concentração celular, tipo de microrganismo utilizado e condições de cultura (Itoh et al., 1975; Brierley et al., 1986; Kuyucak, 1990; Gadd, 1992; Kapoor & Viraraghavan, 1995).

A biomassa microbiana é capaz de seqüestrar íons metálicos de soluções aquosas, mesmo quando as células estão mortas (Modak & Natarajan, 1995; Modak et al., 1996).

O emprego da biomassa morta eliminaria os problemas de toxicidade e aspectos econômicos, como suplementação de nutrientes e manutenção de culturas. No uso de biomassa morta, estão envolvidas forças químicas, físicas e iônicas de adsorção independente do metabolismo (Sekhar et al., 1998). E vantagens sobre células vivas, que são mais sensíveis às concentrações iônicas e condições de pH e temperatura, além da dificuldade de regeneração do bioissorvente (Kapoor & Viraraghavan, 1995).

Estudos realizados demonstraram que a biomassa viva ou morta de *S. cerevisiae* diferem em relação à capacidade de acumular íons, onde células mortas de *S. cerevisiae* removeram 40% mais urânio e zinco de soluções aquosas, quando comparada à biomassa viva (Volesky & May-Phillips, 1995). A concentração de íons metálicos por leveduras mortas tem atraído atenção nos últimos anos (Domingos, 1997), comprovando a eficiência no uso da biomassa morta na remoção de metais pesados e fácil recuperação posterior da biomassa (Brady & Duncan, 1994).

As células podem ser mortas por processos físicos usando calor, autoclavagem, secagem a vácuo, processos químicos ou mecânicos (Pelczar, 1981).

2.3 A biossorção

O termo "biossorção" define um "processo onde se utiliza sólidos de origem vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido" (Cossich et al., 2000). A biossorção é caracterizada por ser um processo com duas fases, a primeira independente de energia e atividade metabólica que chamamos de adsorção e, a segunda, dependente de energia e do metabolismo, a absorção (Strandberg et al., 1985).

A biossorção é um importante componente no tratamento de efluentes líquidos e o desenvolvimento de bioprocessos flexíveis com a possibilidade de reutilização de biomassa industrial (de panificação, cervejarias, destilarias e de células imobilizadas) torna este estudo atrativo.

Para soluções com concentração iônica entre 1 a 100 mg.L⁻¹ os tratamentos convencionais com precipitação e coagulação são menos efetivos e mais caros. Tais tratamentos apresentam desvantagens como, incompleta recuperação dos metais, alto custo dos reagentes, alto requerimento de energia e podem gerar outros produtos que necessitam de depósito, ou tratamento (Sekhar et al., 1998). Outra vantagem dos tratamentos biológicos é a remoção do metal do efluente industrial e não sua simples mudança de fase (Novais, 1992).

Bactérias, fungos, leveduras e algas são microrganismos que apresentam capacidade de remover metais pesados de soluções aquosas (Muraleedharan et al., 1991). A biossorção poderia ser utilizada para remoção de metais preciosos, como ouro e prata (Mullen, 1992).

Há vários grupos químicos que poderiam atrair e reter metais na biomassa: grupos acetamidas da quitina, polissacarídeos estruturais de parede celular de fungos, grupos aminas e fosfatos em ácidos nucleicos, grupos amidos, sulfidrilas e carboxilas em proteínas, e grupos hidroxilas em polissacarídeos (Volesky & Holan, 1995). Os grupos carboxílicos têm sido identificados como um dos principais ligantes de metais (Majidi et al., 1990).

A bioabsorção de metais segue mecanismos complexos, principalmente troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços da rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (Volesky & Holan, 1995).

Os mecanismos pelos quais microrganismos removem metais de solução são:

- a) acumulação extracelular/precipitação;
- b) sorção na superfície celular ou complexação;
- c) acumulação intracelular.

Células vivas e mortas são capazes de acumular metais, podendo apresentar diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, dependendo da extensão da dependência metabólica (Gadd, 1990).

A bioabsorção depende de parâmetros como pH, tipo do metal, concentração do íon, concentração de biomassa, volume e temperatura (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Gadd et al. (1988) afirmaram que a absorção depende exclusivamente de fatores como pH, tempo de residência, concentrações dos íons metálicos e da biomassa, além do estado fisiológico da cultura. Kapoor & Viraraghavan (1995) também consideram a ocorrência de pré-tratamento físico ou químico da biomassa e a presença de vários ligantes na solução.

Vários estudos vêm sendo realizados com a utilização de biomassa na remoção de metais pesados do ambiente. Huang et al. (1990) demonstraram que a remoção de metais pesados por células de *S. cerevisiae* foi bifásica, consistindo inicialmente em uma ligação iônica superficial rápida, seguida por outra, mais demorada de absorção intracelular.

Esta ligação inicial entre o íon metálico e a parede celular, a adsorção, é rápida, mas existe uma variação significativa segundo os autores dos estudos, 4 segundos (Crist et al., 1988), 5 a 15 minutos (Kuyucak & Volesky, 1989) e 3 minutos (Volesky & Holan, 1995).

A segunda fase, que chamamos de absorção, pode ocorrer nas primeiras cinco horas de contato entre a biomassa e a solução de sal de cádmio (Adamis et al, 2003), podendo se manter constante após o máximo de absorção em células vivas, uma vez que a presença do metal induz uma certa toxicidade e impõe à célula mecanismos de defesa. Crist et al. (1988) consideram o máximo de absorção em duas horas.

Além do tempo de contato, outro fator importante que deve ser considerado é o pH. A bioabsorção de metais por fungos vivos é sensível à mudança de pH (Huang et al, 1990;

Sekhar et al., 1998). O pH influencia a remoção de íons metálicos, talvez, pela competição dos prótons e íons por ligantes da parede celular (Doyle et al., 1980; Garnham et al., 1993).

Sekhar et al. (1998) estudaram a remoção de metais em pH variando entre 1 a 7, e obtiveram o maior seqüestro de íons entre valores 4 e 5, sendo que o acúmulo se manteve constante até valores de pH próximos a 7.

Outros estudos de bioissorção utilizando algas e fungos descreveram o melhor pH estava entre 2,0 a 5,0 (Volesky & Holan, 1995), concluíram, também, que a bioissorção pode tornar as soluções ácidas devido à transferência de prótons e mudança de estado físico do metal.

Alguns metais microprecipitam em pH próximos a 5,0 e 6,0, sendo os ensaios conduzidos em condições de pH inferiores, principalmente quando se estuda a bioissorção para metais como zinco, cobre e prata (Volesky & Holan, 1995).

A interação entre a bioissorção e a concentração de biomassa, pode apresentar efeitos antagônicos. Assim pode-se encontrar menores remoções com o emprego de grandes quantidades de biomassa, devido a interações eletrostáticas dos grupos funcionais na superfície celular, diminuindo a área celular superficial da biomassa em contato com a solução de sal (Kiff & Little, 1986). Isso ocorreria porque deve-se a reações de trocas iônicas entre a superfície celular e o íon metálico e a complexação com os mesmos grupos funcionais (Strandberg et al., 1985). Também observaram maiores remoções de metais em concentrações menores de biomassa.

O entendimento dos mecanismos pelos quais os microrganismos acumulam metais é importante para o desenvolvimento de processos de concentração, remoção e recuperação de metais de soluções aquosas. Por exemplo, o conhecimento das reações químicas, ou fisiológicas durante a bioissorção metálica poderia possibilitar a especificação e controle dos parâmetros do processo para aumentar a velocidade, quantidade e especificidade da acumulação metálica, bem como selecionar bioissorventes eficientes, avaliando novos tipos de biomassa, melhorando suas propriedades complexantes através de processos químicos ou biológicos (Fourest & Volesky, 1996).

Cossich et al. (2000) concluíram que para a implementação de uma nova tecnologia de acumulação de metais pesados, uma série de requisitos devem ser estabelecidos para a competitividade técnica e econômica do processo, onde:

- a biomassa deve ter capacidade de acumulação elevada, da ordem de 70 a 100 mg metal por grama biomassa seca;
- a bioissorção e a dessorção devem ser rápidas e eficientes;
- o material biológico deve apresentar baixo custo, ser reutilizável, e ser adaptável a diferentes configurações de reatores;
- a separação do metal retido deve ser fácil e de baixo custo.

Os estudos de bioissorção são importantes, podendo promover futuramente o entendimento das bases moleculares da sensibilidade a metais pesados e gerar informações sobre mecanismos de destoxificação, prevenção de doenças e recuperação total de metais do ambiente.

Esses estudos preliminares de sistemas de bioissorção são usualmente baseados em dois tipos de investigação, sendo o primeiro, a bioissorção de metais em lotes, em quantidades determinadas (Volesky & Holan, 1995). Com base nesse primeiro tipo de investigação, o objetivo deste trabalho foi determinar a bioissorção de cádmio por leveduras mortas e vivas, estabelecendo parâmetros de bioissorção como concentração ideal de cádmio por grama de levedura a ser utilizada, tempo de residência do bioissorvente e determinar a bioissorção de cádmio em diferentes pH. Sugere-se para o futuro, o segundo tipo de investigação, a determinação de bioissorção em sistemas contínuos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética de Leveduras, no Departamento de Genética, ESALQ - USP.

3.1 Material

3.1.1 Leveduras

Foram utilizadas células liofilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, da marca comercial Lassaffre, SAF Argentina - Indústria Argentina, importado e distribuído por SAF do Brasil Produtos Alimentícios Ltda.

3.1.2 Sal de Cádmio

O sal utilizado foi o Acetato de Cádmio (Synth), de fórmula molecular $CdC_4H_6O_4 \cdot 2H_2O$ e peso molecular 302,53.

3.2 Métodos

3.2.1 Água

Para eliminar possíveis problemas de contaminação de cádmio por fonte externa, foi utilizada água deionizada em todas as etapas.

3.2.2 Vidrarias

Todos os materiais laboratoriais reutilizáveis utilizados nos ensaios foram lavados e secos, posteriormente imersos em solução ácida preparada de acordo com Smoley (1992) (ácido nítrico, ácido clorídrico e água deionizada - 1:2:7) por quatro horas e novamente lavados com água deionizada e secos a 50°C em estufa com circulação forçada.

Ao término das análises, os materiais utilizados foram novamente lavados e tratados com a solução ácida.

3.2.3 Biomassa

Foram realizados ensaios com biomassa viva e morta por calor. A morte celular da biomassa liofilizada foi realizada por calor seco, em estufa a 100°C durante 36 horas. Para verificação da morte celular foram realizados testes de coloração com azul de metileno (Moraes & Alves, 1986) e inoculação em meio sólido de YEPD (1% de Extrato de Levedura, 1% de Peptona, 2% de Dextrose e 2% de Ágar) (Anexo A). A biomassa foi reservada em dessecador de vidro durante o período dos testes.

A concentração de biomassa foi estabelecida por estudos de bioadsorção anteriores (Itoh et al, 1975; Volesky et al, 1993) sendo os ensaios conduzidos com 1 e 2 g de levedura liofilizada.

3.2.4 Soluções de sal de cádmio

As concentrações de sal de cádmio comumente utilizadas em ensaios de bioadsorção estão entre 10 a 200 mg Cd.L⁻¹ (Volesky & Holan, 1995) e neste estudo utilizamos concentrações entre 10 a 100 mg Cd.L⁻¹.

Por se tratar de um sal higroscópico, o acetato de cádmio foi previamente seco em estufa a 56°C durante 12 horas e acondicionado em dessecador de vidro durante todo o experimento.

As soluções de sal de cádmio foram preparadas nas concentrações iniciais (Ci) de 100; 80; 60; 40; 20 e 10 mg Cd.L⁻¹. A cada repetição foi preparada uma solução estoque de 100 mg Cd.L⁻¹, dissolvendo-se 0,269 g CdC₄H₆O₄.2H₂O em 1 litro de água deionizada.

A partir desta solução estoque prepararam-se as demais soluções, adicionando os volumes de 160; 120; 80; 40 e 20 mL da solução estoque em balões volumétricos de 200 mL e volume completado com água deionizada, para a obtenção das respectivas concentrações iniciais (C_i) de 80; 60; 40, 20 e 10 mg Cd.L^{-1} .

3.2.5 Avaliação da capacidade de bioissorção de cádmio e tempo de residência

As unidades experimentais foram frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, compostas por 1 ou 2 g de biomassa, adicionadas de 50 mL de solução (Fig.1). Neste volume a massa de cádmio adicionada (M_i) foi equivalente a 5; 4; 3; 2; 1 e 0,5 mg de Cd.50 mL^{-1} , ou simplesmente:

$$\text{Massa inicial de Cádmio (Mi): } C_i * 0,05\text{L.}$$

Onde: C_i : concentração inicial (mg Cd.L^{-1});

0,05: volume utilizado (50 mL).

O tempo de contato entre a biomassa e a solução de sal de cádmio, também chamado de tempo de residência do bioissorvente, de acordo com Volesky (1990) foi fixado em 16 horas, sendo que tempos superiores seriam desnecessários. Diante deste fato estabeleceu-se o tempo de residência máximo de 16 horas, e tempos inferiores de 0; 2; 4; 8 e 16 horas.

Figura 1– Procedimentos realizados para montagem dos ensaios de bioissorção

A temperatura para os ensaios foi proposta em 25°C de acordo com Norris & Kelly (1977), sob agitação constante de 150 rpm. Outro fator que poderia influenciar na bioadsorção, como o pH foi estudado após os primeiros ensaios deste trabalho.

Ao final dos tempos de residência foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada frasco, e centrifugados a 2000 g durante 10 minutos. Foram retiradas do sobrenadante alíquotas de 4 mL, as quais foram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e armazenados sob refrigeração até o momento da leitura, sendo o tempo não superior a 24 horas. Para a leitura em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (marca Varian, modelo AA175) as alíquotas foram diluídas 10 vezes.

Foram utilizados como controle dos ensaios, frascos tipo Erlenmeyer contendo apenas água e biomassa, com o objetivo de reduzir o efeito de possíveis erros causados pela presença de material orgânico liberado pela biomassa. Juntamente à outros frascos com somente soluções de sal de cádmio nas diferentes concentrações, analisando o comportamento do sal de cádmio durante todo o tempo de residência e se ocorreriam ligações do íon cádmio a radicais possivelmente presentes nos frascos.

3.2.6 Determinação da massa de cádmio na solução

A concentração final (C_f) de cádmio presente nas amostras obtidas no item 3.2.5, foi determinada diretamente por uma curva padrão (preparada a cada repetição), por substituição direta dos valores de absorbância, obtidos por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA), em $\lambda=228,8$ nm e fenda espectral de 0,5 nm, o gás utilizado foi o acetileno PA.

A massa residual ou final (M_f) de cádmio presente no sobrenadante foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Massa residual de cádmio: } C_f \cdot 10 \cdot 0,05$$

Onde: C_f : concentração final (mg Cd.L^{-1});

10: fator de diluição;

0,05: volume utilizado (50 mL).

3.2.7 Determinação da massa de cádmio bioissorvida pela biomassa

A massa de cádmio bioissorvida pela biomassa viva e adsorvida pela biomassa morta foram calculadas da mesma forma.

A massa de cádmio bioissorvida (mg), ou retida na biomassa, foi determinada pela diferença entre a massa de cádmio adicionada (C_i) e a massa de cádmio residual (C_f) na solução sobrenadante.

Então:

$$\begin{aligned} \text{Massa de cádmio adicionada: } C_i (\text{mg Cd.L}^{-1}) * 0,05 \text{ L} \\ C_i * 0,05 \end{aligned}$$

$$\text{Massa de cádmio restante: } C_f * 10 * 0,05 \text{ L}$$

$$\text{Massa de cádmio bioissorvida (mg): } 0,05 * (C_i - 10 C_f)$$

3.2.8 Determinação da bioissorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes pH

O pH é um parâmetro que pode influenciar na bioissorção de cádmio (Sekhar et al., 1996). Então, para verificar o efeito do pH na bioissorção e adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas soluções de 80 e 40 mg Cd.L⁻¹ e 1 g de biomassa, com pH ajustado para 4,0; 7,0; e 10,0. O ajuste do pH foi realizado utilizando-se hidróxido de sódio - NaOH (0,75N) e ácido clorídrico - HCl (0,75N).

A solução estoque de 80 mg Cd.L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,2154 g CdC₄H₆O₄.2H₂O em 1 litro de água deionizada. A solução de 40 mg Cd.L⁻¹ foi obtida adicionando 100 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 200 mL.

Os tempos de residência foram de 0; 2; 4; 6, 8 e 12 horas. A determinação da massa de cádmio bioissorvida e adsorvida pela biomassa foi realizada como descrita no item 3.2.7.

3.2.9 Determinação da quantidade de proteínas solúveis no sobrenadante

A determinação da concentração de proteínas no sobrenadante foi realizada pelo método de Bradford (1976) em microplacas utilizando BSA (Albumina Bovina) como padrão.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada amostra, e transferidas para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Estes tubos foram acondicionados durante toda a análise em gelo, e centrifugados a 10000 g durante 10 minutos.

Do sobrenadante foram transferidos 20 µL da amostra para três poços da placa ELISA (triplicata), em seguida foi adicionado 200 µL do reagente de Bradford (8 mg de Coomassie Brilliant Blue - G250, 5 mL de Etanol 95%, 10 mL de Ácido Orto Fosfórico (H_3PO_4) e completado para 100 mL com água deionizada) diluído 1:1 com água deionizada no momento da aplicação.

A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA marca Bio-Rad, modelo 550, em $\lambda=595$ nm.

3.2.10 Delineamento Experimental

O experimento seguiu o Delineamento Fatorial Inteiramente Casualizado com 3 repetições, e a análise dos dados foi realizada pelo SANEST.

3.2.11 Destino do material contaminado

Todo o material (biomassa/soluções) contaminado foi acondicionado em recipiente plástico com tampa e submetido à secagem em estufa com circulação de ar forçada a 50° C, até a evaporação do material líquido. O recipiente com o material residual seco foi armazenado em local seguro, para posterior descarte apropriado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados no presente trabalho, foram testados os efeitos dos fatores: Concentração de Biomassa (Cbio), Tipo de Biomassa (Tbio), Tempo de Residência (Tempo) e Concentração de Cádmio (CCd) e suas interações, sobre a bioissorção de cádmio. Todos os fatores individualmente (Tabela 1) tiveram efeito significativo sobre a bioissorção de cádmio (Prob.>F=0,0001). As interações simples Cbio*CCd, Tbio*Tempo e Tbio*CCd foram significativas, também sendo significativa (1,64%) a interação Cbio*Tbio*CCd (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de bioissorção de cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae* - Análise de Variância

Fontes de Variação	GL	QM	Prob.> F
Concentração de Biomassa (Cbio)	1	0,735	0,00078
Tipo de Biomassa (Tbio)	1	19,390	0,00001
Tempo	4	0,554	0,00001
Concentração de Cd (CCd)	5	92,070	0,00001
CBio * TBio	1	0,122	0,14400
CBio * Tempo	4	0,133	0,05949
CBio * CCd	5	0,340	0,00013
Tbio * Tempo	4	0,307	0,00069
Tbio * CCd	5	1,913	0,00001
Tempo * CCd	20	0,055	0,51590
Cbio * Tbio * Tempo	4	0,037	0,63650
Cbio * Tbio * CCd	5	0,165	0,01640
Cbio * Tempo * CCd	20	0,037	0,87510
Tbio * Tempo * CCd	20	0,038	0,86000
Cbio * Tbio * Tempo * CCd	20	0,013	0,99960
Resíduo	240	0,058	
Total	359		
Média Geral = 2,056	CV (%) = 11,74		

O detalhamento das análises quanto às interações simples $C_{bio} \times CCd$ e $T_{bio} \times CCd$, será discutido adiante, conjuntamente com a interação tripla $C_{bio} \times T_{bio} \times CCd$, uma vez que a mesma evidencia melhor os resultados obtidos.

Analisando o efeito do tipo de biomassa (viva ou morta) sobre as médias de bioabsorção de cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae*, em cada tempo de residência, constatou-se que em todos os tempos a biomassa morta adsorveu significativamente mais cádmio que a biomassa viva (Tabela 2). Entretanto há um diferencial expressivo na bioabsorção de cádmio, entre a biomassa viva e morta (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 2. Médias de bioabsorção de cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae* - interação entre o tempo de residência e o tipo de biomassa - Teste de Tukey

Tipo de Biomassa	Médias*	5%	1%
Todos os tempos			
Morta	2,288	A	A
Viva	1,825	B	B
Zero hora			
Morta	2,187	A	A
Viva	1,697	B	B
Duas horas			
Morta	2,313	A	A
Viva	1,687	B	B
Quatro horas			
Morta	2,317	A	A
Viva	1,966	B	B
Oito horas			
Morta	2,328	A	A
Viva	1,790	B	B
Dezesseis horas			
Morta	2,295	A	A
Viva	1,984	B	B
D.M.S. 5% = 0,1065		D.M.S. 1% = 0,1393	

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey

Os valores de bioabsorção da biomassa viva ajustaram-se a regressões de 1º, 3º e 4º grau (Tabela 3). A equação de 1º grau indicou que houve um aumento significativo da bioabsorção à medida que aumentou o tempo de exposição. Mas, essa conclusão não evidencia todas as variações que ocorrem durante as 16 horas de exposição da biomassa viva ao

cádmio (Figura 2), tanto que o ajuste das médias de bioabsorção para esta equação foi de apenas aproximadamente 50%, indicando que este ajuste não considera o pico de quatro horas como o de maior acúmulo de cádmio. Os ajustes significativos para as equações de 3º ($R^2=70\%$) como de 4º grau ($R^2=100\%$) sugeriram uma tendência mais aproximada das variações ocorridas durante bioabsorção de cádmio pela biomassa viva. A primeira destas não considera a diferença de bioabsorção entre o tempo zero e duas horas. A equação de grau 4 é a que melhor explicou as variações ocorridas nas médias de bioabsorção de cádmio pela biomassa viva (Prob.>F=0,00013) (Figura 2). Ambas equações sugerem que as variações ocorridas neste período de exposição ao cádmio foram em função dos fatores estudados e não devido ao acaso, devido aos altos ajustes dos dados às equações de regressão e, portanto, tende a se manter em experimentos semelhantes (Tabela 3).

Tabela 3. Médias de bioabsorção de cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae* - Interação entre o tempo de residência e o tipo de biomassa -Regressão Polinomial

Regressão (Prob. > F)	Equação	R ² (%).
Biomassa Viva		
0,00002	$y = 1,73 + 0,016x$	0,49
0,005	$y = 1,658 + 0,103x - 0,016x^2 + 0,0007x^3$	0,69
0,00013	$y = 1,697 - 0,186x + 0,124x^2 - 0,018x^3 - 0,018x^4$	1,00
Biomassa Morta		
0,0231	$y = 2,219 + 0,029x - 0,00154x^2$	0,74

Os dados (Tabela 2 e Figura 2) demonstraram que o comportamento da biomassa morta teve uma maior bioabsorção de cádmio em todos os tempos estudados, mas não indicou uma alteração na quantidade de cádmio bioabsorvido após as duas primeiras horas de residência. Não houve portanto, um ajuste linear dos dados (Prob. >F=0,224, $R^2=16,5\%$), mas um ajuste a equação de 2º grau ($R^2=74\%$) (Tabela 3), indicando que houve um aumento significativo entre o tempo zero e duas horas de exposição, e que não ocorreu diferenças entre os demais tempos de residência (Figura 2).

Figura 2 – Padrão de bioabsorção de cádmio para a interação entre os níveis de tempo de residência e o tipo de biomassa

Os resultados expostos na tabela 3 evidenciaram alguns aspectos relevantes do processo de bioabsorção do cádmio por *S. cerevisiae*. Em primeiro lugar, cabe destacar que há uma diferença significativa entre as quantidades de cádmio bioabsorvido entre a biomassa morta e viva (Anexos B e C), como já demonstrado na Tabela 2. Observou-se que, em média, ocorreu uma redução de cerca de 20% na quantidade de cádmio seqüestrado na biomassa viva. Neste caso a membrana celular permaneceu intacta e permeável seletivamente, dificultando a entrada de soluto e dos íons cádmio (Adamis *et al.*, 2003) mantendo assim os gradientes de concentração (Volesky & Holan, 1995).

Em segundo lugar, evidenciou-se na figura 2 uma expressiva diferença nos padrões de bioabsorção da biomassa viva e morta, isso pode ter ocorrido em função dos processos biológicos de defesa à toxidez provocada pela presença do cádmio e produção de proteínas para detoxificação celular (Adamis *et al.*, 2003).

Esses resultados indicaram que a biomassa morta, talvez seja mais indicada para uma aplicação prática, pelos motivos de aproveitamento de resíduos agro-industriais e pela maior capacidade total de bioissorção em todos os tempos de residência. Não foram observadas variações na quantidade (mg) de cádmio bioissorvido depois de duas horas de exposição ao cádmio (Figura 2 e Anexo B), ainda que o ajuste dos dados seja à curva de segundo grau e indique um pico de maior capacidade de bioissorção a partir de duas horas de exposição, e que o pico máximo (ponto de inflexão) estimado pela equação ocorreria em 9 horas do tempo de residência para a biomassa morta.

Crist et al. (1988) demonstraram que a acumulação de cádmio em biomassa morta pode ocorrer aproximadamente em 2 horas, o que pode ser observado após as primeiras horas de residência, onde ocorreu uma estabilização da bioissorção dos íons (Anexo B), o que também foi constatado por Adamis *et al.* (2003), demonstrando uma adsorção "constante". Isso pode ser explicado pelos complexos formados entre o cádmio e os constituintes celulares presentes no meio (Norris & Kelly, 1977).

Já o observado (Figura 2) para a bioissorção de cádmio na biomassa viva (Anexo C), sugeriu uma possível resposta biológica à toxicidade do cádmio, associada ao tempo de exposição. Constataram dois picos significativos de maior bioissorção de cádmio, respectivamente em 4h e 16h. Esses picos podem corresponder, por exemplo, à atividade de diferentes tipos de enzimas do sistema antioxidante da célula, e aos mecanismos de defesa celular na presença do cádmio, como produção de proteínas exógenas capazes de se ligarem ao íon metálico o qual é extremamente tóxico (Brady & Duncan, 1994).

Detalhando-se as análises de média de bioissorção de cádmio por *S. cerevisiae* para evidenciar os efeitos da interação tripla entre os fatores tipo e quantidade de biomassa e concentrações de cádmio, constatou-se que tanto para a biomassa viva como para a morta, nos níveis 0,5 e 1 mg de cádmio não houve diferenças significativas entre a bioissorção deste metal, mas sim, nos demais níveis, quando a capacidade da biomassa morta mostrou-se significativamente superior à biomassa viva (Tabela 4).

Essa diferença pode ser explicada por um possível mecanismo de defesa característico da célula viva, que impede a bioissorção do metal, mecanismo este que, eventualmente estava ausente na célula morta.

Tabela 4. Médias de bioabsorção de Cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae*, interação entre o tipo e a quantidade de biomassa e as concentrações de cádmio - Teste de Tukey

Tipo de Biomassa	Médias*	5%	1%	Tipo de Biomassa	Médias*	5%	1%
1 g de biomassa				2 g de biomassa			
0,5mg Cd				0,5mg Cd			
Morta	0.497	A	A	Morta	0,497	a	A
Viva	0.449	A	A	Viva	0,417	a	A
1 mg de Cd				1 mg de Cd			
Morta	0.989	A	A	Morta	0,997	a	A
Viva	0.870	A	A	Viva	0,834	a	A
2 mg Cd				2 mg Cd			
Morta	1.925	A	A	Morta	1,949	a	A
Viva	1.653	b	B	Viva	1,647	b	B
3 mg Cd				3 mg Cd			
Morta	2,688	A	A	Morta	2,700	a	A
Viva	2,026	b	B	Viva	2,184	b	B
4 mg Cd				4 mg Cd			
Morta	3,379	A	A	Morta	3,510	a	A
Viva	2,692	b	B	Viva	2,754	b	B
5 mg Cd				5 mg Cd			
Morta	4,091	A	A	Morta	4,236	a	A
Viva	2,877	b	B	Viva	3,495	b	B
DMS 5% = 0,1065				DMS 1% = 0,1393			

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey

Tabela 5. Médias de bioabsorção de cádmio (mg) por *Saccharomyces cerevisiae* - interação entre as concentrações de cádmio e a concentração e tipo de biomassa - Regressão Polinomial

Concentração de cádmio	Regressão (Prob.>F)	Equação	R ² (%)
1 grama			
viva	0,00001	y= 0,346 + 0,548x	96,96
	0,00001	y= 0,019 + 0,918x - 0,068x ²	99,32
Morta	0,00001	y= 0,211 + 0,794x	99,53
	0,00167	y= 0,012 + 1,019x - 0,042x ²	99,95
2 gramas			

viva	0,00001	$y = 0,172 + 0,665x$	99,48
	0,01746	$y = -0,185 + 1,277x - 0,242x^2 + 0,027x^3$	99,95
Morta	0,00001	$y = 0,177 + 0,827x$	99,70
	0,00954	$y = 0,018 + 1,008x - 0,033x^2$	99,96

Quanto à interação entre os níveis de cádmio e a biomassa (Tabela 5), observamos que para 1 grama de biomassa viva e morta foram significativas as equações lineares e quadráticas, indicando que ao aumentar os níveis de cádmio ocorreu um aumento na quantidade de cádmio bioissorvido.

O ajuste dos dados à uma equação quadrática para ambas as biomassas utilizadas, indicam um aumento na bioissorção com o aumento das concentrações de cádmio e mostram a tendência de um pico de bioissorção de cádmio. Pelas equações, estes picos (ou ponto de inflexão da curva) estimados pelas equações quadráticas ocorreriam em 6,8 e 12 mg Cd.50 mL⁻¹ solução, respectivamente para 1g de biomassa viva e morta. Esses dados demonstraram que embora ocorra visualmente um aumento na bioissorção (Figura 3), não foram atingidos os pontos de saturação estimados pelas equações.

Figura 3 – Médias de bioissorção de cádmio para a interação entre os níveis de concentração de cádmio e níveis de tipo e concentração de biomassa

A biossorção de cádmio para as concentrações (1 e 2 g) de biomassa viva ou morta mostraram uma tendência de comportamento semelhante para as duas concentrações de biomassa até 4,0 mg Cd (Figura 4). Isso demonstrou que até essa concentração de cádmio, a quantidade de biomassa não interferiu na quantidade média biossorvida. Diferindo apenas para a concentração de 5,0 mg Cd, onde indicou uma possível saturação da biomassa de 1g, enquanto que para a biomassa viva de 2 g ainda ocorreu um aumento na biossorção de cádmio. Esse resultado não foi observado quando utilizou a biomassa morta, demonstrando uma tendência semelhante para ambas as concentrações de biomassa morta (Figura 4).

A biossorção "semelhante" de cádmio para as concentrações de 1 e 2 g (Anexos D e E) de ambas as biomassas, até o nível de 4mg Cd pode ser atribuída as interações eletrostáticas dos grupos funcionais presentes na parede celular da levedura, causando uma aglomeração celular, diminuindo assim a área superficial de contato da biomassa com os íons de cádmio (Kiff & Little, 1986).

Os resultados demonstrados evidenciam alguns aspectos importantes do processo de biossorção do cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que sugerem a biomassa morta como a mais indicada para aplicação prática, principalmente por fatores onde o aproveitamento de resíduos agro-industriais e a possibilidade de aquisição fácil e barata, alia-se a uma "melhor" capacidade média de biossorção, quando comparada com a biomassa viva. Nas condições estudadas, a biossorção por biomassa morta foi aproximadamente 20% maior.

Também indicou um acúmulo de cádmio a partir de duas horas de exposição a biomassa morta, com pico de máximo "estimado" em aproximadamente 9 horas. Neste tempo teríamos o maior acúmulo de cádmio, mas haveria a necessidade de se estudar outros fatores como Econômico e Prático da aplicação no tratamento de efluentes, para a determinação de um tempo ótimo de residência, uma vez que, este estudo não foi realizado em fluxo contínuo, mas duas horas já seriam capazes de biossorver em media cerca de 94% do cádmio inicial. Também demonstrado por Crist et al. (1988) onde a acumulação de cádmio em biomassa morta ocorreria aproximadamente em até 2 horas.

Foi verificada após as primeiras horas de residência, uma estabilização da bioadsorção dos íons de cádmio, o que também foi constatado por Adamis *et al.* (2003), demonstrando uma adsorção quase “constante”. Isso pode se dever aos complexos formados entre o cádmio e os constituintes celulares presentes no meio (Norris & Kelly, 1977).

A diferença entre a bioadsorção da biomassa morta e viva, pode ser evidenciada pelos processos de defesa da célula à toxidez provocada pela presença do cádmio. A capacidade de bioadsorção reduzida na biomassa viva demonstrou a importância da presença da membrana celular, que neste caso permaneceu intacta e permeável seletivamente, mantendo os gradientes de concentração, e dificultando a bioadsorção do metal (Brady & Duncan, 1994; Volesky e Holan, 1995; Adamis *et al.*, 2003). Outro fator que pode explicar a menor bioadsorção pela biomassa viva, é a provável síntese de compostos protéicos para a destoxificação celular. Isso pode ser demonstrado pela presença de dois picos bioadsorção de cádmio, respectivamente em 4h e 16h. O detalhe prático disto, é que ao trabalhar com a biomassa viva seria desnecessário tempos de residência superiores a quatro horas, uma vez que os níveis estudados aqui dificilmente serão encontrados em efluentes industriais.

Outro dado importante, foi a semelhança entre as concentrações de biomassa (1 e 2 g) em relação a bioadsorção de cádmio para as concentrações de até 4,0 mg Cd, onde a concentração de biomassa não interferiu na quantidade média bioadsorvida de cádmio. Diferindo apenas na concentração de 5,0 mg Cd, sugerindo que não foi encontrado o ponto de saturação da biomassa estudada, e que 1 grama de biomassa morta poderia acumular cerca de 12 mg Cd.50 mL⁻¹ solução, e a biomassa viva poderia acumular aproximadamente 7 mg Cd.50 mL⁻¹ solução (de acordo com as equações de 2º grau - Tabela 5).

Em termos práticos há necessidade de verificação destes teores acumulados, uma vez que outros fatores podem estar envolvidos, como se torna importante uma verificação destes valores para a acumulação de cádmio em estudos de fluxo contínuo.

Também foi verificado neste estudo a bioadsorção de cádmio em diferentes pH, utilizando a biomassa viva e morta, mas em outros parâmetros, onde foi utilizado apenas 1 grama de biomassa e duas concentrações de cádmio, 40 e 80 mg. 50mL⁻¹ solução.

Não foi realizada a análise estatística destes dados, uma vez que o interesse era apenas verificar o comportamento da biomassa nestes pH e se este influenciaria na bioadsorção de cádmio. Este ensaio foi conduzido com apenas 1 grama de biomassa viva e morta nas concentrações de cádmio de 2 e 4 mg Cd.50 mL⁻¹. Com isso poderíamos observar o efeito do pH na bioadsorção e relacionar com os dados apresentados nos ensaios anteriores.

Os resultados observados na Figura 4 e Anexo F do ensaio com células mortas, e concentração inicial de 2 mg Cd.50 mL⁻¹, mostraram o padrão de maior adsorção para o pH 7,0, e menor adsorção para o pH 4,0, ficando o pH 10,0 em situação intermediária entre as duas anteriores.

Figura 4 – Teores de cádmio adsorvido (mg Cd.g⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* mortas e concentração de 2,0 mg Cd.50 mL⁻¹

Neste ensaio observamos, também, que independentemente do pH, o pico máximo de adsorção permaneceu, como nos ensaios anteriores após duas horas de contato. A adição de ácidos e bases fortes para a correção do pH, podem apresentar um sítio de competição com o cádmio (Garnham et al.,1993) diminuindo assim a capacidade adsorptiva do mesmo. Em face destes resultados, a linhagem *S. cerevisiae* empregada no presente trabalho, nestes pH, pode ser considerada como valores medianos na bioadsorção de cádmio como já descrito por Volesky (1994).

Os dados apresentados na Figura 5 e Anexo G onde se utilizou a concentração inicial de $4 \text{ mg Cd} \cdot 50 \text{ mL}^{-1}$ demonstram que o tempo ótimo de adsorção permanece em 2 horas e a capacidade de adsorção diminuiu devido aos mesmos fatores do ensaio anterior. Para o pH 7,0 os resultados apresentaram um acúmulo de cádmio superior aos encontrados no ensaio conduzido em pH 6,0 (experimento inicial).

Figura 5 – Teores de cádmio adsorvido ($\text{mg Cd} \cdot \text{g}^{-1}$ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* mortas e concentração de $4,0 \text{ mg Cd} \cdot 50 \text{ mL}^{-1}$

Para os ensaios de adsorção (biomassa morta), o pH teve efeito significativo, principalmente na concentração de 2 mg Cd , apresentando menor adsorção em relação aos demais ensaios, demonstrando que ocorre uma competição entre as cargas positivas pelos sítios de ligação presentes na parede celular e em outros constituintes, uma vez que a disponibilidade de íons metálicos é menor (Garnham et al, 1993; Doyle et al, 1980).

O pH ótimo de adsorção é diferente para cada metal estudado, podendo variar entre 4,0 e 7,0. O pH ótimo para o ensaio de adsorção deve ser considerado e valores de pH acima do ótimo podem promover redução da solubilidade e microprecipitações, reduzindo a adsorção, como visto nos resultados apresentados por Sekhar et al (1998).

Em ambos os ensaios temos o pH ótimo de 7,0, sendo acumulados altos teores de cádmio em até 2 horas. Depois desse tempo de residência, observamos uma adsorção

"constante" e já esperada, pois a célula está desprovida de qualquer atividade metabólica (Sekhar et al., 1998).

Diferentemente do ocorrido com leveduras mortas, observamos que o cádmio é um elemento tóxico a células vivas e, que estas se comportam diferentemente quando expostas ao metal.

A bioissorção para a concentração inicial de 2 mg de cádmio, apresentou comportamentos semelhantes para os diferentes pH, mas com teores de cádmio acumulados diferentes (Figura 6 e Anexo H). O pico de bioissorção ocorreu em 4 horas e o teor máximo bioissorvido de cádmio de 0,6 mg em pH 7,0. Já em pH 10,0 e 4,0 os teores acumulados foram inferiores ao pH 7,0, sendo de 0,47 e 0,11 mg Cd, respectivamente.

Figura 6 – Valores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g⁻¹ biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* viva e concentração de 2,0 mg Cd.50 mL⁻¹

Os dados apresentados pela Figura 7 e Anexo I em ensaio com 4 mg de cádmio, apresentam maior bioissorção em pH 7,0 (Sekhar et al., 1998). Igualmente ao ensaio com biomassa morta em diferentes pH, tendo o pico de bioissorção ocorrido em 4 horas.

A menor bioissorção em pH 4,0 pode ser explicada pela competição entre prótons e conseqüentemente diminuindo a capacidade de bioissorção da célula (Garnham et al., 1993; Doyle et al., 1980).

Figura 7 – Teores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g^{-1} biomassa) nos diferentes pH em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* mortas e concentração de $4,0 \text{ mg Cd} \cdot 50 \text{ mL}^{-1}$

Nos demais pH, houve comportamento semelhante com teores de cádmio acumulados menores quando comparados à adsorção por leveduras mortas e solução de sal de cádmio na concentração de $2,0 \text{ mg Cd} \cdot 50 \text{ mL}^{-1}$ nos diferentes pH.

Através dos resultados apresentados, os processos de bioissorção são pH dependentes (Kuyucak et al, 1990) e a acumulação de cádmio pela biomassa viva é menor, isto pode ser devido aos fatores de proteção celular na presença do metal, isso poderia justificar a utilização de biomassa morta ou de reutilização de biomassa residual dos processos industriais (Brady & Duncan, 1994).

Já a concentração de proteínas solúveis no sobrenadante aumentou com o aumento da concentração de cádmio. Nos ensaios de adsorção (biomassa morta), a concentração de proteínas se mantém constante, enquanto que nos ensaios de bioissorção (biomassa viva) a concentração aumentou com o tempo de residência.

Na Figura 8 observamos uma alta concentração de proteínas nas primeiras horas, o que demonstrou a saída de constituintes celulares durante a reidratação (Adamis et al, 2003).

Figura 8 - Concentrações de proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* mortas e concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50 mL⁻¹

Durante o tempo de residência deste ensaio observamos que a saída de constituintes se mantém constante e a concentração de proteínas também, uma vez que não há metabolismo celular.

Figura 9 – Concentrações de proteínas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae* vivas e concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50 mL⁻¹

A toxidez do metal pode interferir tanto na quantidade acumulada de cádmio, como também na quantidade de proteínas presentes no sobrenadante, como observada na Figura 9. As células vivas sofrem estresse oxidativo pela presença de cádmio e respondem metabolicamente com a produção de proteínas, como metalotioneínas, para a destoxificação celular (Adamis et al, 2003).

Além do crescente teor de proteínas no sobrenadante com o aumento do tempo de residência, indicando processos normais de destoxificação, juntamente com a liberação de proteínas (biomassa viva) e a perda de material citoplasmático em função da ruptura da parede celular (em ambas as leveduras vivas e mortas) devido às altas concentrações celulares.

Nos tempos de residência a partir de 6 horas, as concentrações de proteínas se mostram semelhantes nas diferentes concentrações de cádmio, indicando que mesmo em baixas concentrações de cádmio apresentariam efeito tóxico para a célula, além da possível desorganização dos sistemas enzimáticos e da parede celular (Albertini, 2001).

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos anteriormente nos ensaios, podemos afirmar que:

- ❖ Leveduras mortas apresentam melhor capacidade na remoção de cádmio do que leveduras vivas. Podendo ser extremamente eficiente na remoção de cádmio de ambientes líquidos desde que sejam respeitados os parâmetros de bioissorção.
- ❖ O tempo de residência para a bioissorção de cádmio é de 2 horas para leveduras mortas e de 4 horas para leveduras vivas, sendo desnecessário tempos superiores.
- ❖ Quanto à capacidade de bioissorção de leveduras diante de nossos ensaios podemos afirmar que 1 g de levedura morta é capaz de adsorver até 4,2 mg Cd.50 mL⁻¹. e 1 g de levedura ativa é capaz de bioissorver até 3,1 mg Cd.50 mL⁻¹.
- ❖ O pH ótimo para os processos de bioissorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* situa-se entre 5.5 e 6.0.
- ❖ A concentração de proteínas no sobrenadante é diferente para os ensaios de bioissorção com biomassa viva e morta.
- ❖ A biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* necessária para o tratamento de efluentes contaminados por cádmio não deve ultrapassar a 20 g biomassa seca.L⁻¹ pois podem ocorrer efeitos antagônicos.

ANEXOS

Anexo A – Plaqueamento da biomassa ao longo de 48 horas de tratamento térmico em estufa à 100°C. Da esquerda para direita, tem-se 24, 36 e 48 horas de tratamento térmico

Anexo B . Valores de adsorção de cádmio (mg Cd.g^{-1} de biomassa) e respectiva porcentagem de adsorção (%) em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* mortas e soluções de sal nas concentrações iniciais (C_i) de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50 mL^{-1} e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 16 horas

C_i	Tempo de Residência (horas)				
	0	2	4	8	16
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
2,0	1,9	2,0	2,0	2,0	2,0
	(95)	(100)	(100)	(100)	(100)
3,0	2,6	2,7	2,7	2,7	2,7
	(87)	(90)	(90)	(90)	(90)
4,0	3,1	3,6	3,5	3,5	3,5
	(77)	(90)	(87)	(87)	(87)
5,0	3,7	4,3	4,2	4,2	4,2
	(74)	(86)	(84)	(84)	(84)

Anexo C . Valores de bio sorção de cádmio (mg Cd.g^{-1} de biomassa) e respectiva porcentagem de bio sorção (%) em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* viva e soluções de sal nas concentrações iniciais (C_i) de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\text{mg Cd . 50 mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 16 horas

C_i	Tempo de Residência (horas)				
	0	2	4	8	16
0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4
	(80)	(80)	(100)	(100)	(80)
1,0	0,8	0,7	1,0	0,9	0,9
	(80)	(70)	(100)	(90)	(90)
2,0	1,4	1,5	1,8	1,8	1,8
	(70)	(75)	(90)	(90)	(90)
3,0	1,9	1,9	2,1	2,0	2,1
	(63)	(63)	(70)	(67)	(70)
4,0	2,3	2,3	2,8	2,7	2,8
	(58)	(58)	(70)	(68)	(70)
5,0	2,5	2,5	3,1	3,0	3,1
	(50)	(50)	(62)	(60)	(62)

Anexo D . Valores de bioissorção de cádmio (mg Cd.2g^{-1} de biomassa) e respectiva porcentagem de bioissorção (%) em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* morta e soluções de sal nas concentrações iniciais (C_i) de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg Cd.50 mL^{-1} e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 16 horas

C_i	Tempo de Residência (horas)				
	0	2	4	8	16
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
2,0	1,88	1,99	1,97	1,96	1,93
	(94)	(99)	(99)	(98)	(97)
3,0	2,55	2,68	2,75	2,78	2,74
	(85)	(89)	(92)	(92)	(91)
4,0	3,35	3,60	3,51	3,54	3,54
	(84)	(90)	(88)	(89)	(88)
5,0	3,91	4,31	4,23	4,21	4,18
	(79)	(86)	(85)	(84)	(84)

Anexo E . Valores de bio sorção de cádmio ($\text{mg Cd.}2\text{g}^{-1}$ de biomassa) e respectiva porcentagem de bio sorção (%) em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* viva e soluções de sal nas concentrações iniciais (C_i) de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $\text{mg Cd.}50\text{ mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 16 horas

C_i	Tempo de Residência (horas)				
	0	2	4	8	16
0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5
	(80)	(80)	(100)	(80)	(100)
1,0	0,7	0,8	0,9	0,8	0,9
	(70)	(80)	(90)	(80)	(90)
2,0	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7
	(80)	(80)	(85)	(80)	(85)
3,0	2,1	2,1	2,3	1,9	2,2
	(70)	(70)	(76)	(63)	(73)
4,0	2,6	2,6	3,0	2,6	2,8
	(65)	(65)	(75)	(65)	(70)
5,0	3,1	3,3	3,5	3,3	3,4
	(62)	(66)	(70)	(66)	(68)

Anexo F . Valores de cádmio adsorvido (mg Cd.g^{-1} de biomassa) nos diferentes pH 4,0; 7,0 e 10,0 em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* morta e solução de sal na concentração inicial de $2,0 \text{ mg Cd.50 mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 12 horas

pH	Tempo de Residência (horas)					
	0	2	4	6	8	12
4	0,00	0,15	0,02	0,00	0,07	0,02
7	0,75	1,00	0,65	0,57	0,39	0,32
10	0,19	0,82	0,43	0,41	0,25	0,19

Anexo G . Valores de cádmio adsorvido (mg Cd.g^{-1} de biomassa) nos diferentes pH 4,0; 7,0 e 10,0 em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* morta e solução de sal na concentração inicial de $4,0 \text{ mg Cd.50 mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 12 horas

pH	Tempo de Residência (horas)					
	0	2	4	6	8	12
4	2,07	2,81	2,62	2,38	2,32	2,30
7	3,31	3,85	3,58	3,42	3,38	3,34
10	2,83	3,29	3,08	2,97	2,90	2,88

Anexo H . Valores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g^{-1} de biomassa) nos diferentes pH 4,0; 7,0 e 10,0 em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* vivas e solução de sal na concentração inicial de $2,0 \text{ mg Cd.50 mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 12 horas

pH	Tempo de Residência (horas)					
	0	2	4	6	8	12
4	0,00	0,00	0,11	0,00	0,05	0,03
7	0,05	0,39	0,60	0,38	0,29	0,23
10	0,00	0,28	0,47	0,25	0,21	0,16

Anexo I . Valores de cádmio bioissorvido (mg Cd.g^{-1} de biomassa) nos diferentes pH 4,0; 7,0 e 10,0 em ensaio realizado com *Saccharomyces cerevisiae* viva e solução de sal na concentração inicial de $4,0 \text{ mg Cd.50 mL}^{-1}$ e tempo de residência de 0; 2; 4; 8 e 12 horas

pH	Tempo de Residência (horas)					
	0	2	4	6	8	12
4	0,94	1,27	1,42	1,24	1,19	1,12
7	2,09	2,69	3,21	2,81	2,49	2,38
10	1,41	2,21	2,67	2,24	2,07	1,97

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIS, P.D.B.; PANEK, A.D.; LEITE, S.G.F.; ELEUTHERIO, E.C.A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brasiliian Journal of Microbiology**, v. 34, p.55-60, 2003.

ALBERTINI, S. Isotermas de adsorção de sais de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1999. 53p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ASHKENAZY, R.; YANNAI, S.; RAHMAN, R. Fixation of spent *Saccharomyces cerevisiae* biomass for lead sorption. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.52, p.608-611, 1999.

BAYAN, Y.K., KESKINLER, B.; ÇAKICE, A.; LEVENT, M.; AKAY, G. Removal of divalent heavy metal mixtures from water by *Saccharomyces cerevisiae* using crossflow microfiltration. **Water Resource**, v.35, n.9, p.2191-2200, 2001.

BEM, R.H.A.; SILVA, M.C.T.; GUSMÃO, N.B. Ocorrência de fungos em áreas poluídas por chumbo e de preservação ambiental em Belo Jardim – PE. <http://www.prosp.ufpe.br/comc97/ccb/RES-30080> (23 set. 2003).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADY, D.; DUNCAN, J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.149-159, 1994.

BRADY, D.; STOLL, A.D.; STARK, L.; DUNCAN, J.R. Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.297-302, 1994.

BREIEROVÁ, E.; VAJČZIKOVÁ, I.; SASINKOVÁ, V.; STRATILOVÁ, E. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.57, p.634-639, 2002.

BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L.; GOYAK, G.M. ATM-BIOCLAIM™ : a new wastewater treatment and metal recovery technology. In: LAURENCE, R.W.; R.M.R. BRARANION; R.M.R.; EBNER, H.G. (Ed). **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.291-304.

CARDOSO, P.F. Resposta de linhagens de arroz à exposição ao cádmio. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CARVALHO, R.S. Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Piracicaba, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CASALL, A. The Metallurgical Society of CIM. **Mineral Processing and Environmental**. v.2, p.391-397, 1996.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 20 de 31 de junho de 1986. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86res2086.htm> (14 out. 2003).

- COOBET, G.P.; SANDS, K.; WATERS, M.; WIXSON, B.G.; DORWARD-KING, E. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. **Environmental Toxicology and chemistry**, v.19, n.3, p.600-607, 2000.
- COSSICH, E.S.; TAVARES, C.R.G.; SILVA, E.A.; RAVAGNANI, T.M.K. Biossorção de Cromo. <http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/MonografiasTeneria/capitulovii.htm> (28 nov. 2003).
- CRIST, R.H.; OBERHOLSER, K.; SCHWARTZ, D.; MARZOFF, J.; RYDER, D.; CRIST, D.R. Interactions of metals and protons with algae. **Environmental Science and Technology**, v.22, p.755-760, 1988.
- DAS, P.; SAMANTARY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, v.98, n.1, p.29-36, 1997.
- DOMINGOS, R. N. Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando mosto de melão. Piracicaba, 1997. 72p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DOYLE, R.J.; MATTHEWS, T.H.; STREIPS, U.N. Chemical basis for the selectivity of ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. **Journal Bacteriology**, v.143, p.471-480, 1980.
- FEDUMMENTI, N.; PANOSSIAN, Z.; ALMEIDA, N.L.; PIMENTA, G.S.; PAES, M.T.P. Alternativas ao revestimento de cádmio utilizado em offshore pela Petrobrás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORROSÃO, 23. Florianópolis, 2003, **Anais**. Florianópolis, 2003. t.198. www.abraco.org.br/23sreme.htm (04 nov. 2003)
- FOUREST, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metals biosorption by dry biomass of *Sargassum fluitans*. **Environmental Science and Technology**, v.30, p.277-282, 1996.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. Handbook of the toxicology of metals, **Elsevier**, p.130-184, 1986.

GADD, G.M. Fungi and yeast for metal accumulation. In: EHRICH, H.I., BRIERLY, C.L. (Ed), **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. p.249-275.

GADD, G.M. WHITE, C.; ROME, I. Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeast. **Biohydrometallurgy**, p.421-435, 1988.

GADD, G.M.; WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? **Biotechnology**, v.11, p.353-359, 1993.

GADD, G.M. Biosorption. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.55, p.302-304, 1992.

GALAL-GORCHEV, H. Dietary intake of pesticide residues, cadmium, mercury and lead. **Food Additives and Contaminants**, v.8, p.793-806, 1991.

GARNHAM, G.W.; CODD, G.A.; GADD, G.M. Accumulation of zirconium by microalgae and cyanobacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.39, p.666-672, 1993.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, v.13, n.5, p.591-602, 1998.

GRATÃO, P.L. Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv By-2 submetidas ao cádmio. Piracicaba, 2003. 109p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- HUANG, C.P.; HUANG, C.P.; MOREHART, A. The removal of Cu (II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. **Water Resource**, v.24, p.433-439, 1990.
- ITOH, M.; YUASA, M.; KOBAYASHI, T. Adsorption of metal ions on yeast cells at varied cell concentration. **Plant Cell Physiology**, v.16, p.1167-1169, 1975.
- JARUP, L.; BERLUND, M.; ELINDER, C.G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health**, v.24, p.1-51, 1998. Suplemento, 1.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES . **WHO Food Additives Series 46: Cadmium**. www.inchem.org/pages/jecfa.html (23 Set. 2003).
- JORDÃO, C. P.; DA SILVA, A. C.; PEREIRA, J.L.; BRUNE, W. Contaminação por crômio de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, v.22, p.47-52, 1999.
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption - an alternative treatment sorption for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v.53, p.195-206, 1995.
- KUBOI, T.; NOGUCHI, A.; YAZAKI, J. Relation ship between tolerance and accumulation characteristics of cadmium in higher plants. **Plant and Soil**, v.104, p.275-280, 1987.
- KUYUCAK, N. Feasibility of biosorbents application. In: VOLESKY, B (Ed.) **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton: CVC Press, 1990. p.371-380.
- KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Accumulation of cobalt by marine alga. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.809-814, 1989.

- LAGRIFFOUL, A. MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v.200, p.241-250, 1998.
- LOVIEY, D.R.; COATES, J.D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.285-289, 1997.
- MAJIDI, V.; LAUDE, D.A.; HOLCOMBRE, J.A. Investigation of the metal algae binding site with ^{113}Cd nuclear magnetic resonance. **Environmental Science Technology**, v.24, p.1300-1312, 1990.
- MASON, J.O. **Toxicological profiles: cadmium**. www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-metals1/ip04-a.pdf (25 set 2003).
- MATTIAZO-PREZOTTO, M. M. Comportamento de cobre, cádmio e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba, 1994. 197p. Tese (Livre Docência) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MIDIO, J.M.; NATARAJAN, K.A. Biosorption of metals using nonliving biomass. **Minerals and Metallurgical Processing**, v.12, p.189-195, 1995.
- MODAK, J.M.; NATARAJAN, K.A. Biosorption of metals using nonliving biomass. **Minerals and Metallurgical Processing**, v.12, p.189-195, 1995.
- MOWLL, J.L.; GADD, G.M. Zinc uptake and toxicity in yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal General Microbiology**, v.129, p.3421-3425, 1983.

- MUELER, M.D.; WOLF, D.C.; BEVERIDGE, T.J.; BAILEY, G.W. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.129-135, 1992.
- MURALEEDHARAN, T.R., LYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. **Current Science**, v.61, p.379-385, 1991.
- NAKAJIMA, A., HORIKOSHI, T., SAGAGUCHI, T. Studies on accumulation of heavy elements in biological systems. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.76-83, 1981.
- NORRIS, P.R.; KELLY, D.P. Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal General Microbiology**, v.99, p.317-324, 1977.
- OLDIGES, H.; HOCHRAINER, P.; GLASER, U. Long term inhalation study with Wistar rats and four cadmium compounds. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v.19, p.217-222, 1989.
- OLIVEIRA, F.C. Metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com lodo de esgoto. Piracicaba, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- OURA, E. Biomass from Carboydrates. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**: a multi - volume comprehensive treatise. Wheimeim: Verlang Chemie, 1995. cap.1, v.3, p.3-41.
- PELCZAR Jr, M.; KREID, R.; CHAN, E.C.S. . In: PELCZAR Jr, M; KREID, R; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. v.1, cap.16, p.345-366.
- PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.35, n.4, p.525-545, 1995.

- ROS, J.P.M.; SLOOFF, W. Integrated criteria document cadmium. **National Institute of Public Health and Environmental Protection**, 1987 (Report no 75847776004).
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.
- SEKHAR, K.C.; SUBRAMANIAN, S.; MODAK, J.M.; NATARAJAN, K.A. Removal of metal ions using on industrial biomass with reference to environmental control. **International Journal of Mineral Processing**, v.53, p.107-120, 1998.
- SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Cadmium and iron interactions in higher plants - its consequences for the photosyntetic apparatus. **Photosynthetica**, v.36, n.3, p.321-331, 1999.
- SMOLEY, C.K. **Metods for determination**. Palo Alto: Boca Raton, 1992. cap. 3, p.25-32.
- STRANDBERG, G.W., SHUMATE, S.E.; PARROT, J.R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.237-245, 1981.
- TURECKI, T.; CIBULKA, J. SLAMOVA, A.; BARCALIKOVA, R. Effect of organic and inorganic forms of dietary cadmium on cadmium, zinc, copper, iron and manganese availability to rats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.78, p.119-128, 1998.
- TYLER, G. Bryophites and heavy metals: a literature review. **Botanic Journal of Linnean Society**, v.10, p.221-235, 1990.
- VALLESPIN, L.M.; SANCHEZ, L.; CALVO, M. Cadmio en leche y otros alimentos. http://www.medspain.com/n5_jun99/cadmio.htm (10 out. 2003).

- VICENTE, E. Fisiologia das leveduras: metabolismo fermentativo e oxidativo, nutrição e crescimento. In: VITOLO, M. & MINAMI, P.S. (Ed.). **Leveduras em Biotecnologia**. São Paulo Editora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP São Paulo, 1987, cap.3, p.11-20.
- VOLESKY, B. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. **FEMS Microbiology Reviews**, v.14, p.291-302, 1994.
- VOLESKY, B. Biosorption and Biosorbents. In: VOLESKY, B. (Ed). **Biosorption of heavy metals**. Palo Alto: Boca Raton CRC Press, 1990, cap.1, p. 15-39.
- VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v.11, p.235-250, 1995.
- VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z.R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.345-355, 1993.
- VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H.A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.797-806, 1995.
- WARE, G.W. Cadmium. USEPA Office of drinking water health advisories. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.107, p.25-37, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria nº 134: cadmium**. www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je01.htm (24 set. 2003).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO food additives series nº 24: toxicological evaluation of certain food additives and contaminants**. www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm (23 set. 2003).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO technical report series n° 837**: evaluation of certain food additives and contaminants. whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_873.pdf (24 set. 2003).