ACÚMULO DE CÁDMIO POR
Saccharomyces cerevisiae
FERMENTANDO MOSTO DE CALDO-DE-CANA

SAMUEL MARIANO GISLON DA SILVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Titular Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Silva, Samuel Mariano Gislon da

Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando mosto de caldo-de-cana / Samuel Mariano Gislon da Silva. - Piracicaba, 1998.
54 p.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Cádmio 2. Contaminação química 3. Espectrofotometria de absorção atômica 4. Fermentação alcoólica 5. Levedura 6. Mosto de caldo-de-cana I. Título

CDD 663.13

Dedico

A Deus, pois sem sua iniciativa criadora nada seria possível

Aos meus pais, Brando Mariano da Silva e Irene Gislon da Silva, verdadeiros educadores, pelo estímulo e apoio em todas as fases da minha vida

À Fabiana Maria de Siqueira, companheira de tantas horas, pelo afeto, carinho e paciência

À meu mano, Rafael Mariano da Silva, por tudo que já fizemos juntos

À terra onde nasci, de cujo barro fui moldado....

Querência....

Terra da gente

Essência de gente terra

Que lições de vida encerra

Terra humilde, tão capaz....

Agradecimentos

Ao Professor Titular, Luiz Gonzaga do Prado Filho, pela oportunidade, orientação, amizade e confiança

À Farmacêutica Bioquímica, Silvana Albertini, pela colaboração e amizade

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa concedida

Aos professores dos cursos de Microbiologia Agrícola e Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelos conhecimentos transmitidos

Ao Departamento de Genética, nas pessoas do Professor Titular Flávio Tavares e Biólogo Luiz Humberto Gomes pela análise de teor alcóolico

Ao Funcionário Eduardo Giovani Arthuso, da ESALQ/USP, pelo auxílio na obtenção da matéria prima

Ao Desenhista-Projetista Luiz Carlos Rodriguez, da ESALQ/USP, pelo auxílio na confecção da figura

Apartem, os que mais quiserem

Os demais soltem prá fora

E deixem que se vá embora

Seja para o lado que for

Que este vago peleador

Fica a cavalo na cerca

Olhando até que se perca

Na volta do corredor

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Metais pesados.....	3
2.1.1 Metais pesados nos solos.....	8
2.1.2 Influência da CTC e do pH.....	11
2.1.3 Equilíbrios de precipitação	12
2.1.4 Metais pesados em plantas	12
2.2 Levedura.....	14
2.2.1 Leveduras na alimentação animal e humana	15
2.2.2 Acúmulo de metais pesados.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Materiais.....	22
3.1.1 Mosto	22
3.1.2 Levedura.....	22
3.1.3 Sais de cádmio	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Planejamento estatístico do experimento.....	23

3.2.2. Preparo do material.....	23
3.2.3 Preparo do mosto.....	23
3.2.4 Preparo do inóculo.....	24
3.2.5 Fermentação	24
3.2.6 Determinação da viabilidade celular.....	24
3.2.7 Determinação do peso úmido	24
3.2.8 Determinação da matéria seca	24
3.2.9 Determinação do álcool no vinho	25
3.2.10 Dosagem de proteína bruta.....	25
3.2.11 Dosagem de cádmio	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Teor de cádmio na levedura	26
4.2 Teor alcoólico no vinho.....	27
4.3 Viabilidade celular.....	28
4.4 Peso seco e peso úmido da levedura	29
4.5 Porcentagem de proteína bruta na levedura	30
5 CONCLUSÕES.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
Anexo: ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Correlação entre as contaminações no mosto e os teores de cádmio determinados na levedura bruta.....	27

LISTA DE TABELAS

Página

1	Propriedades físicas de alguns compostos de cádmio	5
2	Concentração de cádmio (mg kg^{-1}) na levedura bruta seca	26
3	Etanol presente no vinho centrifugado (v/v)	28
4	Porcentagem da viabilidade celular da levedura recuperada através da centrifugação do mosto contaminado com cádmio, após a fermentação.	29
5	Pesos úmido e seco em gramas, da levedura recuperada, após a fermentação dos mostos contaminados com cádmio.	30
6	Proteína bruta da levedura recuperada após a fermentação de mostos contaminados com cádmio ($f=6,25$).....	31

**ACÚMULO DE CÁDMIO POR
Saccaromyces cerevisiae
FERMENTANDO MOSTO DE CALDO-DE-CANA**

Autor: SAMUEL MARIANO GISLON DA SILVA
Orientador: Prof Titular LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

RESUMO

O presente trabalho estudou o acúmulo de cádmio (Cd) por *Saccharomyces cerevisiae*, fermentando mosto de caldo de cana com contaminações controladas, em níveis sub-tóxicos do citado metal. As condições de fermentação foram similares às reinantes na produção industrial de etanol. O mosto, não esterelizado, continha 12% de açúcares redutores totais (ART) e pH 4,5. Para a contaminação controlada empregou-se dois sais de cádmio, cloreto e acetato e, quatro níveis de contaminações 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg Cd kg⁻¹ mosto. A inoculação do mosto foi executada com fermento de panificação (10% p/p). Após a fermentação (4 horas) foram determinados, porcentagem de fermento no vinho centrifugado e teor alcoólico do mesmo. Na levedura separada foram determinados peso úmido, matéria seca, proteína bruta e teores de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica. Em todos os níveis de contaminação estudados houve acúmulo de Cd pela levedura.

**ACUMULATION OF CADMIUM BY
Saccharomyces cerevisiae
FERMENTING MUST OF SUGAR-CANE**

Author: SAMUEL MARIANO GISLON DA SILVA
Adviser: Prof. Titular LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

SUMMARY

The aim of this paper is to study the absorption and cadmium (Cd) concentration by *Saccharomyces cerevisiae*, fermenting must of sugar-cane, with control contamination, under toxic levels of cadmium (mg Cd kg^{-1} must). Fermentation conditions were the same ones for alcohol industrial production. Non-sterelized must showed 12% of total reducing sugar (w/w) e pH 4,5. For the control contamination, two salts of cadmium were applied, chloride and acetate, with diferent properties and four levels of contamination: 0,5; 1,0; 2,0 and 5,0 mg Cd kg^{-1} must. The inoculation of must was carried out with bread yeast (10% w/w). After fermentation (4 hours), samples were selected to evaluate cellular viability and yeast percentage. Wine was centrifuged and analysis of wine without yeast and raw yeast were performed. The alcohol content was mensured , as well as the total humid weight for the yeast material, raw protein and heavy metal by atomic absorption spectroscopy. All level studed have acumulation of cadmium at yeast.

1 INTRODUÇÃO

O homem, desde os tempos mais remotos, tem tido contato com os metais pesados, que se encontram naturalmente no solo, na água e que, provavelmente, provocaram os primeiros envenenamentos. Os metais, posteriormente utilizados nos utensílios domésticos, tubulações de água entre outros, aumentaram os riscos de intoxicação.

O advento da era industrial e a mineração em alta escala, possibilitaram o aparecimento de enfermidades relacionadas com os diversos metais tóxicos.

O problema da contaminação do ambiente por estes metais, alcança hoje dimensões mundiais, sendo observado tanto em países desenvolvidos como naqueles subdesenvolvidos. A ausência de controle dos rejeitos contaminados por metais pesados, alterou o solo, a água e o ar, trazendo como consequência a contaminação dos sistemas aquáticos, continentais e marinhos.

Este risco em potencial, suscitou pesquisas na área de alimentos, uma vez que estes contaminantes tem caráter cumulativo na cadeia biológica da qual o homem faz parte. Como resultado do fenômeno de bioacumulação, as quantidades subtóxicas presentes no ambiente podem atingir níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica.

Estudos recentes têm demonstrado a toxicidade do cádmio (Cd), que juntamente com o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg) são os elementos que têm concentrado a atenção dos pesquisadores devido à toxidez e à disseminação nos ecossistemas, como resultado do desenvolvimento tecnológico.

O uso industrial do cádmio deve-se principalmente ao seu baixo ponto de fusão. Suas aplicações são amplas, como em galvanoplastia na indústria automobilística, construção de baterias, juntamente com o níquel, estabilizador na indústria de plásticos

polivinílicos e como pigmento amarelo em tintas e vidros. É utilizado ainda na fabricação de ligas metálicas de baixo ponto de fusão, com baixo coeficiente de fricção e grande resistência à fadiga.

Apesar da baixa absorção do cádmio quando introduzido no organismo de mamíferos, ele se concentra nos rins e fígado, onde tem vida biológica de 10 anos.

Quando as matérias primas de processos fermentativos são provenientes de solos ácidos, podem conter quantidades apreciáveis de cádmio, transportando este metal para o processo (Babich & Stotzky, 1983).

O processo de fermentação normalmente utilizado no Brasil é o denominado Melle-Boinot, onde as células de leveduras são recuperadas por centrifugação e reaproveitadas, mantendo elevada a concentração celular nos mostos e, assim, obtendo-se um aumento do rendimento alcoólico, devido ao menor consumo de açúcar para a multiplicação celular (Lopes, 1989). Entretanto, várias usinas e destilarias desviam parte do leite de levedura a ser reciclada, não comprometendo a produção de etanol (Lima, 1983).

Os microorganismos possuem capacidade de acumular metal pesado, sendo que *Saccharomyces cerevisiae* não é exceção. A levedura que cresce em meio com concentrações subtóxicas aceitáveis de quaisquer metais, poderá apresentar, devido à essa propriedade, níveis maiores do que aqueles presentes no meio de crescimento, podendo assim atingir padrões não admissíveis pela legislação vigente, o que a invalidaria como ingrediente de ração e muito menos como suplemento protéico.

O presente trabalho visou o estudo do acúmulo de cádmio (Cd) por *S. cerevisiae*, fermentando mosto de caldo-de-cana, com contaminações controladas, em níveis sub-tóxicos do citado metal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metais pesados

A crescente industrialização nas últimas décadas, expôs animais e vegetais à muitas espécies químicas potencialmente tóxicas. Os metais pesados destacam-se como os mais perigosos, pois mesmo a níveis traço podem causar danos eco-biológicos irreversíveis (Miranda, 1993). Os metais pesados compreendem em torno de 40 elementos, que apresentam densidade mínima de $4,5 \text{ g cm}^{-3}$ (Garcia et al, 1990), 5 g cm^{-3} (Coker & Matthews, 1983) ou $6,0 \text{ g cm}^{-3}$ (Alloway, 1995; Malavolta, 1994). Muitos destes metais são essenciais para o crescimento de organismos procariotos e eucariotos, sendo exigidos em concentrações muito pequenas. Contudo, alguns destes metais como cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) não são essenciais para o crescimento celular, e são extremamente tóxicos em baixas concentrações (Miranda, 1993; Trevors et al., 1986; Volesky, 1990a).

A produção mundial de cádmio é oriunda dos processos de extração de zinco, chumbo e em menor escala do cobre. A remoção do cádmio é essencial para a produção destes metais, uma vez que sua presença afetaria as suas propriedades. Na fusão de minérios, e sua redução térmica a metal, o cádmio, sendo mais volátil e mais facilmente oxidável do que o zinco e o chumbo, é emitido preferencialmente e posteriormente captado como partícula de CdO na saída do forno (Tavares, 1990).

O uso industrial do cádmio deve-se ao seu baixo ponto de fusão ($320,9^{\circ}\text{C}$). A produção anual de cádmio está ao redor de 20×10^3 toneladas (Volesck, 1990a).

A aplicação principal (34% do consumo total) do cádmio é em revestimentos metálicos, os quais são muito resistentes à corrosão alcalina e marinha, devido à proteção catódica que oferecem. A indústria automobilística, a espacial e a de telecomunicações

são os maiores usuários destes revestimentos. O segundo maior uso (23%) é para pigmentos, geralmente à base de sulfeto de cádmio. Estes variam de amarelo à marrom, apresentado alta estabilidade térmica e sendo utilizados em tintas e vernizes plásticos. Outra área de aplicação é na indústria de PVC (policloreto de vinila) e plásticos afins como estabilizador (15% do total do consumo). Os sais de cádmio dos ácidos graxos inibem eficazmente a degradação do PVC por radiação e/ou oxigênio. O uso de baterias de níquel / cádmio, com eletrólito alcalino, cresceu bastante nos últimos anos, devido a sua boa descarga e confiabilidade. O cádmio tem os seguintes usos menores: constituinte de soldas e ligas e baixa fusão; produção de semicondutores e instrumentos fotovoltaicos, como bastão de controle de reatores nucleares (devido a sua grande capacidade de absorção de neutrons); como endurecedor na cura da borracha; como constituinte do amalgama em odontologia (25% cádmio : 75% mercúrio); na indústria do vidro; na fotografia, litografia e processo de gravura, além de fungicidas (Mattiazzo-Prezotto, 1994; Tavares, 1990; Tavares & Carvalho, 1992).

A toxicidade do cádmio é altamente dependente das espécies atômicas, bem como de vários fatores físicos, químicos e biológicos (Adriano, 1986; Babich & Stotzky, 1978). São importantes as diferenças, entre os vários compostos de cádmio, quanto a sua solubilidade (tabela 1). Em geral, compostos solúveis como o CdCl_2 são mais absorvidos e mais tóxicos que compostos praticamente insolúveis como CdS (Mason, 1987). Reilly (1991) considera o cádmio um elemento altamente tóxico, que têm sido descrito como um dos elementos traço mais perigosos presentes em alimentos e no ambiente do homem. Apesar de estar presente em quantidades preocupantes no ar, solo e água, o principal caminho de entrada do metal no organismo de seres humanos não expostos industrialmente, são os alimentos contaminados (Elpo & Freitas, 1995; Pacyna, 1996). Gerhardsson & Skerfving (1996), alertam que além dos alimentos, o tabaco é outra grande fonte de contaminação, correspondendo em torno de 1,2 μg por cigarro. Deste, 100% é absorvido pelo organismo humano (Tavares & Carvalho, 1992).

Tabela 1. Propriedades físicas de alguns compostos de cádmio

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Densidade (g cm ⁻³)	Solubilidade	
						Água (g/100cc)	Solventes orgânicos
Cádmio	Cd	112,411	321	765	8,65	insolúvel	ND*
Carbonato de cádmio	CdCO ₃	172,43	321	ND*	4,26	pi**	insolúvel
Cloreto de cádmio	CdCl ₂	183,32	568	960	4,047	140	acetona metanol etanol
Hidróxido de cádmio	Cd(OH) ₂	146,43	130	ND*	4,79	qi***	ND*
Nitrato de cádmio	Cd(NO ₃) ₂	236,43	350	ND*	ND*	326 a 60°C	éter acetona álcool
Óxido de cádmio	CdO	128,40	900	ND*	8,15	insolúvel	ND*
Silicato de cádmio	CdSiO ₃	188,49	1.242	ND*	4,93	insolúvel	ND*
Sulfato de cádmio	CdSO ₄	208,47	1.000	ND*	4,691	76 a 0°C	álcool acetona

* não determinado

** praticamente insolúvel

*** quase insolúvel

Fonte: Adaptado de Mason, 1987

Na sua vigésima segunda edição, realizada de 19 a 24 de março de 1990, o comitê do Códex Alimentarius sobre Contaminantes e Aditivos nos Alimentos, propôs níveis de cádmio de 0,1 mg kg⁻¹ para vegetais e 0,5 mg kg⁻¹ para cereais (Elpo & Freitas, 1995). Contudo, os limites fixados pela legislação brasileira são de 1,0 mg kg⁻¹.

O cádmio introduzido no organismo via oral é pouco absorvido sendo que cerca de 95% é eliminado (Gerhardsson & Skerfving, 1996; Tavares, 1990). Porém, o restante se acumula nos rins e no fígado, onde foi detectado que sua meia vida biológica é de 10 anos (Tavares & Carvalho, 1992). A dose letal para um adulto de 60 kg é de 0,35g de cádmio (Pereira, 1995).

Muito pouco é conhecido sobre o mecanismo de toxicidade do cádmio (Gerhardsson & Skerfving, 1996). Os autores ressaltam, porém, que é bem conhecido que o cádmio se liga aos grupos sulfidril das proteínas. Se isto ocorre com uma enzima, esta pode ter suas funções inibidas.

O cádmio, uma vez assimilado, se distribui no organismo. É principalmente encontrados nas células sanguíneas, parte ligado a metaloproteínas e parte circulando através do plasma, alcançando desta forma o fígado (Elpo & Freitas, 1995; Tavares, 1990; Tavares & Carvalho, 1992). No fígado, o cádmio induz a produção de metaloproteínas (proteínas de baixo peso molecular e ricas em enxofre) no prazo de 4 a 24 horas (Mason, 1987). Esta proteína sequestra cádmio nas células do fígado, atuando como agente destoxicador (Tavares, 1990). No entanto, somente 15% da carga corporal de cádmio é encontrada no fígado (Miranda, 1993; Tavares & Carvalho, 1992), pois há uma liberação vagarosa do complexo metaloproteína-cádmio para o sangue (Tavares, 1990). Este complexo é filtrado pelo glomérulo renal para a urina primária, como o são as outras proteínas de baixo peso molecular (Mason, 1987). Subsequentemente, o complexo é reabsorvido pelas células tubulares do rim, provavelmente por pinocitose (Tavares, 1990). Nas células tubulares, lisosomas contendo enzimas digestivas, degradam rapidamente o complexo cádmio-metaloproteína e liberam cádmio no citoplasma (Mason, 1987; Tavares, 1990). As células tubulares tem a capacidade de produzir a sua própria metaloproteína, consequentemente evitando os efeitos tóxicos do cádmio não complexado. Quando a capacidade produtora de metaloproteína das células tubulares é excedida, os primeiros sinais de toxicidade aparecem (Tavares, 1990). Cerca de 50% da carga corporal de cádmio é encontrada nos rins (Miranda, 1993; Tavares & Carvalho, 1992).

O rim é considerado o órgão crítico no acúmulo de cádmio (Tavares, 1990). A falência do sistema renal é esperada como resultado da ingestão do metal (Mattiazzo-Prezotto, 1994). Entretanto, o único caso mundialmente aceito de toxicidade de cádmio é a célebre doença chamada “itai-itai”, observada no Japão, na cidade de Fochu, situada na bacia do rio Jintsu. (Adriano, 1986), em pessoas que se alimentaram com arroz e beberam

água de arrozais que continham alta concentração do elemento (Nogawa & Kido, 1996).

A humanidade foi alertada para o perigo do cádmio no meio ambiente. Durante 19 anos houve o surto de uma doença desconhecida, de natureza reumática, denominada “itai-itai” (ai-ai) devido aos gritos de dor dos pacientes, decorrentes de deformidades ósseas dolorosas. Ao todo, cerca de 100 pessoas morreram desta doença, cuja causa somente foi relacionada com o cádmio em 1961. Uma mineradora lançava seus rejeitos no rio que servia para irrigação dos arrozais e como fonte de água potável (Tavares, 1990).

Segundo Tavares & Carvalho (1992), quando a exposição a níveis altos de cádmio ocorre em pessoas com deficiência nutricional, efeitos diversos podem ocorrer. Segundo os autores este foi o caso do evento trágico de “itai-itai”, onde a ingestão continuada de cádmio por pessoas com deficiência de cálcio e vitamina D causou as deformidades.

Embora o cádmio tenha sido descrito como elemento relativamente raro (Valle & Ulmer, 1972; Wood, 1974), posteriormente Varma (1986b) afirma que o mesmo encontra-se presente no ambiente em baixos níveis. Mattiazzo-Prezotto (1994) e Tavares (1990), relatam que a concentração de cádmio na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg kg⁻¹, sendo o 67º metal em ordem de abundância.

O cádmio é o elemento número 48 da tabela periódica, com um peso atômico de 112,4. É medianamente denso (8,6 g cm⁻³), branco prateado, sendo um metal maleável com ponto de fusão 320,9°C e ebulição 765°C (Adriano, 1986; Reilly, 1991; Varma, 1986b).

Os níveis de cádmio em solos agrícolas alcançam a faixa de 0,001 à 2,4 mg.kg⁻¹, sendo o valor médio de 0,22 mg kg⁻¹, embora áreas vizinhas à fundições possam apresentar conteúdo de cádmio na camada superficial do solo entre 0,20 e 350 mg kg⁻¹ (Adriano, 1986; Alloway, 1995). As concentrações de cádmio na hidrosfera alcançam de 0,07 à 1,02 µg kg⁻¹ (Trevors et al., 1986), 10 µg kg⁻¹ na água potável (Volesky, 1990a) e 0,01 a 0,04 µg kg⁻¹ em água salgada (Robards & Worsfold, 1991). Pacyna (1996) afirma que em 1983 a emissão global de cádmio na atmosfera variou de 3,1 a 12,0 ton³.

Segundo o autor, na Europa e na América do Norte, a emissão de metais pesados decresce na seguinte ordem:

No Brasil, os teores de cádmio total em solos se situam entre valores menores que 0,1 até 0,4 mg.kg⁻¹ (Domingos, 1990)

O cádmio ocorre na natureza principalmente associado com o Zn, com o qual têm similar estrutura iônica e eletronegatividade (Adriano, 1986; Mattiazzo-Prezotto, 1994; Reilly, 1991; Varma, 1986b), a grupos contendo S, com o qual têm grande afinidade (Mattiazzo-Prezotto, 1994), e ao cobre e ao chumbo (Reilly, 1991).

A utilização industrial de cádmio têm provocado um desequilíbrio biológico e modificações no transporte deste elemento (Babich & Stotzky, 1978). Elevadas concentrações de cádmio podem ser encontradas na água de esgoto (Cenci & Morozzi, 1977), plantas, plancton marinho e invertebrados (Robards & Worsfold, 1991) e ao longo das rodovias, pelo desgaste de pneus, já que o cádmio entra na fabricação destes (Omae, 1986).

2.1.1 Metais pesados nos solos

Quando se considera o uso agronômico de resíduos contendo metais, devem ser feitas previsões do seu comportamento nos solos, e neste aspecto, a preocupação mais frequente diz respeito à solubilização, com consequente deslocamento destes metais para o lençol freático, aumentando a biodisponibilidade para vegetais, resultando na entrada do metal na cadeia alimentar (Domingos, 1996).

Entre as práticas e atividades que podem poluir solos agrícolas com metais pesados são citados o uso de corretivos para acidez (Adriano, 1986; Amaral Sobrinho et al, 1992; Robards & Worsfold, 1991), fertilizantes fosfatados (Amaral Sobrinho et al, 1992; Kabata-Pendias & Pendias, 1984a; Tavares, 1990) deposição de resíduos da indústria siderúrgica (Nogueira, 1993), de lixo urbano (Kabata-Pendias & Pendias, 1984a) e de lodo de esgoto (Arteaga, 1996; Gouvêa, 1995; Kabata-Pendias & Pendias, 1984a; Jorge et al., 1991; Oliveira, 1995; Robards & Worsfold, 1991).

É sabido que os países altamente industrializados confrontam-se com sérios problemas de poluição do ar, da água e do solo, sendo a atividade industrial uma das fontes principais de poluição do solo com metais pesados. Por outro lado, com o crescente aumento da produção de resíduos sólidos nos centros urbanos, em função do aumento populacional, bem como da aceleração do processo de industrialização, a questão do manejo, tratamento e destino final do lodo de esgoto torna-se crítica e prioritária, visando preservar o meio ambiente.

Segundo Oliveira, (1995), somente na grande São Paulo, SP, estima-se uma produção diária de esgotos em torno de $4,2 \times 10^6 \text{ m}^3$. Segundo o mesmo autor, estima-se para 1996 uma geração de lodo de esgoto seco e digerido em torno de $7,8 \times 10^4$, tendo por base a capacidade de tratamento já instalada.

A aplicação de lodo de esgoto, em solos agrícolas, está se tornando uma prática comum em virtude do seu teor relativamente elevado de matéria orgânica, que confere a este material um potencial considerável para melhorar a fertilidade do solo. O aumento do custo dos fertilizantes químicos, bem como a demanda de muita energia no processo de incineração de esgoto, torna a sua aplicação em solos agrícolas uma alternativa atraente (Jorge et al., 1991). Ao mesmo tempo, a utilização do lodo de esgoto diminui os problemas ambientais ocasionados pelo acúmulo e pela não utilização destas fontes poluidoras (Arteaga, 1996).

Kabata-Pendias & Pendias (1984a) esclarecem que apesar da adição de lodo de esgoto aos solos promover o aumento da concentração dos metais Cd, Cu, Cr e Zn nos mesmos, evidências do aumento da fitodisponibilidade desses metais só são observadas quando a dose aplicada for muito alta. Oliveira (1995) estima esta dose como sendo ao redor de 150 mg ha^{-1} .

Também a contaminação de solos por metais pesados, provocada pela aplicação de corretivos, fertilizantes e agrotóxicos vem preocupando pesquisadores de vários países (Alloway, 1990; Amaral Sobrinho et al, 1992; Kabata-Pendias & Pendias, 1984a; Mulla et al, 1980).

Segundo Amaral Sobrinho et al. (1992), a maioria dos solos de regiões tropicais, devido ao seu elevado poder tampão, necessita normalmente de grande quantidade de

corretivos para acidez e de fertilizantes fosfatados. Kabata-Pendias & Pendias (1984b) alertam que fertilizantes fosfatados podem conter de 1 a 70 mg kg⁻¹ de cádmio.

Mulla et al (1980), mostraram que a concentração total de cádmio na superfície de um solo que recebeu superfosfato triplo por 36 anos aumentou de 0,07 à 1,0 mg kg⁻¹ de solo.

O cádmio pode ocorrer distribuído quimicamente no solo de várias maneiras (Adriano, 1986):

a) Trocável: adsorvido por atração eletrostática em sítios de cargas negativas das argilas, matéria orgânica e óxido hidratados;

b) Redutível: adsorvido ou cooprecipitado com óxidos e hidróxidos de Fe, Mn e possivelmente Al, presentes como revestimento de minerais de argila ou partículas isoladas.

c) Carbonato: precipitado como carbonato em solos com muito carbonato de cálcio livre.

d) Complexado ou quelado: produtos de solubilidade e estabilidade variáveis;

e) Rede cristalina: fixação no interior da rede cristalina da argila;

f) Sulfeto: muito insolúvel e estável. Compostos de Cd com sulfeto ocorrem em solos mal arejados, como em arrozais inundadas;

g) Fase orgânica: complexação com a fração orgânica. Quelado ou ligado à matéria orgânica;

h) Solução iônica ou complexado.

Para que haja movimentação e lixiviação de metais e, também, a sua entrada na cadeia alimentar, é necessário que os mesmos estejam presentes na solução do solo, ou associados à partículas móveis. Mattiazzo-Prezotto (1994), ressalta que isto vai depender da interação entre as partículas químicas existentes no solo de adição do metal.

Portanto, todo metal pesado adicionado à solução do solo, pode ser atenuado na fase sólida através de equilíbrios de troca catiônica, adsorção, quelação, precipitação ou cristalização. A distribuição nas várias formas vai depender, além das propriedades químicas de cada metal, de um número de fatores do solo, como pH, potencial redox, textura, composição mineral das argilas, capacidade de troca de cátions (CTC),

quantidade e tipo de compostos orgânicos na fase sólida e na solução do solo, competição de outros metais pelos sítios de adsorção e quelação, temperatura do solo e atividade microbiana (Adriano, 1986; Lake, 1987).

Tendo-se em vista a forma de Cd presente em solos ácidos, evidencia-se a importância da CTC do solo no comportamento do mesmo (Mattiazzo-Prezotto, 1994).

2.1.2 Influência da CTC e do pH

A CTC do solo é um dos mais importantes indicadores da capacidade de retenção de metais pesados na fase sólida do solo (Gouvêa, 1995). Em geral, solos com valores de CTC mais elevadas suportam maiores quantidades de metais do que os de baixa capacidade de troca. Por outro lado, os fenômenos predominantemente eletrostáticos que governam a CTC constituem-se num dos efeitos atenuantes mais fracos no sentido de manter o metal adsorvido à fase sólida do solo. Considera-se portanto, que os metais na forma trocável são prontamente disponíveis às plantas, superada apenas pelas formas solúveis (Lake, 1987).

A CTC do solo é afetada por vários fatores, tais como temperatura, textura, pH e outros. Espera-se em solos argilosos uma maior CTC do que nos arenosos. Solos argilosos e mais ricos em matéria orgânica possuem maior CTC e, portanto, apresentam maior capacidade de retenção de metais (Gouvêa, 1995; Lindsay, 1979).

O pH aparece como o principal fator regulador da solubilidade e disponibilidade de metais no solo (Adriano, 1986). A maior parte da CTC é devida à desprotonação de grupamentos ácidos da matéria orgânica e da superfície de óxidos de ferro e alumínio. Em ambos os casos o pH é fundamental e o máximo valor de CTC é observado a altos valores de pH. Outros equilíbrios envolvendo metais pesados no solo (formação de hidróxidos, carbonatos e fosfatos insolúveis) também são diretamente afetados pelo pH do solo (Lindsay, 1979).

Segundo Gouvêa (1995), sob condições alcalinas, há formação de precipitados de carbonatos e hidróxidos metálicos. Além disto, ocorre aumento na CTC do solo, resultando na maior adsorção de cátions metálicos.

De maneira geral a solubilidade dos metais diminui com o aumento do pH, exceto para o molibdênio que costuma ocorrer na forma aniônica (Pereira, 1995). Aumentos nas concentrações de Cd, Co, Mn e Zn na solução do solo tem sido observados com o decréscimo do pH na faixa comum em solos agriculturáveis (5,0-7,0).

Em valores de pH > 7,0, formam-se no solo hidroxidações tais como $MgOH^+$ e $CaOH^+$ e nesta forma passam a ser adsorvidos. Da mesma forma, com metais pesados ocorre a formação de espécies como $CdOH^+$ e $ZnOH^+$. Uma vez formadas, tais espécies são prontamente adsorvidas às superfícies dos óxidos de Fe e Al e a medida que o pH se eleva precipitam-se sobre os óxidos, constituindo-se uma nova camada de polímeros, cuja forma geral é $(MOH)_x$ (McBride, 1978).

2.1.3 Equilíbrios de precipitação

O fenômeno da precipitação exerce grande influência no comportamento químico dos metais pesados, uma vez que estes formam compostos muito pouco solúveis com uma série de ânions facilmente encontrados no solo. Os ânions mais comuns no solo e capazes de precipitar metais pesados no solo são o carbonato, o cloreto, o sulfato, o oxalato, o fosfato e a silicata (Lindsay, 1979). Com a adubação mineral, calagem e gessagem a probabilidade de ocorrerem tais reações aumenta muito, uma vez que a concentração de carbonato, sulfato e fosfato aumenta consideravelmente (McBride, 1978).

2.1.4 Metais pesados em plantas

A absorção pelas plantas é uma das principais rotas de entrada dos metais pesados na cadeia alimentar. Segundo Volesck (1990a), é conhecido que cádmio é um metal pesado largamente absorvido por plantas. Miranda (1993) alerta que plantas absorvem cádmio mais facilmente que outros metais pesados. Em sua maioria, plantas respondem ao aumento na concentração de metais no solo com a absorção (Gouvêa, 1995). A natureza destas respostas dependerá da sensibilidade individual, da intensidade

(concentração e duração), da exposição, do metal propriamente dito e da forma como se encontra (Lake, 1987).

Os metais pesados são absorvidos pelas plantas por diferentes formas preferenciais, que variam de um metal para o outro. De acordo com Lake (1987), o cádmio é mais absorvido na forma de complexos solúveis orgânicos de baixo peso molecular do que na forma catiônica (Cd^{2+}).

A absorção de metais pesados em plantas é muito afetada por efeitos sinérgicos e antagonísticos (Lake, 1987; Matthews, 1984). Efeito sinérgico é o aumento da absorção de alguns metais, causada pela absorção prévia de outros. Já as relações antagonistas traduzem-se na diminuição da absorção de íons metálicos em virtude da absorção de outros pelos mesmos sítios de troca da raiz. Um exemplo clássico de efeito antagonístico é a diminuição da absorção de cádmio em presença de alta concentração de zinco (Lake, 1987).

Vários são os mecanismos de entrada de metais nas células vegetais. Os principais envolvem permeação passiva através da membrana, envolvendo proteínas integrais ou não, transporte ativo através de moléculas carreadoras e endocitose. A maior parte dos metais pesados, se mantêm então, imobilizados nas cargas negativas da parede celular, e muito pouco é levado para o interior da célula. No interior da célula, o cádmio está normalmente ligado a proteínas citoplasmáticas contendo grupamentos S, pelo qual o metal têm grande afinidade (Domingos, 1996).

De forma geral, o cádmio e o zinco são translocados intensivamente para a parte aérea, enquanto o Cu e o Pb ficam fortemente retidos na raiz. Já o Ni é distribuído igualmente por toda a planta (Matthews, 1984; Lake, 1987).

As plantas tolerantes aos metais pesados devem merecer um cuidado especial, pois podem acarretar sérios danos à saúde humana, pelo motivo de reterem teores de metais pesados muito superiores aos níveis permitidos para os seres humanos, antes de apresentarem sintomas de toxicidade (Lake, 1987).

2.2 Levedura

As fermentações realizadas pelas leveduras são utilizadas pelo homem desde as origens da civilização (Vicente, 1987). As leveduras do fermento eram conhecidas pelos egípcios antigos. Já há 6.000 anos estes produziam uma espécie de cerveja ácida conhecida como “boozah” (Halász & Lásztity, 1991b). Bebidas alcoólicas foram também produzidas por antigos chineses, babilônicos, gregos, índios, judeus, etc. (Dziezak, 1987; Minami, 1987).

O conhecimento dos agentes responsáveis por este processo somente puderam ser ampliados com a invenção do microscópio no século XVII, por Antonie Van Leeuwenhoek. Contudo, foram os estudos de Louis Pasteur entre 1857 e 1876, publicados em seu “ÉTUDES SUR LE VIN” em 1866 e “ÉTUDES SUR LA BIÈRE” de 1876, que estabeleceram o papel da levedura na transformação do açúcar em álcool e, que a levedura é um organismo vivo (Halász & Lásztity, 1991b; Pelczar et al, 1981).

Hoje, se sabe que as leveduras correspondem a um grupo heterogêneo de fungos, de forma predominantemente unicelular, com predominância de algumas características como a estrutura celular (eucariótica), reprodução por brotamento, divisão binária ou ascoesporos, colônias cremosas ou moles (Minami, 1987). Ocorre, porém, que nenhuma destas características são exclusivamente das leveduras e, encontradas em todas elas (Pelczar et al., 1981).

As leveduras e os fungos filamentosos (mofos) fazem parte do vasto conjunto dos fungos eucariotos inferiores, distribuídos em 74.000 espécies (Vicente, 1987). As leveduras, entretanto, estão distribuídas em apenas 350 espécies (Pelczar et al., 1981; Vicente, 1987), agrupadas em 66 gêneros (Barnett, 1992).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* e as espécies filogeneticamente próximas são as mais empregadas pelo homem, que as utilizam nas várias indústrias de fermentação de substratos açucarados ou amiláceos previamente hidrolizados (Vicente, 1987).

2.2.1 Leveduras na alimentação animal e humana

Das espécies taxonomicamente conhecidas, relativamente poucas são utilizadas industrialmente. Segundo Dziezak (1987), somente três gêneros são comercialmente cultivados: *Saccharomyces*, *Candida* e *Kluyveromyces*.

A tecnologia de produção celular microbiana em escala comercial, para alimentos e rações, foi desenvolvida neste século. Até o século passado se recuperava o máximo de leveduras do gênero *Saccharomyces* da produção de bebidas fermentadas, principalmente cervejas, utilizando-as, então, em panificação. Em 1968 Fleischmann iniciou a produção industrial de levedura prensada e, contribuiu na melhoria da bioquímica da fermentação e de técnicas de engenharia, auxiliando muito o desenvolvimento da moderna utilização de leveduras (Halász & Lásztity, 1991b).

Além disto, as leveduras estão recebendo mais atenção por parte dos pesquisadores, devido aos benefícios nutricionais fornecidos ao homem. Sua utilização pode ser na forma de levedura seca, suplementando a alimentação humana, ou enriquecendo os sabores de lanches, carnes e produtos derivados do leite (Dziedak, 1987). Também o uso de proteína microbiana, produzida a partir de substratos de origem natural, é geralmente visto como um suporte eficiente para o crescimento animal (Berto, 1997; Fazano, 1985).

A biomassa de levedura é composta de 45 a 65% de proteína, sendo considerada uma boa fonte protéica não convencional, com ampliação do seu uso na indústria de alimentos (Pacheco, 1996). Têm-se observado que as leveduras são ricas em treonina, lisina e valina. Contudo, a maioria dos relatos indicam a metionina como o aminoácido mais limitante das leveduras. Por outro lado, elas têm sido indicadas como excelentes fontes de vitaminas do complexo B e alguns minerais (Miyada, 1987).

A qualidade da proteína produzida por *S. cerevisiae* em substrato de melaço de cana-de-açúcar é aceitável quando comparada com o concentrado protéico de soja (Pezzato, 1985).

Uma das fontes mais promissoras de alimentos, para a produção animal, são os microrganismos. No caso dos suínos e, particularmente, nas condições brasileiras, uma fonte não convencional é a levedura seca (Berto, 1997).

A utilização de levedura como fonte protéica em rações de aves visando a produção de carnes e ovos, deve ser bem controlada, pois pode ocasionar a “gota visceral” ou “articular”, devido ao elevado teor de ácidos nucleicos (DNA e RNA) presentes e, pelo fato das aves não possuírem a enzima uricase (Pezzato, 1985).

A composição química e o valor nutritivo das leveduras, bem como dos subprodutos de destilarias variam conforme o substrato empregado, espécie da levedura, método de fermentação, idade das células, forma de secagem, a concentração de sais, etc, (Desmonts, 1968; Lahr Filho, 1996).

As leveduras secas apresentam uma composição química aproximada de 6% de umidade, 39% de proteínas (Nx6,25), 34,1% de polissacarídios, 5,0% de trealose, 10,8% de ácidos nucleicos, 4,5% de fosfolipídios, 2,5% de triglicerídios e 1,0% de esteróis (Oura, 1995). O conteúdo mineral, varia de 9,4 à 14,4% (Lima, 1983; Moreira, 1984), sendo o potássio seu principal componente (Oura, 1995).

As características que tornam os microorganismos interessantes, incluindo as leveduras, como produtores de proteína, segundo Miyada (1987), Moreira (1984), Oura (1995), Pezzato (1985) e Santos (1993) são:

- Alta taxa de multiplicação;
- Capacidade de desenvolvimento em substrato barato e facilmente disponível;
- Facilidade de obtenção;
- Utilização de nutrientes nas suas formas mais simples;
- Possibilidade de cultivo, independente de fatores ambientais e climáticos;
- Pequena exigência de área e água;
- Formação de produtos com considerável valor nutritivo.

Vários substratos, geralmente resíduos industriais e da agroindústria, podem ser utilizados pelas leveduras para obtenção de proteínas. Dentre eles, podem ser citados os resíduos das refinarias de petróleo, licor sulfítico das indústrias de celulose, hidrolizado

de madeira, soro de leite, vinhaça, melaço, bem como resíduos de frutas e vegetais (Halász & Lásztity, 1991b; Lima, 1983; Miyada, 1987; Oura, 1995).

O Brasil, sendo o maior produtor mundial de álcool de cana de açúcar, com uma produção estimada em 11,5 bilhões de litros por ano, torna-se um país privilegiado quanto ao aproveitamento dos subprodutos obtidos no processamento da cana de açúcar, notadamente a levedura, na alimentação humana e animal (Lahr Filho, 1996).

Nas destilarias de álcool autônomas ou anexas às usinas de cana de açúcar, podem ser produzidos dois tipos de leveduras destinadas à alimentação humana ou animal. O primeiro denomina-se levedura de recuperação, e pertence ao gênero *Saccharomyces*, sendo que provém da fermentação anaeróbia do caldo de cana ou do melaço no processo de produção de álcool. O segundo tipo é denominado levedura de cultura. Pertence ao gênero *Candida* e é obtida a partir da fermentação anaeróbia da vinhaça ou do melaço. Esta levedura têm geralmente uma qualidade superior aquela recuperada, e neste caso a levedura é o produto visado, não sendo portanto um subproduto (Lima, 1983; Miyada, 1987; Oura, 1995).

Segundo Fazano (1986), as leveduras de recuperação são obtidas da seguinte maneira:

- a) Após o término da fermentação, o vinho (mosto fermentado) é centrifugado, obtendo-se de um lado o vinho e de outro a levedura;
- b) Do total de leite de levedura obtido, a maior parte é novamente enviada para a fermentação de novas quantidades de mosto, e ao restante, sempre em quantidades variáveis, é adicionada água e novamente centrifugado, denominando-se esta operação de lavagem. O número de lavagens é variável, dependendo do grau de pureza desejável no produto final;
- c) Terminada a última lavagem, o leite de levedura é encaminhado à secadores rotativos, onde além da desidratação ocorre a morte das leveduras.

Segundo Santos (1993), esta secagem é necessária para que ocorra a ruptura da parede celular. Moreira (1984) e Pacheco (1996), relatam que a grossa e rígida parede celular das leveduras resiste à digestão intestinal, limitando a disponibilidade da proteína intracelular.

O processo de desidratação além de prolongar o período de conservação das leveduras, facilita o transporte, armazenamento e incorporação às rações (Fazano, 1985). Além disto, as leveduras não devem ser fornecidas vivas aos animais, pois continuando a sua atividade fermentativa no aparelho digestivo, podem causar distúrbios gastrointestinais. Estas leveduras também podem absorver vitaminas do complexo B no intestino dos animais, causando até mesmo avitaminoses (Desmonts, 1968)

A fabricação de levedura é um processo aeróbio e exergônico, portanto é necessário fornecer grandes quantidades de ar e dispor de algum sistema de eliminação de calor para manter a temperatura adequado ao processo, aproximadamente 30 ± 1 °C.

Segundo Oura (1995), a equação empírica que pode representar a formação de biomassa a partir de glicose é a seguinte:

Segundo o autor, a fórmula química da levedura seria:

Do ponto de vista industrial, a biomassa de levedura é uma matéria prima importante, contendo diferentes compostos úteis na formação de uma grande variedade de produtos. A levedura seca e o concentrado protéico são as principais formas de aplicação da biomassa. Também é utilizada para a produção de enzimas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e nucleosídeos, lipídios, carboidratos, vitaminas, etc. A biomassa de levedura pode ser usada como célula integral ou apenas alguns componentes da mesma. A extração das proteínas é realizada após a ruptura celular, e dependendo dos compostos a serem produzidos, diferentes técnicas de separação são utilizadas (Haslász & Lásztity, 1991a).

2.2.2 Acúmulo de metais pesados

Além do seu conteúdo protéico, as leveduras podem ser portadoras, em potencial, de substâncias ou elementos tóxicos, prejudiciais a saúde dos animais (Domingos, 1996). Esta toxidez pode ser originária do substrato ou toxinas produzidas pelas próprias células (Hanssen, 1982). Pode ocorrer também a presença de agrotóxicos, adubos ou inseticidas organo-clorados utilizados na cultura de cana-de-açúcar. Também os metais pesados podem estar presentes, face a habilidade das leveduras em acumular tais elementos (Brandy & Ducan, 1994; Miyada, 1987; Volesky, 1990b; Volesky, 1995). Por este motivo, análises de toxicidade em microorganismos deve ser uma análise rotineira (Hanssen, 1982).

A levedura crescendo em meio contendo uma elevada quantidade de cátions metálicos pode acumular estes metais em suas células (Volesky, 1990b; Volesky, 1995). Este fenômeno pode ser utilizado para a preparação de ingredientes de alimentos pobres em microelementos (Halász & Lásztity, 1991b).

A célula de levedura com sua complexa parede celular representa um sítio adicional de adsorção em relação às células desprovidas de parede. Considera-se a parede celular uma entidade protetora da membrana plasmática e da célula como um todo.

Segundo Wood & Wang (1983), numerosos parâmetros químicos devem ser considerados para que um íon metálico possa ser adsorvido por uma célula viva. Estes incluem carga do metal, raio iônico, a preferência do metal por ligantes orgânicos, a disponibilidade da concentração do metal como poluente, ou não, do ambiente, as reações químicas dos íons metálicos em solução. Em adição, critérios como disponibilidade, solubilidade, pH, temperatura, potencial redox, íons competidores, agentes quelantes, ligações não específicas (para proteína, argila e matéria orgânica) devem ser considerados.

O acúmulo de metais pesados por microorganismos, é geralmente bifásico: uma rápida ligação com a superfície da célula, independente do metabolismo, é seguida de um acúmulo intracelular dependente do metabolismo e com gasto de energia (Brandy &

Duncan, 1994; Massanori et al., 1985; Norris & Kelly, 1977; Valle & Ulmer, 1972; Volesky, 1990b).

Neste acúmulo não dependente do metabolismo, os cátions podem ser depositados na membrana via adsorção ou precipitação inorgânica (Remacle, 1990), ou ficarem adsorvidos à grupos aniônicos fixos, presentes na membrana da célula (Fuhrmann & Rothstein, 1968; Volesky, 1990b). O cátion divalente Cd^{+2} liga-se reversivelmente a estes sítios aniônicos (Massanori et al., 1985; Norris & Kelly, 1977).

Volesky (1990b) relata que leveduras mortas, via este processo independente de energia acumularam até 24,7 mg de cádmio por grama de célula.

Norris & Kelly (1977), constatou que a capacidade da levedura promover ligações superficiais com ions divalentes pode ser considerada relativamente baixa quando comparada com a igual capacidade de algas, bactérias e fungos filamentosos.

O acúmulo independente do metabolismo é seguido de outro, dependente do metabolismo. Neste, o ion cádmio é transportado através da parede celular, provavelmente por proteínas de transporte, até o citossol, onde fica acumulado ligado a metaloproteínas (metalotionina), que tem grande afinidade pelo metal (Brandy & Duncan, 1994; Macaskie & Dean, 1990; Norris & Kelly, 1977; Volesky, 1990b).

Metalotioninas são proteínas ricas em cisteína (30%), com baixo peso molecular e uma alta capacidade de ligação com metais em seus grupos -SH (Ecker et al., 1986; Macaskie & Dean, 1990).

A função da metalotionina tem sido alvo de muitas especulações. Segundo Ecker et al. (1986), ela está envolvida no armazenamento de metais, destoxificação, desenvolvimento, diferenciação, controle do metabolismo celular, proteção contra radicais livres tóxicos e resposta para ultra violeta. Os autores ressaltam que em muitas células, a proteína é parte de uma resposta ao estresse agudo e que é geralmente aceito que uma das funções da metalotionina é proteger a célula contra a toxicidade de metais pesados.

Segundo Macaskie & Dean (1990), a produção de metalotionina, ou de proteínas semelhantes à esta, é classicamente induzida por cádmio e, é um dos mecanismos de destoxificação.

Volesky (1993) constatou que enquanto *Sacharomyces cerevisiae* acumulou 17,98 mg de cádmio por grama de célula, *Sacharomyces uvarum* e *Candida utilis* acumularam 14,67 mg de cádmio por grama de célula, via este processo dependente de energia.

O Cd^{2+} danifica a membrana celular irreversivelmente (Macara, 1978), induzindo uma diminuição dos níveis de K^+ , semelhante à observada com *Saccharomyces cerevisiae* em presença de Hg^{2+} (Passow & Rothstein, 1960). Isto pode ser atribuído a uma disfunção na membrana após a interação do cátion divalente com os grupos sulfidríla. Os grupos sulfidríla são geralmente os sítios de ligação preferidos do Cd^{2+} e do Hg^{2+} (Norris & Kelly, 1977; Passow & Rothstein, 1960; Vallee & Ulmer, 1972)

A adição de Ca^+ diminuiu a absorção de Cd^{2+} e subsequentemente a perda de K^+ . O tratamento com Ca^+ pode ter afetado a ligação dos cátions Cd^{2+} com os grupos sulfidríl da superfície (Norris & Kelly, 1977).

A inibição da absorção de Zn^{2+} , quando da adição de Cd^{2+} sugere que a similaridade do tamanho do cátion e a semelhança na química dos elementos podem ser importantes na competição pela absorção de metais (Norris & Kelly, 1977; Volesky, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Mosto

O mosto, não esterilizado, foi preparado por diluição do caldo de cana, apresentando 12% de Açúcares Redutores Totais (ART), pH 4,5 e suplementado com 300 mg kg⁻¹ nitrogênio ((NH₄)₂SO₄), 150 mg kg⁻¹ fósforo (K₂HPO₄) e 50 mg kg⁻¹ magnésio (MgCl₂.6H₂O).

3.1.2 Levedura

Levedura úmida prensada, obtida no comércio, marca “Fleischmann”

3.1.3 Sais de cádmio

Utilizou-se dois sais de cádmio, um orgânico e outro inorgânico, para contaminar o mosto.

CdC₄H₆O₄.2H₂O PA (Synth)

CdCl₂.2 ½ H₂O PA (Química Moderna)

3.2 Métodos

3.2.1 Planejamento estatístico do experimento

O experimento foi realizado segundo o delineamento estatístico de blocos casualizados, com 5 tratamentos e 3 repetições (Gomes, 1990). As fermentações foram realizadas segundo o esquema abaixo e, os resultados analisados pelo programa SANEST (Zonta e Machado, 1992):

$\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$		$\text{CdC}_4\text{H}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Dose	Tratamento	Dose	Tratamento
0,0	1	0,0	1
0,5	2	0,5	2
1,0	3	1,0	3
2,0	4	2,0	4
5,0	5	5,0	5

3.2.2. Preparo do material

Todo material de laboratório reutilizável, foi previamente imerso, por 4 horas, em uma solução de lavagem ($\text{HNO}_3:\text{HCl}:\text{água}$ na proporção 1:2:9) sendo a seguir enxaguado com água deionizada (McDaniel, 1992).

3.2.3 Preparo do mosto

Todo o mosto utilizado, foi preparado uma única vez, em volume de 10,0 litros, suficiente para realizar toda a pesquisa. A cana foi moída, extraindo-se o caldo, cuja temperatura foi abaixada rapidamente. Após a homogeneização, o mesmo foi subdividido em frações de 2 litros sendo então armazenado em frascos e estocado a $-20^\circ\text{C} \pm 1$ até o momento do uso, quando foram descongeladas, acrescentados os nutrientes, subdivididas em frações de 0,3 kg em erlemmayer de 500 mL e contaminadas

com o sal de Cd correspondente. Procedeu-se então à inoculação com 10% do fermento prensado.

3.2.4 Preparo do inóculo

O fermento foi adquirido no comércio, de uma única partida, na forma de 3 pacotes de 500g, os quais foram homogeneizados através da quebra de blocos e estocados em geladeira (7 °C) por 2 dias, até o momento do uso, quando foi controlada a viabilidade (98,4%) segundo Moraes & Alves, 1986.

3.2.5 Fermentação

Todas as fermentações duraram 4 horas e foram mantidas a 30°C $\pm$ 1, sendo o término das mesmas confirmado por 3 medidas de BRIX, coincidentes, feitas a cada 15 minutos e, pelo término da formação da espuma.

3.2.6 Determinação da viabilidade celular

Ao final das fermentações foram retiradas alicotas de 5,0 mL para a contagem de viabilidade celular (Moraes & Alves, 1986).

3.2.7 Determinação do peso úmido

Após o término da fermentação, o vinho foi centrifugado a 1.500 gravidades e o peso úmido da levedura total recuperada foi determinado para cada ensaio em balança analítica com precisão de 3 casas decimais.

3.2.8 Determinação da matéria seca

Da levedura úmida recuperada determinou-se a matéria seca, para cada ensaio, pelo processo indireto (Silva, 1990a).

3.2.9 Determinação do álcool no vinho

Quantificou-se o etanol por cromatografia gasosa (Araújo, 1995) em aparelho AG37D com coluna capilar para álcool.

3.2.10 Dosagem de proteína bruta

Da biomassa seca foi quantificado o nitrogênio total segundo o método micro-kjeldahl utilizando o fator de conversão 6,25 para conversão em proteína bruta. O método prevê digestão sulfúrica com catalisadores, seguida de destilação e titulação (Silva, 1990b).

3.2.11 Dosagem de cádmio

Após a secagem, cerca de 1,00g foi submetida à digestão sufo-nitro-perclórica (H_2SO_4 ; HNO_3 ; HClO_4) na proporção de 2:5:3 segundo a metodologia proposta por Varma, 1986a). As amostras de biomassa foram colocadas em tubos de ensaio de 20x250 e aquecidos à 250°C por 5 horas até a total descoloração, quando o material foi considerado mineralizado. As amostras foram então diluídas a 25 mL em balão volumétrico e submetidas à análise. O cádmio foi quantificado por espectrofotômetro de absorção atômica marca Varian-AA 175.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor de cádmio na levedura

Em todos os níveis de contaminação estudados houve acúmulo estatisticamente significativo de cádmio, ao nível de 99% de confiança, como mostra a Tabela 2. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Domingos (1996), que trabalhou com acúmulo de cádmio por *S.cerevisiae* fermentando mosto de melaço contaminado com cloreto e acetato de cádmio, e os obtidos por Brady & Duncan (1994), que trabalharam com bioacumulação de cádmio em soluções contaminadas com cloreto de cádmio.

A figura 1 mostra as altas correlações ($r = 0,9786$ para acetato e $r = 0,9244$ para cloreto) com os teores do mesmo nos mostos. Nas condições do presente estudo não é possível quantificar as contribuições da biosorção e da bioacumulação para os teores de cádmio determinados na levedura bruta.

Tabela 2. Concentração de cádmio (mg kg^{-1}) na levedura bruta seca

		mg de Cd kg ⁻¹ de mosto							
Sal	Dose	CdC ₄ H ₆ O ₄ .2H ₂ O				CdCl ₂ .2 ½ H ₂ O			
		0,5	1,0	2,0	5,0	0,5	1,0	2,0	5,0
Cd na	Levedura	1,9C	3,3C	6,5B	10,6A	1,2c	4,0b	5,1b	8,0a

As médias seguidas pela mesma letra, para um mesmo sal, não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 1% de significância.

Figura 1 - Correlação entre as contaminações no mosto e os teores de cádmio determinados na levedura bruta

4.2 Teor alcoólico no vinho

A Tabela 3 mostra os teores alcoólicos nos vinhos das fermentações com diferentes níveis de contaminação de cádmio. Estatisticamente, não foi detectada uma diferença significativa na produção de etanol entre os mostos contaminados e a testemunha.

Tabela 3. Etanol presente no vinho centrifugado (v/v)

	mg de Cd kg ⁻¹ de mosto									
Sal	CdC ₄ H ₆ O ₄ .2H ₂ O					CdCl ₂ .2 ½ H ₂ O				
	Dose	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,0	0,5	1,0	2,0
% etanol	6,57A	7,07A	6,31A	6,52A	5,93A	6,57a	6,66a	6,75a	6,99a	6,92a

As médias seguidas pela mesma letra, para um mesmo sal, não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 1% de significância.

4.3 Viabilidade celular

A Tabela 4 mostra a viabilidade celular. A análise estatística não detectou diferenças significativas entre os níveis de contaminação estudados. Entretanto, o estudo presente não inclui o reaproveitamento das leveduras em fermentações consecutivas. Assim sendo, não fica excluída a possibilidade de, com numerosas reciclagens do fermento, aparecerem sintomas de toxicidade crônica, com reflexos na viabilidade celular e no transcurso normal das fermentações.

Tabela 4. Porcentagem da viabilidade celular da levedura recuperada através da centrifugação do mosto contaminado com cádmio, após a fermentação.

Sal	mg de Cd kg ⁻¹ de mosto									
	CdC ₄ H ₆ O ₄ .2H ₂ O					CdCl ₂ .2 ½ H ₂ O				
Dose	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0
Células vivas	94,53A	92,40A	89,88A	89,81A	91,14A	93,53a	93,85a	90,23a	90,0a	91,37a

As médias seguidas pela mesma letra, para um mesmo sal, não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 1% de significância.

4.4 Peso seco e peso úmido da levedura

Do mesmo modo, o peso úmido e o peso seco da levedura recuperada, após cada fermentação (Tabela 5) não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os teores de contaminação estudados. Para estes resultados, também são válidas as ressalvas feitas para a viabilidade celular.

Tabela 5. Pesos úmido e seco em gramas, da levedura recuperada, após a fermentação dos mostos contaminados com cádmio.

mg de Cd kg ⁻¹ de mosto										
Sal	CdC ₄ H ₆ O ₄ .2H ₂ O					CdCl ₂ .2 ½ H ₂ O				
Dose	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0
Peso úmido	31,94	31,99	32,01	31,85	31,45	31,94	31,73	32,03	32,47	31,77
Peso seco	8,17A	7,99A	8,22A	8,13A	7,96A	8,17a	8,18a	8,29a	8,32a	8,15a

As médias seguidas pela mesma letra, para um mesmo sal, não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 1% de significância.

4.5 Porcentagem de proteína bruta na levedura

Entre os teores de proteína bruta mostrados na Tabela 6, foram detectadas diferenças significantes, segundo o teste de Tukey a 1% de significância, podendo-se observar um aumento não linear nas porcentagens de proteína em relação aos teores de cádmio no meio.

Isto pode ser reflexo do bloqueio de vias metabólicas, favorecendo a permanência de produtos nitrogenados dentro da célula, fazendo assim que as mesmas fujam da normalidade metabólica em uma determinada condição, e passem a acumular produtos nitrogenados (Domingos, 1996).

Por outro lado, o cádmio é acumulado pela levedura no citossol, ligado a metaloproteínas (metionina), que tem grande afinidade pelo metal (Brandy & Duncan, 1994; Macaskie & Dean, 1990; Volesky, 1990b). A produção de metalotioninas, ou de proteínas semelhantes a estas, é classicamente induzida por cádmio, sendo um dos mecanismos de destoxificação (Ecker et al., 1986; Macaskie & Dean, 1990).

Tabela 6. Proteína bruta da levedura recuperada após a fermentação de mostos contaminados com cádmio ($f=6,25$).

	mg de Cd kg ⁻¹ de mosto									
Sal	CdC ₄ H ₆ O ₄ .2H ₂ O					CdCl ₂ .2 ½ H ₂ O				
Dose	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,0	0,5	1,0	2,0	5,0
Teor de proteína (%)	29,31B	26,25B	27,13B	30,63B	44,23A	29,31b	30,63b	42,44a	46,81a	44,23a

As médias seguidas pela mesma letra, para um mesmo sal, não diferem entre si segundo Tukey a 1% de significância.

5 CONCLUSÕES

Saccharomyces cerevisiae concentra cádmio durante a fermentação de mosto de caldo-de-cana com contaminações subtóxicas de cloreto e acetato de cádmio.

Nos teores de contaminações empregados no presente estudo, houve aumento estatisticamente significativo no teor de proteína bruta das células.

Nas dosagens estudadas e sem a reutilização da levedura em fermentações sucessivas, não foram detectados efeitos tóxicos aparentes, não havendo diferenças entre os tratamentos no que se refere à produção de etanol, viabilidade celular, peso úmido da levedura recuperada, nas células após a fermentação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, D. C. **Trace Elements in the Terrestrial Environment**. New York: Springer-Verlang, 1986. cap.4, p.105-155: Cadmium.
- ALLOWAY, B. I. **Heavy Metals in Soils**. 2ª ed. New York: John Wiley, 1995, cap.3, p.38-57: The origins of heavy metals in soils.
- AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; COSTA, L. M.; OLIVEIRA, C.; VELLOSO, A. C. X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.16, n.2, p.271-276, 1992.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995. cap.8, p.163-190: Cromatografia de Fase Gasosa.
- ARTEAGA, D. H. **Dinâmica de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco no sistema solo-planta**. Viçosa, 90p, 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- BABICH, H. & STOTZKY, G. Effects and cadmium on the biota: influence on environmental factors. **Advances in Applied Microbiology**. v. 23 p.55-117, 1978.

- BABICH, H. & STOTZKY, G. Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the microbiota. In: NRIAGU, J.O. ed. **Aquatic toxicology**, New York: Wiley & Sons, 1983, cap.1, p.1-46.
- BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces Meyen ex* Reess: a short review for nontaxonomists. **Yeast**. v.8, p.1-23, 1992.
- BERTO, D. A. Uso da levedura desidratada na alimentação de suínos. In: **Anais do Simpósio Sobre Tecnologia da Produção e Utilização da Levedura Desidratada na Alimentação Animal**. Campinas, São Paulo, 1997, cap. 5, p.85-110.
- BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.41, n.1, p.149-159, 1994.
- CHANEY, R. L. Metal speciation and interactions among elements affect trace elements transfer in agricultural and environmental food chains. In: KRAMER, J. R. & ALLEN, H. E. **Metal speciation theory analysis and application**. Chelsea: Lewis Publ., 1988, cap.08, p.219-260.
- CENCI, G.; MOROZZI, G. Evaluation of the toxic effect of Cd^{+2} and $Cd(CN)^2$ ions on the growth of mixed microbial of activated sludges. **The Science of the Total Environment**. v.07, p.131-143, 1977.
- COKER, E. G. & MATTEWS, P. J. Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. **Water Science Technology**. v.15, p.209-225, 1983.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**. n.39, p.7-18, 1968.

- DOMINGOS, R. N. **Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando em mosto de melão**. Piracicaba, 1996, 63p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DZIEDAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**. v.41, n.02, p104-121, 1987.
- ECKER, D. J.; BUTT, T. R.; STERNBERG, E. J.; NEEPER, M. P.; DEBOUCK, C.; GORMAN, J. A.; CROOKE, S. T. Yeast metallothionein functional in metal ion detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**. v.261, n.36, p.16.895-16-900, 1986.
- ELPO, E. R. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação de teores de cádmio, chumbo, cromo e níquel nos alimentos da cesta básica. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v.13, n.02, p.71-84, 1995.
- FAZANO, A. R. T. **Digestibilidade e valor biológico da proteína da levedura seca (*Saccharomyces spp*) e do farelo de soja para coelhos**. Piracicaba, 1985, 64p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FUHRMANN, G. F.; ROTHSTEIN, A. The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.163, p. 325-330, 1968.
- GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. The influence of composting and naturation process on the heavy metal extractability from some organic wast. **Biological Wastes**. v.31, p.291-301, 1990.

- GERHARDSSON, L.; SKERFVING, S. Concepts on Biological Markers and Biomonitoring for Metal Toxicity. In CHANG, L. W. **Toxicology of Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Press IC. 1996. cap.06, p.81-112.
- GOMES, F. P. Estatística Experimental. 13° ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 1990, 468 p.
- GOUVÊA, L. C. **Estudo da compostabilidade do lodo de esgoto e avaliação da distribuição química de metais pesados no decorrer do processo**. Viçosa, 1995, 255p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC PRESS, 1991a, cap.05, p.115-189: Extration of yeast proteins: yeast protein concentrates and isolates.
- HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC PRESS, 1991b, cap.06, p.193-195: Introduction.
- HANSSEN, J.T. Bioproteins in the feeding of growing-finishing pigs in Norway. I. Chemical composition, nutrient digestibility and protein quality of "Pruteen", "Tropina", "Pequilo" and a methanol-based yeast product (*Pichia aganobii*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.47, p.35-42, 1982.
- JORGE, J. A.; CAMRGO, O. A.; VALADARES, J. S. M. A. Condições físicas de um latossolo vermelho-escuro quatro anos após a aplicação de lodo de esgoto e calcareo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.15, n.03, p.237-240, 1991.
- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1984a, Cap. 2 p.3-14: The Anthroposphere.

- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. **Soils Constituents**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1984b, Cap. 4 p.33-50: The Anthroposphere.
- LAHR FILHO, D.; GUIRALDINI, J. A.; ROSSEL, C. E. V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In. SGARBIERI, V. C.; DRAETTA, I. S. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação animal e humana**. Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada. 1996. cap.07, p.59-67.
- LAKE, D. J. Sludge disposal to land. In: LESTER, J. N. (ed) **Heavy metals in wastewater and sludge treatment process**. Flórida: CRC Press Inc, 1987, v.2. Treatment and disposal. cap.5 p.91-130.
- LIMA, G. J. M. M. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação**. Piracicaba, 1983, 139p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1979. cap. 19, p.315-327: Cadmium.
- LOPES, J. J. C. **Bagaço de nutrientes minerais no processo Melle- Boinot de fermentação alcoólica**. Piracicaba, 1989, 74p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MACARA, I. G. Accomodation of yeast to toxic levels of cadmium ions. **The Journal General of Microbiology**. v.104, n.02, p.321-324, 1978.

- MACASKIE, L. E.; DEAN, A. C. R. Metal-sequestering biochemicals. In: VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Pres IC. 1990. cap.2.5, p.199-248.
- McDANIEL, W. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. In: SMOLEY, C. K. **Methods for the determination of metals in environmental samples**. Boca Ranton, Flórida: CRC Press Inc. 1992. cap. 3, p.25-32.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: Micronutrientes e metais pesados, mistificação e fatos**. São Paulo: Produquímica, 1994, 153p.
- MASON, J. O. **Toxicological profiles: cadmium**. Washington: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1987, 100p.
- MASSANORI, J.; IMAI, T.; MURAYAMA, T. Different distribution of Cd^{+2} between Cd sensitive and Cd resistant strais of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of General Microbiology**. v.131, n.01, p.53-56, 1985.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M. M. **Comportamento de cobre, cádmio, crômio, níquel e zinco adicionados à 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.
- MATTHEWS, P. J. Control of metal application rates from sewage sludge utilization in agriculture. **CRC Critical Reviews in Environmental Control**. v.14, n.3, p.199-250, 1984.
- McBRIDE, M. B. Retention of Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} by amorphous alumina. **Soil Science Society America Journal**. v.42, p.27-31, 1978.

MINAMI, P. S. Leveduras. In: VITOLO, M. & MINAMI, P. S. Ed. **Leveduras em Biotecnologia**. Faculdade de Ciências Farmaceuticas, USP São Paulo, 1987, cap. 1, p.2-4.

MIRANDA, C. E. S. **Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com pré-concentração em resina de troca iônica empregando sistema FIA**. São Carlos, 1993. 89p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MIYADA, V.S. **Uso de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento**. Piracicaba. 1978 106p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MORAES, S. A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Editora Manolo, 1986. cap. 14, p.278-288.

MOREIRA, J.R.A. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento**. Piracicaba. 1984. 107p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Palulo.

MULLA, D. J.; PAGE, A. L.; GANJE, T. J. Cadimum accumulations and bioavailability in soils from long-term phosphorus fertilization. **Journal of Environmental Quality**. v.9, n.3, p.408-412, 1980..

- NOGAWA, K.; KIDO, T. Itai-itai disease and health effects of cadmium. In CHANG, L. W. **Toxicology of Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Press IC. 1996. cap.21, p.353-369.
- NOGUEIRA, A. V. **Eficiência agronômica como fertilizante de um lodo de esgoto e de dois resíduos provenientes de industriais siderúrgica**. Viçosa. 1990, 85p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- NORRIS, P. R. & KELLY, D. P. Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisie*. **The Journal of General Microbiology**. v.99, n.02, p.317-324, 1977.
- 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
- OMAE, S. **Adsorção e deslocamento dos metais pesados cromo, chumbo e cádmio em alguns solos do estado de São Paulo**. Piracicaba, 1986, 184p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- OURA, E. Biomass from Carbohydrates. in REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: A Multi-Volume Comprehensive treatise**. 2º ed, Wheimeim: Verlag Chemie. vol.3, cap.01, p.03-41, 1995, 12v. .
- PACHECO, M. T. B. Levedura como fonte de proteína: extração, isolamento, propriedades nutritivas e funcionais. In. SGARBIERI, V. C.; DRAETTA, I. S. **Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação animal e humana**. Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada. 1996. cap.01, p.5-14

PACYNA, J. M. Monitoring and Assessment of Metal Contaminants in the Air. in CHANG, L. W. **Toxicology of Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Press IC. 1996. cap.01, p.9-28.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. v.2, cap. 16, p.345-366: Fungos: As leveduras.

PEREIRA, J. C. **Avaliação da contaminação do meio ambiente por metais pesados na região do Vale do Aço (MG)**. Viçosa, 1995, 117p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

PASSOW, H. & ROTHSTEIN, A. The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. **Journal of General Physiology**. v.43, p.621-633, 1960.

PEZZATO, A.C. Utilização de levedura na alimentação de monogástricos: I. Aves In: **VI SEMANA DE ZOOTECCIA: 1º SIMPÓSIO SOBRE APROVEITAMENTO DE SUB-PRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**. Botucatu, 1985. p. 37-55.

REILLY, C. **Metal Contamination of Food**. New York, Elsevier, 1991. cap.6, p.131-151: Mercury and Cadmium.

REMACLE, J. The cell wall and metal binding. In: VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Ranton, Flórida: CRC Pres Inc. 1990. cap.2.1., p.83-92.

ROBARDS, K.; WOURSFOLD, P. Cadmium: Toxicology and analysis. **Analyst**. v. 116, n.06, p. 549-568, 1991.

SANTOS, J. A. **Utilização da levedura seca (*Saccharomyces spp*) na alimentação de potros**. Piracicaba, 1993, 64p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 1990a, cap.01, p.1-11: Conceitos gerais sobre análise de alimentos e determinação da matéria seca.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 1990b, cap. 5, p.24-38: Dosagem de nitrogênio total pelo método kjeldahl.

TAVARES, T. M. **Avaliação dos efeitos das emissões de cádmio e chumbo em Santo Amaro, Bahia**. São Paulo, 1990, 274p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. **Avaliação da exposição de populações humanas à metais pesados no ambiente: exemplos do Reconcavo Baiano**. **Química Nova**. v.15, n.2, p.147-54, 1992.

TREVORS, J.T.; STRATTON, G.W.; GADD, G.M. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. **Canadian Journal of Microbiology**. v.32, n.06, p.447-464, 1986.

VALLE, B.L. & ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annual Review of Biochemistry**. v.41, p.91-128, 1972.

VARMA, A. **Handbook of Atomic Absorption Analysis**. 3ª ed. v.I. Boca Raton: Flórida CRC Press, Inc. 1986a. cap.1, p.3-43: Atomic absorption spectroscopy.

- VARMA, A. **Handbook of Atomic Absorption Analysis**. 3^a ed. v.II. Boca Raton: Flórida CRC Press, Inc. 1986b. cap.2, p.73-184: Group IIB elements (Zn, Cd, Hg).
- VICENTE, E. Fisiologia das leveduras: metabolismo fermentativo e oxidativo, nutrição e crescimento. In: VITOLO, M. & MINAMI, P. S. Ed. **Leveduras em Biotecnologia**. Faculdade de Ciências Farmaceuticas, USP São Paulo, 1987, cap. 3, p.11-20.
- VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Press Inc. 1990a. cap.1.2, p.7-43: Removal and Recovery of Heavy Metals by Biosorption.
- VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton, Flórida: CRC Press Inc. 1990b. cap.2.3, p.139-171: Biosorption of Fungal Biomass.
- VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z.R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotecnology & Bioengineering**. n.41, p.826-829, 1993.
- VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.42, n.05, p.797-806, 1995.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST 2: Sistema de Análise Estatística para Computadores**. Piracicaba: SEI, 1992 (softer).
- WOOD, J.M. Biological cycles for toxic elements in the environment. **Science**. v.183, n.4.129, p.1049-1052, 1974.
- WOOD, J.M. & WANG, H.K. Microbial resistance to heavy metals. **Environmental Science Technology**. v.17, n.12, p.582-590, 1983.

ANEXO: Análise Estatística

```

*****
*      ENEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elcio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP  *
*      ANALISE DA VARIÁVEL CONCLEV - ARQUIVO: CLCADMIO      *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCLEVO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCLEVO	4	121.1966341	30.2991585	151.4803	0.00001
RESIDUO	10	2.0002048	0.2000205		
TOTAL	14	123.1968389			

MEDIA GERAL = 3.662000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.213 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCLEVO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	CONCLEVO	3	8.000000	8.000000	a	A
2	4	CONCLEVO	3	5.100000	5.100000	b	B
3	3	CONCLEVO	3	4.000000	4.000000	b	B
4	2	CONCLEVO	3	1.200000	1.200000	c	C
5	1	CONCLEVO	3	0.210000	0.210000	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 1.20069 - D.M.S. 1% = 1.38542

```

*****
*      SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP *
*      ANALISE DA VARIÁVEL ETANOLX - ARQUIVO: CLETANOL  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCO AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCHEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCHEIO	4	0.3648272	0.0912068	0.1622	0.95064
RESIDUO	10	5.6231456	0.5623146		
TOTAL	14	5.9879728			

MEDIA GERAL = 6.778667

COEFICIENTE DE VARIACAO = 11.062 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCHEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	CONC20	3	6.993333	6.993333	a	A
2	5	CONC50	3	6.916667	6.916667	a	A
3	3	CONC10	3	6.746667	6.746667	a	A
4	2	CONC05	3	6.663333	6.663333	a	A
5	1	CONC00	3	6.573333	6.573333	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 2.01318 - D.M.S. 1% = 2.65826


```

*****
#          SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA          #
#  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  #
#  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP  #
#          ANALISE DA VARIABEL ETANOL% - ARQUIVO: ACETANOL  #
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSAVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCO AO ACASO

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	CONCMEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCMEIO	4	2.0509492	0.5127373	0.6479	0.64302
RESIDUO	10	7.9139442	0.7913944		
TOTAL	14	9.9648934			

MEDIA GERAL = 6.400667

COEFICIENTE DE VARIACAO = 13.727 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCMEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	CONC05	3	7.066667	7.066667	a	A
2	1	CONC00	3	6.573333	6.573333	a	A
3	4	CONC20	3	6.523333	6.523333	a	A
4	3	CONC10	3	6.306667	6.306667	a	A
5	5	CONC50	3	5.933333	5.933333	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 2.38830 - D.M.S. 1% = 3.15358

```

*****
*      SANESE - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Ionta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP  *
*      ANALISE DA VARIÁVEL PROTEÍX - ARQUIVO: ACPROTEI      *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS A ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	CONCNEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCNEIO	4	642.7949480	160.6987370	40.1752	0.00004
RESIDUO	10	39.9994549	3.9999455		
TOTAL	14	682.7944029			

MEDIA GERAL = 31.610000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 6.347 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCNEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	CONC50	3	44.230001	44.230001	a	A
2	4	CONC22	3	30.630000	30.630000	b	B
3	1	CONC00	3	29.310000	29.310000	b	B
4	3	CONC12	3	27.130000	27.130000	b	B
5	2	CONC05	3	26.250000	26.250000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 5.36932 - D.M.S. 1% = 7.00981

```

*****
*      BANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elcio Paulo Zonta - Amauri Almeida Macnaco  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP  *
*  ANALISE DA VARIÁVEL PROTEIN - ARQUIVO: CLPROTEI  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: 60NEC0

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCEIO	4	776.9521795	194.2380449	19.6864	0.00025
RESIDUO	10	98.6661866	9.8666187		
TOTAL	14	875.6183661			

MEDIA GERAL = 38.558667

COEFICIENTE DE VARIACAO = 8.148 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	CONC22	3	46.810223	46.810223	a	A
2	5	CONC55	3	44.230201	44.230201	a	A
3	3	CONC12	3	41.773331	41.773331	a	A
4	2	CONC05	3	38.630000	38.630000	b	B
5	1	CONC20	3	29.312000	29.312000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 3.43289 - D.M.S. 1% = 11.13504

* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA *

* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado *

* Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP *

* ANALISE DA VARIÁVEL VIABIL - ARQUIVO: ACVIABIL *

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCRETO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCRETO	4	46.7724583	11.6931146	5.1098	0.01679
RESIDUO	10	22.8837888	2.2883789		
TOTAL	14	69.6562471			

MEDIA GERAL = 91.552666

COEFICIENTE DE VARIACAO = 1.652 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCRETO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONC00	3	94.529999	94.529999	a	A
2	2	CONC05	3	92.403330	92.403330	ab	A
3	5	CONC50	3	91.139994	91.139994	ab	A
4	3	CONC10	3	89.876668	89.876668	b	A
5	4	CONC20	3	89.813334	89.813334	b	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 4.06122 - D.M.S. 1% = 5.36255

```

*****
*      SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP *
*      ANALISE DA VARIÁVEL VIABILZ - ARQUIVO: CLVIABIL  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
-------	------

A	CONCMEIO
---	----------

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCMEIO	4	52.3216902	13.0804225	2.3632	0.12294
RESIDUO	10	55.3496054	5.5349605		
TOTAL	14	107.6712955			

MEDIA GERAL = 91.990669

COEFICIENTE DE VARIACAO = 2.557 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCMEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONC00	3	94.529999	94.529999	a	A
2	2	CONC05	3	93.846670	93.846670	a	A
3	5	CONC50	3	91.373332	91.373332	a	A
4	3	CONC10	3	90.226664	90.226664	a	A
5	4	CONC20	3	89.976664	89.976664	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 6.31611 - D.M.S. 1% = 8.33998

```

*****
*      SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP *
*      ANALISE DA VARIÁVEL PESOSECO - ARQUIVO: ACPSECO  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCMEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCMEIO	4	0.1551521	0.0387880	0.0388	0.99439
RESIDUO	10	10.0000091	1.0000009		
TOTAL	14	10.1551612			

MEDIA GERAL = 8.094000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.355 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCMEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	CONC10	3	8.220000	8.220000	a	A
2	1	CONC00	3	8.170000	8.170000	a	A
3	4	CONC20	3	8.130000	8.130000	a	A
4	2	CONC05	3	7.990000	7.990000	a	A
5	5	CONC50	3	7.960000	7.960000	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 2.68468 - D.M.S. 1% = 3.54493

```

*****
*      SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP  *
*      ANALISE DA VARIÁVEL PESOSSECO - ARQUIVO: CLPSECO  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	CONCMEIO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCMEIO	4	0.0716162	0.0179041	0.0179	0.99780
RESIDUO	10	10.0000228	1.0000023		
TOTAL	14	10.0716390			

MEDIA GERAL = 8.222000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 12.163 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCMEIO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	4	CONC20	3	8.320000	8.320000	a	A
2	3	CONC10	3	8.290000	8.290000	a	A
3	2	CONC05	3	8.180000	8.180000	a	A
4	1	CONC00	3	8.170000	8.170000	a	A
5	5	CONC50	3	8.150000	8.150000	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 2.68460 - D.M.S. 1% = 3.54493

```

*****
*      SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA      *
*  Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado  *
*  Departamento de Matematica e Estatistica - ESALQ - USP *
*      ANALISE DA VARIÁVEL CONCLEV - ARQUIVO: ACCADMIO  *
*****

```

CODIGO DO PROJETO: BONECO

RESPONSÁVEL: SAMUEL MARIANO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: BLOCOS AO ACASO

OBSERVAÇÕES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A CONCLEVO

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	S.L.	S.Q.	D.M.	VALOR F	PROB.>F
CONCLEVO	4	208.6886517	52.1721629	260.8344	0.00001
RESIDUO	10	2.0002026	0.2000203		
TOTAL	14	210.6888543			

MEDIA GERAL = 4.462000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 10.023 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE CONCLEVO

NUM.ORDEN	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	CONC50	3	10.600000	10.600000	a	A
2	4	CONC20	3	6.500000	6.500000	b	B
3	3	CONC10	3	3.300000	3.300000	c	C
4	2	CONC05	3	1.900000	1.900000	d	C
5	1	CONC00	3	0.010000	0.010000	e	D

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 1.20069 - D.M.S. 1% = 1.58542