**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Leveduras como bioindicadores de cádmio no solo

Ana Cláudia Lo Buono Tavares

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2013**

Ana Cláudia Lo Buono Tavares
Licenciada em Ciências Biológicas

Leveduras como bioindicadores de cádmio no solo

Orientadora:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Tavares, Ana Cláudia Lo Buono
Leveduras como bioindicadores de cádmio no solo / Ana Cláudia Lo Buono
Tavares.- - Piracicaba, 2013.
93 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Leveduras 2. Bioindicadores 3. Cádmio 4. Metal I. Título

CDD 631.41
T231L

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

À minha querida mãe Gabriela,
Por ser minha base e força de vida.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter me iluminado e me dado serenidade e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Simone, pela orientação, por sempre estar disposta a me ajudar e pela amizade.

Ao Dr. Luiz Humberto (Beto), pela orientação, paciência e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Kamogawa pela colaboração e ensinamentos no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) pela oportunidade em ingressar no curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Jeane, Sérgio, Felipe, Joze, Flávio, Dea, Natália e Marquinhos, pelas reuniões descontraídas e pela amizade. A Paula, pela colaboração no trabalho.

À minha mãe por sempre estar ao meu lado me apoiando, dando carinho e amor em todos os momentos da minha vida. Amo muito você.

Aos meus irmãos Frederico, Sérgio e Daniel pelo apoio e carinho, em especial ao Sérgio pela ajuda financeira que possibilitou minha estadia em Piracicaba e pelas longas conversas que me fizeram me sentir menos sozinha. Amo vocês.

Às minhas tias Rosária e Betânia pelo apoio, preocupação e carinho sempre.

À minha grande família pelo amor incondicional.

À minha amiga-irmã Giselle por sempre acreditar na minha capacidade e me dar coragem pra enfrentar as minhas dificuldades. Te agradeço muito por fazer parte da minha vida! Amizade pra vida toda!

Ao Felipe Cury por ter me acolhido em Piracicaba, ter me abrigado em sua casa e ter se tornado um grande amigo.

Ao Cassiano por ser uma pessoa muito especial em minha vida! Pela sua preocupação, apoio, incentivo e carinho.

À minha querida amiga Arlete que sempre esteve comigo nos momentos mais alegres de Pira, pelo seu companheirismo e carinho. Amizade eterna.

À minha amiga Luly que pelo pouco tempo de convivência se tornou essencial na minha vida, que tornou os momentos no laboratório mais alegres e tranquilos.

Obrigada pelas risadas, bobagens e comilanças. Te adoro muito!

Aos amigos da Esalq, Alice, Luciano, Elisa, Vivian, Lay, Fabi, Marcelo, Tati Paulinho, Fabito e Galuppo, pelos momentos especiais. Obrigada por tornarem meus dias aqui mais divertidos.

Às minhas amigas-irmãs Belou, Bruna e Karla que mesmo de longe sempre estiveram presentes em minha vida.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Recomeçar

Não importa onde você parou...

em que momento da vida você cansou...

o que importa é que sempre é possível

e necessário "RECOMEÇAR".

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...

é renovar as esperanças na vida

e o mais importante...

acreditar em você de novo...”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão Bibliográfica.....	21
2.1.1 Áreas contaminadas.....	21
2.1.2 Metais.....	23
2.1.2.1 Metal cádmio.....	25
2.1.3 Indicadores.....	29
2.1.3.1 Organismos utilizados como bioindicadores.....	31
2.1.3.1.1 Bioindicadores aquáticos.....	31
2.1.3.1.1.1 Algas.....	32
2.1.3.1.1.2 Macroinvertebrados bentônicos.....	32
2.1.3.1.1.3 Perifíton.....	34
2.1.3.1.1.4 Microcrustáceos.....	34
2.1.3.1.1.5 Peixes.....	35
2.1.3.1.1.6 Insetos.....	36
2.1.3.1.2 Bioindicadores terrestres.....	37
2.1.3.1.2.1 Oligoquetas.....	37
2.1.3.1.2.2 Plantas.....	39
2.1.3.1.3 Micro-organismos como bioindicadores.....	39
2.1.3.1.3.1 Bactéria.....	39
2.1.3.1.3.2 Fungos filamentosos.....	40
2.1.3.1.3.3 Fungos unicelulares (Leveduras).....	41
2.1.4 Justificativa.....	42
3 Objetivos.....	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.1.1 Objetivos específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45

4.1 Material Microbiológico.....	45
4.2 Cultivo das leveduras.....	46
4.3 Seleção de leveduras não floculantes.....	46
4.4 Ensaios biológicos.....	46
4.4.1 Soluções de cádmio utilizadas nos ensaios.....	46
4.4.2 Ensaios biológicos para avaliação da inibição do crescimento das leveduras na presença de solução com cádmio.....	46
4.4.3 Ensaios biológicos para avaliação da atividade metabólica com o uso da técnica do Trifeniltetrazólio (TTC).....	48
4.4.4 Ensaios biológicos para avaliação da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio.....	48
4.4.4.1 Obtenção das amostras de solo.....	48
4.4.4.2 Seleção de extratores de cádmio no solo.....	49
4.4.5 Ensaios de germinação e crescimento de sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) em solução de cádmio e milho (<i>Zea mays</i>) em extrato de solo com cádmio.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Avaliação de linhagens de leveduras quanto a característica de floculação.....	53
5.2 Avaliação da inibição do crescimento das leveduras na presença de solução com cádmio.....	54
5.3 Avaliação da viabilidade celular com a utilização do TTC.....	61
5.4 Avaliação da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contendo cádmio.....	63
5.5 Avaliação dos ensaios de germinação e crescimento de sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) em solução de cádmio e milho (<i>Zea mays</i>) em extrato de solo contendo cádmio.....	68
5.5.1 Teste com germinação e crescimento de sementes de <i>Cucumis sativus</i> em solução padrão de cádmio.....	68
5.5.2 Teste com germinação de sementes de <i>Zea mays</i> em extrato de solo com cádmio.....	72
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Leveduras como bioindicadores de cádmio no solo

Devido à ampla utilização do cádmio nas indústrias, muitos solos encontram-se contaminados. Vários estudos com bioindicadores estão sendo realizados para detectar cádmio em solos, sendo a maioria com minhocas (*Eisenia fetida*) e plantas, contudo estes testes são laboriosos e longos. Os micro-organismos tem se mostrado uma alternativa promissora para esta aplicação, pois são de fácil cultivo e manutenção, além de apresentarem uma rápida resposta às alterações ambientais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes gêneros de leveduras como bioindicadores de cádmio no solo. Para tanto foram avaliadas dezoito linhagens de leveduras, das quais foram selecionadas três quanto à sensibilidade na presença de cádmio. A levedura *Torulopsis utilis* var. *thermophilus* (IZ214) apresentou alta sensibilidade, a *Candida utilis* (IZ300) sensibilidade mediana e *Saccharomyces cerevisiae* (Pedra) a menor sensibilidade. O crescimento foi avaliado por espectrometria, através de leituras de D.O. e pela técnica do Trifeniltetrazólio (TTC) para avaliação da viabilidade celular. O uso do TTC mostrou-se mais adequado nos bioensaios com leveduras evidenciando as células metabolicamente ativas. Foi avaliado o crescimento das leveduras em extratos de solo com cádmio obtidos pelo extrator CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Observou-se que o crescimento das leveduras na maioria dos tratamentos foi igual ou superior ao controle. Isso ocorreu devido à adsorção do cádmio à matéria orgânica e outros elementos. Para comprovar a adsorção do cádmio à matéria orgânica, foi realizado ensaio com a levedura *S. cerevisiae* (Pedra) onde ao extrato de solo obtido foi adicionado solução de Cd^{2+} . Através da leitura de D.O. foi observada uma taxa de inibição de 75% para 100 mg L^{-1} de cádmio e, pela técnica do TTC, a taxa de inibição de 100% ocorreu na concentração de 44 mg L^{-1} . Ensaios com sementes foram realizados para avaliar a germinação e crescimento na presença de cádmio. Sementes de *Cucumis sativus* foram expostas à solução de Cd^{2+} , ocorrendo 100% de germinação e apresentando DL_{50} de $7,33 \text{ mg L}^{-1}$. Este resultado foi maior comparado aos obtidos para as leveduras avaliadas, as quais apresentaram uma DL_{50} de $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ para a levedura *T. utilis* (IZ214) e DL_{50} de $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ para a *S. cerevisiae* (Pedra). As sementes de *Zea mays* foram expostas ao extrato de solo com cádmio, onde foi obtido uma DL_{50} de $33,9 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e, nas mesmas condições para a levedura *S. cerevisiae* (Pedra), a DL_{50} foi de $29,8 \text{ mg L}^{-1}$. Os resultados obtidos mostraram uma proximidade de valores nos ensaios com extrato de solo com cádmio entre a semente de milho e levedura. Com isso, foi possível concluir que as leveduras são sensíveis ao cádmio e podem ser uma nova opção de bioindicadores. Além disso, as leveduras e principalmente a *S. cerevisiae* possuem um alto grau de homologia com os eucariotos superiores, permitindo assim o estudo de aspectos de toxicidade relevantes a biologia humana.

Palavras-chave: Leveduras; Bioindicadores; Cádmio; Metal

ABSTRACT

Yeasts as indicators of cadmium in soil

Due to extensive use of cadmium in industries, many soils are contaminated. Several studies are being conducted with biomarkers to detect cadmium in soils, mostly with earthworms (*Eisenia fetida*) and plants, however, these tests are laborious and lengthy. Micro-organisms have been presented as an alternative to this application, as they are easy to grow and maintain, and offer a rapid response to environmental changes. Thus, the aim of this study was to use different kinds of yeasts as indicators of cadmium in soil. Eighteen yeasts strains were evaluated, from which three were selected for their sensitivity in the presence of cadmium. The yeast *Torulopsis utilis* var. *thermophilus* (IZ214), showed high sensitivity, *Candida utilis* (IZ300), showed a median sensitivity and *Saccharomyces cerevisiae* (Ale Yeast) a showed lower sensitivity. Yeasts growth was assessed through spectrophotometry, by reading O.D. and by the technique Triphenyltetrazolium (TTC) to assess cell viability. The use of TTC was more appropriate as an indicator of cell viability in yeast bioassays showing metabolically active cells. We evaluated the growth of yeasts in soil extracts with cadmium obtained by extraction with CaCl_2 0.01 mol L^{-1} . It was observed that the growth of the yeast on most of the treatments was equal or superior to the control. This was due to the adsorption of cadmium to organic matter and other elements. To prove the adsorption of cadmium to organic matter, an essay was performed with the yeast *S. cerevisiae* (Ale Yeast), in which the soil extract solution obtained was added with Cd^{2+} . By reading the O.D. it was observed an inhibition rate of 75% for 100 mg L^{-1} cadmium and, by the TTC technique, the highest rate of 100% inhibition occurred at a concentration of 44 mg L^{-1} . Seeds trials were conducted to evaluate germination and growth. *Cucumis sativus* seeds were exposed to a solution of Cd^{2+} , resulting in 100% of germination and showing a LD_{50} of 7.33 mg L^{-1} , which was greater than the one measured for yeasts, who had an LD_{50} of 0.89 mg L^{-1} to the yeast *T. utilis* (IZ214) and LD_{50} of 1.86 mg L^{-1} for *S. cerevisiae* (Ale Yeast). The seeds of *Zea mays* were exposed to soil extract containing cadmium, in which it was noticed a LD_{50} of $33.9 \pm 3.0 \text{ mg L}^{-1}$ and, by having the same conditions for the yeast *S. cerevisiae* (Ale Yeast), the LD_{50} was of 29.8 mg L^{-1} . The results showed similar values in tests with soil extract with cadmium comparing the corn seed and the yeast. Thus, it was concluded that the yeasts are sensitive to cadmium and may be a new option bioindicators. Also, yeasts, in special *S. cerevisiae*, have a high degree of homology with higher eukaryotes, therefore allowing the study of relevant toxicity aspects in human biology.

Keywords: Yeasts; Bioindicators; Cadmium; Metal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática de uma placa Elisa de 96 poços com as leveduras inoculadas e o controle.....47
- Figura 2 - Esquema de extração do solo com a utilização do extrator CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A) Pesagem do solo B) Extração C) Filtração.....50
- Figura 3 - Ilustração do ensaio realizado para avaliação da inibição do crescimento das leveduras com extrato de solo com cádmio.....51
- Figura 4 - A) Levedura não floculante; B) Levedura floculante.....54
- Figura 5 - Porcentagem de inibição do crescimento das diferentes linhagens de leveduras expostas a três concentrações de cádmio: 4 mg L^{-1} , 6 mg L^{-1} , 8 mg L^{-1}55
- Figura 6 - Ilustração das três leveduras selecionadas: *T. utilis*, *C. utilis* e *S. cerevisiae*.....56
- Figura 7 - Linhagem *T. utilis* (IZ 214) exposta a diferentes concentrações de cádmio.....58
- Figura 8 - Linhagem *C. utilis* (IZ 300) exposta a diferentes concentrações de cádmio.....58
- Figura 9 - Linhagem *S. cerevisiae* (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio.....59
- Figura 10 - Avaliação da porcentagem de crescimento da levedura *T. utilis* (IZ214) exposta a diferentes concentrações de cádmio, através de dois métodos (D.O. e TTC).....61
- Figura 11 - Avaliação da porcentagem de crescimento da levedura *S. cerevisiae* (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio, através de dois métodos (D.O. e TTC).....62
- Figura 12 - Avaliação da porcentagem de inibição de crescimento das linhagens *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra) na presença de extratos de solo com diferentes concentrações de cádmio ($20, 40, 60$ e 80 mg Kg^{-1}). A) CaCl_2 (controle); B) CaCl_2 com solo não contaminado; C) CaCl_2 com solo contaminado com 20 mg Kg^{-1} de Cd; D) CaCl_2 com solo contaminado com 40 mg Kg^{-1} de Cd; E) CaCl_2 com solo contaminado com 60 mg Kg^{-1} de Cd; F) CaCl_2 com solo contaminado com 80 mg Kg^{-1} de Cd.....66

Figura 13 -	Porcentagem de inibição do crescimento da linhagem <i>S. cerevisiae</i> (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio em solução de extração de solo, avaliada por D.O. e pela técnica do TTC.....	67
Figura 14 -	Sementes de pepino germinadas em solução aquosa de cádmio, nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L ⁻¹	69
Figura 15 -	Porcentagem de inibição de crescimento das sementes de pepino, calculada pela área dos brotos (cm ²), relativos ao tratamento controle.....	70
Figura 16 -	Fotos das sementes de milho germinadas em extrato de solo contaminado com cádmio, tratamento controle, 10; 20; 30, 35 e 40 mg L ⁻¹	73
Figura 17 -	Porcentagem de inibição de crescimento de sementes de milho em extratos de solo contaminados com cádmio.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas no estudo.....	45
Tabela 2 - Ensaio para seleção do extrator mais apropriado.....	49
Tabela 3 - Comparação dos resultados de inibição de crescimento das três leveduras na presença de diferentes concentrações de cádmio.....	60
Tabela 4 - Análise em espectrofotômetro (FAAS) dos extratos de solo obtidos através de três diferentes extratores.....	64

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por vários elementos vem aumentando em todo mundo. Os principais causadores desta contaminação são os agrotóxicos, compostos orgânicos, organometálicos, resíduos radioativos e por metais. Existe uma considerável extensão de áreas contaminadas por vários elementos principalmente por metais. Estes metais são provenientes de resíduos industriais que são despejados desordenadamente nos aterros e rios, contaminando diretamente o solo, vegetação, organismos do solo e águas superficiais ou subterrâneas. Essa contaminação do solo afeta diretamente a saúde humana causando doenças provenientes de águas contaminadas por substâncias químicas.

Alguns desses metais denominados nutrientes são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos. São eles: N, P, K, S, Ca, Mg, B, Cl, Co, Cu, Fe. Outros como Cádmio, Chumbo e Mercúrio não exercem nenhuma função nos organismos se tornando tóxicos e acumulativos. No entanto, todos esses metais possuem potencial para tornarem-se tóxicos quando atingem valores acima das concentrações limites (SKORDAS; KELEPERTSIS, 2005).

Dentre todos os metais descartados no ambiente, o cádmio é considerado altamente danoso à saúde por ser indutor de carcinogênese em humanos (VOLESKY, 1990; ADAMIS et al., 2003). Sua utilização é ampla principalmente em indústrias automobilísticas e de telecomunicações, e em menores proporções no preparo de pigmentos (de tintas e vernizes), indústrias de PVC e de plásticos (MIDIO; MARTINS, 2000), baterias, corretivos para acidez de solo, fertilizantes fosfatados, fungicidas, curtumes e outros (JORDÃO et al., 1999), como consequência tem sido encontrado em resíduos de siderurgia, lixo urbano, lodo de esgoto e rios (OLIVEIRA, 1995). A principal fonte de contaminação dos seres vivos por este metal é pela ingestão de alimentos contaminados, sendo a água o principal veículo de transporte até o solo, consequentemente até o alimento.

Atualmente, para análises ambientais de solo contaminado por cádmio é realizada uma extração de cádmio no solo pelo uso de extratores químicos convencionais como CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e Mehlich1. Após a extração, a detecção é realizada pela leitura de absorbância nas soluções de solo em espectrofotômetro de absorção atômica em chamas (FAAS). Os testes ecotoxicológicos que utilizam

vários organismos como bioindicadores, também tem sido realizados com alguns organismos, como os oligoquetas, principalmente minhocas da espécie *Eisenia fetida* e colêmbolos, algumas plantas, microcrustáceos e peixes. Alguns micro-organismos como a bactéria *Vibrio fischeri*, também tem sido muito utilizada devido a sua resposta de bioluminescência.

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial das leveduras como bioindicadores da presença de cádmio no solo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Áreas contaminadas

O termo área contaminada possui diferentes significados onde há a preocupação em solucionar os problemas causados pela contaminação, de qualquer área, seja solo ou água, por meio da elaboração de políticas e normas.

Sánchez (1998) descreve que o termo “área contaminada”, quando para especificamente no solo, pode ser substituído por sinônimos como “solos contaminados”, “terrenos contaminados”, “sítio contaminado” e “solo poluído”, que são usualmente empregados na literatura nacional e internacional.

Pesquisadores do Reino Unido descreveram em “Section 57 of the Environment Act, 1995” como sendo um local contaminado “uma área ou terreno apresentada a autoridade local em uma situação onde substâncias são encontradas dentro ou abaixo da superfície do terreno, onde significativamente um dano está sendo originado ou pode ser originado; ou possivelmente está sendo causada a poluição de águas controladas” (POLLARD; HERBERT, 1998).

O conceito de área contaminada na Bélgica, na região de Flandres, é denominado como um local onde se encontram resíduos ou a poluição dos solos e águas subterrâneas ocorrem ou podem ocorrer, resultantes das atividades humanas (VAN DYCK, 1995).

Segundo uma legislação federal da Alemanha (consolidada em 1999), área contaminada é denominada como sendo “locais rejeitados com finalidade para deposição, tratamentos ou armazenamento de resíduos e áreas industriais em desuso contendo rejeitos de substâncias perigosas, causando danos à qualidade do solo, conseqüentemente prejudicando o indivíduo ou público em geral” (BIEBER et al., 1998).

No Brasil, uma área contaminada é definida como área, terreno, local, instalação ou edificação que contenha quantidades ou concentrações de substâncias químicas, comprovadas por estudos, que causem ou possam causar danos à saúde humana, ao meio ambiente ou a outro bem a ser protegido (FEAM, 2008).

Mesmo assim, é relativamente novo o conceito de “áreas contaminadas” como sendo um local onde o solo fica impossibilitado de realizar suas funções naturais ou legalmente garantidas, devido a danos prejudiciais (CETESB, 2001).

O solo, devido ao seu poder tampão e seu potencial de autodepuração, por muito tempo foi determinado um receptor inacabável de materiais perigosos descartáveis, como o lixo doméstico e os resíduos industriais. Contudo, foi comprovada que essa capacidade receptora foi superestimada, e somente a partir da década de 70, uma maior atenção foi dada a sua proteção (CETESB, 2001).

A contaminação dos solos é um processo que vem aumentando em todo mundo. Isso se deve basicamente ao desenvolvimento das grandes cidades e a rápida industrialização, originando-se assim graves problemas ambientais, resultado de despejos desordenados de resíduos industriais em solos e rios, oferecendo um grande risco à saúde e ao ambiente (TANDY et al., 2004).

O mundo industrializado tomou consciência dos problemas gerados pelas áreas contaminadas somente no final da década 70 e início da década 80 quando ocorreram casos marcantes como o “Love Canal”, canal situado em Niágara Falls, Nova York-EUA, que recebeu uma quantidade elevada de produtos químicos como pesticidas, solventes clorados e naftalenos; e os casos “Lekkerkerk”, na Holanda e “Ville la Salle” no Canadá, onde em ambos os casos foram descobertos antigos aterros sanitários sob áreas residenciais (BEAULIEU, 1998).

Existe uma grande extensão de área contaminada por compostos orgânicos, organometálicos, metais e radioativos em concentrações que podem significar um perigo ambiental, causando impacto ao solo, vegetação, organismos do solo e águas superficiais ou subterrâneas.

A contaminação das áreas gera quatro principais problemas: 1) existência de riscos da segurança das pessoas e propriedades através do acúmulo de gases nas residências e outras edificações; 2) riscos ao ecossistema e saúde pública devido ao aumento da incidência de doenças causadas por exposição a substâncias químicas presentes em águas subterrâneas coletadas em poços, contato dermal e ingestão de solos contaminados por crianças ou trabalhadores, inalação de vapores e consumo de alimentos contaminados; 3) limitações ao desenvolvimento urbano e 4) diminuição do valor imobiliário das propriedades, devido à redução de usos possíveis do solo (SÁNCHEZ, 1998).

2.1.2 Metais

O termo “metais pesados” é ainda muito utilizado em publicações para designar grupos de metais e semi-metais associados à contaminação, que possuem potencial de toxicidade ou ecotoxicidade. Porém, este termo tem sido usado de forma inconsistente gerando uma confusão em relação ao significado correto de metais pesados. No uso convencional, metal refere-se ao elemento puro ou uma ligação dos elementos metálicos, e pesado implica em alta densidade. O conhecimento da densidade contribuiu pouco para a previsão dos efeitos biológicos dos metais, não definindo sua real toxicidade. Portanto, não é recomendado o uso do termo metal pesado no sentido de ser metal tóxico, pois este termo ultimamente designa uma nova classificação de elementos na tabela periódica; entretanto, este termo ainda é usado em regulamentações de agências ambientais de muitos países (IUPAC, 2002).

O termo metal pesado pode ser substituído por termos como elementos traço, metais traço, metais tóxicos, microelementos ou simplesmente metais, dentre outros (DUARTE; PASQUAL, 2000).

Os metais tóxicos são elementos químicos pertencentes aos grupos de transição da tabela periódica, com densidade atômica maior que 4 g cm^{-3} , e com altos valores de número atômico, massa específica e massa atômica. Além dos metais, fazem parte desse conjunto os elementos As e Se pertencentes ao grupo dos não-metais (MATOS et al., 1996). Os metais podem ser definidos como cátions e aniões, e são encontrados no solo, em baixas concentrações, normalmente menor que $100\text{ }\mu\text{g}^{-1}$ (PIERZYNSKI et al., 1994; SPARKS, 1995; ESSINGTON, 2004; GUILHERME; MARCHI, 2005).

Alguns desses metais são provenientes do intemperismo de rochas e minerais encontrados em abundância no ambiente natural (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K e Mg). Na crosta terrestre podem estar presentes em concentrações menores que 1000 mg kg^{-1} , e nos alimentos podem ser encontrados em uma concentração que não excede 20 mg L^{-1} (ADRIANO, 2001).

Alguns desses elementos são indispensáveis para a vida, como os macronutrientes N, P, K, S, Ca, Mg e os micronutrientes B, Cl, Co, Cu, Fe, utilizados em pequenas quantidades pelos organismos para a realização de funções vitais.

Estes elementos são classificados de metais que representam pequeno risco. Todavia, se consumidos em excesso, podem se tornar altamente tóxicos.

Os elementos cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) não possuem nenhuma função nos organismos e são acumulativos (OLIVIER et al., 2008). São tóxicos na forma de cátions e ao se ligarem às substâncias orgânicas se tornam ainda mais tóxicos (SUMMER; SILVER, 1978).

Nos últimos anos, principalmente a partir da década de 90, a poluição do solo por estes metais tem recebido especial atenção, sendo mundialmente reconhecida como um problema que pode representar sérios riscos a saúde humana e a qualidade do meio ambiente (GUILHERME et al., 2005).

O aumento da deposição desses metais no solo tem ocorrido principalmente pelas atividades humanas, como uso de pesticidas, fertilizantes e lodo de esgoto na agricultura, mineração, emissões industriais e por despejos de resíduos sólidos no solo (CUNHA et al., 2008).

O solo apresenta características que o difere dos outros componentes da biosfera (ar, água e biota), tornando-se um dreno para contaminantes e, também, comportando-se como um tampão natural que controla o transporte de elementos químicos e outras substâncias para atmosfera, hidrosfera e biota (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Estes elementos tóxicos influenciam negativamente nos processos mediados biologicamente no solo (LEE et al., 2002), como as transformações de compostos nitrogenados, diminuindo a taxa de nitrificação (MUNN et al., 2000), a decomposição microbiana da celulose (CHEW et al., 2001), e a mineralização da matéria orgânica do solo (REBER, 1992).

Estes metais dependem de alguns parâmetros do solo para serem adsorvidos e dessorvidos, como pH e potencial redox (Eh), fração granulométrica (< 0,02 mm), matéria orgânica, óxidos e hidróxidos (Fe, Mn e Al) (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Os metais no solo são encontrados nas seguintes formas químicas: 1) móveis e potencialmente disponíveis (íons livres, complexos solúveis com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos); 2) formas trocáveis retidas por forças eletrostáticas aos coloides do solo que apresentam carga negativa permanente ou cargas variáveis de acordo com o pH (argilas silicatadas, óxidos de Fe, Mn e Al e matéria orgânica) e material amorfo (óxidos de Fe, Al e Mn) por meio da formação de complexos de esfera externa; 3) formas adsorvidas especificamente que são os

metais de transição retidos fortemente em sítios específicos (hidroxilas funcionais) na superfície dos óxidos de (Fe, Al e Mn); 4) formas retidas em material orgânico insolúvel, constituída de cátions quelados no material orgânicos; 5) formas de precipitado que são compostos pouco solúveis (Carbonatos, Sulfetos, Fosfatos e Hidróxidos) (MELO; ALLEONI, 2009).

2.1.2.1 Metal Cádmio

Dentre todos os metais despejados no ambiente, o cádmio é considerado um elemento altamente danoso à saúde, por ser indutor de carcinogênese em humanos, principalmente câncer de pulmão, próstata, pâncreas e rim (VOLESKY, 1990; ADAMIS et al., 2003; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005; HUFF et al., 2007).

Sua utilização nas indústrias automobilísticas e de telecomunicações é ampla, sendo também utilizado em menores proporções no preparo de pigmentos de tintas e vernizes, indústrias de PVC e de plásticos (MIDIO; MARTINS, 2000), baterias recarregáveis de níquel-cádmio, corretivos para acidez de solo, fertilizantes fosfatados, fungicidas, curtumes, dentre outros (JORDÃO et al., 1999; MERRINGTON et al., 2001; MIRLEAN; ROISENBERG, 2006), sendo assim encontrados em grandes quantidades em resíduos de siderurgia, lixo urbano, lodo de esgoto (OLIVEIRA, 1995). Até mesmo na água potável consumida pelos seres humanos, são encontradas pequenas quantidades deste metal (cerca de 1 mg L^{-1}) (SANTOS et al., 2006).

O cádmio é um metal estável que circula pelo ambiente acumulando-se. É altamente distribuído no ambiente, através da contaminação da água, solo e ar. Sua emissão para a biosfera através da atividade humana é muito superior às emissões resultantes de fontes naturais (SPERANKAYA et al., 2008).

O cádmio no solo pode ser absorvido por meio de forças eletrostáticas simples ou associado a carbonatos, óxidos e matéria orgânica (ANDERSEN et al., 2002).

Nas plantas, o cádmio é absorvido acumulando-se em suas raízes (SPERANKAYA et al., 2008), interferindo na absorção, transporte e uso de nutrientes essenciais como fósforo, magnésio, cálcio, potássio (DAS et al., 1997) e enxofre (JIANG et al., 2005) bem como da água (DAS et al., 1997). O primeiro efeito causado pela toxidez do cádmio é observado na germinação. As sementes, ao

serem colocadas para germinar em ambiente com elevados níveis de cádmio apresentam diminuição na atividade das enzimas β e α amilases, comprometendo a respiração (CHUGH; SAWHNEY, 1996) e resultando na redução do crescimento embrionário e da radícula (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000; SHAW et al., 2004).

O principal alvo da ação de metais como o cádmio são as enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto. O cádmio desencadeia a oxidação destes grupos, que ao reagir com o enxofre tem suas ligações dissulfeto desfeitas desnaturando a proteína e consequentemente reduzindo a atividade enzimática. Um elevado número de enzimas contém metais e a substituição destes metais por outro pode resultar na alteração ou até inibição da atividade enzimática.

O cádmio, por ser semelhante ao zinco quanto à estrutura atômica e comportamento geoquímico, pode substituí-lo nas enzimas, alterando a atividade enzimática (SHAW et al., 2004). Em algumas espécies de plantas, foi constatada uma alteração na estrutura da enzima ribulose-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), resultando na desagregação em subunidade desta enzima, o que pode ter sido causado pela substituição do magnésio pelo cádmio.

Outros sintomas visíveis da toxidez do cádmio em plantas é a clorose foliar, o enrolamento das folhas e a redução do tamanho das plantas. (BENAVIDES; SUSANA; TOMARO, 2005; JIANG et al., 2005; KÜPPER et al., 2007). A clorose é uma doença onde as plantas param de produzir clorofila, adquirindo uma cor verde pálido ou amarelada. É mais frequente nas folhas jovens do que nas velhas, podendo indicar que as folhas mais jovens absorvem mais cádmio ou que são mais susceptíveis a toxidez do metal (KURDZIEL et al., 2004; KÜPPER, et al., 2007). A clorose pode ser consequência da competição do cádmio com o ferro por sítios de absorção na membrana (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000) ou com o magnésio, prejudicando potencialmente a estabilidade das clorofilas. Também pode ser causada pela deficiência de fósforo ou redução do manganês devido à presença do cádmio (GODBOLD; HUTTERMAN, 1985).

Em ambientes aquáticos, o cádmio pode afetar as algas inibindo a atividade de suas enzimas (LOCKWOOD, 1976). No trabalho de Silverberg (1976), foi observada a formação de grânulos de cádmio no interior da mitocôndria de três espécies de algas verdes. Bouzon e colaboradores (2012) examinaram “in vitro” os segmentos apicais da alga *Hypnea musciformis* exposta a diferentes concentrações

de cádmio: 50 a 300 μM . Após sete dias foi observado que a exposição ao cádmio aumentou a espessura da parede celular e destruiu a organização interna do cloroplasto. Comparado aos controles, as algas expostas mostraram redução da taxa de crescimento, despigmentação e entrelaçamento dos ramos laterais. Além disso, o teor de pigmentos fotossintéticos, incluindo clorofila e ficobiliproteínas diminuíram.

Essas algas agregam um valor econômico, pois possuem carragenina, um polissacarídeo sulfatado utilizado como geleificante, espessante e estabilizante (BRAVIN; YONESHIGUE-VALENTIN, 2002). Sendo assim, o cádmio afeta negativamente a arquitetura e o metabolismo da *H. musciformis*, indicando uma ameaça a economia dessas algas.

O cádmio é facilmente acumulado em bactérias e crustáceos. Altos níveis de cádmio foram encontrados também nos rins, fígado e brânquias de hidrobiontes e em animais terrestres foram detectados no fígado, rins e nos ossos (SPERANKAYA et al., 2008).

A principal fonte de contaminação dos seres humanos por cádmio é pela ingestão de água ou alimentos contaminados com resíduos industriais, onde a água é o principal veículo de transporte do metal até o solo e, conseqüentemente, até o alimento. O hábito de fumar também aumenta a exposição ao cádmio, pois as folhas de tabaco tendem a acumular elevadas quantidades do metal, provenientes de solo contaminado (JARUP et al., 2009).

O cádmio é um metal altamente tóxico mesmo em pequenas concentrações e possui um tempo de meia vida biológico estimado entre 15 e 20 anos. A taxa de excreção renal dos íons cádmio nos humanos é baixa, e conseqüentemente o cádmio se acumula no corpo, particularmente nos rins, no fígado e nos ossos (JIN et al., 1998; SATARUG et al., 2002). Os principais efeitos causados por envenenamento por cádmio são: lesões nos rins e sistema nervoso, presença de proteínas na urina (devido aos danos celulares causados pelo cádmio), disfunções de órgãos reprodutivos (lesões testiculares), dores agudas nos ossos das pernas e coluna e o comprometimento do metabolismo de Ca^{+2} , causando osteoporose e osteomalácia (KAZANTZIS, 2004; JARUP et al., 2009; PROZIALECK et al., 2007; RIGON et al., 2004; SPERANKAYA, 2008; THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

Um dos exemplos mais conhecidos de contaminação de seres humanos por cádmio ocorreu em 1946 em Funchu-Machi no Japão, nas margens do rio Jintsu.

Plantadores de arroz e trabalhadores foram acometidos de dores reumáticas e mialgias devido à intoxicação por cádmio derivado de rejeitos da mineração que contaminaram a água de irrigação das plantações de arroz. A doença ficou conhecida como Itai Itai que é a tradução da expressão “ouch-ouch” que significa “dor nos ossos”, gemido da dor “ai-ai” (FRIBERG et al., 1971; VOLESKY, 1990; KASUYA, 2000). No Brasil, na região de Santo Amaro (Bahia) crianças apresentaram altas taxas de cádmio no sangue, provavelmente proveniente da metalúrgica de chumbo, localizada na região (TAVARES, 2002).

Para a detecção de solos contaminados com cádmio e outros metais é necessário fracionar os metais ligados ao solo e sedimentos (SILVEIRA et al., 2006). Uma das técnicas utilizadas consiste na extração simples, onde são utilizados um ou mais extratores químicos seletivos, para diagnosticar a deficiência ou toxidez do metal. Apesar desses métodos simples de extração serem bem estabelecidos, eles possuem limitações, pois tendem a ser específicos a determinado elemento (ABREU et al., 2002).

Na técnica denominada “extração sequencial”, usualmente de três a oito extratores são adicionados sequencialmente, de tal forma que o reagente anterior seja pouco reativo e mais específico, e os extratores seguintes sejam gradualmente mais agressivos. Ao serem adicionados continuamente, esses reagentes químicos extraem sequencialmente os metais associados a diversas frações da amostra. Este método é muito utilizado para fracionar metais em amostras de solo, sedimentos, lodo, composto de lixo e por sua capacidade de estimar lixiviação (ACKAY et al., 2003).

Mesmo que estes métodos de extração sequencial revelem a distribuição dos metais no solo, trabalhos com estes elementos raramente podem ser comparados em virtude de diversos fatores: 1) uso de diferentes reagentes em concentrações variadas, que acabam extraíndo quantidades diferentes de metais; 2) pouca especificidade dos reagentes em extrair determinada fase, o que seria de pouco uso na comparação com um reagente mais específico; 3) diferentes condições físicas e químicas do solo, que influenciam a interação de metais com os minerais e com a matéria orgânica (MELO; ALLEONI, 2009).

Hoje, é aceitável que os extratores não são seletivos e que a mínima variação nas condições experimentais de qualquer procedimento analítico tem efeito significativo nos resultados. Mas alguns problemas em ambas as extrações precisam

ser resolvidos, como a não seletividade das reações e a influencia da variação das condições experimentais.

Outra forma de estimar os teores ambientalmente disponíveis dos metais e avaliar o risco ao meio ambiente é utilizar reagentes químicos distintos na extração simples de metais no solo que se correlacionem com o absorvido por modelos biológicos (ABREU et al., 2002; MIRANDA et al., 2003). Um elevado número de extratores tem sido utilizado para isolar e extrair elementos, tanto essenciais quanto tóxicos, de uma determinada fase do solo. São eles: água, sais neutros, sais específicos, ácido acético, acetato de amônio e acetato de sódio, ácido oxálico e oxalato ácido de amônio, ácidos orgânicos de baixa massa molar, ácido clorídrico, ácido nítrico, EDTA e DTPA (agentes quelantes), dentre outros (MELO; ALLEONI, 2009).

Vários testes ecotoxicológicos estão sendo utilizados para identificar a toxidez de metais presentes no solo e na água. Estes testes utilizam-se de organismos e micro-organismos como bioindicadores, tais como, oligoquetas (minhocas e colêmbolos), plantas, algas, microcrustáceos, peixes, alguns insetos e alguns micro-organismos, principalmente bactérias.

2.1.3 Indicadores

Na literatura são encontradas várias definições para indicadores ambientais.

Um indicador pode ser um índice, uma média ou uma porcentagem que expressa uma determinada avaliação de interesse comum. Um indicador de modo geral pode ser uma forma de avaliar uma determinada situação.

No nosso contexto, um indicador pode ser um resultado final obtido através de uma análise, química, física ou biológica de uma determinada área ou ambiente que se encontra em situação preocupante, como por exemplo, áreas contaminadas.

Um contaminante, no caso um metal tóxico pode ser atualmente detectado de diversas formas diferentes.

As técnicas de investigação de uma área contaminada são escolhidas pelas características específicas de cada área a ser estudada. Primeiramente é feito um levantamento de dados existentes sobre geologia, pedologia, hidrologia, com o intuito de indicar as características do fluxo das águas nas zonas saturadas e não saturadas na área a ser investigada, com a finalidade de definir os meios pelos quais

irá ocorrer a propagação dos contaminantes, além de serem definidos os métodos de perfuração e amostragem utilizados para a coleta de solo e/ou água. Em segundo lugar deve-se identificar e estabelecer as características dos contaminantes presentes ou provavelmente presentes na área. Essa identificação pode ser realizada através de um levantamento histórico da área, utilizando-se de informações como registro de matérias-primas e resíduos gerados. Também pode-se localizar as áreas onde estes resíduos foram manipulados, aplicados ou dispostos através de fotografias (NICHOLSON; SMYTH, 1994).

Em consequência dos resultados obtidos são utilizados métodos diretos (sondagens, amostragens, testes para definir as propriedades do solo, das rochas e outros materiais, além das concentrações dos contaminantes) e indiretos (métodos geofísicos de investigação como eletrorresistividade, eletromagnéticos, sísmica e radar de penetração do solo (USEPA, 1993b) para caracterizar a contaminação nos diferentes compartimentos definindo-se assim o seu posicionamento e taxa de propagação e as concentrações que atingem os receptores ou bens a proteger (LAGREGA et al., 1994).

Nos indicadores físicos são avaliados: textura, estrutura, resistência à penetração, profundidade de enraizamento, percolação da água (transmissão) e capacidade de água disponível (capacidade de campo); nos indicadores químicos são avaliados: pH, carbono orgânico, CTC efetiva (quantidade de cátions retidos na superfície das argilas ou colóides minerais e orgânicos presentes no solo), nitrogênio, nutrientes disponíveis para as plantas, condutividade elétrica e sais solúveis totais; e nos biológicos são avaliados: biomassa microbiana do solo, respiração do solo e fixação biológica de nitrogênio (GOMES; FILIZOLA, 2006).

Apesar de apresentarem uma menor complexidade e uma maior acessibilidade, os indicadores químicos e físicos não indicam necessariamente o quanto esses parâmetros podem refletir na interação com contaminantes e as consequências nas suas funções ecológicas, e seus impactos ambientais e na saúde humana (BRUGGEN; SEMENOV, 2000).

Os indicadores biológicos ou bioindicadores utilizam-se de um componente de um ecossistema como indicador da qualidade do ambiente (ANDREÁ, 2008).

Os bioindicadores são fatores bióticos utilizados para a averiguação de condições passadas, presentes ou futuras de ecossistemas. As espécies se adaptam para sobreviver, reproduzir e realizar relações ecológicas em condições

ambientais específicas. Assim, a presença de cada tipo de ser vivo revela características físicas, químicas e estruturais do ambiente em que se encontra (ZAMONER, 2007).

Têm-se observado que alguns organismos possuem resistência a certos níveis de contaminação. Ao serem expostos a agentes tóxicos não morrem e fornecem importantes informações sobre a saúde dos ambientes em que habitam. Esses organismos são denominados indicadores biológicos ou bioindicadores.

Embora não ocorra eliminação desses organismos no ambiente, os mesmos demonstram comportamentos ou reações metabólicas, indicando alterações no ambiente (ANDREÁ, 2008).

De um modo geral, os bioindicadores são empregados para analisar, descrever, sintetizar e apresentar cientificamente informações baseadas nas condições ambientais, suas tendências e significados (Florida State University, 1995 apud FISHER, 1998).

Os bioindicadores podem ser caracterizados como: 1) sentinelas: indicam níveis de degradação e preveem ameaças ao ecossistema; 2) detectoras: respondem as mudanças de forma exploradora reagindo positivamente às modificações; 3) acumuladoras: permitem a verificação pela acumulação; 4) bio-ensaios: utilizados em experimentação; 5) sensíveis: mudam totalmente o comportamento (ZAMONER, 2007).

Um bom bioindicador deve possuir as seguintes características: limites de tolerância estreitos (sensíveis a pequenas mudanças ambientais), fácil e rápida identificação do contaminante, ser bem conhecido biologicamente e ecologicamente, possuir pouca mobilidade e ciclo de vida curto (RAND; PETROCELLI, 1985).

2.1.3.1 Organismos utilizados como bioindicadores

2.1.3.1.1 Bioindicadores aquáticos

Os organismos aquáticos, em seu habitat natural, promovem o registro ininterrupto da qualidade ambiental, onde as respostas fornecem informações importantes de onde e quando é preciso investigar potenciais fontes de poluição (LOWE; PAN, 1996).

A toxicidade das águas é frequentemente avaliada por meio de ensaios realizados com espécies de diferentes níveis tróficos do ecossistema (WALKER et

al., 2001; NEWMAN; UNGER, 2002), pois nenhum organismo possui todos os requisitos necessários, como sensibilidade constante a diferentes agente químicos; possibilidade de manutenção em laboratório; pequeno porte e ciclo de vida curto; espécies com estabilidade genética e que possibilitem uma obtenção de um lote uniforme de organismos (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Os principais organismos utilizados são as algas verdes unicelulares *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, os macroinvertebrados bentônicos, o perifíton, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*, e os peixes *Brachydanio rerio* (peixe zebra), *Poecilia reticulata* (Guppy) e *Cyprinus carpio* (carpa) (COONEY, 1995).

2.1.3.1.1.1 Algas

As algas são produtoras primárias e formam a base da cadeia alimentar, e qualquer modificação na estrutura de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema (BONACELLA; MAGOSS, 1990). Como bioindicadores, são utilizadas principalmente para analisar características ambientais e o nível de destruição das microbacias. As principais algas utilizadas são as clorófitas, cianofíceas e diatomáceas (TUNDISI, 2003).

2.1.3.1.1.2 Macroinvertebrados bentônicos

Os macroinvertebrados bentônicos são os organismos mais utilizados como bioindicadores em impactos ambientais e monitoramento biológico (ROSENBERG; RESH, 1993; CALLISTO, 2000). Eles são encontrados próximo, sob ou dentro de substratos de fundo em ambientes aquáticos, ou associados a outros tipos de substratos, como plantas submersas ou algas filamentosas de água doce, conchas, carapaças de animais, pilares de plataformas e cascos de navios.

Estes organismos habitam o substrato em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida (ROSENBERG; RESH, 1993; LOYOLA, 1994) e incluem moluscos, vermes, crustáceos, larvas ou adultos de insetos, entre outros. Os macroinvertebrados bentônicos são considerados bons bioindicadores porque geralmente permanecem

por um tempo maior no ambiente, pois vivem de semanas a alguns meses no sedimento.

A diversidade dos macroinvertebrados, bem como sua distribuição, está associada ao tipo de substrato, a morfologia do ecossistema, tipo e quantidade de detritos orgânicos, presença de vegetação aquática e mata ciliar. Além disso, mudanças na produtividade primária e nas concentrações de nutrientes podem afetá-los indiretamente (WARD et al., 1995; GALDEAN et al., 2000).

Os macroinvertebrados bentônicos diferem entre si em relação à poluição orgânica, em: 1) Organismos sensíveis: insetos aquáticos das ordens Trichoptera e Plecoptera; 2) Organismos tolerantes: insetos aquáticos e outros invertebrados, como moluscos, bivalves, algumas famílias de Diptera, e principalmente por representantes das ordens Heteroptera, Odonata e Coleoptera; 3) Organismos resistentes: larvas de Chironomidae e outros Diptera e por toda a classe Oligochaeta (CALLISTO, 2000).

Um bom exemplo de bioindicador bentônico é o molusco bivalve da espécie *Limnoperma fortunei*, que é uma espécie exótica que apresenta fácil adaptação e ocupação em ambientes aquáticos. É comumente encontrado no rio Paraná e popularmente conhecido como mexilhão dourado (DARRIGRAN, 2002).

Waykar e Deshmukh (2012) utilizaram diferentes espécies nativas de bivalves de água doce, *Lamellidens corrianus*, *Lamellidens marginalis* e *Indonaia caeruleus*, com o objetivo de estabelecer uma rede de monitoramento ambiental local, utilizando essas espécies como bioindicadores para avaliar as tendências de Cu, Cd, Hg, As, Pb e Zn, em diferentes concentrações, no ecossistema de água doce. A medida do peso seco de cada animal foi utilizada para calcular a concentração do metal (lg/g). Os autores observaram que a concentração de Pb (1,235,4 lg/g) e As (37,9 lg/g) foram maiores no bivalve *Lamellidens corrianus*, Zn (3.032,3 lg/g) foi maior em *Lamellidens marginalis*, enquanto Hg (5,87 lg/g), Cd (142 lg/g) e Cu (826,7 lg/g) foram maiores em *Indonaia caeruleus*. Sendo assim, concluíram que cada espécie de bivalve acumulou metais diferentes e propuseram *Lamellidens corrianus* como bioindicador de Pb e As, *Lamellidens marginalis* de Zn e *Indonaia caeruleus* de Hg, Cd e Cu.

2.1.3.1.1.3 Perifíton

O perifíton é uma comunidade formada por organismos autotróficos e heterotróficos (algas, cianobactérias, fungos e animais), detritos orgânicos e inorgânicos que estão ligados a superfícies submersas na maioria dos ecossistemas aquáticos (WETZEL, 1983). É uma importante fonte de alimento para invertebrados, girinos e alguns peixes. Também pode absorver contaminantes, removê-los e limitar seu movimento através do ambiente. É frequentemente utilizada como bioindicadores da qualidade da água (FERNANDES; ESTEVES, 2003).

2.1.3.1.1.4 Microcrustáceos

Os microcrustáceos de água doce da ordem Cladocera pertencentes ao gênero *Daphnia* (pulgas d'água) são utilizados frequentemente em ensaios de toxicidade, devido a diversos fatores. Entre eles podemos destacar a ampla distribuição nos corpos de água doce, a importância na cadeia alimentar (por serem fontes de alimentos de peixes), a facilidade de cultivo em laboratório, o seu período de vida curto, sua sensibilidade a vários contaminantes do ambiente aquático e seu tamanho relativamente pequeno, necessitando de volumes pequenos de amostra-teste de água de diluição em comparação aos testes com alga e peixes (SHAW; CHADWICK, 1998).

As espécies de *Daphnia* são as mais utilizadas para avaliar a toxicidade de novas formulações químicas, e as espécies de *Ceriodaphnia* sp. para avaliar a toxicidade crônica de amostras ambientais de água e efluentes líquidos (ARAGÃO; ARAUJO, 2006). O microcrustáceo *Artemia salina* também é muito utilizado em testes de toxicidade devido à resistência dos seus ovos a secagem e estocagem por longos períodos de tempo (MATHEWS, 1995; NUNES et al., 2006).

Geralmente o efeito tóxico observado em testes com microcrustáceos é a imobilidade dos mesmos, porque devido ao pequeno tamanho desses organismos, se torna difícil a avaliação da mortalidade (SHAW; CHADWICK 1998).

2.1.3.1.1.5 Peixes

Diversas espécies de peixes são utilizadas como bioindicadores. No Brasil, a espécie mais utilizada é o *Danio rerio*, popularmente conhecida como peixe-paulistinha ou peixe zebra (KNIE; LOPES, 2004).

Nos testes de toxicidade aguda com peixes, o parâmetro observado é a mortalidade, e nos testes de toxicidade crônica necessitam de extensos períodos de tempo, devido ao seu longo ciclo de vida e período reprodutivo, comparado com outras espécies (HARMEL, 2004). Porém, uma das limitações da utilização de peixes como bioindicadores é o fato deles possuírem uma alta mobilidade (OOST et al, 2003).

Em 2012, Azevedo e colaboradores utilizaram peixes das espécies *Cathorops spixii* e *Genidens genidens* como bioindicadores de metais, como chumbo, cádmio, mercúrio, cobre e zinco resultantes de atividades industriais. O objetivo desse estudo foi obter informações sobre as concentrações de alguns metais encontrados no tecido muscular das espécies. Foram escolhidos dois locais de amostragem distintos no Estuário de São Vicente, em Santos/SP, um afetado pela atividade industrial intensa e outro um local no Estuário de Cananéia/SP, onde estudos recentes indicaram a presença de metais, incluindo Hg nos peixes e sedimentos (AMORIM et al., 2008; AZEVEDO; SERAFIM et al., 2009). Os peixes foram coletados em dois períodos consecutivos (julho e agosto de 2009), foram mortos, e as amostras foram retiradas dos tecidos musculares e armazenadas para posterior análise.

As concentrações de metais variaram conforme a espécie do peixe. Em geral, com exceção dos níveis de Cu, as espécies de *G. genidens* coletadas do Estuário de São Vicente apresentaram maiores concentrações de metais do que as espécies de *C. spixii* coletadas do mesmo local. Os níveis de Hg e Cu no tecido dos peixes do estuário de São Vicente foram maiores do que no tecido dos peixes do estuário de Cananéia; os níveis de Zn e Cu foram normais, demonstrando não ocorrer influência significativa de contaminação antropogênica; os níveis de Cd e Pb foram relativamente baixos, no entanto a Análise de Componentes Principais (ACP) indicou a presença destes metais na área de Cananéia.

Os resultados das concentrações obtidas para todas as amostras neste estudo estavam de acordo com os resultados observados para outras espécies de

peixes estuarinos bentônicos (HAS-SCHÖN et al., 2006; MANSILLA-RIVERA; RODRÍGUEZ-SIERRA, 2011), mas foram inferiores aos valores internacional (FAO, 1983; MAFF, 1995; HC, 2007) e nacional (ANVISA, 1998).

2.1.3.1.1.6 Insetos

Os insetos são relativamente pouco utilizados como bioindicadores de contaminação por metais, por serem difíceis de coletar em quantidades suficientes ou ocorrer uma escassez sazonal. Alguns insetos aquáticos foram estudados anteriormente por Jardine e colaboradores (2005) e Nummelin e colaboradores (1998) como indicadores de metais. Estudos também demonstraram que espécies de *Halobates* sp. (insetos aquáticos que vivem em mar aberto) são eficientes bioindicadores de cádmio em águas superficiais oceânicas (CHENG et al., 1984; SCHULZ-BALDES, 1989), pois concentram o elemento em seus tecidos (CHENG et al., 1976; SCHULZ-BALDES, 1979).

Em 2006, Nummelin e colaboradores testaram quatro espécies diferentes de insetos predadores como bioindicadores de metais em torno de uma fábrica de aço no sul da Finlândia. Eles utilizaram insetos aquáticos (Gerridae), larvas de libélula (Odonata), larvas de insetos da família Myrmeleontidae e formigas (Formicidae). Foram recolhidos exemplares em torno da área contaminada e em uma área controle a 3 km da fábrica. Os resultados obtidos foram que as concentrações de ferro foram significativamente maiores no local próximo à fábrica do que nos locais de controle, considerando as amostras agregadas de todos os insetos. Já para as concentrações de cádmio, os resultados obtidos foram significativamente maiores nos locais de controle. Outros metais analisados não diferiram significativamente entre os locais.

No entanto, a capacidade dos insetos em acumular metais difere entre as espécies e são necessários mais estudos para detectar diferenças na eficiência de diferentes grupos de insetos para acumular diferentes metais de caráter tóxico. Também, de acordo com os resultados, as formigas são o grupo mais fraco para detectar diferenças de poluição por metais de caráter tóxico.

2.1.3.1.2 Bioindicadores terrestres

2.1.3.1.2.1 Oligoquetas

No solo, os organismos mais utilizados como bioindicadores são as oligoquetas, por possuírem um papel fundamental na macrofauna, visto que possuem uma capacidade de modificar características químicas e físicas do solo, podendo servir de alimento para várias espécies de animais e sendo um elo importante da cadeia trófica terrestre. Estes animais representaram mais de 90% da biomassa do solo e possuem uma extrema sensibilidade aos agentes tóxicos e um elevado potencial de acumulação de metais (LIU et al., 2005; NAHMANI et al., 2007; HINTON; VEIGA, 2008).

As minhocas, através de seus deslocamentos e pela ingestão da serapilheira e solos contaminados, entram em contato com poluentes. Estes contaminantes do solo podem permanecer adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo (SPADOTTO et al., 2004). As minhocas podem ainda ser expostas a solução do solo por meio do contato direto ou pela cutícula, absorvendo os contaminantes presentes nesses ambientes (VIJVER et al. 2003; CASTELLANOS; HERNANDEZ, 2007). Esse contato pode resultar na intoxicação, contaminação e morte das minhocas pela incorporação ou bioacumulação desses poluentes em seus tecidos (CURRY, 2004).

Em 2007, Suthar e colaboradores utilizaram exemplares de duas espécies de minhocas de diferentes categorias ecológicas: *Metaphire posthumus* e *Lampito mauritii*. A primeira é classificada ecologicamente como endogeica, ou seja, constrói galerias horizontais no solo para se mover e se alimentar e algumas podem penetrar profundamente no solo, e a segunda é classificada como anécica, ou seja, constrói galerias verticais permanentes e vive em camadas superficiais e intermediárias do solo (BOUCHÉ, 1977; LAVELLE et al., 1994). As minhocas foram coletadas de terras cultiváveis, jardim urbano e esgoto. Estas foram expostas aos metais Zn, Fe, Pb, Mn, Cu e Cd, extraídos por DTPA (agente quelante de complexação dos metais com ácido dietilenotriaminopentacético). O solo coletado do esgoto mostrou uma maior concentração de Zn ($542,0 \pm 11,26 \text{ mg kg}^{-1}$), Fe ($563,0 \pm 1,45 \text{ mg kg}^{-1}$), Pb ($20,2 \pm 0,86 \text{ mg kg}^{-1}$) e Mn ($477,2 \pm 3,65 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto Cu e Cd foram maiores ($49,4 \pm 1,17$ e $6,78 \pm 0,09 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente) em solos de terras cultiváveis. A concentração de Zn ($518,4 \pm 6,50 \text{ mg kg}^{-1}$), Fe ($529,0 \pm 9,14 \text{ mg kg}^{-1}$), Pb ($18,75 \pm$

0,61 mg kg⁻¹) e Mn (397,4 ± 3,02 mg kg⁻¹) foram maiores nas minhocas coletadas de esgoto, enquanto as minhocas coletadas de terras cultivadas mostraram maiores concentrações de Cu (39,6 ± 0,75 mg kg⁻¹) e Cd (6,23 ± 0,02 mg kg⁻¹).

Comparando-se as duas espécies, *M. posthuma* mostrou maiores concentrações de metais em seus tecidos do que *L. mauritii*, exceto para Zn e Mn em terras cultiváveis. Os autores concluíram que os exemplares de minhocas recolhidos em esgoto e terras cultiváveis tinham maiores níveis de metais nos tecidos do que as minhocas do solo. As minhocas do tipo endogeica, por habitar horizontes do subsolo, foram mais susceptíveis aos contaminantes. Na literatura existem evidências de que os poros de passagem de água do solo desempenham um importante papel na susceptibilidade de metais. Existe uma hipótese de que o sistema horizontal criado pelas minhocas endogeicas no solo, possivelmente retém mais água dos poros, consequentemente aumentando a disponibilidade de metais para estas minhocas. Então, neste trabalho as concentrações de metais encontradas nos tecidos das minhocas indicou que elas são eficientes como bioindicadores de contaminação do solo.

No trabalho de Vampré e colaboradores (2010), os autores utilizaram a minhoca da espécie *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação do solo por hexaclorobenzeno (HCB) que é um composto organoclorado persistente no ambiente (UNEP, 2005). Este composto é resultado de processos intermediários de manufatura, incluindo a produção de solventes clorados e agrotóxicos (USEPA, 1999).

No Brasil, de acordo com Matheus (2003) e Silva e colaboradores (2001), este composto foi descartado como resíduo do processo industrial da produção do tetracloreto de C (desengraxante utilizado na indústria metalúrgica) e encontra-se na área do polo petroquímico de Cubatão, na Baixada Santista (SP). A contaminação por HCB tem efeitos negativos em organismos aquáticos e terrestres e pode causar intoxicação nos humanos através do consumo de água e alimentos contaminados. Um dos objetivos deste trabalho foi estudar a influencia do HCB em minhocas. Foi realizado um teste prévio de toxidez e avaliada a mortalidade dos animais. No teste de toxidez, foi observada uma taxa de mortalidade entre 10 e 30 % após 72 horas (SCHEUNERT, 1992; SPADOTTO et al., 2004).

Em 2005, Andréa e Papini detectaram valores de até 7 de FBA do herbicida simazina em minhocas, porém, somente quando a quantidade de matéria orgânica

do solo era pequena, demonstrando que o HCB foi mais bioacumulado nas minhocas do que os outros agrotóxicos. Portanto, foi concluído que as minhocas da espécie *Eisenia andrei* podem ser utilizadas como bioindicadores de poluição de solo com o HCB.

2.1.3.1.2.2 Plantas

Outros bioindicadores utilizados para avaliação da qualidade dos solos são as plantas, visto que retiram diretamente dos solos os nutrientes essenciais através das raízes. Como constituem a base das teias tróficas dos ecossistemas (produtores), desempenham o papel de porta de entrada dos contaminantes na cadeia trófica.

As plantas possuem a capacidade de acumular metais provenientes das interações de vários fatores, como adsorção, absorção, interação com sítios metabólicos, estocagem e a eliminação do metal. A importância desses mecanismos na resposta da planta depende não só das características biológicas, mas também das condições ambientais (VALITTUTO, 2004).

An e colaboradores (2004), ao avaliarem a toxicidade dos metais cádmio, chumbo e cobre, nas concentrações 40, 80, 160, 320 e 640 mg Kg⁻¹ de solo, separadamente, e também em combinações binárias e terciária, sob o alongamento e crescimento da raiz de planta de pepino (*Cucumis sativus*), obtiveram CE₅₀ (concentração sub-letal à 50% dos organismos) de 77 (72), 88 (102), e 643 (403) mg Kg⁻¹ para Cu, Cd e Pb, respectivamente. A combinação binária mais tóxica foi de Cd + Pb, que apresentou CE_{50mix} de 0,95 (0,75) mg Kg⁻¹ e a combinação terciária apresentou a menor toxicidade, CE_{50mix} de 1,62 e 1,35 mg Kg⁻¹. A bioacumulação dos metais foi aumentada ou diminuída de acordo com a combinação destes.

2.1.3.1.3 Micro-organismos Bioindicadores

2.1.3.1.3.1 Bactéria

Um dos micro-organismos mais utilizados como bioindicador é a bactéria *Vibrio fischeri*. Desde os anos 70 essa bactéria é utilizada para determinar a toxicidade do solo, de sedimentos e de meios aquáticos. Essa bactéria emite luz naturalmente em ambientes aquáticos favoráveis, com concentrações de oxigênio

dissolvido superiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Apesar de ser de origem marinha, é possível também utilizá-la para a avaliação da toxicidade de amostras de águas doces e de sedimentos destes ambientes, após ajuste osmótico (KNIE; LOPES, 2004).

Em 2006, Tisirids e colaboradores investigaram os efeitos dos ácidos húmicos (HAs) sobre a toxicidade do cobre, zinco e chumbo utilizando a bactéria *Vibrio fischeri* como bioindicador. A bactéria foi liofilizada e ativada por uma solução de reconstituição e foi realizado um ajuste da pressão osmótica das amostras para obter uma salinidade de 2%, com uma solução salina concentrada (22% de NaCl e água deionizada). A emissão de luz da bactéria obtida pelo contato direto com as amostras foi medida por um aparelho (Microtox 500 (SDI)) em função do tempo e da concentração em soluções de compostos puros.

A toxicidade do cobre diminuiu com a adição de HAs, enquanto a toxicidade de zinco permaneceu quase constante, e a do chumbo aumentava dependendo da concentração de HA. Os efeitos interativos entre cobre e zinco, e entre chumbo e zinco em *V. fischeri* foram sinérgicos, ao passo que o efeito interativo entre o cobre e chumbo foi aditivo para todas as combinações testadas. A presença de HA causou redução de toxicidade relativamente elevada nas misturas de cobre e zinco e de chumbo e zinco, enquanto que a redução da toxicidade no caso da mistura de cobre e chumbo não foi alterada. Os autores concluíram que, para constatar corretamente o perigo causado por uma substância ao ambiente, deve ser avaliada também a presença de outros componentes que podem interagir com os mesmos.

2.1.3.1.3.2 Fungos filamentosos

Os fungos também podem ser utilizados como bioindicadores de contaminação do solo. Basile (2008) realizou um trabalho com o fungo *Alternaria cassiae* para testar sua sensibilidade ao dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Foram adicionadas diferentes concentrações de dicromato (0; 50; 90; 130; 170; 210 e 250 mg L^{-1}) ao meio líquido e após o resfriamento e solidificação do meio foram adicionados as placas discos com 6,5 mm de *A. cassiae*. Neste trabalho foi avaliado o crescimento do fungo por medidas transversais do diâmetro da colônia. Após sete dias, a CE_{50} estimada foi de $65,97 \pm 9,48 \text{ mg L}^{-1}$. Na concentração de 50 mg L^{-1} a inibição foi de 29%; em 90 mg L^{-1} , de 72%; em 130 mg L^{-1} , de 86%; em 170 mg L^{-1} , de 92%; em 210 mg L^{-1} , de 95%; e em 250 mg L^{-1} de 94%.

Neste trabalho foi concluído que o fungo *A. cassie* pode ser utilizado como organismo teste em testes ecotoxicológicos do solo, pois a resposta deste ao dicromato está de acordo com o padrão de aceitabilidade do desempenho laboratorial, além do fungo possuir uma capacidade de homeostase (capacidade de manter o ambiente interno em equilíbrio) e atingir o ponto de não retorno ou de inibição total de seu crescimento rapidamente.

2.1.3.1.3.3 Fungos unicelulares (Leveduras)

As leveduras apresentam características que garantem uma rápida resposta destes micro-organismos a alterações ambientais, indicando que estes podem ser utilizados com sucesso como bioindicadores de solo. Além disso, as leveduras e principalmente a *S. cerevisiae* possuem um alto grau de homologia com os eucariotos superiores, permitindo assim o estudo de aspectos de toxicidade relevantes a biologia humana.

O metabolismo das leveduras é anaeróbio facultativo, ou seja, ocorre crescimento tanto na presença quanto ausência de oxigênio, e o pH ideal ao crescimento é neutro a ligeiramente ácido. Na presença de oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente metabolizando hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água, na ausência de oxigênio fermentam os hidratos de carbono produzindo etanol e dióxido de carbono, realizando a fermentação (PELCZAR, 1997). Sua principal fonte para obtenção de energia e crescimento é o carbono orgânico (OLIVEIRA, 2009), mas alguns elementos como água, nitrogênio, oxigênio e minerais também são essenciais (GUIMARÃES, 2005).

Oliveira e colaboradores (2009) realizaram um trabalho para investigar a capacidade da vinhaça da cana-de-açúcar de diminuir os efeitos tóxicos do alumínio e utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como bioindicadora. As leveduras foram cultivadas em meio YED suplementado com concentrações de até 54 mg L⁻¹ de alumínio na forma de AlCl₃.H₂O na presença ou ausência de 150 g L⁻¹ de vinhaça. Na ausência da vinhaça, a adição de níveis crescentes de Al até 54 mg L⁻¹ reduziu em 18% a taxa de crescimento da levedura, enquanto que na presença da vinhaça não foi observada uma taxa significativa de redução. A viabilidade celular diminuiu de 97,7% (início) a 84,% (final) dos ensaios sem vinhaça e 92,3% com a vinhaça. Foi avaliado também a taxa de brotamento que aumentou de 7,62% no

início para 8,84% no final dos ensaios sem vinhaça e 17,8% com vinhaça. Os autores concluíram que estes resultados demonstram que a vinhaça possui capacidade de estimular o crescimento celular e de atenuar os efeitos tóxicos do alumínio.

Um trabalho semelhante foi realizado pelos mesmos autores Oliveira e colaboradores (2012). Eles investigaram a capacidade da vinhaça de cana-de-açúcar em diminuir os diversos efeitos de cádmio e níquel no crescimento celular, viabilidade e taxa de brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras foram cultivadas em meio YED suplementado com diferentes concentrações de vinhaça: 0,20 e 40 g L⁻¹, Cd e Ni. O Cd utilizado foi sob a forma de acetato de cádmio (CdC₄H₆OH.2H₂O) e o Ni sob a forma de cloreto de níquel (CdCl₂.2H₂O) e as concentrações utilizadas foram: 0; 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mg L⁻¹.

Na ausência da vinhaça e com a adição de doses crescentes de Cd e Ni, o crescimento celular diminuiu em aproximadamente 35% e 70% nas concentrações de Cd de 7,5 mg L⁻¹ e 15 mg L⁻¹ e para Ni nas mesmas concentrações ocorreu redução de 37% e 69%. Na presença da vinhaça não houve redução do crescimento celular. Como se sabe com a toxicidade bem provada de ambos os metais, a viabilidade das células e a taxa de brotamento reduziram progressivamente com o aumento das concentrações dos metais, mas na presença de vinhaça a situação foi notavelmente melhorada, pois minimizou os efeitos negativos de ambos os metais na concentração da massa celular, viabilidade celular e a taxa de brotamento. Estes resultados demonstram a capacidade da vinhaça da cana-de-açúcar de atenuar os efeitos tóxicos de Cd e Ni.

Além disso, até o momento não foram descritos na literatura a utilização de leveduras como bioindicadores de solo contaminado com cádmio.

2.1.4 Justificativa

Devido ao alto índice de contaminação e toxicidade dos solos com metais, vários testes ecotoxicológicos estão sendo realizados com a utilização de bioindicadores. Estes testes são realizados com diversos seres vivos, principalmente com organismos como oligoquetas (minhocas e colêmbolos) e plantas, porém, estes ensaios costumam se longos e trabalhosos. Os micro-organismos também têm sido utilizados, principalmente bactérias.

As leveduras apresentam diversas características que as tornam candidatas promissoras na utilização como bioindicadores de alterações ambientais. Dentre estas características destacam-se, por possuírem seu genoma sequenciado, demonstrarem uma resposta rápida a alterações ambientais, serem de fácil cultivo e manutenção e principalmente por possuírem um alto grau de homologia com os eucariotos superiores, possibilitando estudos de aspectos de toxicidade relevantes a biologia humana.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo utilizar diferentes gêneros de leveduras como bioindicadores do cádmio no solo.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Seleção de 18 linhagens de leveduras quanto à característica de floculação;
- Avaliação, por ensaios biológicos, da inibição do crescimento das leveduras na presença de cádmio;
- Avaliação, por ensaios biológicos, da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio;
- Avaliação, por ensaios de germinação e crescimento de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em solução de cádmio e milho (*Zea mays*) em extrato de solo com cádmio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material microbiológico

Para este trabalho foram utilizadas 18 linhagens de leveduras, compreendidas em oito gêneros, cedidas pelo Laboratório de Genética da ESALQ/USP. A seguir, na tabela 1, são apresentadas as linhagens utilizadas.

Tabela 1. - Linhagens de leveduras utilizadas no estudo

Gênero	Espécie	Sigla
<i>Candida</i>	<i>C. freyschussii</i>	78-50
	<i>C. guilliermondii</i>	2936
	<i>C. pseudotropicalis</i>	IZ809
	<i>C. shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	CBS4286
	<i>C. tropicalis</i>	IZ1824
	<i>C. utilis</i>	IZ300
<i>Kluveromyces</i>	<i>K. lactis</i>	IZ422
	<i>K. marxianus</i>	IZ619
<i>Pichia</i>	<i>P. membranaefaciens</i>	IZ379
	<i>P. stipitis</i>	NRRLY-124
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. rubra</i>	IZ1016
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Pedra
	<i>S. diastaticus</i>	J132b
<i>Schwanniomyces</i>	<i>S. allenius</i>	IZ2012
	<i>S. castellii</i>	58-7
<i>Torulopsis</i>	<i>T. colliculosa</i>	IZ1966
	<i>T. utilis</i> var. <i>thermophilus</i>	IZ214
<i>Trichosporon</i>	<i>T. pullulans</i>	IZ1146

As leveduras utilizadas no estudo foram compreendidas em oito gêneros: *Candida*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporon*.

4.2 Cultivo das leveduras

O meio de cultura utilizado em todos os procedimentos deste trabalho foi o YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) constituído de 2% de dextrose, 1% de peptona, 1% de extrato de levedura e 2% de Agar. As leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido e acondicionadas em B.O.D. a 30° C por 48 horas, em modo estático.

4.3 Seleção de leveduras não floculantes

Para selecionar as leveduras de características não floculantes, as 18 leveduras foram inoculadas individualmente em tubos tipo Falcon de 15 mL (TTP®, EUA), contendo 5 mL de meio YEPD. Os tubos foram acondicionados em B.O.D. a 30° C por 24 horas, em modo estático. Após este período as leveduras foram ressuspensas por agitação em vórtex e avaliadas visualmente quanto à característica floculação.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Soluções de cádmio utilizadas nos ensaios

As soluções de cádmio utilizadas foram preparadas a partir de solução padrão de cádmio (Cd 1000 mg $\pm$ 3 μ g/mL em 2% de HNO₃, (High-Purity Standards®), e esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121° C. Foram utilizadas 15 soluções de cádmio variando as concentrações (a cada 0,2 mg L⁻¹), iniciando em zero até 22 mg L⁻¹.

4.4.2 Ensaios biológicos para avaliação da inibição do crescimento das leveduras na presença de solução com cádmio

Para selecionar as leveduras sensíveis ao elemento cádmio foi realizado um bioensaio onde as mesmas foram expostas a diferentes concentrações de cádmio (descritas no item 4.4.1). As leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 20 mL de meio líquido e acondicionadas em B.O.D. a 30° C por 24 horas, em modo estático.

Os ensaios foram realizados em placas de cultura de células de poliestireno (Placas de ELISA) com 96 poços de 0,31 cm² (EasyPath). A figura 1 a seguir exemplifica como foi realizado o ensaio.

Figura 1 - Representação esquemática de uma placa Elisa de 96 poços com as leveduras inoculadas e o controle

Estas placas possuem oito linhas denominadas A-H e 12 colunas numeradas de 1-12. Estas foram preenchidas da seguinte forma:

- A coluna 1 foi preenchida somente com meio de cultura YEPD (100 µL) e H₂O estéril (75 µL) (controle sem cádmio);
- As linhas A-D e as colunas 2-12 foram preenchidas com meio de cultura YEPD (100 µL), H₂O estéril (75 µL) e células de leveduras (75 µL) (controle sem cádmio);
- As linhas E-H e as colunas 2-12 foram preenchidas com meio de cultura YEPD (100 µL), células de leveduras (75 µL) e solução de cádmio (75 µL) (tratamento com cádmio).

Após 24 horas foi realizada a leitura das placas no equipamento espectrofotômetro (Bio-Rad - Modelo 550 - Microplate Reader) e o comprimento de onda utilizado foi de 597 nm.

4.4.3 Ensaios biológicos para avaliação da atividade metabólica com o uso da técnica do Trifeniltetrazólio (TTC)

Para estes ensaios as leveduras selecionadas foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 20 mL de meio YEPD e colocadas em mesa horizontal a uma agitação de 150 rpm por 24 horas.

Os ensaios foram realizados em tubos tipo Falcon 15 mL (TTP®, EUA), foram adicionados: 2 mL de meio YEPD concentrado (5%), 1,5 mL de H₂O destilada esterilizada, 1,5 mL de solução de cádmio e 10 µL de células de levedura. Estes foram acondicionados em B.O.D. a 30° C por 24 horas. As concentrações utilizadas neste ensaio foram 0,6; 0,8; 1; 2; 4 e 6 mg L⁻¹.

Após o crescimento das leveduras, os tubos foram agitados em vórtex (AP 56-Phoenix) por 20 segundos e o conteúdo transferido para tubos de vidro de 15 mL e centrifugados por 2 minutos a 1500 x g em centrífuga de bancada Baby (Fanem®). Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 1 mL de solução de Trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% com 0,1% de glicose preparada em água destilada. Os tubos foram agitados em vórtex e acondicionados em B.O.D. a 30° C por 4 horas. Após este período, os tubos foram submetidos a uma nova centrifugação por 2 minutos a 1500 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 3 mL de etanol. Após 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante utilizado para leitura em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm para detecção da atividade metabólica celular das leveduras.

4.4.4 Ensaios biológicos para avaliação da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio

4.4.4.1 Obtenção das amostras de solo

As amostras de solo foram obtidas no Laboratório de Química Analítica Aplicada da ESALQ/USP.

O solo foi contaminado com solução de cádmio em concentrações que variaram de 20 a 80 mg Kg⁻¹.

4.4.4.2 Seleção de extratores de cádmio no solo

Foram avaliados três extratores de cádmio no solo: H₂O, Cloreto de Cálcio (CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹) e Mehlich 1 (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹).

Um primeiro ensaio foi realizado para seleção do extrator mais apropriado para cádmio, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Ensaio para seleção do extrator mais apropriado

Frascos	Amostras	Extratores
1- 2- 3	Sem solo	H ₂ O
4- 5- 6	5 g de solo controle	H ₂ O
7- 8- 9	5 g de solo contaminado com Cd	H ₂ O
10- 11- 12	Sem solo	CaCl ₂
13- 14- 15	5 g de solo controle	CaCl ₂
16- 17- 18	5 g de solo contaminado com Cd	CaCl ₂
19- 20- 21	Sem solo	Mehlich 1
22- 23- 24	5 g de solo controle	Mehlich 1
25- 26- 27	5 g de solo contaminado com Cd	Mehlich 1

Os ensaios foram realizados em triplicata, onde a um frasco de plástico foram adicionados 5 g de amostra de solo e 50 mL do extrator, conforme apresentado na tabela 2. Os 27 frascos foram agitados em mesa agitadora horizontal por 5 minutos, a 200 rpm e posteriormente ficaram em repouso. Após 4 horas, as soluções foram filtradas em papel filtro quantitativo C40 de 125 mm (Unifil®) e acondicionadas em geladeira a 10°C por 24 horas. Nos ensaios com o extrator Mehlich 1 a solução foi ajustada a um pH final de 5, com solução NaOH 0,1 mol L⁻¹, para deixar em condição apropriada para o crescimento das leveduras.

Um segundo ensaio foi realizado modificando a quantidade de amostra para 10 g e de extrator para 25 mL. Os demais parâmetros e procedimentos foram idênticos aos já descritos acima.

A seguir é apresentado um esquema da extração do cádmio no solo (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de extração do solo com a utilização do extrator CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. **A)** Pesagem do solo **B)** Extração **C)** Filtração

Os extratos de solo obtidos foram analisados no equipamento espectrofotômetro de Absorção Atômica em chamas (FAAS) modelo AA240FS (Varian), para quantificação de cádmio.

Os extratos que continham solo com cádmio no extrator CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram diluídas 5 vezes, (2 mL de extrato + 8 mL de extrator CaCl_2 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$) e os extratos que continham solo com cádmio no extrator Mehlich 1 foram diluídas 6 vezes (2 mL de extrato + 10 mL de Mehlich 1). Os extratos que não continham cádmio ou os que utilizaram somente H_2O como extrator não tiveram necessidade de serem diluídos.

Foram construídas as curvas de calibração utilizando os três extratores separadamente, com padrão de cádmio a concentração de 1000 mg L^{-1} . Para cada extrator foi utilizada soluções contendo cádmio nas concentrações de 0 a 100 mg L^{-1} .

Após a quantificação do cádmio nos extratos de solos, estes foram utilizados nos ensaios biológicos para avaliação da inibição do crescimento das leveduras.

Para este ensaio, as leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 20 mL de meio YEPD e acondicionadas em mesa agitadora horizontal a 150 rpm por 24 horas.

Aos tubos tipo Falcon de 15 mL (TTP®, EUA), foram adicionados: 2 mL de meio YEPD concentrado (5%), 1,5 mL de H_2O destilada esterilizada, 1,5 mL de extrato de solo e 10 μL de células de levedura. Estes foram acondicionados em B.O.D. a 30°C por 24 horas (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração do ensaio realizado para avaliação da inibição do crescimento das leveduras com extrato de solo com cádmio

Posteriormente, os tubos foram submetidos ao procedimento para avaliação da viabilidade celular com o uso da técnica do Trifeniltetrazólio (TTC) descrito no item 4.4.3.

4.4.5 Ensaio de germinação e crescimento de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em solução de cádmio e milho (*Zea mays*) em extrato de solo com cádmio

Foi realizado um ensaio para avaliação da germinação e crescimento de sementes em solução de cádmio e extrato de solo com cádmio.

Foram utilizadas sementes de *Cucumis sativus* (nome popular: pepino) (Topseed Garden, lote: 023488) e de *Zea mays* (nome popular: milho) (Topseed Garden, lote: 022150), adquiridas no comércio da cidade de Piracicaba/SP. Estas sementes foram imersas durante um minuto em uma solução de hipoclorito de sódio 10%, em seguida lavadas com água destilada para descontaminação.

O ensaio com as sementes de pepino foram realizados em duplicata. Nove sementes foram separadas e semeadas sobre Placas de Petri de 15 cm forradas com papel filtro quantitativo 80 g/m², contendo 20 mL de solução aquosa de cádmio, nas concentrações 0; 2,5; 5; 7,5; 10 mg L⁻¹. As placas foram acondicionadas em B.O.D. a 28° C por 7 dias.

O ensaio com as sementes de milho foram realizados em duplicata. Nove sementes foram separadas e semeadas sobre Placas de Petri de 15 cm forradas

com papel filtro quantitativo 80 g/m², contendo 20 mL de extrato de solo com cádmio, nas concentrações 0; 10; 20; 30, 35 e 40 mg L⁻¹. As placas foram acondicionadas em B.O.D. a 28° C por 7 dias.

Após a germinação, as raízes das plântulas foram coradas com violeta genciana, fotografadas e as imagens convertidas em um formato binário de arquivo para posterior análise no software Image J, que permite processamento de imagens com precisão. Através dos resultados obtidos foi realizado o cálculo da DL₅₀.

Os bioensaios de germinação de sementes seguiram as recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), e dos testes de efeito ecológico OPPTS 850.4200, que consistem em expor sementes de diferentes espécies à solução teste, e avaliar, após período de incubação em estufa com temperatura controlada, o número de germinações, alterações na morfologia e comprimento da raiz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação de linhagens de leveduras quanto a característica de floculação

Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes gêneros de leveduras com potencial para aplicação como bioindicadores de ambientes contaminados com o elemento tóxico cádmio.

Toda metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida para tal objetivo e é inédita na literatura para esse propósito.

Foram avaliadas 18 linhagens de leveduras para selecionar as que apresentaram a característica de não floculação. Leveduras floculantes são leveduras que se agregam através de um mecanismo onde homólogos da lecitina presentes na parede celular se unem aos íons cálcio livres na solução, formando pontes de cálcio entre elas e consequentemente levando a formação de grumos com milhões de células, esses grumos ou flocos devido ao peso são depositados no fundo do recipiente e utilizados para o crescimento, formando um único sedimento, e são classificados de Floc1 até Floc5, de acordo com sua capacidade de flocular (STRATFORD, 1989; BONY et al., 1997).

A característica de floculação é de extrema importância para uma avaliação preliminar, já que todos os ensaios realizados neste trabalho utilizaram-se de leituras de absorbância no equipamento espectrofotômetro, ou seja, foram avaliadas segundo resultados obtidos na leitura de densidade ótica (D.O.) e esta característica de floculação pode influenciar nas leituras.

A leitura de densidade ótica (D.O.) da cultura microbiológica corresponde à absorbância (ou absorvância), que é determinada com base na expressão $D.O = \log(I_0/I)$, onde $\log$ é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Os comprimentos de onda frequentemente usados para medição da densidade ótica de suspensões de células de bactérias ou leveduras são 540, 600 ou 640 nm.

Na figura 4 é ilustrada a diferença entre uma linhagem floculante e uma não floculante.

Figura 4 - **A)** Levedura não floculante; **B)** Levedura floculante

Com este experimento foi possível observar que, logo após a ressuspensão, a linhagem de característica floculante voltou a se precipitar no fundo do tubo, podendo influir erroneamente nos resultados da leitura no espectrofotômetro.

Sendo assim, das 18 linhagens de leveduras avaliadas, 16 linhagens apresentaram a característica não floculante, foram elas: *Saccharomyces cerevisiae* (Pedra), *Saccharomyces diastaticus* (J132b), *Torulopsis utilis* var. *thermophilus* (IZ214), *Torulopsis colliculosa* (IZ1966), *Candida freyschussii* (78-50), *Candida guilliermondii* (2936), *Candida pseudotropicalis* (IZ809), *Candida shehatae* var. *insectosa* (CBS4286), *Candida utilis* (IZ300), *Pichia membranaefaciens* (IZ379), *Pichia stipitis* (NRRLY-124), *Kluveromyces marxianus* (IZ619), *Rhodotorula rubra* (IZ1016), *Schwanniomyces allenius* (IZ2012), *Schwanniomyces castellii* (58-7) e *Trichosporon pullulans* (IZ1146). E apenas duas, as leveduras *Kluveromyces lactis* (IZ422) e *Candida tropicalis* (IZ1824) apresentaram a característica de floculação e não continuaram no foco deste estudo, sendo descartadas das próximas etapas.

5.2 Avaliação da inibição do crescimento das leveduras na presença de solução com cádmio

Após a seleção das 16 linhagens de leveduras não floculantes, foi realizado um ensaio para avaliação da sensibilidade de crescimento destes micro-organismos na presença do elemento cádmio. Estes micro-organismos foram cultivados em meios de cultura líquidos onde foram adicionadas soluções de diferentes concentrações de cádmio. Para a escolha das concentrações utilizadas foram realizados aproximadamente 30 ensaios, onde foram selecionadas algumas das

concentrações para serem apresentadas. Os outros parâmetros utilizados, tais como volume do meio de cultura e concentração do inóculo das leveduras também foram otimizados para se adequar a metodologia em placa de ELISA.

A escolha da utilização das placas de ELISA para estes ensaios foi devido a praticidade em se trabalhar com um grande número de amostras simultaneamente e volumes reduzidos. Após o crescimento das leveduras em placas foi realizada a análise por espectrofotômetro, pela leitura de D.O.

As 16 leveduras não floculantes, foram expostas a três diferentes concentrações exploratórias de cádmio (4 , 6 e 8 mg L^{-1}). Os resultados obtidos através da leitura de D.O. neste ensaio são apresentados na figura 5.

Figura 5 - Porcentagem de inibição do crescimento das diferentes linhagens de leveduras expostas a três concentrações de cádmio: 4 mg L^{-1} , 6 mg L^{-1} , 8 mg L^{-1}

Foi observado que as 16 linhagens apresentaram diferentes níveis de sensibilidade na presença do cádmio durante o crescimento.

Apenas as leveduras IZ809 e IZ214 apresentaram uma porcentagem de inibição de crescimento acima de 50% nas três concentrações avaliadas (exceto para a IZ214 na concentração de 4 mg L^{-1} que foi de 41,05%), ou seja, foram as que apresentaram um menor crescimento na presença do elemento cádmio, sendo consideradas as mais sensíveis neste ensaio.

Quando avaliadas em concentração de 8 mg L^{-1} , as leveduras NRRY-124, IZ300, 2936, IZ619 e J132b apresentaram uma porcentagem de inibição de crescimento entre 25 e 50%. Nas concentrações de 4 e 6 mg L^{-1} as mesmas leveduras apresentaram uma alta variação na porcentagem de inibição de 0,63 a 23,15%. Considerando a concentração de 8 mg L^{-1} estas leveduras apresentaram uma sensibilidade mediana comparada as 16 leveduras avaliadas.

As leveduras Pedra, IZ1146, 58-7, 78-50, IZ1966, IZ2012, CBS4286, IZ1016 e IZ379 apresentaram as menores porcentagens de inibição (menos de 25%), sendo consideradas as mais resistentes ao elemento cádmio e apresentando um maior crescimento.

Após avaliação das 16 leveduras, foram selecionadas três leveduras com diferentes níveis de tolerância ao elemento cádmio. Foi selecionada a levedura *Torulopsis utilis* var. *thermophilus* (IZ214) por ter apresentando uma inibição de crescimento acima de 50%, ou seja, por ser muito sensível a presença de cádmio. Dentre as leveduras que apresentaram sensibilidade mediana (entre 0,63 e 23,15%), foi selecionada a levedura *Candida utilis* (IZ300). E também foi selecionada uma levedura dentre aquelas que apresentaram menor sensibilidade (menor que 25%) ao elemento cádmio, que foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Pedra). As leveduras *T. utilis* (IZ214), *C. utilis* (IZ300) e *S. cerevisiae* (Pedra) podem ser visualizadas na Figura 6.

Figura 6 - Ilustração das três leveduras selecionadas: *T. utilis* (IZ214), *C. utilis* (IZ300) e *S. cerevisiae* (Pedra)

Além da seleção pelo nível de sensibilidade, estas foram selecionadas por serem de gêneros diferentes e por apresentaram boa resposta de crescimento.

Após este ensaio de seleção foi verificado a necessidade de se alterar alguns parâmetros, principalmente o volume de inóculo inicial das leveduras (concentração celular das leveduras) e as concentrações de cádmio nas soluções.

A necessidade de alteração no volume de inóculo inicial foi devido as observações dos ensaios anteriores que mostraram que os inóculos com alta concentração de células de leveduras causavam alterações nos resultados finais. Foi observado que devido ao número elevado de células, estas em determinadas concentrações de cádmio demorariam mais para ter seu crescimento inibido, enquanto que se estivessem em concentrações celulares menores ficariam mais sensíveis e morreriam mais rapidamente nas mesmas concentrações de cádmio.

Sendo assim, após a seleção das três leveduras, os parâmetros de concentração celular foram reduzidos e as faixas de concentrações de cádmio foram aumentadas para os próximos ensaios.

As concentrações das soluções de cádmio utilizadas foram 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 12 mg L⁻¹, para que fosse determinado exatamente as concentrações limite para inibição de crescimento para cada levedura. E também foi alterado o inóculo inicial, que no ensaio anterior era de 1% (vol/vol) partindo de pré-inóculo crescido por 48 horas, e passou a ser de 0,1% (vol/vol).

A seguir são apresentados os resultados obtidos através da leitura de D.O em espectrofotômetro com as três leveduras selecionadas nos ensaios otimizados com os novos parâmetros.

No estudo com a levedura *T. utilis* (IZ214) foi obtido o resultado que pode ser visualizado na figura 7.

Figura 7 - Linhagem *T. utilis* (IZ 214) exposta a diferentes concentrações de cádmio

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que a partir de 0,8 mg L⁻¹ ocorreu 100% de inibição do crescimento celular e que quando a concentração de cádmio utilizado foi de 0,2 mg L⁻¹ a inibição de crescimento foi de apenas 1%, ou seja praticamente não ocorreu a inibição.

No ensaio com a segunda levedura selecionada, *C. utilis* (IZ300) foi obtido o resultado que pode ser visualizado na figura 8.

Figura 8 - Linhagem *C. utilis* (IZ 300) exposta a diferentes concentrações de cádmio

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que a partir de 1,0 mg L⁻¹ ocorreu 100% de inibição do crescimento celular e que quando a concentração de cádmio utilizado foi de 0,2 mg L⁻¹ a 0,4 mg L⁻¹ a inibição de crescimento foi de apenas 3%, ou seja praticamente não ocorreu a inibição.

No ensaio realizado com a terceira levedura selecionada, *S. cerevisiae* (Pedra) foi obtido o resultado que pode ser visualizado na figura 9.

Figura 9 - Linhagem *S. cerevisiae* (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que a partir de 8,0 mg L⁻¹ ocorreu 100% de inibição do crescimento celular e que quando a concentração de cádmio utilizada foi de 0,2 mg L⁻¹ a 0,8 mg L⁻¹ não ocorreu a inibição do crescimento.

A seguir é apresentada uma tabela comparativa dos resultados obtidos com as três leveduras (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos resultados de inibição de crescimento das três leveduras na presença de diferentes concentrações de cádmio

Concentrações de cádmio (mg L ⁻¹)	% de inibição do crescimento		
	<i>T. utilis</i> (IZ214)	<i>C. utilis</i> (IZ300)	<i>S. cerevisiae</i> (Pedra)
0,2	1	3	0
0,4	30	3	0
0,6	90	35	0
0,8	100	85	0
1,0	100	100	10
2,0	100	100	25
4,0	100	100	42
6,0	100	100	91
8,0	100	100	100
10,0	100	100	100
12,0	100	100	100

Comparando os resultados obtidos para as três leveduras foi possível concluir que a levedura com menor sensibilidade ao cádmio foi a *S. cerevisiae* (Pedra), pois se mostrou tolerante até a concentração de 6 mg L⁻¹ de cádmio e que a partir de 8 mg L⁻¹ houve total inibição do crescimento; já a linhagem que menos apresentou tolerância ao cádmio foi a *T. utilis* que se mostrou tolerante até a concentração de 0,6 mg L⁻¹ de cádmio e que a partir de 0,8 mg L⁻¹ houve total inibição do crescimento, ou seja 10 vezes menos tolerante a presença do elemento cádmio. Já a linhagem *C. utilis* se mostrou tolerante até a concentração de 0,8 mg L⁻¹ de cádmio e que a partir de 1,0 mg L⁻¹ houve total inibição do crescimento.

A partir deste ensaio foram realizados ensaios para a confirmação da viabilidade celular (células metabolicamente ativas, capazes de realizar os processos de seletividade de membrana) com o uso da técnica do TTC. Para isso foram selecionadas somente as linhagens *T. utilis* e *S. cerevisiae* (Pedra), pois apresentaram resultados discrepantes, ou seja, uma apresentou alta sensibilidade e

a outra baixa sensibilidade ao cádmio. A linhagem *C. utilis* (IZ300) por apresentar resultados intermediários, foi excluída dos próximos ensaios.

5.3 Avaliação da viabilidade celular com a utilização do TTC

Nos ensaios anteriores, foram avaliadas a inibição de crescimento das leveduras por leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro. Porém, através desta medida foi possível verificar apenas a quantidade celular (número de células no meio), não demonstrando a sua viabilidade. Por este motivo, os ensaios foram complementados com a utilização do TTC (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio), um reagente que mede a respiração celular pela conversão do TTC (incolor) em Fornazam (reagente vermelho). Esta reação é realizada pelas mitocôndrias durante a respiração, identificando facilmente as leveduras que estão respirando, ou seja, as células viáveis.

Estes ensaios foram realizados em tubos tipo Falcon, devido aos problemas obtidos com as placas de ELISA, como contaminação e crescimento desuniforme das leveduras nos poços. As linhagens utilizadas foram *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra) e as concentrações de cádmio utilizadas foram 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L⁻¹. Foram utilizados os dois métodos para avaliação de inibição de crescimento celular, por medida de D.O. e viabilidade celular pela técnica do TTC.

No estudo com a levedura *T. utilis* (IZ214) foi obtido o resultado que pode ser visualizado na figura 10.

Figura 10 - Avaliação da porcentagem de crescimento da levedura *T. utilis* (IZ214) exposta a diferentes concentrações de cádmio, através de dois métodos (D.O. e TTC)

De acordo com os resultados obtidos nesta análise, a linhagem *T. utilis* (IZ214) apresentou valores de D.O. que indicaram um crescimento da levedura até a concentração de 1 mg L^{-1} com 33% de inibição na presença do cádmio e que somente a partir da concentração de 2 mg L^{-1} ocorreu 100% da inibição. Já quando foi utilizado a técnica do TTC foi observado que ocorreu 100% de inibição na concentração de 1 mg L^{-1} .

No estudo com a levedura *S. cerevisiae* (Pedra) foi obtido o resultado que pode ser visualizado na figura 11.

Figura 11 - Avaliação da porcentagem de crescimento da levedura *S. cerevisiae* (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio, através de dois métodos (D.O. e TTC)

De acordo com o ensaio realizado, a linhagem *S. cerevisiae* (Pedra) apresentou valores de D.O. que indicaram um crescimento da levedura até a concentração de 4 mg L^{-1} com 38% de inibição na presença do cádmio e que somente a partir da concentração de 6 mg L^{-1} ocorreu 100% da inibição. Já quando analisamos a mesma levedura com o uso da técnica do TTC foi observado que ocorreu 100% de inibição na concentração de 4 mg L^{-1} .

Os resultados apresentados pela linhagem *S. cerevisiae* (Pedra) foram semelhantes aos apresentados pela linhagem *T. utilis* (IZ214), apesar de apresentarem sensibilidade em concentrações diferentes. Comparando as duas técnicas utilizadas, a do TTC mostrou-se mais sensível, indicando que já havia ocorrido inviabilidade celular (ou morte celular) a concentrações menores de cádmio, quando comparado com a leitura de D.O.

Com os resultados apresentados nestes ensaios, foi observado o grande potencial do uso da técnica do TTC como indicador da viabilidade celular em bioensaios com leveduras.

A técnica do TTC é conhecida na literatura por apresentar uma ampla aplicação para verificação da viabilidade de sementes (BARROS, 1990; BHÉRING et al, 1996; FRANÇA NETO, 1999). Também é utilizada em testes com leveduras para identificação de mutantes Petit (linhagens com deficiência respiratória) (NAGAY, 1961).

No entanto, a aplicação na qual foi utilizada neste trabalho medindo a viabilidade celular das leveduras em meios contendo elementos tóxicos como o cádmio, é inédita na literatura e está sendo proposta pela primeira vez.

5.4 Avaliação da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio

Após a realização de ensaios para avaliação de inibição do crescimento das leveduras em solução contendo cádmio, foi realizado ensaios com leveduras em extratos de solo contendo cádmio. Estes ensaios tiveram por objetivo simular uma situação mais próxima da realidade utilizando leveduras como bioindicadores em ambientes contaminados com cádmio, como o solo.

Para isto, antes dos ensaios com as leveduras, foi necessário um estudo para seleção do (s) extrator (es) mais adequado para o elemento cádmio no solo.

Isso porque os metais se encontram no solo sob diferentes formas químicas e vários extratores têm sido utilizados para isolar e extrair elementos, tanto essenciais quanto tóxicos, de uma determinada fase do solo (MELO; ALLEONI, 2009). Muitos desses extratores, entretanto, são menos específicos extraindo menos ou mais da fase do solo que se deseja (MELO; ALLEONI, 2009).

Existem quatro tipos de extratores químicos: água, ácidos, os agentes quelantes e as soluções salinas.

Os extratores ácidos são utilizados na dissolução dos minerais de argila, independentemente das formas extraídas, quer dizer não evidenciando de onde o metal foi extraído da forma imobilizada, solúvel ou livre. Os mais utilizados são, HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) (PAGE et al, 1982) e Mehlich 1 (NELSON et al, 1953). Os agentes quelantes combinam-se com os íons metálicos em solução formando complexos

solúveis e diminuindo sua atividade iônica na solução do solo, são eles: (ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). E as soluções salinas extraem preferencialmente os metais dos sítios de troca iônica do solo (MELO; ALLEONI, 2009) e possuem forma iônica semelhante à do solo. Os mais empregados são acetato de amônio (que extrai Mn, Ni, Cd e Pb), cloretos (CaCl_2) (McLAREN; CRAWFORD, 1973) ou nitratos: KNO_3 (EMMERICK et al, 1982), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (BECKETT, 1989), MgCl_2 (TESSIER et al., 1979; HARRISON et al., 1981) e BaCl_2 (RAURET, 1998).

Para este experimento foi utilizado solo contaminado com cádmio na concentração 20 mg Kg^{-1} e foram escolhidos três extratores com princípios diferentes: H_2O , CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e Mehlich 1. A H_2O extrai íons que estão livres na solução do solo e também aqueles que estão na forma de complexos solúveis (orgânicos e inorgânicos), o CaCl_2 é um extrator salino que extrai metais de sítios de troca iônica, e o Mehlich 1 é um extrator ácido também chamado de solução duplo-ácida que é constituída de HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + H_2SO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ (MELO; ALLEONI, 2009). O objetivo foi escolher o extrator mais adequado à extração de cádmio do solo.

Após a extração utilizando os três extratores, foi realizada uma leitura de absorbância para determinação da concentração de cádmio extraído dos extratos do solo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica em chamas (FAAS) (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise em espectrofotômetro (FAAS) dos extratos de solo obtidos através de três diferentes extratores

Extrator	mg L^{-1} (média)	Desvio padrão (Dv)
H_2O	0,010	0,002
$\text{H}_2\text{O} + \text{Solo}$	0,010	0,001
$\text{H}_2\text{O} + \text{Solo Cd}$	0,095	0,005
CaCl_2	0,022	0,000
$\text{CaCl}_2 + \text{Solo}$	0,024	0,001
$\text{CaCl}_2 + \text{Solo Cd}$	0,652	0,005
Mehlich 1	0,037	0,001
Mehlich 1 + Solo	0,038	0,002
Mehlich 1 + Solo Cd	1,473	0,003

Após a leitura de absorbância, foi obtida as concentrações de cádmio nos extratos de solo e seus respectivos controles. O resultado obtido foi que o extrator Mehlich 1 foi o mais eficiente na extração do cádmio do solo, com uma concentração média de $1,473 \text{ mg L}^{-1}$, seguido do CaCl_2 que extraiu em média $0,652 \text{ mg L}^{-1}$ e da H_2O que extraiu $0,095 \text{ mg L}^{-1}$.

Após a quantificação do cádmio nos extratos de solo foram realizados ensaios para avaliar a inibição do crescimento das leveduras nos extratos de solo contaminados com cádmio, conforme descrito no item 4.4.4. Os resultados obtidos para ambas linhagens (*T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra)) confirmaram que o Mehlich 1 foi o extrator mais eficiente para o cádmio, pois, após a adição de TTC aos tubos, os sobrenadantes apresentaram coloração transparente, fato que evidencia células mortas.

Contudo, após este experimento, o Mehlich 1 foi desconsiderado por apresentar uma elevada acidez e assim interferir nos resultados, de modo que o crescimento das leveduras não diferiu nos três tratamentos (Mehlich 1, Mehlich 1 + solo e Mehlich 1 + solo Cd). Por esta razão, optamos por utilizar o CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, considerado também um bom extrator, além de não ter interferido nos resultados. Outra vantagem é que esta solução possui característica molar e força iônica muito similar a encontrada em muitos solos (HOUBA et al., 2000).

Após a escolha do extrator, foi realizado um ensaio para a avaliação do crescimento das leveduras *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra) na presença de extratos de solos contaminados com diferentes concentrações de cádmio (20, 40, 60 e 80 mg Kg^{-1}). Os resultados obtidos através deste ensaio podem ser visualizados na figura 12, a seguir.

Figura 12 - Avaliação da porcentagem de inibição de crescimento das linhagens *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra) na presença de extratos de solo com diferentes concentrações de cádmio (20, 40, 60 e 80 mg Kg⁻¹). **A)** CaCl₂ (controle); **B)** CaCl₂ com solo não contaminado; **C)** CaCl₂ com solo contaminado com 20 mg Kg⁻¹ de Cd; **D)** CaCl₂ com solo contaminado com 40 mg Kg⁻¹ de Cd; **E)** CaCl₂ com solo contaminado com 60 mg Kg⁻¹ de Cd; **F)** CaCl₂ com solo contaminado com 80 mg Kg⁻¹ de Cd

Na figura 12, foi possível observar que a porcentagem de inibição de crescimento das leveduras não diferiu entre o controle e a maioria dos tratamentos com as diferentes concentrações de cádmio. Além disso, o comportamento das leveduras foi completamente inesperado, pois na maioria das concentrações o crescimento das leveduras foi superior ao controle. Este resultado pode estar relacionado à presença de matéria orgânica no solo, o qual pode ter causado uma suplementação ao meio de cultura.

Em relação às diferentes concentrações de cádmio, a não visualização dos efeitos tóxicos provavelmente pode estar ligado à imobilização do cádmio a matéria orgânica presente nos extratos de solo, tais como açúcares, debris celulares, ligantes (óxido de Fe, Al e Mn), entre outros.

Resultados semelhantes foram apresentados por Yang e colaboradores (2012). Os autores utilizaram minhoca (*Eisenia fetida*) para avaliar os efeitos do cádmio, onde as mesmas foram expostas a diferentes concentrações (0;1;25; 2,5; 5 e 10 mg Kg⁻¹). Foi avaliada a atividade das enzimas GST, CAT, SOD e P450. As enzimas apresentaram alterações diante das diferentes concentrações de cádmio, entretanto, nenhum sinal de toxicidade ou alteração fisiológica foi observado nas minhocas durante a exposição nas oito semanas de ensaio.

Após buscas na literatura, foi possível encontrar que o cádmio realmente se liga a outros componentes do solo (MELO; ALLEONI, 2009). Entretanto, não se

pode afirmar que o cádmio, ao se ligar a algum componente do solo, perde sua toxicidade em relação às leveduras.

Para comprovar a suspeita que o cádmio poderia estar ficando adsorvido na matéria orgânica do solo e sofrendo interferência de outros elementos, foi realizado um ensaio onde ao extrato de solo (já extraído) foi adicionado solução de cádmio livre.

Este ensaio foi realizado somente com a levedura *S. cerevisiae* (Pedra), devido a sua alta tolerância ao cádmio (figura 13). Foi utilizado um extrato de solo com a concentração de $6,63 \text{ mg L}^{-1}$ de cádmio, e o mesmo foi acrescido de íons de cádmio livre para as seguintes concentrações: 22 mg L^{-1} ; 29 mg L^{-1} ; 37 mg L^{-1} ; 44 mg L^{-1} e 82 mg L^{-1} , para a avaliação da capacidade de saturação do extrato do solo.

Figura 13 - Porcentagem de inibição do crescimento da linhagem *S. cerevisiae* (Pedra) exposta a diferentes concentrações de cádmio em solução de extração de solo, avaliada por D.O. e pela técnica do TTC

Após 24 horas de incubação da linhagem *S. cerevisiae*, foi observado através da leitura de D.O. que na concentração de 22 mg L^{-1} não ocorreu inibição do crescimento. Por outro lado, ao ser observado pela técnica do TTC foi constatado que ocorreu uma inibição de 19% no crescimento da levedura, na mesma concentração.

Já nas concentrações seguintes, foi verificado através da leitura de D.O. que ocorria uma inibição do crescimento (1, 38, 57 e 75%, respectivamente). Porém, ao

se utilizar a técnica do TTC foi constatado que a partir da concentração de 37 mg L^{-1} ocorreu uma inibição de 91% e que na concentração de 44 mg L^{-1} ocorreu 100% de inibição do crescimento.

Os resultados obtidos pela leitura de D.O. apresentaram um erro, pois a leitura não é capaz de diferenciar células vivas de células mortas. O contato da levedura com o cádmio promove a morte celular por intoxicação, apesar disso, antes de morrer a célula é capaz de realizar algumas divisões dando uma falsa impressão de crescimento.

O efeito da redução da toxidez do cádmio pela presença de matéria orgânica no solo observado neste estudo também foi observado no trabalho realizado por An e colaboradores (2012). Os autores verificaram que a matéria orgânica do solo captura íons livres de cádmio e que a incorporação de Ca e Mg diminui o efeito de toxidez do cádmio em plantas, pois estes íons competem com o cádmio pelos mesmos bioligantes nas células.

5.5 Avaliação dos ensaios de germinação e crescimento de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em solução de cádmio e milho (*Zea mays*) em extrato de solo contendo cádmio

Muitos trabalhos têm sido realizados com a utilização de plantas para detectar a presença de elementos químicos no ambiente. As plantas mais utilizadas tem sido: milho *Zea mays* (milho); *Triticum sativum* (trigo); *Cucumis sativus* (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo), estas tem se mostrado bons bioindicadores na identificação da ecotoxicidade dos solos por metais (RIBEIRO; ZAMPIERON, 2011).

Como a realização de experimentos com plantas como bioindicadores ambientais são mais comuns do que utilizando-se micro-organismos, foram realizados neste trabalho testes com sementes de pepino e milho (em solução de cádmio e extrato de solo com cádmio, respectivamente), com objetivo de comparar os resultados obtidos nos ensaios.

5.5.1 Teste com germinação e crescimento de sementes de *Cucumis sativus* em solução padrão de cádmio

Para avaliar a toxicidade do cádmio em plantas e correlacionar os resultados com os testes com leveduras, foi realizado um experimento com sementes de *Cucumis sativus* (pepino) para avaliar a resposta da germinação e crescimento em solução de cádmio.

As sementes de pepino foram expostas às concentrações de cádmio: 2,5 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 7,5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 14, a seguir.

Figura 14 - Sementes de pepino germinadas em solução aquosa de cádmio, nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹

Como verificado neste ensaio, todas as sementes de pepino tiveram resposta positiva quanto a germinação, ou seja 100% germinaram.

A partir da análise dos resultados, as sementes foram analisadas quanto ao crescimento e foi determinada a área dos brotos germinados em cm^2 usando o programa Image J. Os resultados estão expressos no gráfico na figura 15.

Figura 15 - Porcentagem de inibição de crescimento das sementes de pepino, calculada pela área dos brotos (cm^2), relativos ao tratamento controle

Foi verificado que na concentração de solução padrão de cádmio $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ houve 50% de inibição de crescimento e na concentração 10 mg L^{-1} essa inibição chegou a 100%.

Para a comparação dos resultados, foi calculada a DL_{50} para as sementes de *Cucumis sativus* e para o ensaio com as leveduras *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra).

A DL_{50} é a concentração que causa a morte de 50% dos organismos-teste, no caso das plantas que inibe 50% do seu crescimento e no caso das leveduras que causam morte em 50%.

Foi utilizado o modelo de ajuste logístico, obtendo a equação: $Y = 102,02 / (1 + 8,21 \times e^{-0,28x})$ $R = 0,9313$, no qual foi calculado um valor de DL_{50} de $7,33 \text{ mg L}^{-1}$ para as sementes de pepino.

Para os ensaios com as leveduras, em solução de cádmio e utilizando-se a técnica do TTC na análise, foram obtidas um valor de DL_{50} de $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ para a *T. utilis* (IZ214) e de $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ para a *S. cerevisiae* (Pedra).

O valor da DL_{50} para as sementes foi superior para os ensaios realizados com as leveduras, mostrando que as leveduras foram mais sensíveis a presença do elemento cádmio, causando uma porcentagem de morte maior as concentrações menores.

O valor de DL_{50} obtido nos resultados com sementes de pepino podem ter sido maior em comparação com as leveduras, devido ao fato de que parte do metal (contido na solução) pode ter permanecido retido nas raízes não sendo absorvido pela plântula. Esse efeito foi descrito por vários autores, como Marsola e colaboradores (2005) e Miyazawa e colaboradores (2002). A explicação de tal fato pode estar relacionada com a adsorção (das raízes) como um mecanismo de defesa da planta que minimiza os efeitos de toxicidade.

As plantas também possuem mecanismos de tolerância ao cádmio. Um dos mais importantes é através de reações de complexação intracelular ou quelação. O cádmio é quelado pela glutiona (GHS) ou fitoquelatinas (PCs) que são pequenos peptídeos sintetizados enzimaticamente a partir da GHS em uma reação catalisada pela enzima fitoquelatina sintase PCS (REA et al., 2004). Através desta quelagem o cádmio é detoxificado pela maioria das plantas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Outro mecanismo de tolerância ao cádmio que está associado ao de quelação é a compartimentalização. Após a quelação, o produto formado (Cd-quelador) entra em contato com metais ou metalóides, então a síntese de PCs é iniciada e o cádmio é o mais forte desencadeador desta acumulação (MAITANI et al., 1996). Esta síntese é seguida por um processo de indução coordenada da transcrição de muitos genes associado à absorção e assimilação de sulfato (NOCITO et al., 2002) e também pela biossíntese de GSH (SAITO, 2004) onde é armazenado em estruturas celulares como o vacúolo, diminuindo sua concentração no citosol e organelas, onde estão presentes as enzimas do metabolismo primário, evitando a desnaturação das mesmas e a redução de sua atividade enzimática (MA et al., 2005).

Além destes existem outros mecanismos de tolerância como a complexação do Cd por proteínas ligantes (Metalotioninas) (Ma et al., 2005) e a associação entre plantas e fungos micorrízicos (JENTSCHKE et al., 1999).

Em 2003, An e colaboradores utilizaram as plantas milho (*Zea Mays*); trigo (*Triticum sativum*); pepino (*Cucumis sativus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) para avaliar a ecotoxicidade de cádmio no solo. As plantas foram expostas a diferentes

concentrações de cádmio: 40, 80, 160, 320, 640 mg L⁻¹. Os parâmetros observados foram a germinação das sementes e o crescimento das plântulas (caule e raiz). A presença de Cd diminui o crescimento das mudas devido ao seu maior acúmulo nas raízes. A biodisponibilidade do cádmio no interior das plantas foi relacionada com a concentração e a espécie. Todas as espécies bioacumularam uma elevada concentração de cádmio nas raízes.

Esse trabalho corrobora com os nossos resultados obtidos nos ensaios, ambos em concentrações crescentes influenciam no crescimento das sementes avaliadas. No entanto, não competem comparações diretas entre os resultados obtidos e a literatura pela grande diferença de concentrações de cádmio em soluções utilizados nos dois trabalhos.

5.5.2 Teste com germinação e crescimento de sementes de *Zea mays* em extrato de solo com cádmio

Para avaliar a toxicidade do cádmio em semente de milho e correlacionar os resultados com os testes com leveduras, foi realizado um experimento com sementes de *Zea mays* (milho) para avaliar a resposta da germinação e crescimento em extrato de solo com cádmio.

Foram avaliados a germinação e crescimento das sementes em solução de cádmio. As sementes foram expostas as concentrações de cádmio: 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 35 mg L⁻¹ e 40 mg L⁻¹ (Figura 16).

Figura 16 - Fotos das sementes de milho germinadas em extrato de solo contaminado com cádmio, tratamento controle, 10; 20; 30, 35 e 40 mg L^{-1}

Como verificado neste ensaio, todas as sementes de milho tiveram resposta positiva quanto a germinação, ou seja 100% germinaram.

A partir da análise dos resultados, as sementes foram analisadas quanto ao crescimento e foi determinada a área dos brotos germinados em cm^2 usando o programa Image J. Os resultados estão expressos no gráfico na figura 17.

Figura 17 - Porcentagem de inibição de crescimento de sementes de milho em extratos de solo contaminados com cádmio

Foi verificado que na concentração de extrato de solo com cádmio 35,0 mg L⁻¹ houve cerca de 60% de inibição de crescimento.

O teste com sementes de milho, apresentou DL₅₀ de 33,9 ± 3,0 mg L⁻¹ de Cd. Este valor foi calculado a partir da equação $y = (58,72/(1 + 819,99e^{-0,25x}))$, R = 0,9953.

Este valor se mostrou bem próximo ao valor de DL₅₀ obtido para a levedura *S. cerevisiae* (Pedra) que foi de 29,8 mg L⁻¹ de Cd. Este foi obtido pelo ensaio de TTC e calculado pela equação $y = (102,71/(1 + 1458,78e^{-0,24x}))$, R = 0,9965.

Já o valor de DL₅₀ para a levedura *S. cerevisiae* (Pedra) foi de 40,3 mg L⁻¹ de Cd, quando o resultado observado foi pela medida do D.O e utilizando a equação $y = (72,59/(1 + 30951,36e^{-0,28x}))$, R = 0,9942.

Os resultados obtidos mostram uma proximidade de valores entre os da semente de milho com as leveduras. Dentre os resultados obtidos somente para a levedura o DL₅₀ quando obtido pela técnica do TTC mostra-se ainda mais próximo ao da semente do que quando obtido pela leitura de D.O.

A maior concentração para o início dos efeitos de toxicidade neste ensaio em comparação com os da semente de pepino (onde havia somente cádmio livre em solução) pode ser explicada pela presença de agentes complexantes presentes na solução de solo, onde estes podem interagir com o íon Cd²⁺ inibindo os efeitos tóxicos. Estes resultados são importantes, pois permitem avaliar a espécie química

em solução e ampliam as opções de avaliação da toxicidade, indo além das análises dos teores totais.

Tanto para os ensaios com as leveduras como nos ensaios com sementes, a concentração necessária de cádmio para inibir o crescimento foi maior quando os organismos vivos estavam na presença do extrato de solo com cádmio.

Quando os organismos vivos estavam em soluções de cádmio livre, as concentrações necessárias para causar inibição de crescimento ou morte celular foram menores. Isso porque o elemento cádmio estava livre em solução ficando mais disponível para intervir no metabolismo biológico causando assim as inibições.

Já quando foi utilizado os extratos de solo, precisou-se de uma maior concentração de cádmio para começar a haver um efeito inibitório no crescimento ou causar morte celular. Isso porque, quando o elemento cádmio está no solo este pode ser encontrado na forma disponível, trocável ou imobilizada. O que significa que o sistema presente no solo é bem mais complexo devido a interações com outros íons, formando óxidos, ou até mesmo a adsorção na matéria orgânica. Assim sendo, o elemento cádmio pode se tornar menos tóxico ou parcialmente indisponível para organismos vivos.

A comparação com os resultados obtidos pela germinação de sementes nos indicou que as leveduras podem ser utilizadas para avaliar possíveis efeitos de toxicidade e que podem ser ainda mais sensíveis para detecção. Entretanto para cada planta a ser comparada existirá uma faixa de concentração apropriada, podendo ocorrer variações.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve por objetivo utilizar leveduras como bioindicadores do cádmio no solo.

A pesquisa foi dividida em três etapas: a) seleção das leveduras não floculantes e avaliação por ensaios biológicos da inibição do crescimento de leveduras em solução de cádmio; b) Seleção de um extrator adequado ao cádmio e avaliação por ensaios biológicos da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio; c) Avaliação por ensaios biológicos, de germinação e crescimento de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em solução de cádmio e de milho (*Zea mays*) em extrato de solo com cádmio.

Os principais resultados foram:

- Foram avaliadas 18 leveduras quanto a característica de floculação. Destas 16 não flocularam e foram selecionadas.
- Estas 16 leveduras foram avaliadas, por ensaios biológicos, quanto a sensibilidade do crescimento na presença de cádmio. Como promissoras foram selecionadas três leveduras com diferentes níveis de tolerância ao elemento cádmio. São elas: a levedura *Torulopsis utilis* var. *thermophilus* (IZ214) que apresentou uma alta sensibilidade, a levedura *Candida utilis* (IZ300) que apresentou sensibilidade mediana e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Pedra) que apresentou menor sensibilidade ao elemento cádmio. Destas, duas leveduras, *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae* (Pedra) foram avaliadas em duas técnicas diferentes, leitura de D.O. em espectrofotômetro e viabilidade celular pela técnica do Trifeniltetrazólio TTC. O uso da técnica do Trifeniltetrazólio (TTC) mostrou-se mais adequada como indicador da viabilidade celular em bioensaios com leveduras porque mostrou as células metabolicamente ativas e não apenas realizou a leitura de células em suspensão (inclusive as não viáveis) como é o caso na leitura de D.O.
- Na avaliação, por ensaios biológicos, da inibição do crescimento das leveduras em extratos de solo contaminados com cádmio, foi inicialmente selecionado o extrator mais adequado para cádmio, o cloreto de cálcio (CaCl_2 0,01 mol L⁻¹). Após a escolha do extrator, foi realizado um ensaio para a avaliação do crescimento das leveduras *T. utilis* (IZ214) e *S. cerevisiae*

(Pedra) na presença de extratos de solo contaminados com diferentes concentrações de cádmio. Foi possível observar com esses resultados que a porcentagem de inibição de crescimento das leveduras não diferiu entre o controle e a maioria dos tratamentos e que na maioria das concentrações o crescimento das leveduras foi superior ao controle. Este resultado pode estar relacionado a adsorção do cádmio pela matéria orgânica no solo e outros elementos, além do fornecimento de suplementação de nutrientes. Adicionalmente, foi realizado um ensaio para comprovar essa adsorção do cádmio à matéria orgânica. Este foi realizado somente com a levedura *S.cerevisiae* (Pedra) onde ao extrato de solo obtido foi adicionado solução de cádmio livre. Através da leitura de D.O. foi observada uma taxa de inibição de 75% na concentração de 100 mg L^{-1} , e pela técnica do TTC a maior taxa de inibição de 100% que ocorreu na concentração de 44 mg L^{-1} de cádmio.

- Foram avaliados por ensaios biológicos, a germinação e crescimento de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em solução de cádmio. O resultado obtido foi que 100% das sementes germinaram e a DL_{50} calculada foi de $7,33 \text{ mg L}^{-1}$. Para fins comparativos foi calculado também a DL_{50} para as leveduras *T. utilis* (IZ214) e para a *S. cerevisiae* (Pedra) que foi de $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,86 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O valor de DL_{50} obtido no resultado com sementes de pepino foi maior em comparação com as leveduras, provavelmente devido ao fato de que parte do metal (contido na solução) pode ter ficado retido nas raízes não sendo absorvido pela plântula.
- Na avaliação por ensaio de germinação e crescimento de sementes de milho (*Zea mays*) em extrato de solo com cádmio foi calculada a DL_{50} de $33,9 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e para fins comparativos foi calculada para a levedura *S. cerevisiae* (Pedra), DL_{50} de $29,8 \text{ mg L}^{-1}$. Os resultados obtidos mostraram uma proximidade de valores entre a semente de milho e a levedura.

Ao final de todos os ensaios, foi possível concluir que quando utilizou-se apenas solução de cádmio livre os organismos foram mais sensíveis do que quando utilizou-se extrato de solo com cádmio. No entanto, ao se utilizar extratos de solos com cádmio estes se aproximaram mais da realidade dos ambientes contaminados, uma vez que estes sistemas são extremamente complexos com muitas interações ocorrendo simultaneamente e os testes que levam em consideração somente as

concentrações de cádmio livre podem na verdade estar superestimando o efeito do elemento cádmio no meio ambiente.

Estudos adicionais são necessários para comprovar os efeitos reais do cádmio no ambiente e suas interações nos organismos vivos.

Com este trabalho foi possível contribuir significativamente com novas opções de bioindicadores de ambientes contaminados e também com novas metodologias, principalmente com o uso do TTC, que pode ter diversas outras aplicações de interesse biotecnológico, colaborando assim de forma expressiva com o conhecimento para a comunidade científica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; BERTON, R.S. Análise química de solo para metais pesados. In: ALVAREZ, V.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N. F.; MELLO, J.W. V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 645-692.
- 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*. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 55-60, 2003.
- ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals**. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 2001. 867 p.
- AMORIM, E.P.; FAVARO, D.T.I.; BERBEL, G.B.B.; BRAGA, E.S. Assessment of metal and trace element concentrations in the Cananéia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. **Journal of Radioanalytical And Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 278, n. 2, p. 485-489, 2008.
- AN, J.; JEONG, S.; MOON, H. S.; JHO, E. H.; NAM, K. Prediction of Cd an Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand- based models in soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 203, p. 69-76, 2011.
- AN, Y.J. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 127, p. 21-26, 2004.
- AN, Y.J.; KIM, Y.M.; KWON, T.I.; JEONG, S.W. Combined effect of cooper, cadmium and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. **Science of the Total Enviroment**, New York, v. 36, p. 85-93, 2004.
- ANDERSEN, M.K.; RAULUND, K.; HANSEN, H. C. B.; STROBEL, B.W. Distribution and fractionation of heavy metals in pairs of arable and afforested soils in Denmark. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 491-502, 2002.
- ANDREÁ, M.M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. São Paulo: Instituto Biológico, 2008. (Instituto Biológico. Comunicado Técnico, 83). Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83. Acesso em: 17 jan. 2013.
- ANDRÉA, M.M.; PAPINI, S. Influence of soil properties on bioaccumulation of 14C-simazine in earthworms *Eisenia foetida*. **Journal of Environmental, Sciences and Health**, New York, v. 40, p. 55-58, 2005.
- ANVISA. Portaria no. 685, de 27 de agosto de 1998. Brazilian Legislation. http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm. Acesso em: 04 Mar. 2013.
- ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 117-152.

AZEVEDO, J.S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; BRAGA, E.; FAVARO, D.; IBEBIANNO, M.J. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South América, Brazil. **Ecotoxicology**, London, v. 18, p. 1001-1010, 2009.

BARROS, A.S.R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1447-1459, 1990.

BASELI, A.G. **Desenvolvimento de teste ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae***: Toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia “Produção Vegetal” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus Jaboticabal, 2008.

BEAULIEU, M. The use of risk assessment and risk management in the revitalization of brownfields in North America: a controlled opening. In: CONTAMINATED SOIL'98, 1998. Edinburgh, **Proceedings...** London: The Reserch Center Karlsruhe (FZK), Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO and Scottish Enterprise, 1998. v. 1, p. 51-59.

BENAVIDES, M.P.; SUSANA, M.G.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

BHÉRING, M.C.; SILVA, R. F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.N.F.S.; PENA, M.F. **Avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de feijão de vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo teste de tetrazólio**, UFV, Viçosa, 1996, 27 p. (Boletim Técnico).

BIEBER, A.; FRANZIUS, V.; FREIER, K. Framework for contaminated sites management in Germany. In: CONTAMINATED SOIL'98, Edinburgh, 1998. **Proceedings**. London, The Reserch Center Karlsruhe (FZK), Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO and Scottish Enterprise, 1998, v. 2, p. 1235-1236.

BONACELLA, P.H.; MAGOSSO, L.R. **A poluição das águas**. Luis Roberto. São Paulo: Moderna, 1990 (Coleção Desafios).

BONY, M.; THINES-SEMPOUX, D.; BARRE, P.; BLONDIN, B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 4929-4936, 1997.

BOUCHÉ, M.B. Strategies lombriciennes. **Ecological Bulletin**, Stockholm, v. 25, p. 122-132, 1977.

BOUZON, Z.L.; FERREIRA, E.C.; dos SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P.A.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E.C. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. **Protoplasma**, Wien, v. 249, n. 3, p. 637-650, 2012.

BRAVIN, I.C.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, p. 469-474, 2002.

BRUGGEN, A.H.C. van; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2000.

CALLISTO, M. Macroinvertebrados bentônicos. In: BOZELLI, R.L.; ESTEVES, F.A.; ROLAND, F. **Lago Batata: impacto e recuperação de um ecossistema amazônico**. IB-UFRJ/SBL. Rio de Janeiro, 2000. p. 139-152.

CALLISTO, M.; MARQUES, M.M.; BARBOSA, F.A.R. Deformities in larval *Chironomus* (Diptera Chironomidae) from the Piracicaba river, southeast, Brazil. Ver. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, Stuttgart, v. 27, p. 2699-2702, 2000.

CASTELLANOS, L.R.; HERNANDEZ, J.C.A. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science**, Nakazato, v. 3, p. 360-371, 2007.

CHENG, L.; ALEXANDER, G.V.; FRANCO, P. J. Cadmium and other heavy metals in sea-skaters (Gerridae: Halobates, Rheumatobates). **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 6, p. 33-38, 1976.

CHENG, L.; SCHULZ-BALDES, M.; HARRISON, C. S. Cadmium in oceanskaters, *Halobates sericeus* (Insecta), and in their seabird predators. **Marine Biology**, Berlin, v. 79, p. 321-324, 1984.

CHEW, I.; OBBARD, J.P.; STANFORTH, R.R. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. **Environmental Pollution**, Barking, v. 111, p. 367-375, 2001.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, Barking, v. 92, p. 1-5, 1996.

COOBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Reviews Plant Physiology**, Lancaster, v. 53, p.159-182, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB, 2004. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-s/7-manual>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.gov.br/media/files/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2012.

COONEY, J.D. Freshwater tests. In: RAND, GM (Ed.). **Aquatic toxicology: effects, environmental data, and risk assessment** 2nd ed. London: editor, 1995. 1125 p.

CUNHA, K.P.V. da; NASCIMENTO, C.W.A. do; PIMENTEL, R M.M. de; ACCIOLY, A.M.A. de; SILVA, A.J. da. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1319-1328, 2008.

CURRY, J.P. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. In: C. A. Edwards (Ed.). **Earthworm ecology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 91-113.

DARRIGRAN, G.A. Potential impact of filterfeeding invaders on temperate inland freshwater environments. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 4, p. 145-156, 2002.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cádmium tixicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 98, p. 29-36, 1997.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática-princípios e aplicações**. São Carlos: Rima: 2006. p. 153-184.

DUARTE, R.P.S.; PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), Níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 46-58, 2000.

ESSINGTON, M.E. **Soil and water chemistry: an integrative approach**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 534 p.

FAO (Food and Agriculture Organization). Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. 1983. p. 5-100. (FAO fishery circular, 464).

FERNANDES, V.O.; ESTEVES, F.A. The use of indices for evaluating the periphitic community in two kinds of substrate in Imboassica Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Biology**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 233-243, 2003.

FRANÇA NETO, J.B.; KRYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P.O. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa/cnpso, 1998. 72 p.

FRIBERG, L.; PISCATOR, M.; NORDBERG, M.B. **Cadmium in the Environment**, Ohio: C.R.C., 1971. 166 p.

GALDEAN, N.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F.A.R. Lotic Ecosystems of Serra do Cipó, southeast Brazil: water quality and a tentative classification based on the benthic macroinvertebrate community. **Journal of the Aquatic Ecosystem Health and Management**, Burlington, v. 3, p. 545-552, 2000.

GODBOLD, D.L. HUTTERMANN, A. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest dieback. **Environmental and Pollution**, Barking, v. 38, p. 509-516, 1985.

GOMES, M.A.F.; FILIZOLA, H.F. Indicadores físicos e químicos de qualidade de solo de interesse agrícola. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2006. 8 p.

GUILHERME, L.R.G.; MARCHI, G. Elemento-traço: os metais pesados no solo. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 20-21, 2005.

GUILHERME, L.R.G.; MARQUES, J.J.; PIERANGELI, M.A.P.; ZULIANI, D.Q.; CAMPOS, M.L.; MARCHI, G. Elementos traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em ciências do solo**, Viçosa, v. 4, p. 345-390, 2005.

GUIMARÃES, T.M. **Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HARRISON, R.M.; LAXEN, D.P.H.; WILSON, S.J. Chemical associations of lead, cádmium, cooper and zinc in street dusts and roadside soils. **Environmental Science & Technology**, Iowa, v. 15, p. 1378-1383, 1981.

HAS-SCHÖN, E.; BOGUT, I.; STRELEC, I. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 50, p. 545-551, 2006.

HC (Health Canada). (2007). Canadian standards for various chemical contaminants in foods, Ottawa, Ontario. Disponível em: <http://laws.justice.gc.ca/PDF/Readability/CRC870.pdf>. Acesso em: 03 Mar. 2011.

HINTON, J.; VEIGA, M.M. The influence of organic acids on mercury bioavailability: insight from an earthworm assessment protocol. **Environmental Bioindicators**, London, v. 3, p. 47-67, 2008.

HUFF, J.; LUNN, R.M.; WAALKES, M.P.; TOMATIS, L.; INFANTE, P.F. Cadmium induced cancers in animals and humans. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, Lodz, v. 13, p. 202-212, 2007.

JARDINE, T.D.; AI, T.A.; MacQUARRIE, K.T.B.; RITCHIE, C.D.; ARP, P.A.; MAPRANI, A.; CUNJAK, R.A. Water striders (family Gerridae): Mercury sentinels in small freshwater ecosystems. **Environmental Pollution**, Barking, v. 134, p. 165-171, 2005.

JARUP, L.; KESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 238, p. 201-208, 2009.

JENTSCHKE, G.; WINTER, S.; GODBOLD, D.L. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. **Tree Physiology**, Oxford, v. 19, p. 23-30, 1999.

JIANG, R. F.; MA, D.Y.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, p. 805-814, 2005.

JIN, T.; LU, J.; NORDBERG, M. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 19, p. 529-535, 1998.

JORDAO, L.; PERRONE, M.; COSTEIRA, J.; SANTOS-VICTOR, J. Active face and feature tracking. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON IMAGE ANALYSIS AND PROCESSING, 10, 1999. Edinburgh **Proceedings**...London, 1999. p. 572-577.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soil and Plants**. 3rd ed, Boca Raton: CRC press, 2001. 49 p.

KASUYA, M. Recent epidemiological studies on itai-itai disease as a chronic cadmium poisoning in Japan. **Water Science Technology**, Oxford, v. 2, p. 147-154, 2000.

KAZANTIS, G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 17, p. 493-498, 2004.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W B. **Testes Ecotoxicológicos**: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KÜPPER, H.; PARAMESWARAN, A.; LEITENMAIER, B.; TRTÍLEK, M.; SETLÍK, I. Cadmium- induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Amsterdam, v. 175, p. 655-674, 2007.

KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. India: Springer, 2004. p. 146-181.

LAGREGA, M.D.; BUCKINGHAM, P.L.; EVANS, J.C. **Hazardous waste management**. New York: McGraw-Hill, 1994. 1232 p.

LAVELLE, P.; DANGERFIELD, M.; FRAGOSO, C.; ESCHENBRENNER, V.; LOPEZHERNANDEZ, D.; PASHANASI, B.; BRUSSAARD, L. The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility. In: SWIFT, M.J.; WOOMER, P. (Ed.). **Tropical Soil Biology and Fertility**. New York: John Wiley, 1994. p. 137-169.

LEE, I.S.; KIM, O.K.; CHANG, Y.Y.; BAE, B.; KIM, H.H.; BAEK, K.H. Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 406-411, 2002.

LIU, X.; CHENGXIAO, H.; ZHANG, S. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. **Environment International**, Elmsford, v. 31, p. 874-879, 2005.

LOYOLA, R.G.N. **Contribuição ao Estudo dos macroinvertebrados Bentônicos em Afluentes da Margem Esquerda do Reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil**. 1994. 300 p. Tese (Doutorado em Zoologia) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1994.

LOWE, R.L.; PAN, Y. Benthic Algal Communities as Biological Monitors. In: STEVENSON, R.J.; BOTHWELL, M.L.; LOWE, R.L. (Ed.). **Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems**. New York: Academic Press, 1996. p. 31-56.

MA, J.F.; UENO, D.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Subcellular localization of cadmium and Zn in the leaves of cadmium-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 731-736, 2005.

MAITANI, T.; KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T. The composition of metals bound to class III thiolthionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 110, p. 1145-1150, 1996.

MAFF Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of wastes at sea, 1993. Lowestoft: Directorate of Fisheries Research, 1995. (Aquatic Environment Monitoring Report, 44.).

MANSILLA-RIVERA, I.; RODRÍGUEZ-SIERRA, C. J. Metal levels in fish captured in Puerto Rico and estimation of risk from fish consumption. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p. 132-144, 2011.

MATHEWS, R.S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 18, p. 919-922, 1995.

MATOS, A.T.; FONTES, M.P.F.; JORDÃO, C.P.; COSTA, L.M. Mobilidade e formas de retenção de metais pesados em Latossolo Vermelho Amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 20, p. 379-386, 1996.

McLAREN, R.G.; CRAWFORD, D.V. Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 172-181, 1973.

MELO, V.F. de; ALLEONI, L.R.F. **Química e Mineralogia do Solo**. Viçosa, 2009. 685 p.

MERRINGTON, G.; MILLER, D.; MCLAUGHLIN, M.J.; KELLER, M.A. Trophic barriers to fertilizer Cd bioaccumulation through the food chain: a case study using a plant-insect predator pathway. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, p. 151-156, 2001.

MIDIO, J.M., NATARANJA, K.A. Biosorption of metals using nonliving biomass. **Minerals and Metallurgical Processing**, Englewood, v.12, p. 189-195, 1995.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A. The effect of emissions of fertilizer production on the environment contamination by cadmium and arsenic in southern Brazil. **Environmental Pollution**, Barking, v. 143, p. 335-340, 2006.

NAGAY, S.; YANAGISHIMA, N.; NAGAI, H. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. **Bacteriology Review**, New York, v. 25, p. 404-426, 1961.

NAHMANI, J.; HODSON, M.E.; BLACK, S. A Review of Studies Performed to Assess Metal Uptake by Earthworms. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, p. 402-424, 2007.

NELSON, W.L.; MEHLICH, A.; WINTERS, E. The development, evaluation and use of soil test for phosphorus availability. **Agronomy**, Madison, v. 4, p. 153-188, 1953.

NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. Fundamentals of Ecotoxicology. 2nd ed. New York: Lewis Publishers, 2002. 541 p.

NICHOLSON, R.; SMYTH, D. Desk top review. In: CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT, WATERLOO CENTRE FOR GROUND WATER RESEARCH. **SUBSURFACE ASSESSMENT HANDBOOK FOR CONTAMINATED SITES**. Winnipeg, 1994. section 2, p. 21-43.

NOCITO, F.F.; PIROVANO, L.; COCUCCI, M.; SACCHI, G.A. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 1872-1879, 2002.

NUMMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E. Waterstriders (Gerridae: Heteroptera) as indicators of heavy metal pollution. **Entomologica Fennica**, Turku, v. 8, p. 185-191, 1998.

NUMELIN, M.; LODENIUS, M.; TULISALO, E.; HIRVONEN, H.; ALANKO, T. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, p. 339-347, 2006.

NUNES, B.S.; CARVALHO, F.D.; GUILHERMINO, L.M.; STAPPEN, G.V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, Barking, v. 144, p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, A.A.C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

OLIVEIRA, R.P.S. de; BASSO, L.C.; JUNIOR, A.P.; PENNA, T.C.V.; BORGHI, M.D.; CONVERTI, A. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Cadmium and Nickel Stress: The Use of the Sugar Cane Vinasse as a Potential Mitigator. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 145, p. 71-80, 2012.

OLIVEIRA, R.P.S. de; TORRES, B.R.; ZILLI, M.; MARQUES, D.A.V.; BASSO, L.C.; CONVERTI, A. Use of Sugar Cane Vinasse to Mitigate Aluminum Toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 57, p. 488-494, 2009.

OLIVIER, S.; SILVA, V.L. da; SOBRINHO, M.A. da. Resíduos industriais ricos em metais pesados e implicações ambientais associadas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, São Paulo, n. 9, p. 4-8, 2008.

OOST, R.V.D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, p. 57-149, 2003.

PAGE, A.L.; MILLER, P.H.; KEENEY, D.F. **Methods of soil analysis**. 2nd ed. Madison: Soils Science Society of America, 1982. 1159 p.

PELCZAR, J.R.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. v. 1.

PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 313 p.

POLLARD, S.J.T.; HERBERT, S.M. Contaminated land regulation in the UK: the role of the Environment Agency and Scottish Environment Protection Agency. In: CONTAMINATED SOIL '98, 1998. Edinburgh. **Proceedings...** London: The Research Center Karlsruhe (FZK), Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO and Scottish Enterprise, 1998. v. 1, p. 33-42.

PROZIALECK, W.C.; VAIDYA, V.S.; LIU, J.; WAALKES, M.P.; EDWARDS, J.R.; LAMAR, P.C.; BERNARD, A.M.; DUMONT, X.; BONVENTRE, J.V. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. **Kidney International**, New York, v. 72, p. 985-993, 2007.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application**. London: Hemisphere Publishing, 1985. p. 1-28.

RAURET, G. Extraction procedures for the determination of heavy metals in Contaminated soil and sediment. **Talanta**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 449-455, 1998.

REBER, H.H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative ability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility Soils**, Firenze, v. 13, p. 181-186, 1992.

RINGO, A.P.; CORDOVA, F.M.; OLIVEIRA, C.S.; POSSER, T.; COSTA, A.P.; SILVA, I.G.; SANTOS, D.A.; ROSSI, F.M.; ROCHA, J.B.; LEAL, R.B. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 29, p. 727-734, 2004.

ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 1-9.

SAITO, K. Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 2443-2450, 2004.

SANTOS, W.N.L. dos; COSTA, J.L.O.; ARAÚJO, R.G.O.; JESUS, D.J.; COSTA, A.C.S. Na on- line pre- concentration system for determination of cadmium in drinking water using FAAS. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 137, p. 1357-1361, 2006.

SATARUG, S.; BAKER, J.R.; REILLY, P.E.; MOORE, M.R; WILLIAMS, D.J. Cadmium levels in the lung, liver, kidney córtex, and urine samples from australians without occupational exposure to metals. **Archives of Environmental Health**, Washington, v. 57, p. 69-77, 2002.

SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: BING, W.E. (Ed). **Terrestrial behaviour of pesticides**. New York: Springer Verlag, 1992. p. 25-75.

SCHULZ-BALDES, M.; CHENG, L. Uptake and loss of radioactive cadmium by the sea-skater *Halobates robustus* (Heteroptera: Gerridae). **Marine Biology**, Berlin, v. 52, p. 253-258, 1979.

SCHULZ-BALDES, M. The sea-skater *Halobates micans*: an open ocean bioindicator for cadmium distribution in Atlantic surface waters. **Marine Biology**, Berlin, v. 102, p. 211-215, 1989.

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M.N.V. **Heavy metal stress in plants**: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. India: Springer, 2004. p. 84-126.

SKORDAS, K.; KELEPERTSIS, A. Soil contamination by toxic metals in the cultivated region of Agia, Thessaly, Greece. Identification of sources of contamination. **Environmental Geology**, Heidelberg, v. 48, n. 4/5, p. 615-624, 2005.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SPARKS, D.L. **Environmental soil chemistry**. San Diego; Academic Press, 1995. 267 p.

SPERANSKAYA, O. The problem of environmental contamination by cadmium, lead and Mercury in Russia and Ukraine: a survey. In: INTERGOVERNMENTAL FORUM ON CHEMICAL SAFETY. Global Partnerships for Chemical Safety, 2008, Dakar. **Contributing to the 2020 goal**. Moscow: ECO-ACCORD, 2008. Forum VI. Disponível em: http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum6/eco_accord_en.pdf. Acesso em: 04 abr. 2012.

SILVEIRA, M.L.; ALLEONI, L.R.F.; O' CONNOR, G.A.; CHANG, A.C. Heavy metal sequential extraction methods: a modification for tropical soils. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 46, p. 1929-1938, 2006.

STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 5, p. 441-445, 1989.

SUMMERS, A.O.; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annual of Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 32, p. 617-672, 1978.

TANDY, S.; BOSSART, K.; MUELLER, R.; RITSCHER, J.; HAUSER, L. SCHULIN, R.; NOWACK, B. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 38, p. 937-944, 2004.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2002.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 25, p. 304-315, 2008.

TISIRIDS, V.; PETALA, M.; SAMARAS, P.; HADJISPYROU, S.; SAKELLAROPOULOS, G.; KUNGOLOS, A. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 63, p. 158-167, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 8th ed. Berkeley: Artmed, 2008. 920 p.

TUNDISI, J.G. **Água no século XXI: Enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima, 2003. 248 p.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM - UNEP. Ridding the world of POPs: A guide to the Stockholm convention on persistent organic pollutants. Geneva, 2005. 18 p.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

VALITTUTO, R.S.; SELLA, S.M.; SILVA-FILHO, E.V.; PEREIRA, R.G.; MIEKELEY, N. Accumulation of metals in macrophytes from water reservoirs of a power supply plant. **Water Air Soil Pollut**, Rio de Janeiro, v. 178, p. 89-102, 2006.

VAMPRÉ, T.M.; FUCCILLO, R.; ANDRÉA, M.M.D. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 59-66, 2010.

VAN DYCK, E. The contaminated sites policy in Flanders (Belgium). In: VAN DYCK, E. CONTAMINATED SOIL'95, 1995. Maastricht, **Proceedings...** Dordrecht: The Research Center Karlsruhe (FZK), Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO, 1995. v. 1, p. 39-48.

VIJVER, M.G.; VINK, J. P. M.; MIERMANS, C.J.H.; GESTEL, C.A.M. van. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 35, p. 125-132, 2003.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: VOLESKY, B. (Ed). **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 390 p.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. Local: Taylor e Francis, 2001. 344 p.

WARD, D.; HOLMES, N.; JOSÉ, P. **The New Rivers & Wildlife Handbook**. Bedfordshire: RSPP, NRA ; The Wildlife Trusts, 1995. 426 p.

WAYKAR, B; DESHMUK, H. Evalution of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 88, p. 48-53, 2012.

WETZEL, R.G. Periphyton of freshwater ecosystems. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1983. 346p.

YANG, X.; SONG, Y.; ACKLAND, M. L.; LIU, Y; CAO, X. Biochemical responses of earthworm *Eisenia fetida* exposed to cadmium-contaminated soil with long duration. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 89, p. 1148-1153, 2012.

ZAMONER, M. **Biologia Ambiental**. Curitiba: Prottexto, 2007. 432 p.