

**"Avaliação da capacidade de leveduras isoladas da
fermentação da cachaça para biorremediação de cádmio"**

Frederico Haddad Ribeiro

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
**Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia das
Radiações, Minerais e Materiais**

Avaliação da capacidade de leveduras isoladas da
fermentação da cachaça para biorremediação de cádmio

Frederico Haddad Ribeiro

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, com requisito
parcial à obtenção do Grau de Mestre

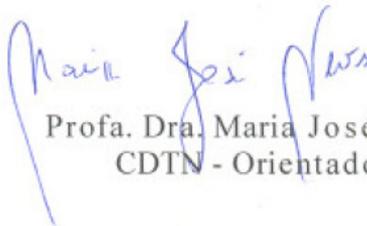
Área de concentração: Ciências e Tecnologia das Radiações

Orientadora: Dra. Maria José Neves

Belo Horizonte
2009

A presente dissertação de mestrado, intitulada “Avaliação da capacidade de leveduras isoladas da fermentação da cachaça para biorremediação de cádmio”, de autoria de **Frederico Haddad Ribeiro**, foi defendida e aprovada em 12 de maio de 2009, pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 12 de maio de 2009.


Profa. Dra. Maria José Neves
CDTN - Orientadora


Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola
UFV


Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos
UFMG


Profa. Dra. Ana Cláudia Queiroz Ladeira
CDTN

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

*À minha querida mãe Margareth e
minha irmã Paula, pelo exemplo de luta e
por representarem o que há de melhor nas
mulheres; a vocês, que sempre
acompanharam meu trabalho, apoiando e
incentivando minha caminhada.*

Dedico-lhes

*À minha orientadora, Dra. Maria José
Neves, pela confiança depositada e pela
oportunidade na VIDA.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por me dar a possibilidade de estudar a vida e despertar o desejo de buscar o conhecimento sem limites. Por assegurar minha caminhada, muitas vezes incerta, na luta em busca do desenvolvimento científico. Pela realização de um *SONHO*...

À *Dra. Maria José Neves* por acreditar no meu potencial, pelo acolhimento, ensinamentos, pela disponibilidade e orientação;

À minha *mãe*, pelo exemplo de vida, pelos valores sólidos, por tudo que eu sou;

A meus irmãos *Paula e Felipe*, meus cunhados *Junior e Renata*, e meu sobrinho *Pp*, pela alegria constante;

Às minhas avós pelo exemplo de sabedoria;

Ao meu *pai*, por sua trajetória acadêmica que sempre me incentivou;

Aos ídolos, *Charles Robert Darwin, Alfred Russel Wallace, Louis Pauster, Gregor Johann Mendel, Carl von Linné, Albert Einstein, Ernesto Guevara de la Serna, Chico Buarque de Holanda, Gil Brother Away*, pelos exemplos, científicos, ideológicos, poéticos, de perseverança e luta;

Aos verdadeiros amigos(as), *Rapha, Li, Manu, Vovô Caótico, Peixão, Yuri, Reggae, Gusta, Rodolfão, Tiagão, Laila, Paty Lora*, pela força e carinho;

Ao *Cadinho, Nogueira* e à *Du*, pela torcida contínua;

À *Lu*, minha grande amiga de todas as horas, que me ensinou toda a prática de laboratório, estando sempre disponível para meus questionamentos profissionais e pessoais. À *Karine, Bárbara, Larissa, Izabela, Dani, e Luiza Porto*, queridas estagiárias e do meu grupo;

Aos colegas da Radiobiologia, *Marcella, Priscilla Pujatti, Baiano, Ju Soprani, Ju Lage, Rômulo, Thaissa, Pryscila Rodrigues, Luiza, Marina Bicalho, Fabrício, Lucilene, Tetê, Nino, Marina Demicheli, Márcia, Camila, Rodrigo e Flaviano*, pelo companheirismo e luta diária;

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela ajuda e caminhada;

Aos pesquisadores, *Antero Silva Ribeiro e Raquel Gouveia dos Santos*, pelo conhecimento repassado;

A todos os professores da CPG CDTN/CNEN, pelos ensinamentos;

Ao *Luis Garcia* da Microanálise do ICEX/UFMG, pela atenção dispensada nas análises de EDS;

Ao *Zacarias, Patrícia, Geraldinho, Oliene e Dovenir*, pelos preciosos serviços prestados;

À equipe do reator (*Fausto Moretti Junior, Amir Zacarias Mesquita, Paulo Fernandes de Oliveira, Luiz Otávio I. Sette Câmara, Wagner Souza*), pela irradiação das amostras;

À *Maria Ângela de Barros Correia Menezes* e *Ana Claudia Ladeira*, pelos valorosos conselhos e sugestões dispensados na pré-defesa, que contribuíram muito no desenvolvimento deste trabalho;

À *Maria Ângela de Barros Correia Menezes* e *Ângela Maria Amaral* do laboratório de Ativação Neutrônica, pelo profissionalismo nas análises das amostras;

Ao *Dr. Carlos Augusto Rosa*, pelas linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho;

Ao *Adair* e *Noil*, pela grande ajuda na destinação dos rejeitos de cádmio;

Às bibliotecárias, *Lenira*, *Nívea* e *Virgínia*, pela atenção e ajuda valiosa;

Aos funcionários da secretária da pós-graduação *Roseli*, *Cerisa* e *Fulgêncio*;

A todas as pessoas do CDTN que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As atividades industriais lançam anualmente grandes quantidades de metais pesados no meio ambiente. Metais essenciais como ferro, selênio, sódio e potássio são absolutamente necessários para os sistemas biológicos em suas atividades bioquímicas e fisiológicas. Entretanto, metais como cádmio, mercúrio e arsênico, chamados de não-essenciais, não exercem nenhuma função biológica e são tóxicos até mesmo em concentrações-traço. Os métodos físico-químicos convencionais de tratamento de efluentes quando empregados em soluções diluídas cuja concentração de metal é menor que 100 mg.L^{-1} apresentam desvantagens como remoção incompleta do metal, reagentes, equipamentos caros, altos gastos de energia e produção de rejeitos secundários tóxicos. Frente a este fato, a biorremediação representa uma alternativa viável, podendo ser empregada nos mais diversos ambientes. O processo de biorremediação só se justifica se a biomassa utilizada for de fácil obtenção e de baixo custo, o que ocorre com as leveduras isoladas da fermentação da cachaça que foram utilizadas neste trabalho. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol e único produtor de cachaça, bebida típica do país. *Saccharomyces cerevisiae* é a principal espécie utilizada na fermentação da cana de açúcar, sendo gerada em grandes quantidades e comercializada a baixo custo. Neste trabalho foram utilizadas 10 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de grandes alambiques mineiros, sendo testadas quanto à capacidade de incorporação de cádmio e às alterações bioquímicas decorrentes desta incorporação. Tanto células viáveis quanto não-viáveis foram testadas e comparadas quanto à remoção do metal, assim como células pré-tratadas com selênio, um metal essencial para o metabolismo de enzimas. As leveduras de alambiques foram mais eficientes na captação de cádmio quando comparadas à linhagem laboratorial W303-WT. Todas as linhagens foram capazes de incorporar cádmio tanto por bioacumulação como por biossorção, sendo que as linhagens UFMG-A1007 e UFMG-A1011 quando vivas foram as mais eficazes na captação do metal. Determinou-se o efluxo de íon potássio durante o influxo de cádmio. A presença do metal na superfície celular foi demonstrada pela técnica de EDS, comprovando que o cádmio se liga a componentes presentes na parede celular de leveduras. O crescimento celular foi avaliado em meio de cultura líquido adicionado de cádmio. Observou-se que todas as linhagens da fermentação foram capazes de crescer em presença de cádmio, o que não ocorreu com a linhagem de comparação (laboratorial). A tolerância ao cádmio foi testada através do crescimento das linhagens em meio sólido suplementado com 100 mg.L^{-1} ($0,5 \text{ mM}$) de CdCl_2 . Os resultados mostram que o desenvolvimento da linhagem W303-WT foi fortemente inibido em todas as concentrações o que não ocorreu com as outras leveduras. Os lipídeos peroxidados foram determinados como forma de demonstrar os danos causados às membranas pela exposição ao cádmio. As leveduras da fermentação apresentaram menores danos aos lipídios, mostrando serem mais resistentes aos efeitos do cádmio. A determinação dos resíduos sulfidrílicos totais indicou que a presença do metal no meio intracelular deve estimular os mecanismos de defesa frente ao estresse ocasionado pelo cádmio. A capacidade “scavenging” de cada extrato bruto das leveduras foi analisada, sugerindo que a resistência celular das linhagens não está relacionada diretamente com o conteúdo antioxidante das mesmas. Estes resultados comprovam que as leveduras isoladas da fermentação da cachaça são mais eficientes na captação de cádmio e são mais resistentes aos efeitos da incorporação do metal, quando comparadas à linhagem laboratorial.

ABSTRACT

The industrial activities annually discharging large quantities of heavy metals in the environment. Essential metals as iron, selenium, sodium, and potassium are absolutely necessary for biological systems in their biochemical and physiological activities. However, metals as cadmium, mercury, and arsenic called non-essential, not is any biological function and are toxic even at trace concentrations. Physico-chemical conventional methods of treatment of the effluent when employed in diluted solutions whose concentration of metal is lower than 100 mg.L^{-1} , have disadvantages as an incomplete removal of the metal, reagents, expensive equipments, high energy costs and production of secondary toxic waste. Bioremediation represents an appropriate alternative which can be employed in different environments. Bioremediation process is justified only if the biomass used is easy to obtain and low cost, which occurs with isolated yeasts from the “cachaça” fermentation that were used in this work. Brazil is the biggest world producer of ethanol alcohol and the only one producer of “cachaça,” drink typical of the country. *Saccharomyces cerevisiae* is the main species used for the fermentation of the sugar cane, which is generated in big quantities and commercialized at low cost. In this work, 10 strains of *S. cerevisiae* isolated from big “mineiros” stills and tested in relation to their capacity of incorporating cadmium and the biochemical change from cadmium incorporation. Viable cells and non-viable were tested and compared in removal of metal as well as cells pre-treated with selenium, a essential metal for the metabolism of enzymes. Yeasts from fermentation were more efficient in the uptake of cadmium as compared to laboratory strain W303-WT. All strains were able to incorporate cadmium as by bioaccumulation as by biosorption, considering that UFMG-A1007 and UFMG-A1011 strains, when alive were, more effective than in uptake of the metal. During the uptake of cadmium was determined the efflux of ion potassium. The presence of metal on cellular surface was demonstrated by the EDS technique showed that cadmium binds to components in cellular walls of the yeasts. Cellular growing was determined by curves growth with crescent concentrations of cadmium in liquid medium. It was observed that all strains of the fermentation were able to grow in the presence of cadmium what did not happen with the comparison strain (laboratorial). The tolerance of cadmium was tested through cellular growing in solid medium supplemented with 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) of CdCl_2 . The results show that increasing of strain W303-WT was strongly inhibited in all dilutions which did not occur with other yeast. The peroxidation of lipids was determined as a way to show damages caused to membranes by exposure to cadmium. Yeasts from the “cachaça” fermentation presented less damage to lipids showing to be more resistant to the effects of cadmium. The determination of total sufhydryl residues indicated that the presence of the metal in the intracellular environment to stimulate the defense mechanisms against the stress caused by cadmium. The scavenging capacity of each brut extract of yeasts was analyzed, suggesting that cellular resistance of strains is not directly related to antioxidant content of themselves. These results demonstrate that the yeasts isolated from the fermentation of “cachaça” are more efficient in uptake of cadmium and are more resistant to effects of metal incorporation when compared to laboratorial strain.

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 01. Etapas para definição e implantação de um processo de biorremediação.....	6
FIGURA 02. Grupos funcionais e classe de compostos orgânicos presentes em fungos.....	11
FIGURA 03. Composição e estrutura da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
FIGURA 04. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em processo de divisão por brotamento..	13
FIGURA 05. Fase de crescimento de uma levedura em meio completo.....	14
FIGURA 06. Modelo de mecanismo de destoxificação de cádmio em <i>S. cerevisiae</i>	18
FIGURA 07. Efeitos pleiotrópicos da indução a toxicidade ao cádmio e funções celulares envolvida na resistência ao cádmio.....	19
FIGURA 08. Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria, a partir da redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) até a formação de água (H ₂ O).....	24
FIGURA 09. Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo.....	25
FIGURA 10. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas nesse trabalho.....	32
FIGURA 11. Determinação de cádmio em células de <i>S. cerevisiae</i> W303-WT, controle e expostas a 100 mg.L ⁻¹ (0,5 mM) de CdCl ₂	44
FIGURA 12. Determinação de cádmio incorporado por células viáveis e não viáveis no período de 24 horas. Bioacumulação>Biossorção (A), Biossorção>Bioacumulação (B) e Bioacumulação=Biossorção (C), *P<0,05.....	47
FIGURA 13. Intensa coloração vermelha da cultura após incorporação de selênio. Culturas tratadas com selenito de sódio.....	50

FIGURA 14. Determinação da bio sorção de cádmio após bioacumulação de selênio, * $P < 0,05$	51
FIGURA 15. Determinação de cádmio na superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> W303-WT. Controle (A) e 100 mg.L^{-1} de CdCl_2 (B). Foram analisadas áreas de $50 \times 50 \text{ }\mu\text{m}$ em todas as amostras.....	56
FIGURA 16. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens W303-WT (A), UFMG-A829 (B) e UFMG-A905 (C).....	59
FIGURA 17. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens UFMG-A1003 (D), UFMG-A1007 (E) e UFMG-A1011 (F).....	60
FIGURA 18. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens UFMG-A1386 (G), UFMG-A2097 (H) e UFMG-A2255 (I).....	61
FIGURA 19. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens, UFMG-A2382 (J) e UFMG-A2464 (K).....	62
FIGURA 20. Determinação da sobrevivência celular em meio sólido. Coluna da esquerda, as células cresceram na ausência de cádmio. Na coluna da direita as células foram exposta a concentração de 100 mg.L^{-1} ($0,5 \text{ mM}$) de cloreto de cádmio.....	63
FIGURA 21. Determinação da bio sorção de cádmio por células de <i>S. cerevisiae</i> W303-WT intactas e pré-tatadas com NaOH 5%.....	72

LISTA DE TABELAS**Páginas**

TABELA 01. Procedência das leveduras utilizadas nesse estudo.....	31
TABELA 02. Incorporação de cádmio por bioacumulação durante 24 horas de exposição ao metal.....	45
TABELA 03. Incorporação de cádmio por biossorção durante 24 horas de exposição ao metal.....	46
TABELA 04. Quantidade de potássio em células controle e tratadas com 100 mg.L ⁻¹ (0,5 mM) de cloreto de cádmio por 24 horas.....	54
TABELA 05. Determinação dos níveis de peroxidação de lipídeos.....	66
TABELA 06. Determinação dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais.....	68
TABELA 07. Determinação do status antioxidante total utilizando o radical DPPH [•]	70

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
Cd²⁺	Íon cádmio
CdCl₂	Cloreto de cádmio
Cd(GS)₂	Complexo bis(glutationato) de cádmio
CdSO₄	Sulfato de cádmio
Cd(NO₃)₂	Nitrato de cádmio
g	Grama
Glr	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
Gsh1	α-glutamylcisteína sintase
Gsh2	Cistenilglicina dipeptidase
GSSG	Glutathione oxidada
H₂O	Molécula da água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
K⁺	Íon potássio
kb	Quilobase
Kg	Quilograma
kJ	Quilojoule
mg	Miligrama
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
M	Molar
Na₂SeO₃	Selenito de sódio
nth1Δ	Células deficientes de trealase neutra
O₂	Oxigênio molecular
O₂⁻	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxil
ppm	Partes por milhão
ppb	Partes por bilhão

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BER	Reparo por excisão de base
BSA	Soro albumina bovina
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH[•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DO	Densidade óptica
DTNB	5-5´ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)
EDS	Espectrometria por dispersão de energia (Energy Dispersive Spectrometer)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GYMP	Meio contendo extrato de levedura, glicose, fosfato de sódio e agar
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ICEX	Instituto de Ciências Exatas
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
MDA	Malondialdeído
MMR	Mismatch repair
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (Reactive Nitrogen Species)
rpm	Rotações por minuto
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid reagent species)
TCA	Ácido tricloracético
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
YPG	Meio contendo peptona, extrato de levedura e glicose

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Biorremediação.....	2
1.2. Biossorção	7
1.3. O uso da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	12
1.4. Cádmio	15
1.5. A produção de cachaça	20
1.6. Estresse Oxidativo	22
1.6.1. Radical superóxido	26
1.6.2. Radical hidroperoxila	26
1.6.3. Radical hidroxila	26
1.6.4. Peróxido de hidrogênio.....	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVO	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Linhagens de leveduras	31
4.2. Manutenção das leveduras no laboratório	33
4.3. Meio de cultura.....	33
4.4. Determinação de cádmio incorporado por células de <i>S. cerevisiae</i>	33
4.5. Preparação das amostras para determinação do cádmio incorporado	34
4.5.1 Incorporação de cádmio por células viáveis.....	34

4.5.2 Incorporação de cádmio por células não-viáveis (mortas)	35
4.5.3. Incorporação de cádmio após o enriquecimento da célula com selênio.....	35
4.6. Preparação das amostras para ativação neutrônica.....	35
4.7. Determinação da biossorção de cádmio por células de <i>S. cerevisiae</i>	36
4.8. Curva de crescimento	36
4.9. Tolerância ao cádmio.....	36
4.10. Preparo das amostras para análise do estresse por cloreto de cádmio.....	37
4.11. Obtenção de extratos celulares	37
4.12. Dosagem de proteínas.....	37
4.13. Determinação de cádmio na superfície celular.....	38
4.14. Peroxidação de lipídeos	38
4.15. Resíduos Sulfidrílicos Totais.....	39
4.16. Determinação do status antioxidante total pelo radical DPPH [•]	39
4.17. Descarte de Rejeitos	40
4.18. Análise Estatística	40
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	41
5.1. Determinação da incorporado de cádmio por células viáveis e não viáveis de <i>S. cerevisiae</i>	41
5.2. Determinação de cádmio incorporado após tratamento com selênio	48
5.3. Determinação do efluxo de íons potássio após incorporação de cádmio	52
5.4. Determinação de cádmio na superfície celular.....	55
5.5. Curva de crescimento e tolerância ao cádmio	57
5.6. Determinação da peroxidação de lipídeos	64
5.7. Resíduos sulfidrílicos totais.....	67
5.8. Determinação do status antioxidante total das linhagens pelo radical DPPH [•]	69
5.9. Determinação da biossorção de cádmio por células tratadas com hidróxido de sódio..	71
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

Os metais fazem parte, como componentes integrantes, tanto do meio ambiente como dos seres vivos. O crescimento industrial decorrente do desenvolvimento tecnológico após a Segunda Guerra Mundial foi de grande importância para a humanidade, porém, contribuiu para a poluição ambiental, pois foi o responsável pela introdução crescente de diversos metais pesados no ambiente. Desta forma, aumentou o interesse dos pesquisadores pelo estudo das interações desses metais com o meio ambiente (ALBERTINI *et al.*, 2001).

O problema da contaminação por metais pesados, alcança hoje dimensões mundiais, sendo observado tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A ausência de controle de disposição dos rejeitos contaminados por metais pesados alterou o solo, a água e o ar, trazendo como consequência a contaminação dos sistemas aquáticos, continentais e marinhos (ALBERTINI *et al.*, 2001).

Dentre todas as espécies metálicas, o mercúrio, o chumbo e o cádmio estão em evidência. O cádmio é considerado um provável elemento carcinogênico em humanos. A grande diferença dos metais pesados em relação a outros agentes tóxicos é que eles não são sintetizados e nem destruídos pelos organismos (ADAMIS *et al.*, 2003).

A presença de metais nos ecossistemas, dependendo da concentração e da forma química dos mesmos, afeta todas as formas de vida. Os sistemas biológicos necessitam de vários metais que são considerados essenciais para a manutenção do metabolismo, tais como ferro, zinco e cobre. Estes metais são necessários em baixas concentrações estritamente controladas; acima destes níveis, mesmo os metais essenciais podem acarretar diversos danos aos organismos. (VOLESKY *et al.*, 1990b).

A contaminação de solos, lençóis de águas, sedimentos, águas de superfície e ar, com elementos tóxicos, é um dos maiores problemas enfrentados hoje no mundo industrializado. A necessidade de remediação do meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias, que buscam uma maior eficácia, com redução de custos. Vários tratamentos têm sido testados, entre eles a biorremediação, na tentativa de substituir os métodos convencionais (BOOPATHY, 2000).

1.1. Biorremediação

Conforme Borém e Giúdice (2008), biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir (remediar) a concentração de poluentes no ambiente.

Biorremediação é o uso de microrganismos ou processos microbiológicos para capturar contaminantes ambientais, representando uma nova alternativa de remediação. Esta técnica tem numerosas aplicações, incluindo a limpeza de lençóis de água, solos, lagos e rios poluídos (BOOPATHY, 2000).

Segundo Natural and Accelerated Bioremediation Research (NABIR) (2003), órgão do U.S. Department of Energy (DOE), a biorremediação é uma tecnologia que pode ser usada para reduzir, eliminar, conter ou transformar contaminantes em compostos inócuos, presentes no solo, sedimento, água ou ar.

Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica como alternativa viável para o tratamento de problemas de contaminação em vários tipos de ambientes - incluindo águas superficiais e subterrâneas e solos - por resíduos e efluentes industriais. Esta nova postura científico-tecnológica, assumida nas últimas décadas pela comunidade científica, se reflete no mercado mundial da biorremediação, que tem se mostrado crescente. Nos dias atuais, o maior mercado é o norte-americano, o qual responde por 35 a 40% do mercado global, em que mais de 95% dos processos de biorremediação são empregados para descontaminação de solo e águas subterrâneas. Embora outras tecnologias não-biológicas sejam também utilizadas para descontaminar ambientes poluídos, a biorremediação é a alternativa ecologicamente mais correta e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas de difícil degradação e metais tóxicos (BORÉM & GIÚDICE, 2008).

Como tecnologia, não se pode dizer que seja uma novidade, pois é usada há séculos. No entanto, o termo biorremediação somente apareceu na literatura científica em 1987 (NATURAL AND ACCELERATED BIOREMEDIATION RESEARCH, 2003).

Os microrganismos e, em menor extensão, as plantas podem transformar ou degradar vários tipos de contaminantes orgânicos. Ambientes contaminados com metais pesados têm recebido uma grande atenção, principalmente, pelo fato de que os contaminantes podem ser transferidos por toda cadeia alimentar, acumulando-se nos sistemas biológicos (NATURAL AND ACCELERATED BIOREMEDIATION RESEARCH, 2003).

As legislações ambientais exigem maior cuidado no manejo dos resíduos gerados. A biorremediação pode ajudar na diminuição dos custos finais da indústria (NATURAL AND ACCELERATED BIOREMEDIATION RESEARCH, 2003).

Em 1989, a biorremediação foi utilizada em larga escala para auxiliar na descontaminação da costa do Alasca em Prince Willian Sound, após derramamento de óleo pelo petroleiro Exxon Valdez (BOOPATHY, 2000; BORÉM & GIÚDICE, 2008).

Em 1975, um vazamento em um tanque de armazenamento de combustíveis de aviões a jato da força Aérea dos EUS contaminou o solo de Charlerton, na Carolina do Norte, nos EUA. Parte dos mais de 300.000 litros de combustíveis (tolueno) vazados penetrou no solo, atingindo o lençol freático da região. Em 1985, a contaminação havia se espalhado, atingindo áreas residenciais. A remoção do solo contaminado era tecnicamente impossível, e a remoção apenas da água contaminada não resolveria o problema, uma vez que não eliminava a fonte de contaminação, o solo. Uma das possíveis soluções era o uso de microrganismos naturalmente presentes no solo que possuem a capacidade de digerir combustíveis, transformando-os em gás carbônico, água e energia. Em 1992, a biorremediação foi colocada em prática em Charleston, com a adição de nutrientes que estimulassem o crescimento e atividade desse grupo de microrganismos. Os nutrientes foram aplicados no solo contaminado por meios de tubos de infiltração, e a água contaminada foi removida em vários poços artesianos perfurados. Cerca de um ano mais tarde, o nível de contaminação foi reduzido a 25% do inicial. Próximos aos tubos de infiltração, onde a população de microrganismos teve maior crescimento, os níveis anteriores de cerca de 5.000 partes por bilhão de tolueno foram reduzidos para valores não-detectáveis (BORÉM & GIÚDICE, 2008, p.201).

Esta tecnologia pode ser empregada em ambientes heterogêneos, em que os poluentes estão associados com partículas, dissolvidos em solos e líquidos. Dada a complexidade do processo, o sucesso dependerá da interdisciplinaridade envolvendo disciplinas como microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química (BOOPATHY, 2000; BORÉM & GIÚDICE, 2008).

Biorremediação é uma tecnologia complexa e sua implementação ocorre em etapas que compreendem o estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente (FIG.01). Em primeiro lugar, é necessária uma caracterização do tipo e quantidade de poluente, bem como avaliações de natureza biológica, geológica, geofísica e hidrológica do local contaminado. As avaliações biológicas ocorrem primeiramente em laboratório, e têm como objetivo a otimização da biodegradação do composto. Elas compreendem os testes de bioestimulação, pela adição de nutrientes e, ou, surfactantes, e os testes de bioaugmentação,

pela adição de culturas de microrganismos biodegradadores ou mediadores. Com base nos dados obtidos, é então escolhida a técnica de biorremediação mais adequada para a situação e testes de campo são realizados, para se verificar a eficiência do processo *in-situ* (BORÉM & GIÚDICE, 2008).

A tecnologia da biorremediação pode ser classificada em *ex-situ* e *in-situ*. A tecnologia *ex-situ* é aquela que envolve a remoção física do material contaminado para o processo de tratamento. Em contraste, a técnica *in-situ* envolve tratamento do material contaminado no local (BOOPATHY, 2000). Dada a complexidade desta técnica biotecnológica, cuja eficiência envolve vários fatores, muitos problemas de difícil equacionamento podem surgir no decorrer do processo, dentre os quais se destacam:

- a poluição geralmente envolve vários compostos químicos, requerendo a seleção e utilização de diferentes microrganismos com metabolismos específicos para os diferentes poluentes (BORÉM & GIÚDICE, 2008);
- quando as concentrações dos poluentes são baixas, os microrganismos podem não produzir as enzimas necessárias, do contrário podem ser inibidos (BORÉM & GIÚDICE, 2008);
- alguns compostos são rapidamente absorvidos pelo solo, sedimento e, ou, pela água, diluindo-se abaixo do nível exigido para ativação da biodegradação, contudo permanecendo ainda em concentrações acima da desejável (BORÉM & GIÚDICE, 2008);
- a taxa de biorremediação pode ser muito baixa, resultando em um processo de longa duração (BORÉM & GIÚDICE, 2008).

Os microrganismos, incluindo bactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras, são biorremediadores eficientes, removendo metais via mecanismos ativos, a bioacumulação (BLACKWELL *et al.*, 1995) ou passivos, a biossorção (VOLESKY & HOLAN, 1995).

Conforme Dostalek e colaboradores (2004), grandes quantidades de metais podem ser acumuladas por muitos microrganismos especialmente as leveduras. A captação de metais por fungos é essencialmente um processo bifásico, metabolismo-independente e metabolismo-dependente (BLACKWELL *et al.*, 1995). A fase inicial é rápida e independe da temperatura, do metabolismo energético, da fonte de energia disponível e da presença de inibidores metabólicos. Quase sempre a ligação inicial do metal ao fungo envolve a parede celular, cujos processos podem ocorrer através de troca iônica, adsorção, complexação, precipitação e cristalização com as estruturas microfibrilares da mesma. A segunda fase é mais lenta, dependente do metabolismo e influenciada por fatores tais como temperatura e inibidores metabólicos (DOSTALEK, *et al.*, 2004).

O termo bioacumulação se refere à captação do metal dependente do metabolismo da célula, o que significa que a célula deve estar viva. Uma vez no interior da célula, o metal pode ser imobilizado por várias proteínas (metalotioneínas, fitoquelatinas e glutatona) ou sequestrado no vacúolo. O termo biossorção é usado para descrever a sorção de metal independente do metabolismo (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997). Conforme Gadd (1990) e Del Rio (2004), as paredes celulares de bactérias, algas, fungos e leveduras são eficientes biossorventes metálicos, onde ligações covalentes e iônicas podem estar envolvidas na adsorção, dos metais por constituintes protéicos e polissacarídicos. Em varias espécies, a adsorção pode ser responsável pela maior proporção da retenção total ou biossorção.

Compreende adsorção o acúmulo de substâncias na superfície ou interface, e absorção a penetração uniforme de átomos ou moléculas de uma fase, levando em consideração a capacidade dos metais de se ligarem a vários materiais biológicos, tais como a biomassa de algas, leveduras, fungos e bactérias (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997). A absorção é de interesse para a indústria, dada a capacidade de remoção de metais pesados dos efluentes. Este método é independente do ciclo metabólico do microrganismo e, portanto, o organismo não precisa estar vivo. Este processo também é conhecido por captação passiva (KAPOOR *et al.*, 1999; DONMEZ & AKSU, 1999).

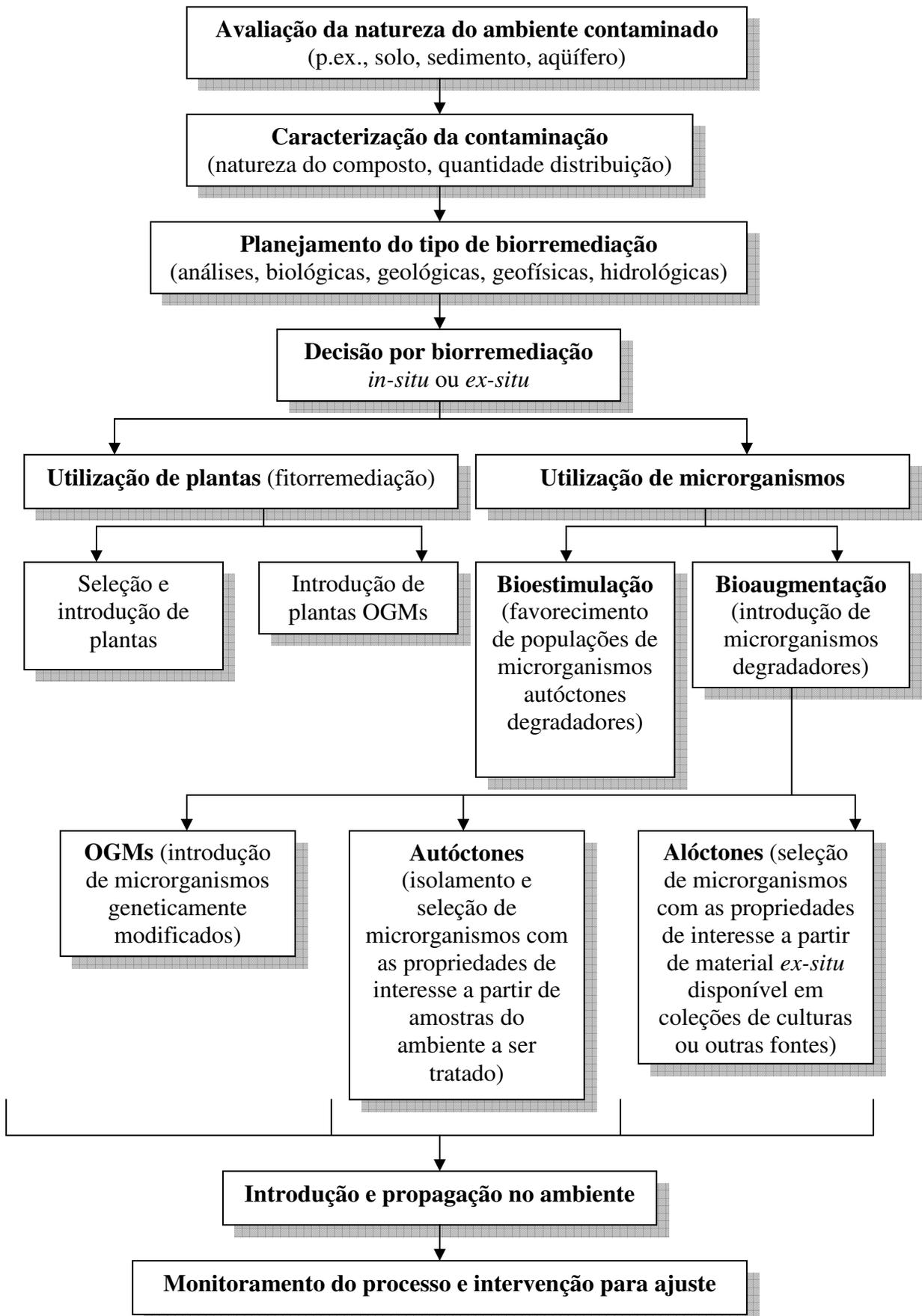


FIGURA 1. Etapas para definição e implantação de um processo de biorremediação. Adaptado de BORÈM & GIÚDICE (2008).

1.2. Biossorção

Segundo Cossich (2000) e Del Rio (2004), o termo biossorção define um processo onde se utilizam sólidos de origem vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de meio líquido. A biossorção é um importante componente no tratamento de efluentes e envolve o desenvolvimento de bioprocessos flexíveis, como a possibilidade de reutilização de biomassa industrial de cervejarias e destilarias, tornando este estudo atrativo.

Metais pesados biossorvidos são usualmente classificados em três categorias: metais tóxicos (tais como Hg, Cr, Pb, Cu, Ni, Cd, Co, Sn, etc.), metais preciosos (tais como Pd, Pt, Ag, Au, Ru, etc.) e radionuclídeos (U, Th, Ra, Am etc.), cujo peso específico é maior que $5,0\text{g/cm}^3$ (VOLESKY, 1990a; BISHOP, 1999). Com o rápido desenvolvimento industrial (incluindo indústrias de eletroplacas, produção de energia e combustível, indústria de fertilizantes e pesticidas, metalurgia, fotografia, tratamento de superfícies metálicas, instalações aeroespaciais e de energia atômica), rejeitos contendo metais são descarregados diretamente ou indiretamente no ambiente, levando a sérios problemas de poluição ambiental (VOLESKY, 1990a; BISHOP, 1999; WANG, 2002a).

Métodos convencionais de remoção de íons metálicos de soluções aquosas têm sido estudados em detalhes, tais como precipitação química, tratamento eletroquímico e membranas. No entanto, a precipitação química e o tratamento eletroquímico são ineficientes, especialmente quando a concentração de íons metálicos em solução aquosa é menor que 100mg.L^{-1} . Processos como, tecnologia de membranas e adsorção por carvão ativado são extremamente caros, principalmente quando utilizados em larga escala em efluentes contendo metais pesados em baixa concentração ($<100\text{mg.L}^{-1}$). Um processo alternativo é a biossorção, que utiliza vários materiais de origem biológica, incluindo bactérias, fungos, leveduras, algas e plantas. Estes biossorventes possuem a capacidade de diminuir as concentrações de metais pesados em soluções de ppm ao nível de ppb. Eles podem efetivamente sequestrar íons metálicos de soluções diluídas com alta eficiência e rapidez. Conseqüentemente, biossorção é um método ideal para tratamento de efluentes de grandes volumes e baixa concentração de metais (WANG & CHEN, 2006; VEGLIO & BEOLCHINI, 1997; VOLESKY 1990a).

A biossorção de metais envolve mecanismos complexos, principalmente troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e retenção de íons em capilares inter e intrafibrilares,

como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (DEL RIO, 2004; VOLESK & HOLAN, 1995).

A biomassa de levedura tem sido utilizada como bioissorvente para remoção de Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, U, Th e Zn a partir de soluções aquosas. Leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia* são eficientes bioissorventes de metais pesados. A maioria das leveduras pode sorver uma vasta gama de metais, ou ser estritamente específica em relação a um íon específico. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* como bioissorvente é de interesse especial (PODGORSKII *et al.*, 2004; WANG & CHEN, 2008).

Segundo Wang e Chen (2006), o uso de *S. cerevisiae* como bioissorventes de metais apresenta algumas vantagens como:

- É de fácil cultivo em larga escala. As leveduras podem crescer facilmente em técnicas de fermentação pouco sofisticadas, em meios de cultura inespecíficos e de baixo custo (KAPPOR & VIRARAGHAVAN, 1995).
- A biomassa de *S. cerevisiae* pode ser obtida de várias indústrias de alimentos e bebidas. *S. cerevisiae* é um subproduto de fácil obtenção nas indústrias de fermentação, quando comparadas com outros tipos de biomassa microbiana.
- *S. cerevisiae* é geralmente considerada segura, pois não está associada a patógenos e a elementos móveis como as bactérias. Bioissorventes feitos de *S. cerevisiae* podem ser facilmente aceitos pelo público quando aplicados na prática.
- *S. cerevisiae* é considerado modelo ideal de organismo para identificar os mecanismos de bioissorção na remoção de íons metálicos, especialmente para investigar a interação metal-microrganismo em nível molecular.

Peregol e Howell (1997), relataram que o uso de leveduras como sistema modelo é particularmente atrativa dada a sua fácil manipulação genética e seu completo sequenciamento genômico, principalmente de *S. cerevisiae*. De fato, *S. cerevisiae*, como modelo, é maciçamente utilizada na biologia molecular, por ser facilmente manipulada geneticamente, o que pode ser útil para os vários propósitos de remoção de metais (WANG & CHEN, 2006).

Células de *S. cerevisiae* obtidas por diferentes processos são usadas para diversos propósitos em pesquisas. Por exemplo, células vivas e mortas, células intactas e desativadas, células sem tratamento e tratadas por processos físico-químicos, células tipo selvagens e mutantes, células floculantes e não-floculantes e células de cultura laboratorial e de subprodutos industriais (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; MARQUES *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003; WANG & CHEN, 2006).

Wang e Chen (2006) relatam que *S. cerevisiae* pode remover metais tóxicos, recuperar metais preciosos e retirar radionuclídeos de soluções aquosas. Schott e Gardner (1997), reportaram a recuperação de metais como alumínio por *S. cerevisiae*. Brady e Duncan (1994) demonstraram que leveduras pré-tratadas com alcalóides foram capazes de acumular uma grande faixa de metais pesados (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} e Fe^{2+}).

Chumbo, cádmio, cobre, zinco, cromo, níquel, prata e urânio têm sido mais estudados que cobalto, molibdênio, ferro, manganês, rádio, selênio, lantanídeos e metais preciosos. Isto ocorre devido à capacidade de *S. cerevisiae* em distinguir diferentes espécies de metais baseado em suas toxicidades, como espécies de selênio (Se^{4+} e Se^{6+}), espécies de antimônio (Sb^{3+} e Sb^{5+}) e compostos de mercúrio (CH_3Hg e HgII). Esta propriedade torna *S. cerevisiae* útil não somente para a biorremediação, remoção ou recuperação de íons metálicos, mas também em medidas analíticas (WANG & CHEN, 2006; MADRID & CAMARA, 1997; PÉREZ-CORONA *et al.*, 1997).

Conforme Wang e Chen, (2006), para se determinar qual íon metálico tem maior afinidade com *S. cerevisiae*, é necessário comparar a capacidade adsorptiva de diferentes metais sob as mesmas condições experimentais. Foi demonstrado que a biossorção de metais em *S. cerevisiae* é seletiva e em muitos casos competitiva. Entretanto, segundo Kapoor e Viraghavan (1997), poucas informações estão disponíveis sobre a competitividade de sorção de metais em biomassa de fungos, especialmente em *S. cerevisiae*. Em princípio, sabe-se que *S. cerevisiae* tem maior afinidade por urânio, chumbo e mercúrio do que por cobre, níquel ou outros metais.

A capacidade biossorptiva é influenciada por muitos fatores, incluindo o status das células de *S. cerevisiae* (idade celular, fase de crescimento), a propriedades dos metais (raio dos íons, valência, etc.) em solução aquosa, as condições da cultura (fonte de carbono, suplementos de nutrição, composição do meio de crescimento, etc.) e as condições de biossorção (tais como pH, temperatura, tempo de contato, concentração inicial de íons e biomassa, disponibilidade de íons do metal e micronutrientes) (WANG & CHEN, 2006).

Os fungos podem produzir ou secretar substâncias poliméricas extracelulares (EPS) tais como polissacarídeos, glicoproteínas, lipopolissacarídeos e peptídeos solúveis. Estas substâncias possuem quantidade substancial de grupos funcionais que podem adsorver íons metálicos (FIG.02) (WANG & CHEN, 2006). A parede celular representada na FIG.03 é a primeira estrutura da célula a entrar em contato com íons metálicos. Existem dois mecanismos básicos de captação de metal pela parede celular, a interação estequiométrica entre os grupos funcionais presentes, incluindo grupamentos fosfato, carboxila, aminas fosfodiéster, e a

deposição físico-química via precipitação inorgânica, complexação, força iônica, adsorção (por interação eletrostática ou força de van der Waals), oxidação e redução (VOLESKY, 1990a; WANG & CHEN, 2006).

O papel das estruturas das células na remoção de metais foi investigada na década de 90 (WANG & CHEN, 2006, 2008). Brady e Duncan (1994) constataram que o bloqueio de amina, carboxila ou hidroxila, grupos isolados de paredes celulares da levedura *S. cerevisiae*, reduziu a capacidade de adsorção de Cu^{2+} , indicando que estes grupos desempenham um papel na ligação deste íon, o que implica que tanto as proteínas como os carboidratos presentes nas paredes celulares estão envolvidos na ligação de metais pesados. Wang (2002b) também confirmou que os grupos amina e carboxila na parede da célula desempenham um papel importante na remoção de Cu^{2+} por células de levedura *S. cerevisiae*.

Formula do grupo funcional	Nome	Classes de compostos
$R' - \text{O} - \text{H}$	Hidroxil	Álcoois, carboidratos
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{// O} \\ \text{OH} \end{matrix}$	Carboxil	Ácidos graxos, proteínas, ácidos orgânicos
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{matrix}$	Amina	Proteínas, ácidos nucleicos
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{// O} \\ \text{O} - R \end{matrix}$	Éster	Lipídeos
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{SH} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$	Sulfidril	Cisteína (aminoácidos), proteínas
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{// O} \\ \text{H} \end{matrix}$	Carboxil terminal	Aldeídos, polissacarídeos
$R - \text{C} \begin{matrix} \text{// O} \\ \\ \text{C} - \end{matrix}$	Carboxil interno	Cetonas, polissacarídeos
$R - \text{O} - \text{P} \begin{matrix} \text{// O} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$	Fosfato	DNA, RNA, ATP

FIGURA 02. Grupos funcionais e classe de compostos orgânicos presentes em fungos. Adaptado de WANG & CHEN (2006, 2008).

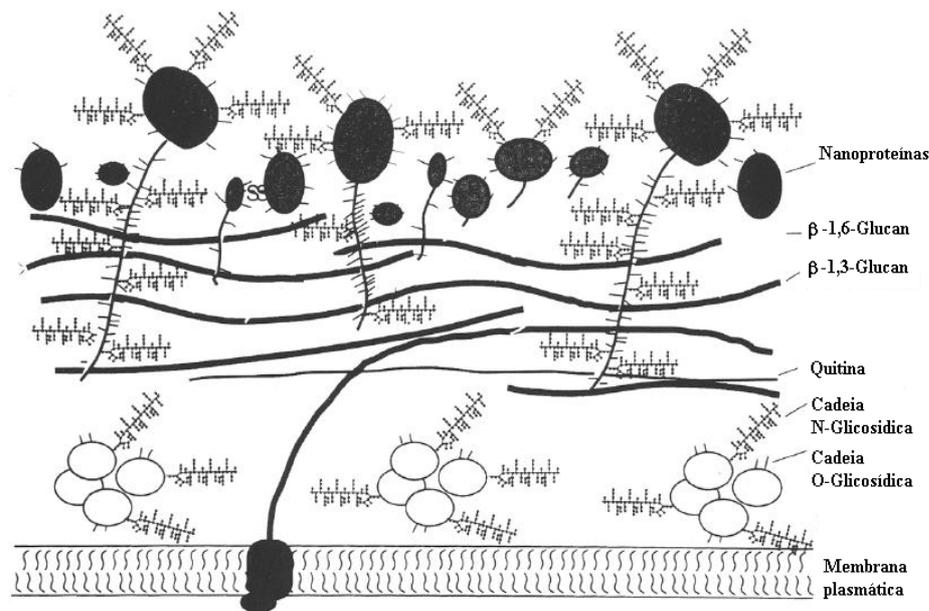


FIGURA 03. Composição e estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. Adaptado de OSUMI (1997).

1.3. O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

As leveduras são exemplares de fungos unicelulares. Geralmente as células de leveduras são maiores que bactérias, variando consideravelmente em tamanho. Uma célula típica de levedura possui de 2,5 a 10 μm de largura e 4,5 a 21 μm de comprimento. As células são esféricas ou ovais, dependendo da espécie da levedura, do estado nutricional e condições da cultura e crescem isoladas ou em colônias, possuem parede celular, membrana citoplasmática, citoplasma e inclusões, um único núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vacúolos, citoesqueleto e glicocálice. As leveduras possuem a maior parte das outras organelas eucarióticas (WANG & CHEN, 2008).

Os fungos unicelulares que apresentam a forma leveduriforme podem formar filamentos sob algumas condições. As colônias de leveduras são muito semelhantes às de bactérias, porque têm uma suave aparência e textura uniforme. As leveduras comerciais mais importantes utilizadas na produção de alimentos e bebidas são do gênero *Saccharomyces* (WANG & CHEN, 2008). Segundo Wang e Chen (2008), *S. cerevisiae* é talvez a mais útil levedura dado o seu uso desde tempos remotos na culinária e produção de bebidas fermentadas. É o microrganismo por trás do tipo mais comum de fermentação. Células de *S. cerevisiae* são arredondadas, quase ovóides, com 5 a 10 μm de diâmetro. Ela se reproduz assexuadamente por um processo conhecido como divisão por brotamento ou gemulação. É

facilmente manipulável e, portanto, excelente modelo em estudos científicos da biologia dos eucariotos (FIG.04).

S. cerevisiae é um organismo eucarioto muito bem caracterizado. Apesar de ser um organismo simples (um fungo unicelular de vida livre), às células desta levedura são similares as de eucariotos superiores na sua estrutura e processos fisiológicos. O genoma de *S. cerevisiae* foi o primeiro a ser totalmente seqüenciado. A seqüência de 12.000 kb define mais de 6.000 genes, fornecendo informação distribuída em 16 cromossomos, sobre sua história evolutiva. As inúmeras experimentações com leveduras, principalmente no que diz respeito ao emprego de métodos de genética molecular, resultou em uma ampla aplicação das mesmas como modelo em estudos, elucidando a regulação do ciclo celular, a biogênese de organelas, a sinalização de vias metabólicas e muitas outras funções celulares, incluindo mecanismos de transporte, a sensibilidade a metais pesados e controles da resposta celular. Resultados obtidos em estudos com *S. cerevisiae* podem ser extrapolados para células humanas, uma vez que aparentemente os mecanismos moleculares envolvidos são muito semelhantes nesses dois tipos de organismos (SYCHROVÁ, 2004; ADAMIS *et al.*, 2003; DEL RIO, 2004; WANG & CHEN, 2008).

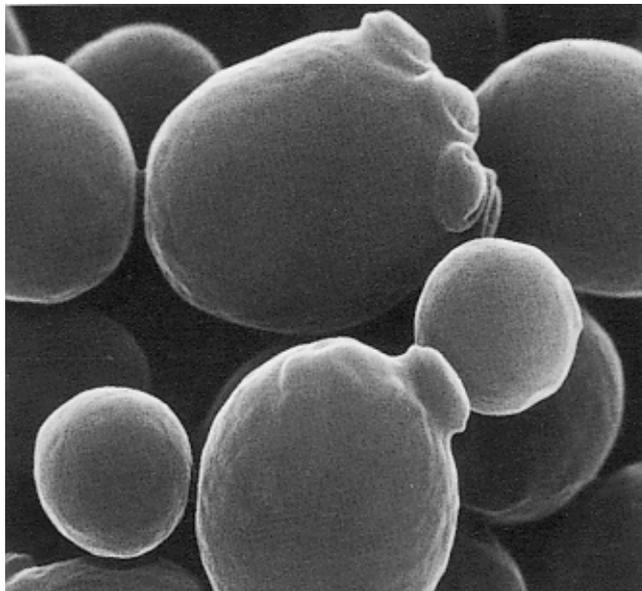


FIGURA 04. Levedura *Saccharomyces cerevisiae* em processo de divisão por brotamento. Fonte: <<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/wheals-a.html>>

S. cerevisiae pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isto significa que ela fermenta hexose independentemente da concentração de oxigênio. A glicose é a fonte preferencial de carbono da *S. cerevisiae*, em razão de um complexo processo de repressão e

ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecida como repressão catabólica da glicose (GASPARRI, 2005).

Segundo De Winde e colaboradores (1997), Gancedo (1998) e Gasparri (2005), quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2%, ocorre desrepressão dos genes que codificam enzimas mitocondriais envolvidas na expressão de outros genes necessários para o crescimento respiratório. Existem fases distintas de crescimento do ponto de vista cinético e metabólico. Após a fase *lag*, em que as células passam por uma rápida adaptação ao meio rico (YPG), as células se dividem a cada uma hora e meia (fase exponencial) obtendo energia como produto da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica, fase na qual ocorre uma parada momentânea na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após isto, retoma-se a divisão celular de forma lenta (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol (produto da fermentação) como fonte de carbono para obtenção de ATP (fase pós-diáuxica). Na inexistência de fontes extras de carbono, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver na ausência de nutrientes por longos períodos (FIG.05).

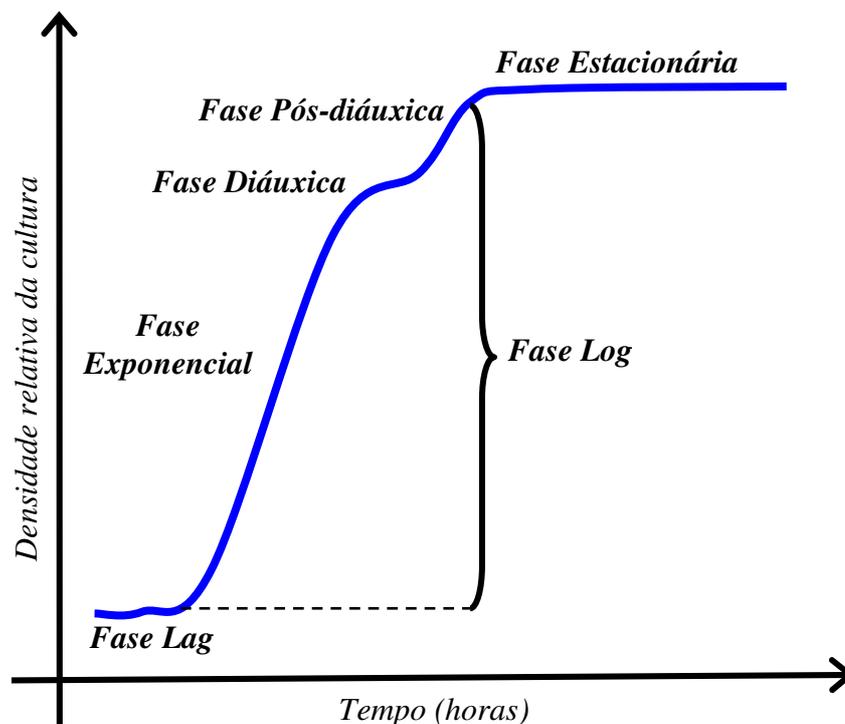


FIGURA 05. Fase de crescimento de uma levedura em meio completo. Adaptado de GASPARRI (2005).

Os organismos unicelulares de vida livre, como a maioria das leveduras, são adaptados à variações constantes nas condições ambientais, pois desenvolvem mecanismos para responder as variações extremas pela modulação de seu crescimento e metabolismo. Os microrganismos são capazes de sobreviver por longos períodos na ausência de nutrientes através da diminuição drástica de seu metabolismo de crescimento, interrupção do ciclo celular e modificações fisiológicas e morfológicas (DE WINDE *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998; ROLLAND *et al.*, 2002; VIANNA, 2003; GASPARRI, 2005).

1.4. Cádmio

A poluição do ambiente com metais pesados tóxicos ocorre em todo mundo, e deve-se ao modelo de desenvolvimento industrial (DÖNMEZ & AKSU, 1999).

Estudos recentes têm detectado a presença de níveis tóxicos de cádmio (Cd) em diversos ambientes. Esse elemento, juntamente com o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg), concentram a atenção dos pesquisadores devido à toxicidade e a penetração nos ecossistemas, como resultado do desenvolvimento tecnológico. De todos os metais poluentes, o cádmio é um dos mais tóxicos para os seres humanos, animais e plantas, sendo entre eles o que apresenta elevadas taxas de emissão para o ambiente nas últimas décadas (KEFALA, 1998). O risco em potencial deste metal suscitou pesquisas na área de alimentos, uma vez que este contaminante tem caráter cumulativo na cadeia biológica da qual o homem faz parte (MARIANO-DA-SILVA & PRADO-FILHO, 1999). Como resultado do fenômeno de bioacumulação, as quantidades subtóxicas presentes no meio ambiente podem atingir níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica (VOLESKY, 1990a).

A produção de baterias níquel-cádmio, a fundição de zinco e atividades de solda causam exposição ocupacional ao cádmio. A fonte mais importante de exposição ao cádmio nos dias de hoje resulta da produção de baterias de níquel-cádmio. (BORJESSON *et al.*, 1997; JÄRUP *et al.*, 1998; JÄRUP, 2002). Segundo a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR) (2008), a tendência geral no consumo global de cádmio, nas duas últimas décadas, tem ocasionado um grande aumento de sua utilização em baterias, e uma diminuição em todas as outras aplicações. Em 1990, 55% da produção de cádmio do mundo ocidental era empregada na fabricação de baterias; em 2000, essa porcentagem subiu para 73%. Embora o uso de cádmio em pigmentos, estabilizadores de PVC e plaqueamento tenha sido erradicado em alguns países, estas aplicações ainda representam uma parte significativa do total de cádmio consumido.

Cádmio é introduzido nos solos principalmente através do uso de fertilizantes e mineração de zinco. Na exposição ocupacional, a contaminação ao cádmio ocorre principalmente através das vias respiratórias e em menos grau na via gastrointestinal, através da ingestão. Ambientalmente, a maior fonte de exposição ao cádmio está no tabaco utilizado em cigarros, seguida da ingestão deste metal presente em alimentos. Entretanto, uma grande fonte de exposição ambiental é a emissão de cádmio por fábricas como produto da fundição de zinco (JÄRUP, 2002).

O cádmio é o elemento número 48 da tabela periódica, com um peso atômico de 112,4. É medianamente denso ($8,6 \text{ g.cm}^{-3}$), branco prateado, sendo um metal maleável com ponto de fusão de $320,9^\circ\text{C}$ e de ebulição de 765°C . Embora o cádmio tenha sido descrito como um elemento relativamente raro, posteriormente, foi constatado que o mesmo se encontra presente no ambiente em baixos níveis. A concentração de cádmio na crosta terrestre varia entre 0,15 e $0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo o 67º metal em abundância (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Em 2007, este metal foi o 7º classificado na lista de “Substâncias Perigosas” da ATSDR e Environmental Protection Agency (EPA), onde as substâncias são classificadas conforme a possível exposição humana e sua potencial ameaça à saúde em razão de sua toxicidade (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY, 2008).

O cádmio tem meia-vida biológica de aproximadamente dez anos, o que o torna essencialmente um metal acumulativo, e não há tratamentos efetivos comprovados contra intoxicação crônica ocasionada por este metal (WAALKES, 2000; JÄRUP, 2002). A porcentagem de absorção de cádmio nos pulmões é de 10 a 50%. Quando introduzido no organismo humano via oral, o cádmio é pouco absorvido, sendo que 95% são eliminados e o restante é acumulado nos rins e fígado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989,1992).

O cádmio não é utilizado em nenhum processo biológico conhecido, com uma única exceção. Demonstrou-se em estudos preliminares que a alga *Thalassiosira weissflogii* possui uma enzima (anidrase carbônica) que é dependente do metal (LANE *et al.*, 2005). A tolerância ao cádmio tem sido extensivamente analisada em uma grande variedade de organismos, dado a sua elevada toxicidade e pelo fato de não ser um elemento essencial. Além disso, em decorrência de sua química de coordenação, este elemento pode ser potencialmente competitivo com outros cátions bivalentes tais como cálcio, magnésio e zinco, tornando-o ainda mais tóxico (BRENNAN & SCHIESTL, 1996; NAGY *et al.*, 2006).

Segundo Brady e Duncan (1994), Volesky (1990b) e Adamis e colaboradores (2007), é bem conhecido que microrganismos possuem capacidade de acumular cádmio, sendo assim,

a levedura *S. cerevisiae* não é exceção. A FIG.06 representa um esquema do mecanismo de transporte e compartimentalização de cádmio na célula. Inicialmente, o cádmio pode ser removido do meio através do transportador Zrt1. Uma vez dentro da célula, o metal pode formar um complexo com glutatona reduzida ($\text{Cd}(\text{GS})_2$), o qual pode ser seqüestrado para dentro do vacúolo pela proteína Ycf1 (GOMES *et al.*, 2002).

Em microrganismos e plantas, a presença de cádmio afeta o DNA e aumenta o estresse oxidativo, levando à inibição do crescimento e à síntese de vários compostos para combater a toxicidade, como por exemplo as fitoquelatinas, metalotioneínas e glutatona. Além disso, várias enzimas antioxidantes são estimuladas na presença deste metal (LIU, *et al.*, 2005; BERTIN & AVERBECK, 2006). A literatura reporta que as enzimas catalase, superóxido dismutase, entre outras, tem sua síntese induzida na presença deste metal (LIU, *et al.*, 2005). Na levedura *S. cerevisiae*, a presença de cádmio no interior da célula leva a uma abundante geração de radicais livres de oxigênio, que podem atacar e danificar todas as macromoléculas levando à oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e danos ao DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; BRENNAN & SCHIESTL, 1996; SERERO *et al.*, 2008). A FIG.07 sumariza os efeitos pleiotrópicos da toxicidade induzida pelo cádmio e os mecanismos de resistência celular a este metal (SERERO *et al.*, 2008).

A toxicidade do cádmio está associada a diversos efeitos, como por exemplo: distúrbios nas funções enzimáticas, alteração de proteínas, influências nas funções mitocondriais, aberrações cromossômicas e danos ao DNA (SERERO *et al.*, 2008).

A exposição ocupacional e ambiental ao cádmio implica em complicações clínicas como disfunção renal, doenças ósseas e alguns tipos de câncer. Mesmo baixos níveis de exposição a este metal podem causar danos aos rins. Este metal acumula-se predominantemente nos rins e fígado, mas também pode se concentrar em outros tecidos, incluindo ossos e placenta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989,1992; JÄRUP *et al.*, 1998; JÄRUP, 2002;).

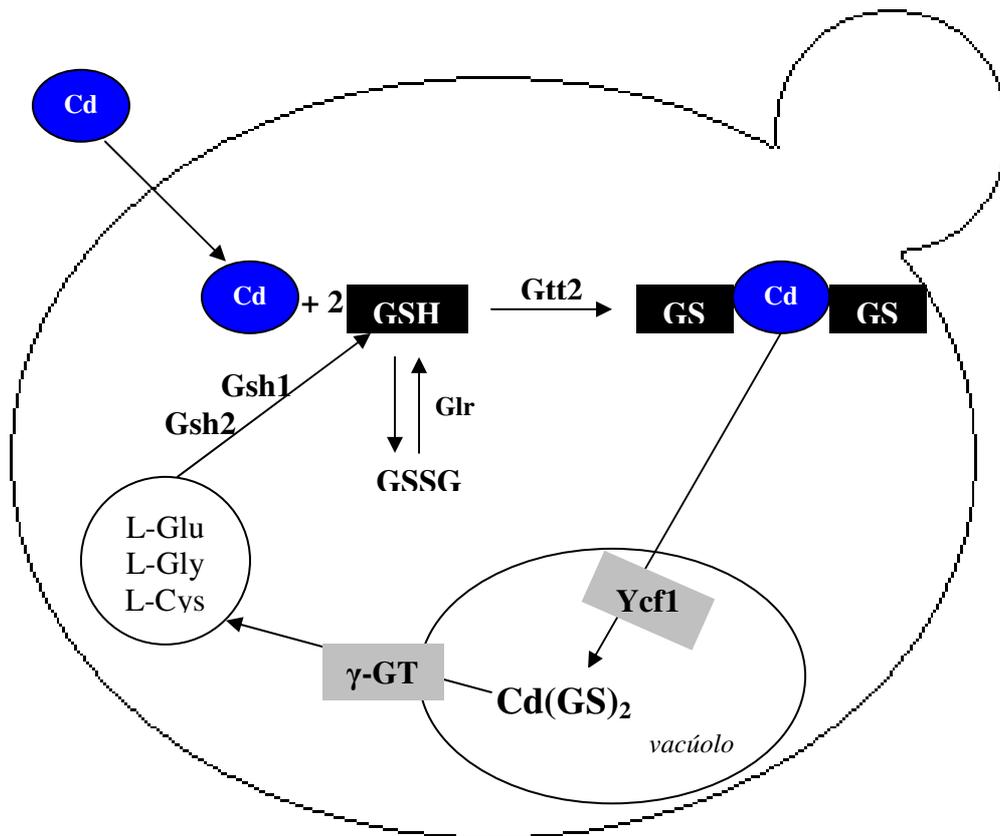


FIGURA 06. Modelo de mecanismos de destoxificação de cádmio em *S. cerevisiae*. Na figura: Cd, cádmio; L-Glu, L-Gys e L-Gly, L-aminoácido glutamato, cisteína e glicina respectivamente; GSH e GSSG, forma reduzida e oxidada de glutatona, respectivamente; Gtt2, glutatona transferase 2; Ycf1, transportador vacuolar; Gsh1 e Gsh2, enzimas responsáveis pela síntese de glutatona; Glr, glutatona redutase; GS-Cd-GS e Cd(GS)₂, complexo formado entre cádmio e glutatona; γ-GT, gama-glutamil transferase. Adaptado de ADAMIS *et al.*, (2007); GOMES *et al.*, (2002).

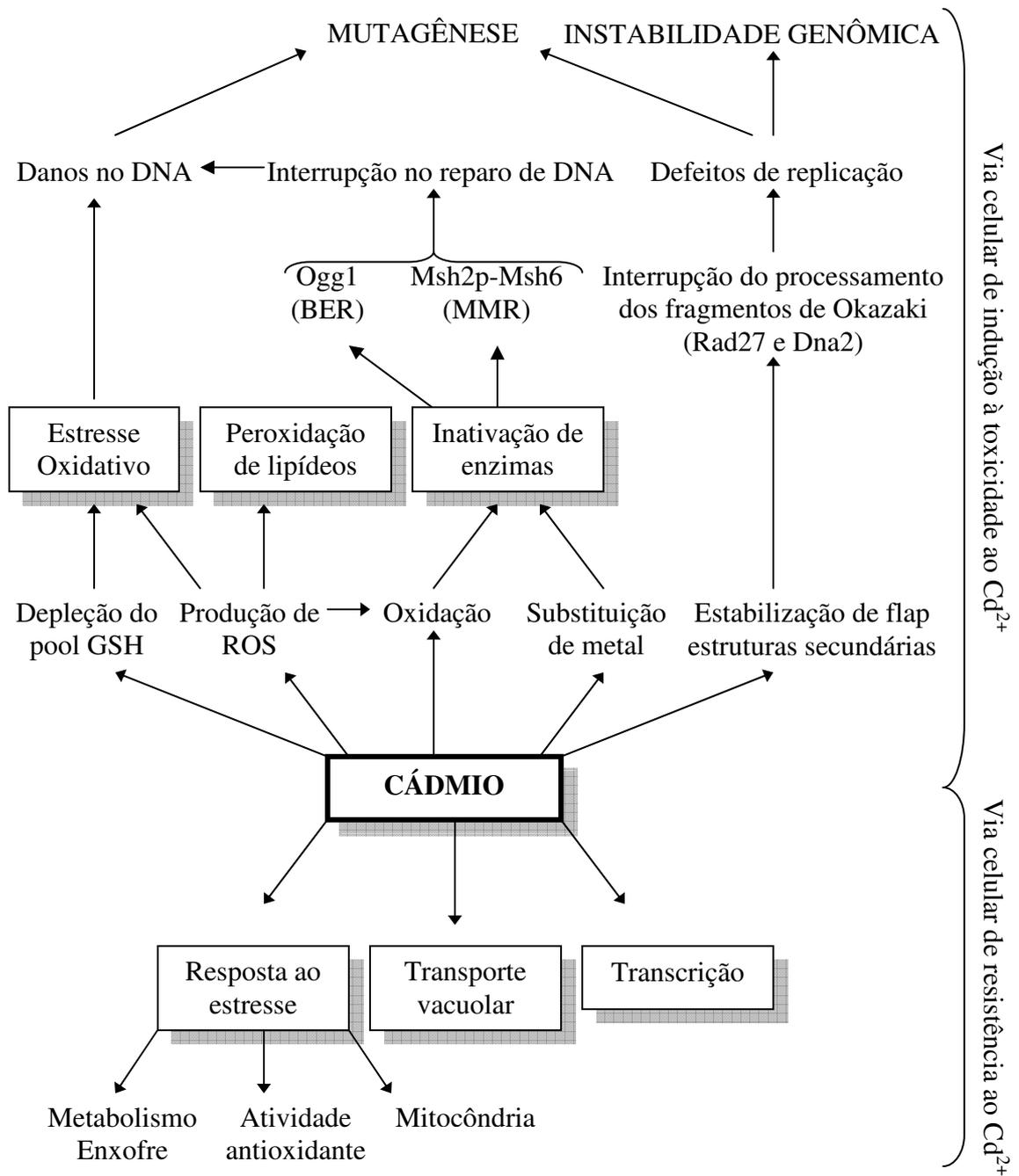


FIGURA 07. Efeitos pleiotrópicos da indução à toxicidade ao cádmio e funções celulares envolvidas na resistência ao cádmio. Adaptado de SERERO *et al.*, (2008).

1.5. A produção de cachaça

Conforme a Legislação Brasileira, Instrução Normativa número 13 de 29/06/2005, que fixa os padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e cachaça, o termo aguardente de cana refere-se a:

Bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% em volume a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 g.L⁻¹, expressos em sacarose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2005).

Por outro lado, pela mesma Instrução Normativa, cachaça refere-se a:

Denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 g.L⁻¹, expressos em sacarose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2005).

O Decreto número 4062 de 21/12/2001 e a Lei da Propriedade Industrial número 9279 de 14/05/1996 definem as expressões “Cachaça”, “Brasil” e “Cachaça do Brasil” como produto de qualidade única, tendo em vista as suas características naturais e as indicações geográficas brasileiras (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001).

O setor do agronegócio tem grande importância na geração de divisas para o País. O agronegócio da cachaça mais que triplicou entre 1970 e 1999, partindo de uma produção de 418 milhões de litros para cerca de 1,5 a 2 bilhões de litros anuais (PATARO *et al.*, 2000; BOGUSZ-JUNIOR *et al.*, 2006). Aguardente de cana-de-açúcar é a mais tradicional bebida alcoólica produzida no Brasil, sendo obtida da destilação do caldo fermentado da cana de açúcar. A produção no estado de Minas Gerais é de aproximadamente 210 milhões de litros por ano. Esta produção ocorre de maio a dezembro, durante o período de colheita da cana-de-açúcar (PATARO *et al.*, 2000, 2002; CARDOSO *et al.*, 2004). Este volume representa uma considerável porcentagem da colheita da cana. O mesmo acontece para o etanol combustível, com uma produção anual em torno de 2x10⁹L (ZAMPERLINI *et al.*, 1997; GODOI *et al.*, 2004; GALINARO *et al.*, 2007.). Conforme Ribeiro, (1997) existe em todo o estado de Minas Gerais por volta de 800 destilarias onde há produção de aguardente artesanal. Grande parte dos alambiques mineiros concentram-se nas regiões Norte, Jequitinhonha e Rio Doce.

As exportações de cachaça passaram de US\$ 7,3 milhões, em 1999, para US\$ 8,7 milhões no ano de 2001. Conforme dados sobre a produção nacional, atualmente existem mais de cinco mil marcas registradas, que exportam um volume superior a 20 milhões de litros ano para o exterior. Esse aumento na produção, associado ao incremento da exportação elevou a cachaça de líquido “marginal” ao posto de bebida nobre, símbolo nacional e terceiro destilado mais consumido no mundo (BOGUSZ-JUNIOR *et al.*, 2005, CARDOSO *et al.*, 2004).

Segundo Bogusz-Junior (2005), o processo produtivo da cachaça pode ser resumido conforme os seguintes estágios: preparação da matéria prima (corte, separação das folhagens, transporte e armazenamento), seguida da extração do caldo para a fermentação propriamente dita. O mosto fermentado é levado à destilação, da qual, por meio de uma coluna de destilação ou alambique, se extrai a cachaça que pode ainda ser envelhecida em barril de madeira, antes de ser engarrafada e distribuída para a comercialização. Durante a fermentação alcoólica, ocorre o desdobramento dos açúcares do caldo de cana com a formação de dois produtos principais, álcool etílico e dióxido de carbono e a formação de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica, tais como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores.

Uma peculiaridade da produção artesanal da cachaça é a preparação do fermento inicial, que consiste na propagação da microbiota fermentativa através de uma mistura de caldo de cana-de-açúcar, arroz, milho e/ou farinha de soja. O processo ocorre na cuba de fermentação e pode levar de 5 a 20 dias até que a população de leveduras seja suficiente para iniciar o ciclo fermentativo. A fermentação resulta no consumo total do açúcar presente no suco da cana-de-açúcar e ocorre no período que pode variar de 18 a 48 horas. A comunidade microbiana responsável pela fermentação do caldo de cana é composta por leveduras e bactérias envolvidas na fermentação do caldo de cana (PATARO *et al.*, 2002). Os microrganismos envolvidos são principalmente os pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Candida*. Durante o ciclo fermentativo, ocorre uma sucessão de espécies de leveduras, culminado com a predominância da espécie *S. cerevisiae* (MORAIS *et al.*, 1997; PATARRO *et al.*, 2000, 2002; GUERRA *et al.*, 2001).

O Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL) iniciou-se no Brasil em 1975 e estimulou o desenvolvimento da agroindústria sucro-alcooleira. Como consequência, muitos produtos advindos desta agroindústria passaram a ser produzidos. Dentre esses produtos destaca-se a grande produção de levedura *S. cerevisiae*, usada para fermentar o caldo de cana

de açúcar. A levedura *S. cerevisiae* pode ser obtida nas destilarias depois de ser utilizada como fermento para a produção de álcool. De cada litro de álcool produzido, sobram cerca de 30 gramas de peso seco de levedura. A produção anual de álcool brasileiro é de cerca de 15 bilhões de litros; assim, o resíduo de leveduras pode ser estimado em cerca de 450 mil toneladas. Estima-se que em 1996/1997 foram comercializadas cerca de 25.000 toneladas de leveduras a um preço médio de aproximadamente R\$ 300,00 por tonelada (DEL RIO, 2004). Estes dados dão a dimensão da quantidade de leveduras que são utilizadas e produzidas na fermentação da cana-de-açúcar, principalmente nos diversos alambiques do estado de Minas Gerais e indicam que a biomassa residual pode vir a ter outra destinação.

A abundante biomassa de fungos produzida como subproduto em processos industriais pode ser uma fonte economicamente viável de biossorventes de metais. A transformação da biomassa residual em biossorventes de metais não apenas reduz drasticamente o custo de produção de biossorventes mas, também, reduz o custo da disposição do resíduo de biomassa proveniente de indústrias, como por exemplo a de fungos utilizados na produção de ácido orgânicos (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; WAIHUNG *et al.*, 1999), ou de leveduras produzidas pela indústria sucro-alcooleira.

O interesse, por parte das indústrias, na utilização da biomassa para processos de biorremediação só será possível se forem comprovados o baixo custo e a eficácia do processo. O baixo custo depende de uma produção em larga escala, razão pela qual este trabalho optou por verificar o potencial da biomassa produzida pelos alambiques de cachaça. A eficácia da metodologia dependerá de trabalhos que comprovem que a biomassa de leveduras remove quantidades significativas de metal, razão pela qual será realizado o presente trabalho.

1.6. Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é definido como uma situação na qual a homeostase celular é alterada por causa da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e/ou diminuição das defesas antioxidantes celulares (enzimáticas e não-enzimáticas). Uma melhor definição de estresse oxidativo foi introduzida recentemente como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, ocasionando danos moleculares pela ruptura do controle e sinalização redox (SIES & JONES, 2007).

O estresse oxidativo é geralmente ocasionado pela geração de níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio “Reactive Oxygen Species” (ROS), principalmente radicais hidroxila (OH^\bullet), que são considerados as mais tóxicas ROS, pois podem atacar e danificar

todas macromoléculas celulares, levando à oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA. Cádmio (Cd^{2+}), como outros pesados metais, provoca estresse oxidativo, peroxidação lipídica, e mutagênese; mas os mecanismos moleculares que acarretam estes efeitos celulares não estão totalmente elucidados. Em *S. cerevisiae* são necessárias para tolerância ao cádmio, os genes que codificam proteínas envolvidas nas defesas antioxidantes (superóxido dismutase, tioredoxina, glutatona e tioredoxina redutase) e Yap1, o ativador transcricional básico *leucin-zipper* (bZIP) para uma eficiente expressão destes genes. Leveduras expostas ao cádmio apresentam um elevado nível de peroxidação lipídica. Três enzimas (Gpx1, Gpx2 e Gpx3) com atividade fosfolipídica hidropoxidase presentes *in vitro*, provavelmente são capazes de remover peróxidos lipídicos em *S. cerevisiae*: Entre elas, Gpx3 tem demonstrado desempenhar um papel importante na resistência ao cádmio através da sua atividade fosfolipídica hidropoxidase, sugerindo que um importante efeito tóxico do cádmio é danificar os lipídeos da membrana plasmática (BAUDOUIN-CORNU & LABARRE, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

Os organismos aeróbicos possuem grandes vantagens energéticas quando usam o oxigênio molecular como oxidante terminal da respiração, entretanto, a presença do oxigênio no ambiente celular constitui uma ameaça constante às estruturas e processos metabólicos. Este fato ocorre devido à formação das ROS, que podem tornar-se altamente destrutivas para as células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada (FIG.08). Devido o consumo de quase 90% do oxigênio ocorrer nas mitocôndrias estas constituem a maior fonte de ROS nas células (RICE-EVANS *et al.*, 1991; MALLICK & MOHN, 2000; SMEITINK *et al.*, 2001).

O ânion do superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}) são as espécies reativas do oxigênio (ROS) mais importantes produzidas pelas células. São frequentemente formados através das reações catalisadas por enzimas em consequência do metabolismo celular normal (respiração celular e a oxidação de ácidos graxos), assim como no estresse oxidativo (calor, etanol, produtos químicos e metais pesados) (FRIDOVICH, 1981, PEREIRA *et al.* 2001). ROS causam danos oxidativo em ácidos nucléicos, lipídeos, proteínas, carboidratos e outros componentes celulares (PEREIRA *et al.*, 2001). Além disso, alguns dos produtos do dano oxidativo aos lipídios e os carboidratos, reagem prontamente com as proteínas e os ácidos nucléicos (PEREIRA *et al.*, 2001).

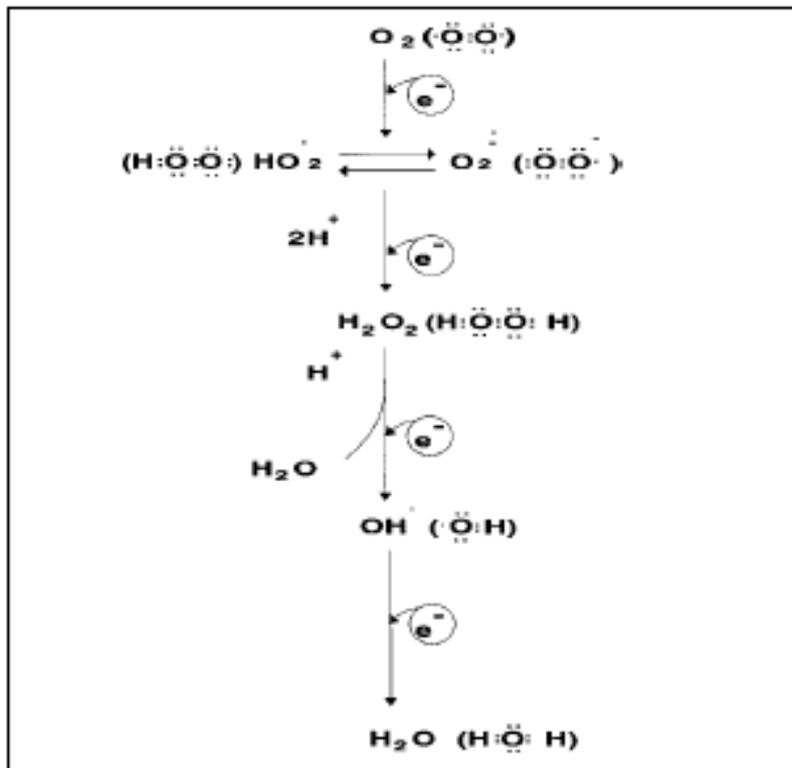


FIGURA 08. Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria, a partir da redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O). Adaptado de FERREIRA & MATSUBARA (1997).

Segundo Ercal e colaboradores (2000), os metais pesados são capazes de causar danos oxidativos tanto diretamente, agindo como redutores e, assim, produzindo as ROS, ou indiretamente, inativando os acumuladores de radicais livres como as glutations e metalotioneínas (FIG.09). O cádmio é um metal não-redox, portanto não é utilizado nas reações de Fenton. Este metal induz o estresse oxidativo por um processo indireto, que leva a um decréscimo de antioxidantes celulares e liberação de ROS pela mitocôndria (BERTIN & AVERBECK, 2006; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Células de leveduras submetidas a diferentes condições de estresse, tais como choque térmico, exposição ao etanol, metais pesados, alta osmolaridade e oxidantes, apresentam um mecanismo comum de defesa. Atualmente, sabe-se que o aumento da produção de ROS, devido à exposição das células a diferentes formas de estresse, está envolvido com a ativação da resposta celular e aquisição de tolerância contra um eventual estresse oxidativo severo (COSTA & MORADA-FERREIRA, 2001). Normalmente, a levedura *S. cerevisiae* responde as diferentes condições de estresse oxidativo com alterações nas defesas antioxidantes, sejam enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Assim, na presença de cádmio, ocorre um aumento de atividade das enzimas glutaciona peroxidase e superóxido dismutase, enzimas responsáveis

pela destoxificação de radicais livres gerados (LIU *et al.*, 2005; SERERO *et al.*, 2008). Células expostas à menadiona, gerador de radical livre intracelular, apresentam aumento nos níveis de superóxido dismutase e glutatona redutase (CYRNE *et al.*, 2003).

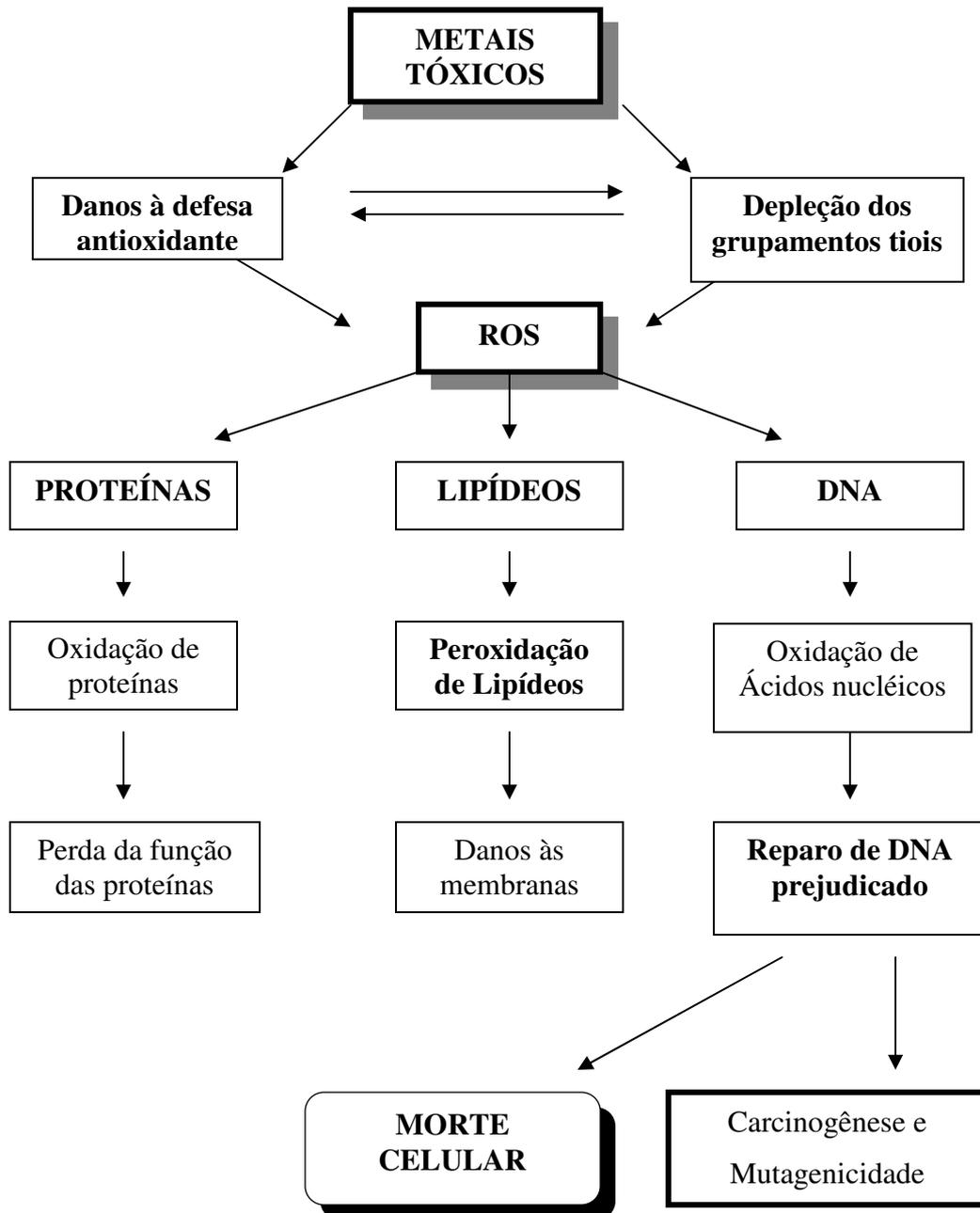


FIGURA 09. Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo. Adaptado de ERCAL, *et al.*, (2001).

1.6.1. Radical superóxido

É formado após a primeira redução do O₂. Ocorre em quase todas as células aeróbicas. Algumas substâncias se autoxidam formando o radical superóxido. Essas autoxidações são, geralmente, reações em cadeia na qual o radical superóxido pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radicalares. Apesar de o nome sugerir que esse radical tem alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das vezes como um agente redutor (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GASPARRI, 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

1.6.2. Radical hidroperoxila

Apresenta-se como a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Acredita-se que o radical hidroperoxila é mais reativo que o radical superóxido, por sua facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

1.6.3. Radical hidroxila

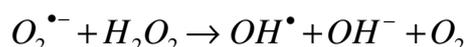
É considerada a ROS mais reativa em sistemas biológicos. A reação extremamente rápida do OH[•] com metais ou outros radicais no próprio local onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GASPARRI, 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Pode ser originado a partir do peróxido de hidrogênio na presença de íons ferro reduzido conforme reação de Fenton:



Por ser altamente reativo, o radical hidroxila possui meia vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com qualquer biomolécula celular. Assim se o radical for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação deste. Além disso, o radical hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a ponte dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) das membranas celulares (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GASPARRI, 2005).

A capacidade desse radical em lesar as células é superior às demais ROS, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra esse radical. Por isso a melhor defesa da célula contra esse radical é evitar que o mesmo seja gerado. Na ausência de íons metálicos no metabolismo celular a reação de Fenton ocorreria de forma muito lenta, pois esses íons possuem papel catalítico nesta reação. Por esta razão, a célula mantém um alto controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons de metais de transição são mantidos em sua valência mais alta, ou complexados a proteínas e/ou enzimas onde são armazenados ou fazem parte funcional da mesma (GASPARRI, 2005; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

Devido ao alto teor de água presente nas células, a exposição deste radical a fatores como radiações ionizantes resulta na formação do radical hidroxila pelo processo de radiólise da água (GASPARRI, 2005). A reação do radical superóxido com peróxido de hidrogênio formando radical hidroxila através da reação de Haber-Weiss, segue abaixo:



A presença de íons de metais de transição funciona como um fator que promove a formação de radicais livres. À medida que mudam de um estado de valência para outro, esses íons podem perder ou ganhar um elétron (GASPARRI, 2005).

1.6.4. Peróxido de hidrogênio

Apesar de não ser um radical livre, por não possuir elétrons livres na última camada. O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que produz o OH^{\bullet} (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar membranas lipídicas podendo atingir alvos distantes do local de sua formação. Assim é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GASPARRI, 2005). O peróxido de hidrogênio é formado principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima *Sod.* (FRIDOVICH, 1998; GASPARRI, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A industrialização é reconhecida como um marco da civilização. No entanto, os poluentes industriais vêm afetando negativamente o meio ambiente. Nas últimas décadas, a concentração de metais pesados no ambiente tem sido claramente evidenciada. Eventualmente, altas concentrações de metais tóxicos podem se acumular em produtos agrícolas cultivados em solos contaminados, fato preocupante em razão dos efeitos nocivos dos metais à saúde humana. O cádmio é um metal pesado extremamente tóxico para os sistemas biológicos. Sua utilização tem sido crescente, sendo empregado na produção de baterias, pigmentos para tintas, revestimentos, estabilizadores de PVC e outros usos.

Os métodos convencionais de tratamento de efluentes não são eficazes e/ou apresentam custo elevados quando empregados em meio líquidos diluídos, ou seja, cuja concentração de metal é inferior a 100 mg.L^{-1} , por isso novas alternativas como a biorremediação que utiliza materiais biológicos ou organismos como bactérias, fungos, plantas e leveduras têm sido muito estudadas. Leveduras podem ser utilizadas para incorporar metais provenientes de efluentes líquidos de diversos setores indústrias tais como mineração e metalurgia.

Para que o processo de biorremediação seja viável é necessário que a matéria prima seja abundante de fácil obtenção e de baixo custo, por isso este projeto utilizou leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, dado que o Brasil gera grandes quantidades do microrganismo durante a produção de álcool e açúcar. Além da disponibilidade da matéria prima, é fundamental conhecer qual a capacidade da matéria prima em incorporar um dado metal, como esse metal atuará sobre o crescimento, a tolerância e a adaptação das células que a constituem.

A eficiência da metodologia usando biomassa de leveduras no processo de biorremediação tem sido amplamente estudada por diversos pesquisadores, demonstrando sua alta capacidade de bioabsorver metais pesados. Este trabalho tem por objetivo estudar a capacidade de incorporação de cádmio por linhagens de leveduras isoladas da fermentação da cachaça e os processos bioquímicos associados à presença deste metal nas células. Entender o comportamento bioquímico das leveduras pode contribuir para se conhecer melhor a origem da capacidade de acúmulo que as leveduras possuem e suas possíveis aplicações em sistemas de biorremediação. Além disso, pode nos fornecer informações a respeito da resposta

adaptativa e sensibilidade das linhagens frente os efeitos intracelulares decorrentes da exposição ao cádmio.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade de incorporação de cádmio por diferentes linhagens de *S. cerevisiae* isoladas da fermentação da cachaça, bem como o crescimento, a sobrevivência e a tolerância destas leveduras, na presença deste metal. Avaliar ainda os mecanismos bioquímicos usados pelas células de levedura para se adaptarem à presença de Cd^{2+} , metal que não tem nenhuma função biológica.

3.2. Objetivos específicos

Selecionar linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de alambiques para biorremediação e verificar:

- a influência da exposição a diferentes concentrações de cloreto de cádmio sobre o crescimento celular em meio líquido;
- a sobrevivência das linhagens estudadas em meio sólido contendo CdCl_2 ;
- a quantidade de cádmio incorporado pelas diferentes linhagens tanto por células viáveis quanto por células mortas;
- o efluxo de K^+ após a incorporação de Cd pelas leveduras;
- a quantidade de Cd incorporado pelas linhagens após incorporação de selênio;
- a presença do cádmio na superfície celular;
- a influência do cádmio na peroxidação de lipídeos;
- os níveis de resíduos sulfidrílicos totais na presença de cádmio;
- o “status” antioxidante de cada linhagem.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagens de leveduras

Nesse trabalho foram utilizadas 11 linhagens de *S. cerevisiae* (FIG.10), sendo 10 isoladas de destilarias produtoras de cachaça de Minas Gerais, e uma linhagem de origem laboratorial (W303-WT) para efeito de comparação. A escolha destas dez leveduras foi resultado do reconhecimento do grande volume de cachaça produzida pelas destilarias (das quais as leveduras foram isoladas) e conseqüentemente a abundante produção de biomassa como produto deste processo. Toda metodologia de coleta, isolamento e identificação das leveduras esta descrita em Moraes e colaboradores (1997) e Pataro e colaboradores (2000). As leveduras foram obtidas da coleção do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. A TAB.01 mostra a procedências destas linhagens.

TABELA 01. Procedência das leveduras utilizadas nesse estudo.

Linhagem	Destilaria	Cidade	Região
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 829	Velha Aroeira	Viçosa	Zona da Mata
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 905	Germana	Nova União	Zona Metalúrgica
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 1003	Seleta Boazinha	Salinas	Jequitinhonha
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 1007	Seleta Boazinha	Salinas	Jequitinhonha
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 1011	Seleta Boazinha	Salinas	Jequitinhonha
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 1386	Brumado Velho	Brumado Velho	Zona Metalúrgica
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 2097	Seleta Boazinha	Salinas	Jequitinhonha
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 2255	Rainha do Vale	Moeda	Zona Metalúrgica
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 2382	Gotas de Minas	Ouro Preto	Zona Metalúrgica
<i>S. cerevisiae</i> UFMGA 2464	Seleta Boazinha	Salinas	Jequitinhonha
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A (WT)	Laboratorial	-	-

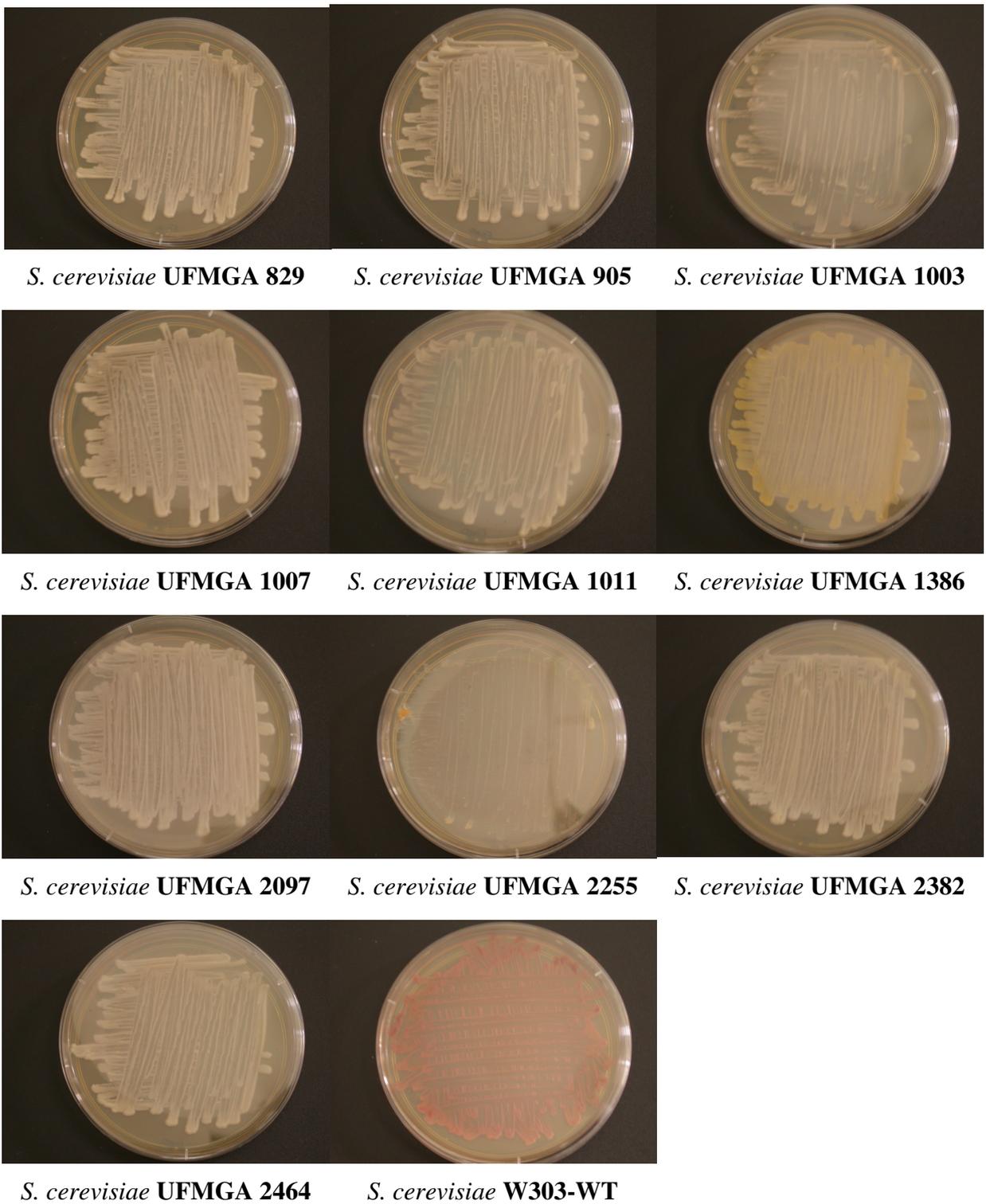


FIGURA 10. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

4.2. Manutenção das leveduras no laboratório

A manutenção das leveduras foi realizada através de três técnicas diferentes de preservação de culturas em laboratório:

- Armazenamento das células em óleo mineral em geladeira:

As leveduras foram preservadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, Na₂HPO₄ 0,2% e ágar 2%) em tubos de ensaio, sendo incubadas a 30°C por 48 horas, acrescentando-se à superfície da cultura óleo mineral esterilizado. Os tubos foram estocados a 4°C.

- Manutenção em placa de petri:

As leveduras foram mantidas em placa de petri contendo meio sólido de YPG (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% de ágar), repicadas periodicamente, a partir do estoque original mantido em tubo inclinado com óleo mineral. As placas foram também armazenadas a 4°C.

- Manutenção em meio glicerol:

As linhagens foram pré-crecidas em meio YPG, sob agitação, a 30°C, coletadas em fase estacionária por centrifugação e ressuspensas em meio contendo 1% de extrato de leveduras, 2% peptona, 30% glicerol. Um mililitro deste meio contendo as células foi transferido para tubos criogênicos e estocado em freezer a -70°C.

4.3. Meio de cultura

O crescimento das células para a realização dos experimentos abaixo descritos foi realizado em caldo YPG.

4.4. Determinação de cádmio incorporado por células de *S. cerevisiae*

Foi utilizada a análise por ativação neutrônica para determinação do cádmio incorporado pelas células. A análise por ativação neutrônica tem sido reconhecida como uma das mais importantes ferramentas analíticas na determinação da composição química elementar em teores de traços. A técnica tem como princípio a indução de radioatividade artificial, em uma amostra, através da irradiação com nêutrons e posterior medida da atividade induzida mediante a detecção da radiação gama. Os fenômenos físicos nos quais está fundamentada esta análise são as propriedades do núcleo, radioatividade e a interação da

radiação com a matéria, via reação de nêutrons-gama (n, γ). Os raios gama emitidos, denominados de raios gama de decaimento, possuem energias que são características de cada radionuclídeo. Assim, quando detectados por espectroscopia gama, podem ser utilizados para identificar e quantificar os elementos químicos presentes em uma amostra.

A técnica tem capacidade de análise de matrizes no estado sólido, líquido e gasoso: a reação nuclear (n, γ) independe do estado físico da matriz. O método pode ser aplicado a qualquer amostra, é não-destrutivo e a amostra não é visivelmente ou quimicamente alterada.

A ativação neutrônica é realizada em reatores de pesquisa ou em fonte de nêutrons. No Brasil, apenas dois Centros de Pesquisa realizam a ativação neutrônica em reatores de pesquisa. O Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte e o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em São Paulo, ambos pertencentes à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

As análises foram realizadas no CDTN/CNEN utilizando o reator TRIGA MARK I IPR-R1 fabricado pela GULF GENERAL ATOMIC, dotado de mesa giratória e dispositivo de irradiação especialmente apropriado para esta técnica analítica. O reator opera a uma potência de 100 kW e, nesta potência, o fluxo de nêutrons térmicos atinge um valor médio de $6,69 \times 10^{11}$ nêutrons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. A meia-vida do ^{115}Cd é de 12,2 dias. Após a irradiação, as amostras são submetidas à espectrometria gama para a análise do(s) radionuclídeo(s) de interesse (MENEZES & JACIMOVIC, 2006).

4.5. Preparação das amostras para determinação do cádmio incorporado

As células foram pré-incubadas a uma temperatura de 30°C, agitadas a 160 rpm por um período de 24 horas, em meio líquido YPG. Após este período, o meio foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante descartado e as células transferidas para novo meio por um período de 4 horas, para obtenção de células em fase exponencial de crescimento. A fase exponencial do crescimento foi constatada pela presença de glicose no meio, através do uso de fitas indicadoras de glicose na urina (UROFITA G – Biobrás Diagnóstico).

4.5.1 Incorporação de cádmio por células viáveis

Após realização do item 4.5, as células foram incubadas em meio YPG na condição controle (ausência de cádmio) e em meio acrescido da concentração de 100 mg.L^{-1} (0,5 mM)

de cloreto de cádmio a 30°C, sob agitação a 160 rpm, durante 24 horas. O cloreto de cádmio foi autoclavado isoladamente, em solução aquosa concentrada e, adicionado ao meio YPG.

4.5.2 Incorporação de cádmio por células não-viáveis (mortas)

Após realização do item 4.5, as células foram inativadas por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e então incubadas em meio YPG, na condição controle (ausência de cádmio) e acrescido da concentração de 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de cloreto de cádmio, a 30°C, sob agitação a 160rpm, durante período de 24 horas.

4.5.3. Incorporação de cádmio após o enriquecimento da célula com selênio

Após realização do item 4.5, as células foram incubadas em meio YPG, na condição controle (ausência de selênio) e em meio acrescido de 200 mg.L⁻¹ de selenito de sódio (Na₂SeO₃), a 30°C, sob agitação a 160 rpm, durante 24 horas. Após tempo previamente determinado, as células foram mortas por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e então incubadas com 100 mg.L⁻¹ de cloreto de cádmio a 30°C, sob agitação a 160 rpm, durante 24horas. O selenito de sódio foi adicionado de uma solução estoque preparada em água e autoclavada separadamente.

4.6. Preparação das amostras para ativação neutrônica

Após a realização dos itens 4.5.1, 4.5.2 e 4.5.3, as células foram coletadas por filtração a vácuo usando filtros de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro e transferidas para tubos apropriados para análise por ativação neutrônica. Os tubos permaneceram por três dias a 70°C. Após este período de evaporação da água presente no material, as amostras foram pesadas para determinação do peso seco e enviadas ao Reator Triga (CDTN/CNEN) para irradiação. A irradiação foi realizada durante 8 horas, nas condições do reator especificadas anteriormente. Posteriormente, as amostras foram submetidas à espectrometria gama, os picos característicos do cádmio foram determinados e usados para a quantificação do metal presente na célula. Os valores são expressos em µg de Cd incorporado/grama de peso seco.

4.7. Determinação da bioabsorção de cádmio por células de *S. cerevisiae*

As células da linhagem laboratorial foram pré-incubadas a uma temperatura de 30°C, agitadas a 160 rpm por um período de 24 horas em meio líquido YPG. Após este período, as culturas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos para obtenção de células mortas. As células foram lavadas, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e incubadas com NaOH 5%, por 2 horas. A biomassa foi então lavada diversas vezes com água estéril (até que o pH determinado por fita colorimétrica atingisse 7,0-7,5), sendo transferida para estufa a 70°C por 48 horas, para obtenção de peso seco. As células foram trituradas em graal, passadas por tratamento granulométrico (fração de 24 Mesh). Amostras de 0,25 g foram transferidas para frascos Erlenmeyer e incubadas com 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de cloreto de cádmio por 2 horas, a 160 rpm. Após o tempo de incubação uma amostra de 15mL foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos em tubos falcons estéreis, e do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 10mL para dosagem por espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN AA240FS) do cádmio presente no meio.

4.8. Curva de crescimento

Para realização das curvas de crescimento das linhagens, um pré-inóculo foi crescido por cerca de 30 horas a 30°C e 160 rpm, em meio YPG. Após este período, verificou-se a densidade óptica da cultura em espectrofotômetro a 600 nm. Os experimentos foram iniciados com uma D.O. de 0,15. Nos tempos pré-estabelecidos (0, 3, 6, 24, 48 e 72h), uma alíquota, usualmente de 100 µL, foi retirada e diluída em 900 µL de água destilada estéril. O crescimento foi determinado pela medida da turbidez da suspensão a 600 nm, em espectrofotômetro. Caso necessário, foram feitas diluições em água para registro da turbidez.

4.9. Tolerância ao cádmio

A análise de sobrevivência das células ao cloreto de cádmio foi feita por plaqueamento em meio ágar YPG. Foram preparados pré-inóculos das linhagens em meio YPG. Após 48 horas de crescimento celular, contou-se o número de células, com uso da câmara de Neubauer. Foram coletados 100 µL de cada pré-inóculo e, realizadas diluições sucessivas em água destilada estéril, obtendo-se assim as concentrações 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³

células/mL. Em seguida, inocularam-se 5 μ L de cada suspensão em placas contendo YPG sólido adicionado de 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) cloreto de cádmio e na ausência do metal, como controle. Após 72 horas de incubação a 30°C, as placas foram fotografadas.

4.10. Preparo das amostras para análise do estresse por cloreto de cádmio

As células foram pré-incubadas a uma temperatura de 30°C, a 160 rpm por um período de 24 horas, em meio líquido YPG. Após este período, o meio foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante descartado e as células transferidas para novo meio YPG por um período de 4 horas, para obtenção de células em fase exponencial de crescimento. As células foram então incubadas em meio YPG, na condição controle e acrescido da concentração de 100 mg.L^{-1} de cloreto de cádmio a 30°C e a 160 rpm, durante período de 24 horas, sendo coletadas por filtração a vácuo usando filtros de nitrocelulose de 0,45 μm de porosidade e 47 mm de diâmetro. O pellet foi removido do filtro com espátula e transferido para papel alumínio, congelado em nitrogênio líquido e estocados em freezer -20°C para as posteriores determinações experimentais.

4.11. Obtenção de extratos celulares

Após a realização da incubação descrita no item 4.10, as células (condição controle e adicionadas de 100 mg.L^{-1}) foram ressuspendidas em tampão de lise (Tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), adicionando-se, a seguir, pérolas de vidro. O rompimento das células foi realizado por seis ciclos de 30 segundos de agitação vigorosa em vórtex, intercalados com períodos de repouso em gelo. Após a lise celular, centrifugou-se a suspensão a 3000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado realização das dosagens de interesse.

4.12. Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico dos extratos brutos de cada amostra foi determinado de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma solução de soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

4.13. Determinação de cádmio na superfície celular

A presença de metal na superfície celular foi determinada através da técnica de espectrometria por dispersão de energia (do inglês, Energy Dispersive Spectrometry – EDS). O equipamento (JEOL JXA 8900 RL) consiste de um detector, uma fonte polarizadora de alta-voltagem para o detector, um amplificador, um analisador multicanal, um reservatório de nitrogênio e uma fonte de força. Este sistema proporciona análises rápidas, precisas e não destrutivas de elementos químicos presentes nas amostras que estão sendo analisadas.

Após a realização do procedimento descrito no item 4.10, as células foram mantidas por três dias a 70°C para obtenção do peso seco e enviadas ao Laboratório de Microanálise do Instituto de Ciências Exatas (ICEX/UFMG), para determinação do cádmio presente na superfície celular.

4.14. Peroxidação de lipídeos

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método TBARS (do inglês thiobarbituric acid reactive species), ou substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico descrito por Howlett e Avery (1997a; 1997b) e adaptado por Costa-Moreira (2007). Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados de acordo com a quantificação das substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são compostas de diversos produtos finais de baixo peso molecular formados via decomposição de certos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica. A análise da quantidade de TBARS é utilizada como um índice de estresse oxidativo. Para o cálculo, utilizou-se uma curva padrão de malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica.

Os extratos celulares foram preparados de acordo com item 4.11. Ao sobrenadante previamente separado adicionou-se ácido tricloroacético (TCA concentração final de 10%) e a suspensão permaneceu em gelo durante 30 minutos. Após este período, a mistura foi centrifugada 3000 rpm por 5 minutos. A uma alíquota de 600 µL do sobrenadante, adicionou-se a solução de TBA (0,5% de ácido tiobarbitúrico preparado em TCA 20%), aquecendo-se a mistura a 100°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas imediatamente em gelo. Ao final, a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 532 nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600 nm.

O índice de peroxidação lipídica foi expresso em picomoles de malondialdeído (produto da reação) por miligrama de proteína por mL (pmoles MDA/mg proteína/mL).

4.15. Resíduos Sulfidrílicos Totais

Os resíduos sulfidrílicos totais foram determinados pelos métodos de Ellman (1959) e Davidson e colaboradores (2001), adaptado por Costa-Moreira, (2007), usando 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) - DTNB. Na presença do grupamento tiol livre, a solução de DTNB forma 5-tio-2-nitrobenzoato, produzindo uma coloração amarela característica que pode ser determinada espectrofotometricamente a 412 nm.

Os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 4.11. Utilizou-se 0,5 mg de proteína diluída em tampão 0,1 M de fosfato de sódio com pH 7,0. Retiraram-se 200 μ L de cada preparação, aos quais foram adicionados 0,01 M de tampão fosfato de sódio, p.H. 8,0 e 7 μ L de reagente Ellman (0,04 g de DTNB em tampão de fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0). A absorbância foi determinada a 412 nm após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. O coeficiente de extinção molar para o DTNB é $13.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, sendo utilizado para determinar a concentração de resíduos sulfidrílicos totais. Os resultados foram expressos em micromoles de resíduos sulfidrílicos por miligrama de proteína por mL ($\mu\text{mol/mg}$ proteína/mL)

4.16. Determinação do status antioxidante total pelo radical DPPH[•]

A determinação da capacidade antioxidante total das linhagens foi realizada a partir dos métodos adaptados de Dordevic e colaboradores (2006) e Jayaprakasha e colaboradores (2007), adaptado por Costa-Moreira (2007). O método consiste na utilização de uma solução metanólica do radical livre estável DPPH[•]. A solução de DPPH[•] apresenta uma cor púrpura forte, com uma absorção máxima de 517 nm, que perde a cor quando um antioxidante está presente no meio. Desta maneira, as moléculas antioxidantes podem se ligar ao radical DPPH[•] modificando a cor, resultando em uma diminuição da absorbância. Portanto, quanto maior a diminuição na absorbância, maior é a capacidade antioxidante do extrato.

Os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 4.11. Foram utilizados 2 mg de proteína/mL adicionando-se 400 μ L de 0,1 mM de DPPH[•] dissolvido em 10 mL de metanol. A preparação foi agitada vigorosamente e, mantida no escuro por 30 minutos a

temperatura ambiente. A leitura foi feita usando 1000 µL do sobrenadante. A absorbância controle foi determinada usando DPPH• 0,1mM em solução metanólica diluído em 4000 µL de metanol.

A inibição do radical DPPH• foi calculada utilizando-se a equação:

$$\text{Inibição} = 100 \times \frac{(\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância das amostras})}{\text{Absorbância controle}}$$

4.17. Descarte de Rejeitos

Todos os meios de cultivo contendo cádmio, após processamento, foram estocados no laboratório, em bombonas plásticas acondicionadas dentro de caixas plásticas, com etiquetas identificando resíduo químico contendo cádmio. Quando repletas, as bombonas foram enviadas ao Serviço de Gerência de Rejeitos do CDTN, onde são estocadas até a destinação final do rejeito.

4.18. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos diferentes. A diferença estatística dos resultados foi realizada utilizando teste t de Student e One-Way ANOVA com níveis de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Determinação da incorporado de cádmio por células viáveis e não viáveis de *S. cerevisiae*

Segundo Brennan e Schiestl, (1996) e Nagy e colaboradores, (2006) o cádmio por ser um metal não essencial não possui nenhuma função fisiológica em leveduras e outros organismos, o que foi comprovado pelo resultado mostrado na FIG.11, onde o metal em questão não foi detectado em células controle.

Células viáveis de todas as leveduras acumularam cádmio (TAB.02), processo conhecido como bioacumulação. As linhagens UFMG-A905, UFMG-A1003, UFMG-A1007, UFMG-A1011, UFMG-A2097, UFMG-A2255 e UFMG-A2464 incorporam respectivamente 122%, 48%, 241%, 283%, 140%, 33%, 83% mais cádmio que a linhagem de laboratório. Wang e Chen, (2006) relatam que podem existir diferenças de bioacumulação de metais por microrganismos e que isso ocorre pela diferença na expressão dos genes que estão envolvidos diretamente ou indiretamente no transporte ou captação de íons metálicos. As leveduras UFMG-A829 e UFMG-A2382 não apresentaram diferença significativa de bioacumulação de cádmio em relação à linhagem W303-WT, enquanto que a linhagem UFMG-A1386 acumulou 30% menos cádmio. Em estudos realizados por Costa-Moreira (2007), linhagens de *S. cerevisiae* de origem laboratorial bioacumularam quantidades diferentes de cádmio quando expostas à mesma concentração do metal.

Os dados apresentados na TAB.03 mostram que todas as linhagens possuem a capacidade de incorporar cádmio por bioissorção, ou seja, células não-viáveis (mortas) foram utilizadas na captação de metal. As linhagens UFMG-A829, UFMG-A905 e UFMG-A1003 apresentaram capacidade de bioissorção significativamente mais elevadas do que a linhagem W303-WT, retendo respectivamente 41%, 23%, 34% mais cádmio do que a linhagem de referência. A linhagem UFMG-A1386 incorporou 18% menos cádmio que a linhagem laboratorial. Nenhuma das demais leveduras estudadas apresentou diferença estatística significativa de captação de cádmio em relação à incorporação da linhagem de laboratório. Segundo Volesky, (1990b) e Kapoor e Viraraghavan, (1995), células mortas de *S. cerevisiae* são capaz de adsorver quantidades significativas de cádmio de soluções aquosas. A aplicação de biomassa morta na indústria oferece certamente vantagens sobre o uso de células vivas, pois sistemas que utilizam biomassa viável são mais sensíveis a fatores como: a toxicidade do

metal, pH e temperatura. Biomassa morta pode ser obtida de fontes industriais como subproduto do processo fermentativo.

Ao compararmos os processos de bioacumulação e biossorção (FIG.12), constata-se que as células incorporam quantidades diferentes de metal conforme o processo testado. As leveduras UFMG-A1011 e UFMG-A1007 incorporam significativamente mais cádmio quando vivas, enquanto que as linhagens, W303-WT, UFMG-A1003, UFMG-A1386, UFMG-A2255, UFMG-A2382 e UFMG-A2464 captaram mais cádmio quando mortas. Três linhagens, UFMG-A 829, UFMG-A905 e UFMG-A2097 removem a mesma quantidade do metal por células viáveis e não-viáveis. A capacidade biossortiva de células mortas de leveduras pode ser maior, equivalente ou menor do que de células vivas (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995).

Costa-Moreira (2007) observou aumento da incorporação de cádmio usando células vivas de *S. cerevisiae* W303-WT, *nth1* e *tps1*, quando comparadas a células mortas por autoclavagem. Muito provavelmente a diminuição na incorporação de cádmio em células autoclavadas ocorre devido aos seguintes fatores: em células mortas a incorporação ocorre somente na superfície celular, dada a dificuldade de penetração do metal causada pelos danos aos complexos celulares responsáveis pelo transporte; os sítios de adsorção podem ter sido desnaturados, durante a exposição à alta temperatura durante o processo de autoclavagem.

Del Rio (2004) demonstrou que existe uma diferença significativa nas quantidades de cádmio acumulado entre biomassa morta e viva, ocorrendo em média uma redução de 20% na quantidade de cádmio seqüestrado pela biomassa viva. A capacidade de biossorção reduzida na biomassa viva, comparativamente à biomassa morta, demonstra a importância da membrana celular, que neste caso permaneceu intacta e permeável seletivamente, dificultando a entrada de soluto e dos íons cádmio, mantendo assim os gradientes de concentração e dificultando a entrada do metal (BRADY & DUNCAN, 1994; VOLESKY & HOLAN, 1995; ADAMIS *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados evidenciam aspectos importantes da biorremediação de cádmio por *S. cerevisiae*, sugerindo a biomassa morta como matéria prima mais indicada para aplicação na prática, uma vez que alia maior capacidade de captação do metal (resultado obtido em seis das onze leveduras testadas) com a ausência de sensibilidade celular, excluindo assim qualquer interferência metabólica e fisiológica no processo. Entretanto, células viáveis de UFMG-A1007 e UFMG-A1011 incorporaram respectivamente 80% e 95% mais cádmio, devendo ser selecionadas para o processo, dada a expressiva captação de metal e a grande

diferença de incorporação em relação à biomassa morta. Estas duas linhagens foram as mais eficientes na remoção de metal do meio líquido.

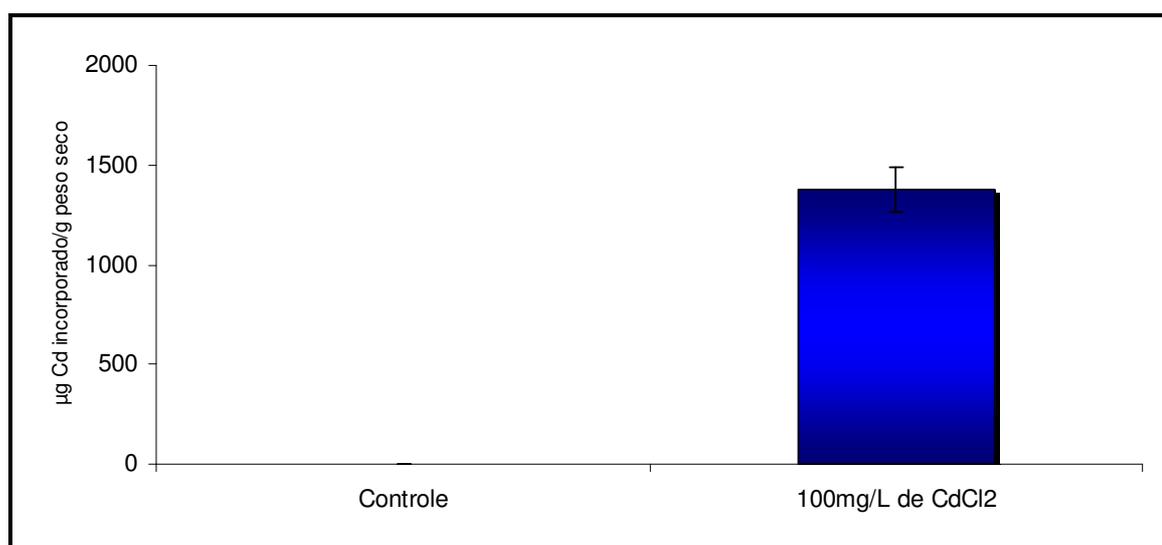


FIGURA 11. Determinação de cádmio em células de *S.cerevisiae* W303-WT, controle e expostas a 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de CdCl₂.

TABELA 02. Incorporação de cádmio por bioacumulação durante 24 horas de exposição ao metal.

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Células expostas ao cádmio ($\mu\text{g Cd incorporado/g peso seco}$)
W303-WT	1377 ^(a) \pm 108 ^(b)
UFMG-A 829	2600 \pm 666
UFMG-A 905	3067 \pm 666 ^c
UFMG-A 1003	2033 \pm 289 ^c
UFMG-A 1007	4700 \pm 700 ^c
UFMG-A 1011	5367 \pm 751 ^c
UFMG-A 1386	967 \pm 252 ^c
UFMG-A 2097	3300 \pm 458 ^c
UFMG-A 2255	1833 \pm 252 ^c
UFMG-A 2382	1367 \pm 58
UFMG-A 2464	2533 \pm 58 ^c

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação à linhagem laboratorial ($P < 0,05$)

TABELA 03. Incorporação de cádmio por bioacumulação durante 24 horas de exposição ao metal.

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Células expostas ao cádmio ($\mu\text{g Cd incorporado/g peso seco}$)
W303-WT	2433 ^(a) \pm 58 ^(b)
UFMG-A 829	3433 \pm 351 ^c
UFMG-A 905	3000 \pm 173 ^c
UFMG-A 1003	3267 \pm 351 ^c
UFMG-A 1007	2600 \pm 200
UFMG-A 1011	2700 \pm 0
UFMG-A 1386	2000 \pm 100 ^c
UFMG-A 2097	2967 \pm 473
UFMG-A 2255	2367 \pm 321
UFMG-A 2382	2233 \pm 58
UFMG-A 2464	3200 \pm 200

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação à linhagem laboratorial ($P < 0,05$)

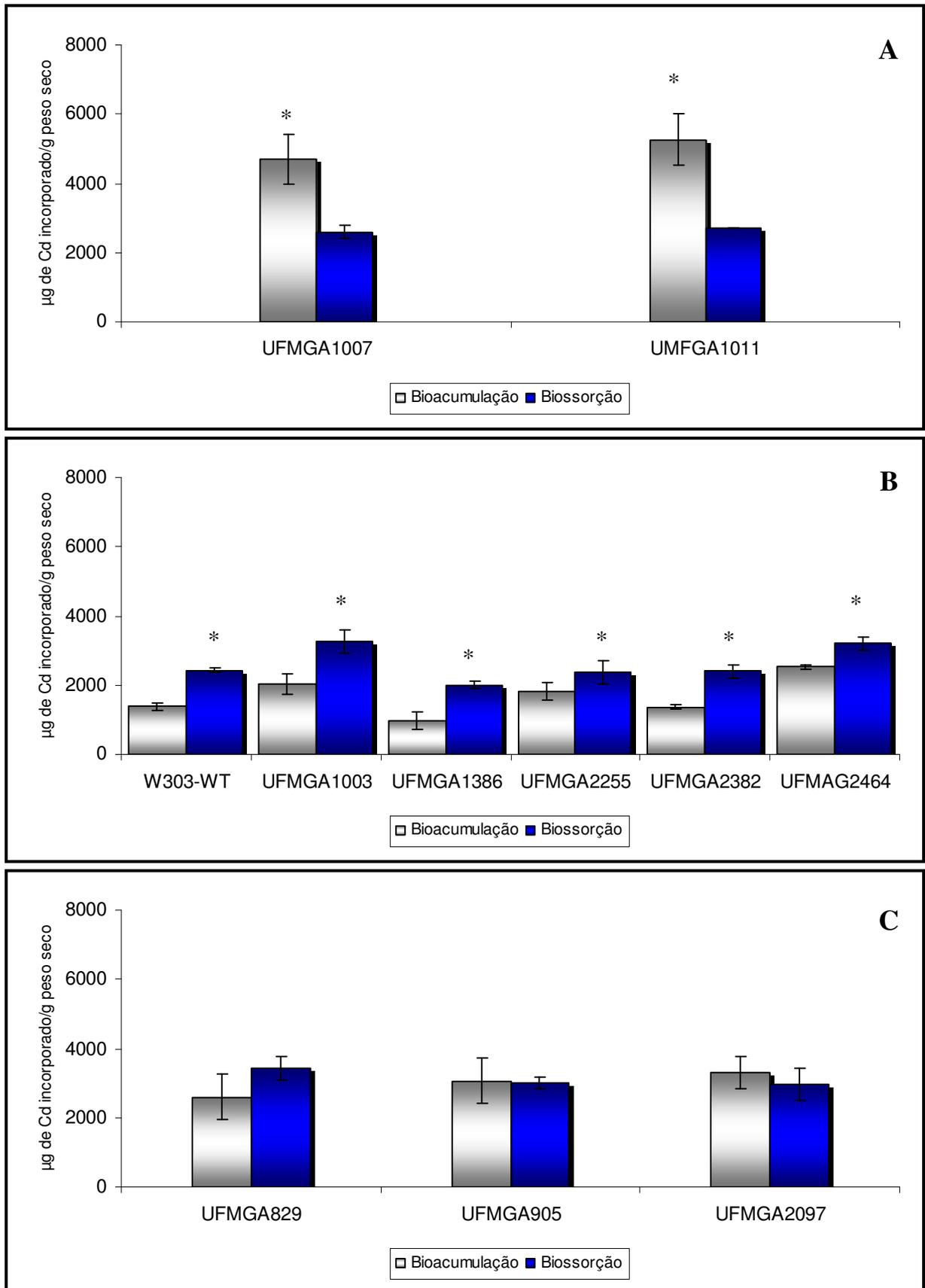


FIGURA 12. Determinação de cádmio incorporado por células viáveis e não viáveis no período de 24 horas. Bioacumulação > Biossorção (A), Biossorção > Bioacumulação (B) e Bioacumulação = Biossorção (C), * $P < 0,05$.

5.2. Determinação de cádmio incorporado após tratamento com selênio

Após a realização dos experimentos de bioissorção, decidimos verificar a influência de selênio na incorporação de cádmio. Os experimentos foram realizados nas leveduras cujas células não-viáveis apresentaram diferença significativa de incorporação de cádmio em relação à linhagem laboratorial.

As culturas após acumularem selênio do meio, apresentavam forte cor vermelha provavelmente pela síntese de compostos, estimulada pela presença deste metal. Entretanto não observou diferença de coloração na cultura de UFMG-A1003, sugerindo que esta linhagem não responde metabolicamente à bioacumulação de selênio (FIG.13).

Os resultados apresentados na FIG.14 mostram que as leveduras W303-WT, UFMG-A905, UFMG-A829 e UFMG-A1386 aumentaram respectivamente 50%, 53%, 47% e 116% a incorporação de cádmio após o tratamento com selênio. Nakajima (2000), utilizando a ativação neutrônica como instrumento de análise, obteve resultados semelhantes na captação de urânio por células de *S. cerevisiae* e *Candida utilis* previamente tratadas com selênio, aumentando em 98% a captação do radionuclídeo. Czauderna e colaboradores (1992) reportaram que o acúmulo de urânio por *S. cerevisiae* é maior quando óxido de selênio (SeO_2) está presente no meio. Acreditamos que o aumento na bioissorção de metais pelas células seja ocasionado pela síntese de biomoléculas dependentes de selênio, como as selenoproteínas Selonolantioninas e Se-Adenosilselenohomocisteína reportadas em *S. cerevisiae* (REZANKA & SIGLER, 2007), que por sua vez possuem em suas estruturas grupos funcionais capazes de adsorver íons.

Ressalta-se que a linhagem UFMG-A1003 (que aparentemente não sofreu alteração metabólica), não apresentou diferença significativa na captação de cádmio após tratamento com selênio.

Dados experimentais indicam que as alterações metabólicas e estruturais provocadas pela bioacumulação de selênio possibilitam um acréscimo significativo na capacidade de bioissorção de cádmio por células de leveduras, representando uma alternativa atrativa para a utilização desta matéria prima pré-tratada no processo de biorremediação.

Srivastava e colaboradores (2009) testaram o efeito antioxidante e prooxidante do selênio na captação e hiperacumulação de arsênico por *Pteris vittata* L. Czauderna e colaboradores (1992; 1994) investigaram o efeito do selênio na acumulação de metais pesados tais como mercúrio, zinco e radionuclídeos como urânio por *S. cerevisiae*. Nakajima, (2000) comparou em bactérias, actinomicetos, fungos e leveduras os níveis de urânio incorporado por

células intactas e carregadas com o metal. Têm sido observados efeitos benéficos do selênio em várias espécies de microrganismos após exposição ao cádmio e prata. Os danos oxidativos causados pelos metais pesados em fungos e leveduras são amplamente estudados, demonstrando que selênio está envolvido no metabolismo de defesa (SERAFÍN-MUÑOZ *et al*, 2007). Segundo Araúzs e colaboradores (2008), este metal em concentrações ideais pode ser considerado um antioxidante e/ou um metal pesado antagonista.

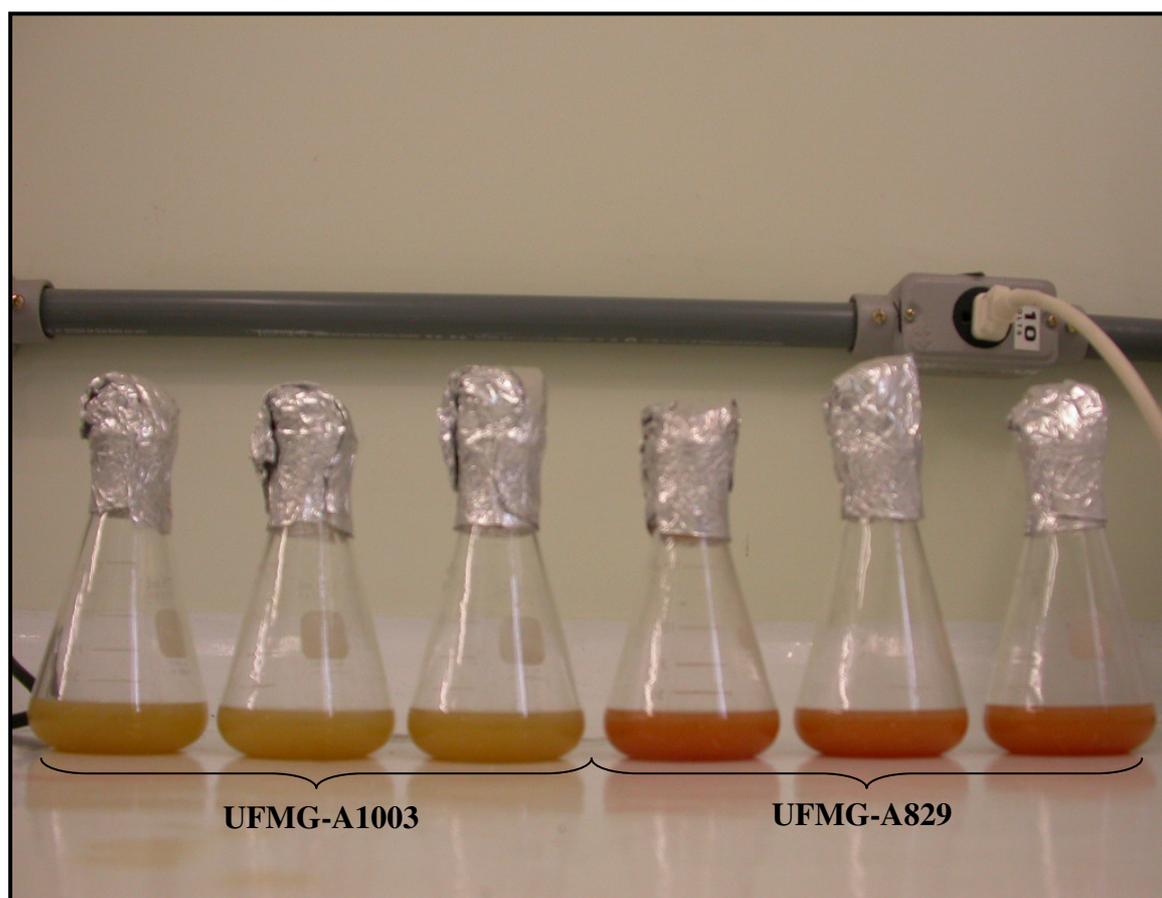


FIGURA 13. Intensa coloração vermelha da cultura após incorporação de selênio. Culturas tratadas com selenito de sódio. A linhagem UFMG-A1003 foi a única que não apresentou diferença de coloração após exposição ao selênio.

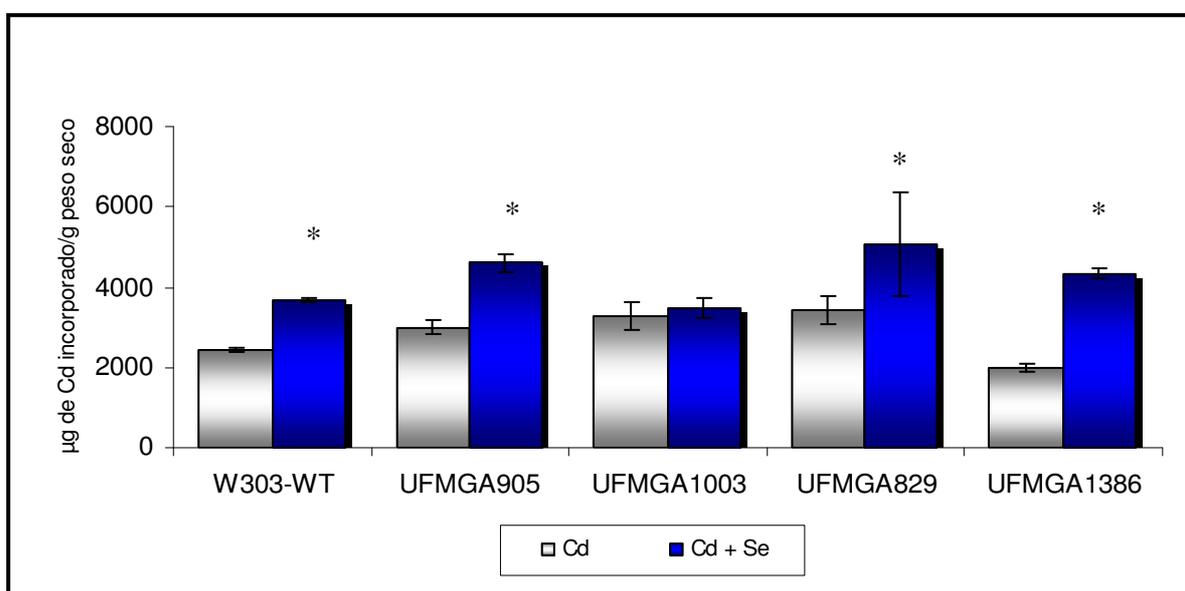


FIGURA 14. Biossorção de cádmio após tratamento das linhagens com selênio, * $P < 0,05$.

5.3. Determinação do efluxo de íons potássio após incorporação de cádmio

Analisando os resultados apresentados na TAB.04, observa-se que o efluxo de íons potássio está intimamente relacionado com a incorporação de cádmio. Praticamente todas as linhagens de levedura (W303-WT, UFMG-A829, UFMG-A905, UFMG-A1003, UFMG-A1007 e UFMG-A1011, UFMG-A1386, UFMG-A2097, UFMG-A2382 e UFMG-A2464) perderam K^+ de forma significativa na presença de cádmio. No entanto, essa perda não foi proporcional à quantidade de cádmio incorporado. Isto pode ser explicado pela diferença na síntese de canais e transportadores do íon pelas leveduras. Exposição de *S. cerevisiae* a concentrações tóxicas de Cd^{2+} geralmente resulta na permeabilização da membrana plasmática, que é prontamente detectada com uma rápida e não estequiométrica perda de K^+ celular (HOWLETT & AVERY, 1997b). Dentre as linhagens estudadas, a laboratorial apresentou o maior efluxo de potássio, demonstrando ser mais susceptível à perda da homeostase após exposição ao Cd^{2+} . A levedura UFMG-A2255 não apresentou diferença de potássio nas células controle e expostas ao cádmio. Howlett & Avery (1997a) relatam grande perda do íon (K^+) por células de *S. cerevisiae* expostas a 50 e 100 μM de $Cd(NO_3)_2$.

A captação de metais por *S. cerevisiae* é geralmente acompanhada pelo efluxo de K^+ representando uma parte integral do mecanismo fisiológico para manutenção do balanço iônico, mas pode ser também um sinal de ruptura da membrana e morte celular (SUH *et al.*, 1999). Tem sido amplamente reportado em *S. cerevisiae* que cádmio e cobre induzem a permeabilização da membrana plasmática, levando ao efluxo de K^+ (HOWLETT & AVERY, 1997a).

O íon potássio (K^+) é necessário para diversas funções fisiológicas (regulação do volume celular e do pH intracelular, síntese de proteína e ativação enzimática), sendo acumulado nas células em alta concentração. Para manter a concentração intracelular ótima de potássio, a célula emprega três estratégias distintas: 1) restrição e seleção no influxo de cátions alcalinos, 2) eficiente efluxo de cátions tóxicos e 3) compartimentalização seletiva de cátions em organelas (SYCHROVÁ, 2004). Dois transportadores ativos (Trk1p e Trk2p) e dois canais (Tok1p e Nsc1p) asseguram a captação de potássio em células de leveduras. Trk1p apresenta maior afinidade por potássio, assegurando um acúmulo eficiente desse íon necessário para o crescimento e divisão celular (KO & GABER, 1991; BERTL *et al.*, 1998; BIHLER, 1998; SYCHROVÁ, 2004). A alta concentração de potássio em células de leveduras corresponde a um estado estável entre influxo e efluxo simultâneos através da

membrana plasmática, e esta circulação continua é necessária para a homeostase celular (LAPATHITIS & KOTYK, 1998; SYCHROVÁ, 2004).

TABELA 04. Quantidade de potássio em células controle e expostas a 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) de cloreto de cádmio por 24 horas.

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Controle ($\mu\text{g K}^+/\text{g}$ peso seco)	Células expostas ao cádmio ($\mu\text{g K}^+/\text{g}$ peso seco)
W303-WT	$18067^{(a)} \pm 1069^{(b)}$	11733 ± 58^c
UFMG-A 829	18800 ± 173	15400 ± 2227^c
UFMG-A 905	17000 ± 265	14400 ± 265^c
UFMG-A 1003	19800 ± 173	15233 ± 586^c
UFMG-A 1007	19550 ± 404	17333 ± 321^c
UFMG-A 1011	19467 ± 289	17767 ± 1650^c
UFMG-A 1386	11633 ± 153	7900 ± 1732^c
UFMG-A 2097	15733 ± 635	12867 ± 808^c
UFMG-A 2255	13733 ± 603	13767 ± 451
UFMG-A 2382	18367 ± 751	15300 ± 173^c
UFMG-A 2464	17700 ± 400	13000 ± 1825^c

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

5.4. Determinação de cádmio na superfície celular

A determinação de cádmio na superfície celular foi realizada através do uso de técnica de espectrometria por dispersão de energia (EDS), que permite analisar a superfície da amostra e determinar a presença ou não de cádmio na parede celular. A microanálise de feixe eletrônico é capaz de determinar a composição de materiais em volume de até no mínimo $1 \mu\text{m}^3$, aproximadamente. Park e colaboradores (2003) e Costa-Moreira (2007) utilizaram esta técnica para analisar a presença de cádmio na superfície celular de leveduras.

Os resultados apresentados na FIG.15 mostram que o cádmio está presente na superfície de células de *S. cerevisiae* W303-WT tratadas com 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) de cloreto de cádmio. Isto demonstra a capacidade do cádmio de se ligar a grupos funcionais presentes em estruturas da parede celular, comprovando, portanto, que leveduras podem incorporar metais por biossorção. Os mecanismos de remoção de metais pesados por microrganismos podem ocorrer por acumulação/precipitação extracelular, sorção/precipitação na superfície celular ou acumulação intracelular, de acordo com a localização do metal removido da solução (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997). Vale ressaltar que este experimento foi conduzido em células vivas que acumularam cádmio tanto por bioacumulação quanto por biossorção. Costa-Moreira (2007), trabalhando com 50 ppm (0,25 mM) de CdCl_2 , não constatou a presença de cádmio na superfície de células de *S.cerevisiae*, concluindo que nesta concentração as células são capazes de incorporar todo o metal e depositá-lo em seu interior. Porém ao utilizar 800 ppm (4 mM de CdCl_2) de foi possível evidenciar a presença do metal na superfície celular, fato também constatado neste trabalho. Park e colaboradores (2003), utilizando a mesma técnica de análise, relatam que existem diferenças marcantes na estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* ATCC834 que produz L-fenilacetilcarbinol e *S. cerevisiae* ATCC24858 usada na produção de etanol, pois apesar de constatar a presença de cádmio na superfície celular, essa foi distinta.

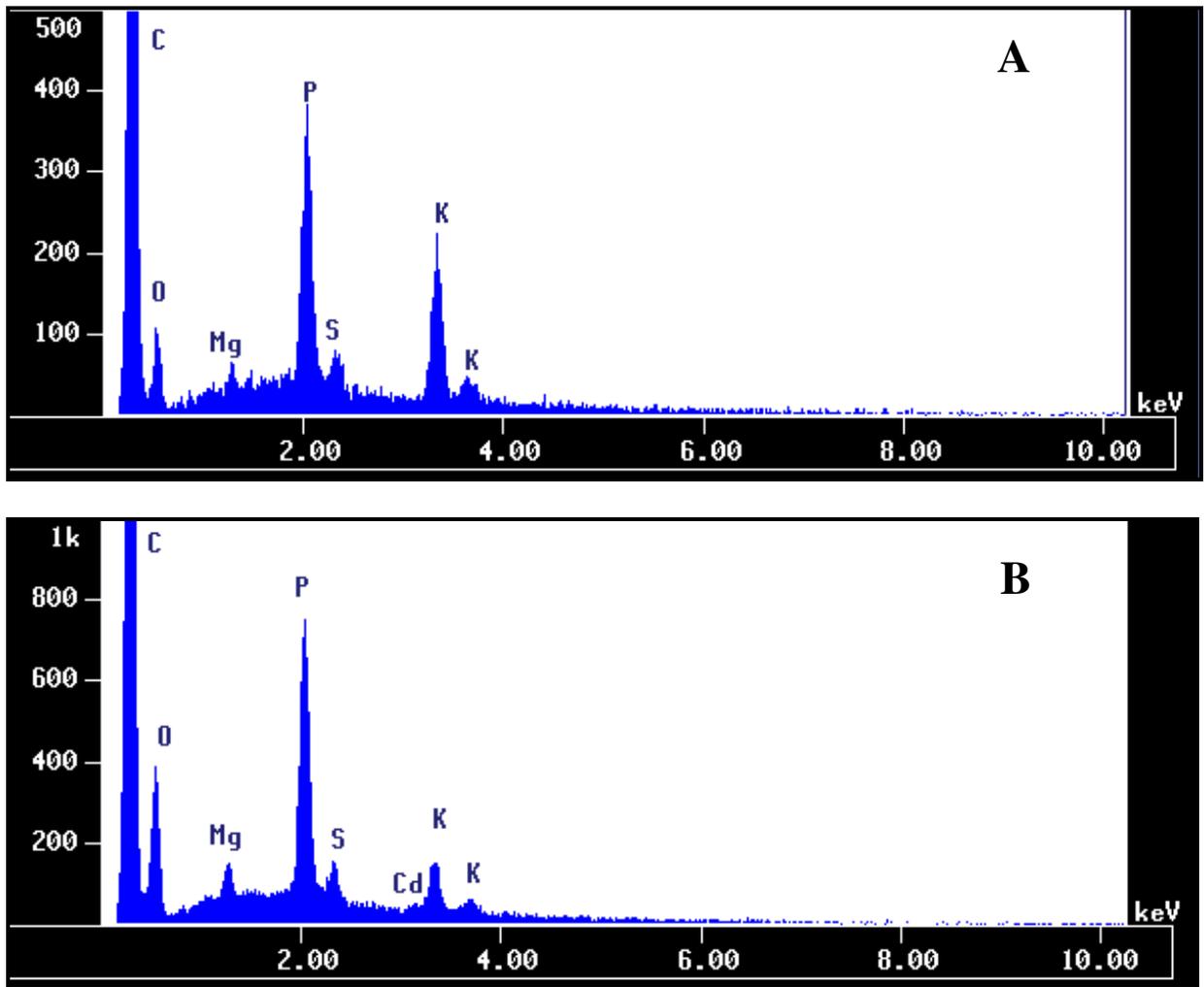


FIGURA 15. Determinação de cádmio na superfície celular de *S. cerevisiae* W303-WT. Controle (A) e 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de CdCl₂ (B). Foram analisadas áreas de 50x50 µm em todas as amostras.

5.5. Curva de crescimento e tolerância ao cádmio

Para avaliar o crescimento das células expostas ao cádmio, as linhagens foram submetidas a concentrações crescentes do metal em meio líquido. A tolerância das leveduras foi avaliada através do crescimento celular em placa com 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) de CdCl_2 .

A análise do crescimento das linhagens na presença de diferentes concentrações de cloreto de cádmio foi comparada com a situação controle em todos os experimentos. Conforme os resultados apresentados nas FIG. 16, 17, 18 e 19, todas as linhagens apresentaram na ausência de cádmio o perfil de crescimento esperado, ou seja, aumento do número de células à medida que o tempo progrediu. A adição de concentrações crescentes de cloreto de cádmio (25, 50 e 100 mg.L^{-1} ou 0,125, 0,25 e 0,5 mM) promoveu inibição ou redução no crescimento de todas as linhagens, comparativamente à situação controle, no período de tempo estudado (72 horas).

As leveduras isoladas da fermentação da cachaça tiveram crescimento consideravelmente maior que a linhagem laboratorial. Observa-se que todas as concentrações de cádmio testadas inibiram o crescimento celular da linhagem W303-WT, demonstrando a maior sensibilidade desta aos efeitos do cádmio. As linhagens UFMG-A1011 e UFMG-A2097 apresentaram crescimento na concentração de 25 mg.L^{-1} (0,125 mM) de cloreto de cádmio, sendo inibidas em concentrações superiores. As linhagens UFMG-A829, UFMG-A905, UFMG-A1007, UFMG-A2382 e UFMG-A2464, cresceram nas concentrações de 25 e 50 mg.L^{-1} (0,125 e 0,25 mM) e não foram capazes de crescer quando expostas a 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) de CdCl_2 . As linhagens UFMG-A1003, UFMG-A1386, UFMG-A2255 cresceram em todas as concentrações testadas.

Costa-Moreira (2007), trabalhando com três diferentes linhagens de *S. cerevisiae* observou significativa inibição ou ausência de crescimento quando expostas a cloreto de cádmio nas concentrações de 10 a 100 ppm (0,05 a 0,5 mM) por 8 horas. Romandini e colaboradores (1992) observaram queda no crescimento de *S. cerevisiae* expostas a $40 \mu\text{M}$ de CdSO_4 , mostrando que, mesmo em baixas concentrações, o cádmio pode influenciar o crescimento celular.

A tolerância ao cádmio foi determinada através do plaqueamento em meio sólido (YPGlicose + ágar) suplementado com 100 mg.L^{-1} (0,5 mM) de cloreto de cádmio e posterior observação das colônias formadas. Observa-se na FIG.20 a formação de colônias em todas as linhagens no meio sem Cd (controle), enquanto que nas placas contendo meio suplementado com CdCl_2 o crescimento das colônias foi inibido ou ausente. Ocorreu crescimento de todas as

linhagens expostas ao cádmio, na concentração 10^8 células/mL, enquanto que em concentrações menores só houve desenvolvimento de colônias isoladas de alambiques. A linhagem UFMG-A905 foi a única a formar colônias na concentração de 10^6 células/mL. Nenhum desenvolvimento celular foi evidenciado em concentrações celulares menores.

Gomes e colaboradores (2002) testaram quatro linhagens de *S. cerevisiae* em 10, 20, 30 ppm (0,05, 0,10 e 0,15 mM) de CdCl_2 , mostrando que as células tiveram seu crescimento inibido, reduzido ou inalterado, apresentando diferentes padrões de crescimento em meio sólido suplementado com cádmio. O efeito inibitório do cádmio sobre crescimento celular se deve a vários fatores, todos eles ligados ao bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, tais como enzimas, sistemas de transporte de íons ou nutrientes e substituição de íons essenciais em sítios ativos (COSTA-MOREIRA, 2007). Shiraishi e colaboradores (1999) demonstraram em seu trabalho comportamentos distintos de mutantes de *S. cerevisiae* em meio sólido com 500 e 1500 μM de CdSO_4 , os quais demonstraram tanto alta tolerância quanto forte inibição do crescimento celular. Costa-Moreira (2007), observou inibição total de crescimento celular de três linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* na presença de 25 ppm (0,125 mM) de cloreto de cádmio.

Os resultados mostram que as leveduras da fermentação crescem mais e são mais tolerantes aos efeitos do cádmio que a linhagem laboratorial, o que pode representar uma vantagem em processo de biorremediação baseado na utilização de células vivas.

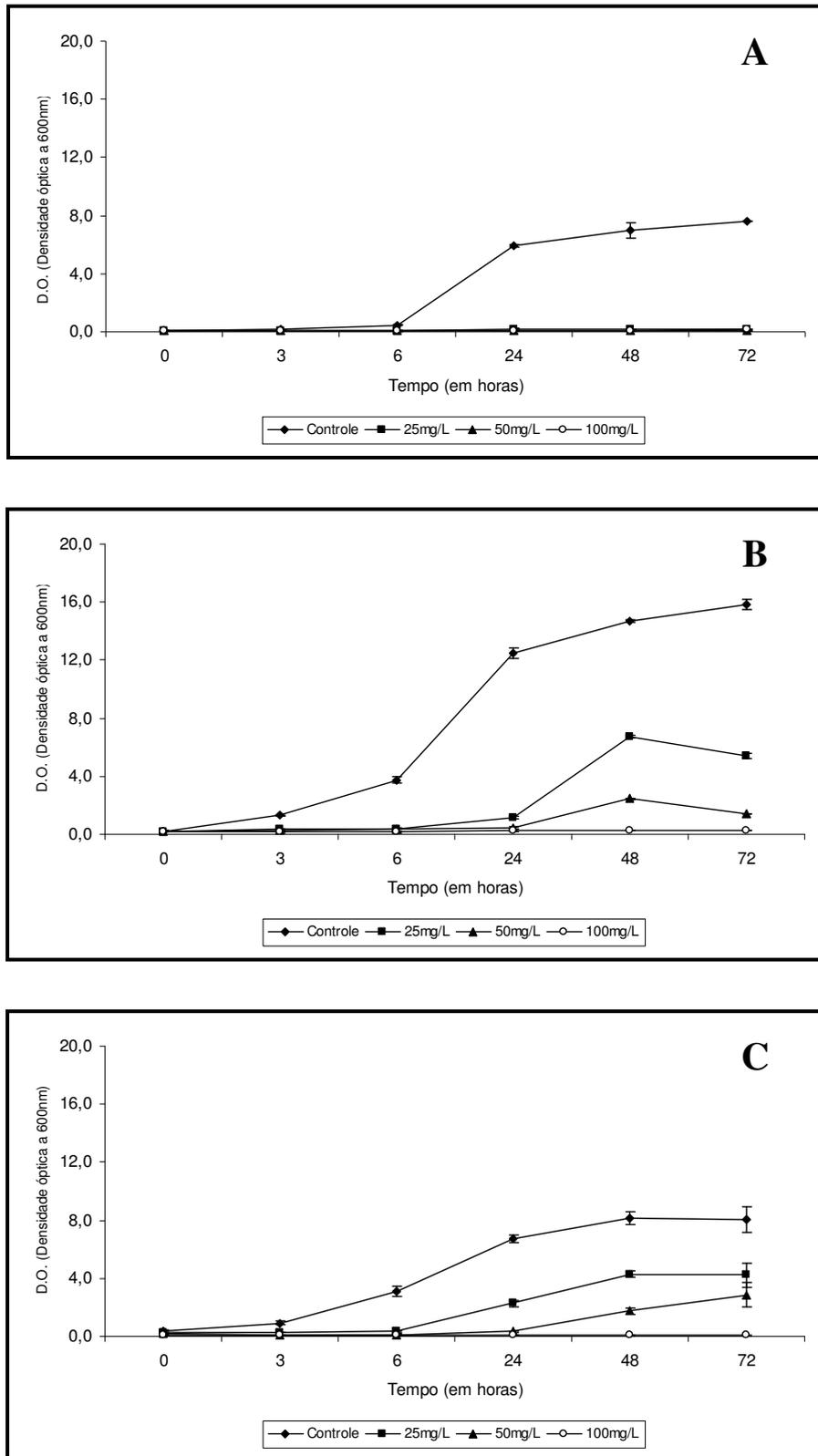


FIGURA 16. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens W303-WT (A), UFMG-A829 (B) e UFMG-A905 (C).

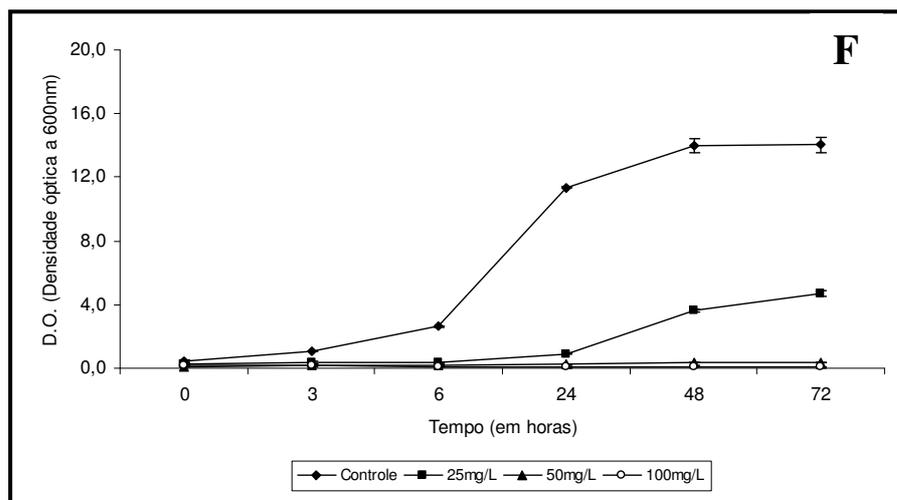
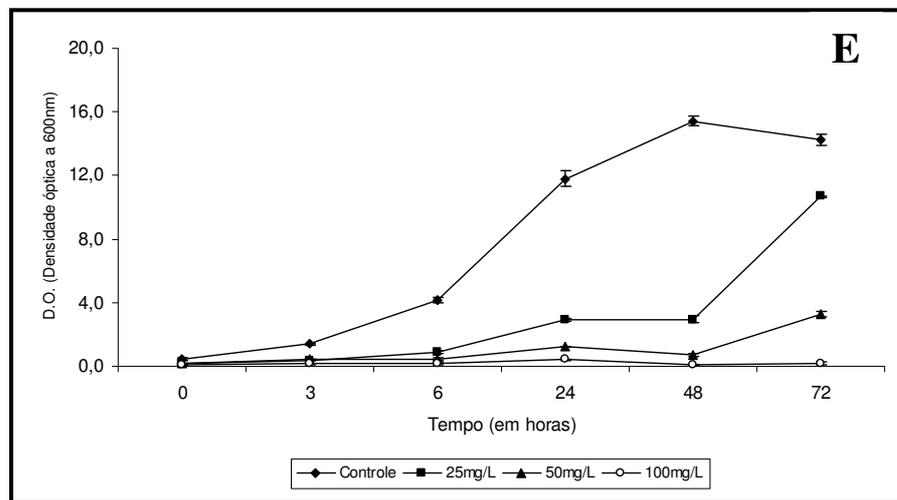
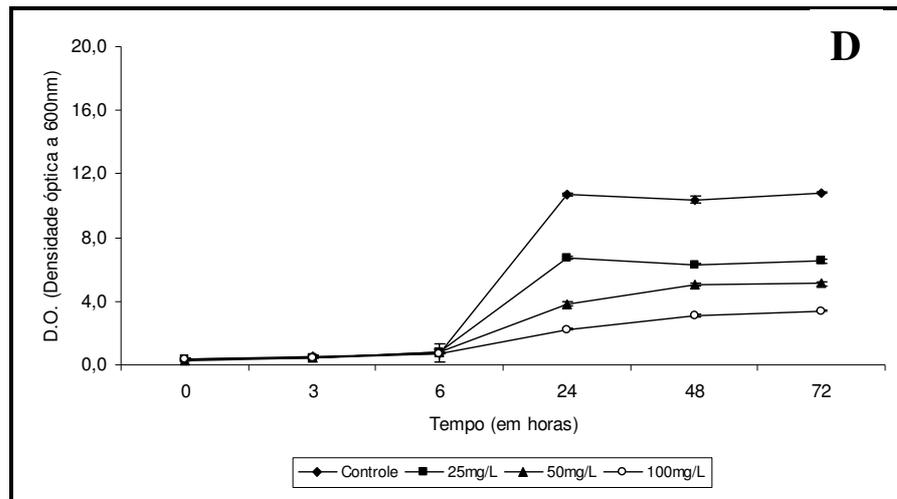


FIGURA 17. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens UFMG-A1003 (D), UFMG-A1007 (E) e UFMG-A1011 (F).

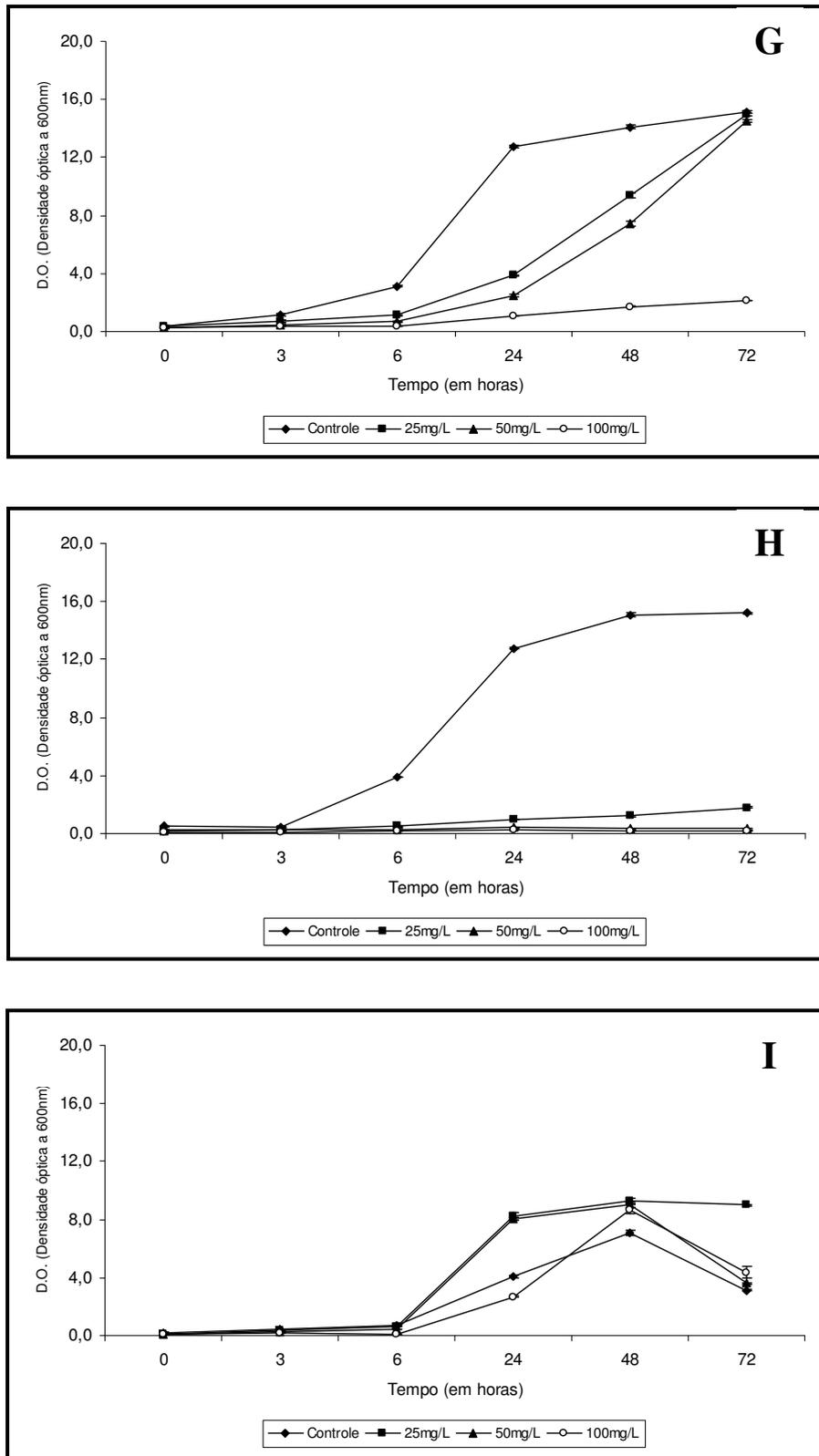


FIGURA 18. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens UFMG-A1386 (G), UFMG-A2097 (H) e UFMG-A2255 (I).

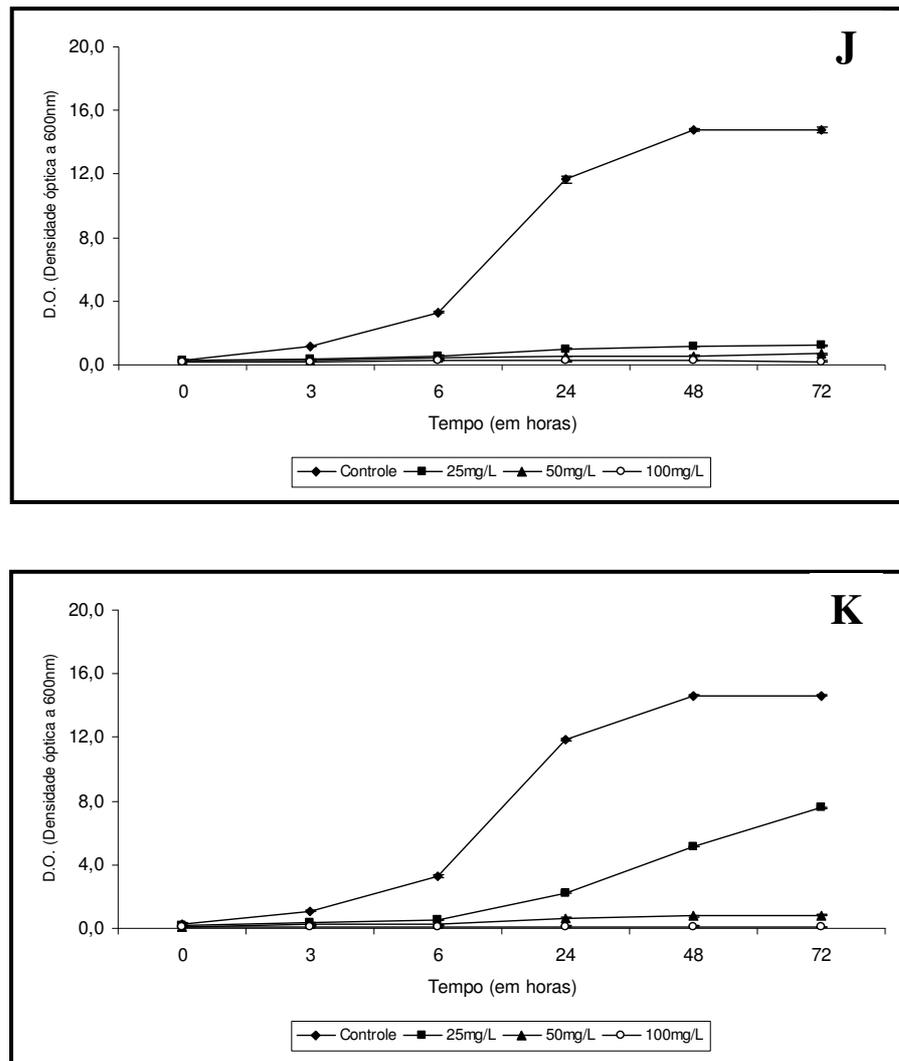


FIGURA 19. Influência das diferentes concentrações de cloreto de cádmio no crescimento das linhagens UFMG-A2382 (**J**) e UFMG-A2464 (**K**).

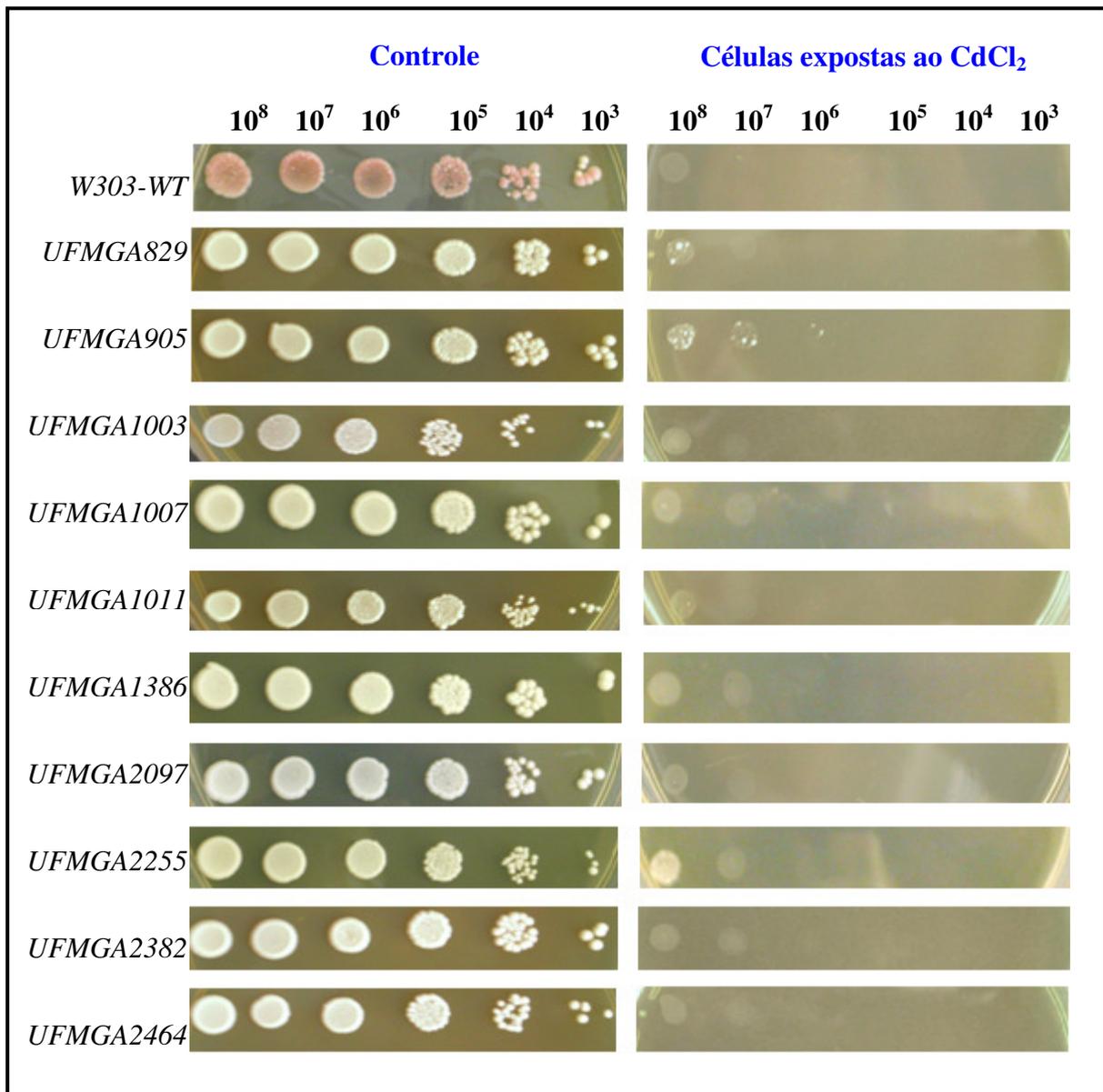


FIGURA 20. Determinação da sobrevivência celular em meio sólido. Coluna da esquerda, as células cresceram na ausência de cádmio. Na coluna da direita as células foram exposta a concentração de 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de cloreto de cádmio.

5.6. Determinação da peroxidação de lipídeos

A determinação dos níveis de lipídeos peroxidados foi realizada de acordo com a quantidade de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), formando uma substância cromófora passível de ser determinada espectrofotometricamente (ESTEUBAUER *et al.*, 1991). Analisou-se e comparou-se em todas as linhagens, os níveis de MDA de células controle, e expostas a concentração 100 mg.L⁻¹ do cloreto de cádmio.

Houve aumento da peroxidação lipídica nas linhagens W303-WT e UFMG-A2255, na concentração de 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM de CdCl₂) comparativamente aos seus respectivos controles (TAB.05). Os níveis de lipídeos peroxidados aumentaram respectivamente 24% e 115%. Ressalta-se que a linhagem W303-WT incorpora menos Cd (por bioacumulação) quando comparada às linhagens isoladas da fermentação da cachaça. Porém mesmo com uma menor incorporação, essa linhagem apresentou aumento significativo dos lipídeos peroxidados quando expostas ao elemento, demonstrando uma maior sensibilidade celular a este metal. A membrana plasmática é um importante local de interação entre metais tóxicos e as células de microrganismos. Estudos comprovaram que a alta toxicidade do cádmio induz a permeabilidade celular por peroxidar lipídeos presentes na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (HOWLLETT & AVERY, 1997a). Segundo Costa-Moreira (2007), linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram aumento dos danos lipídicos nas concentrações de 50 e 800 ppm (0,25 e 4 mM) de CdCl₂. Conforme Howllet e Avery (1997b), a exposição de células a 200 µM de Cd(NO₃)₂ causa grande alteração nos lipídeos de membrana de *S. cerevisiae* S150-2B. O mesmo foi evidenciado no trabalho de Adamis e colaboradores (2007), quando células de *S. cerevisiae* foram expostas a 48 µM de CdSO₄. A levedura UFMG-A1007 por sua vez diminuiu em 35% os níveis de lipídeos peroxidados, supondo que esta linhagem foi capaz de reduzir os danos, ativando vias de defesas antioxidantes.

Ao se comparar a situação controle de todas as células, observamos que as linhagens UFMG-A829, UFMG-A905, UFMG-A1003, UFMG-A1007, UFMG-A2097, UFMG-A2255, UFMG-A2382 e UFMG-A2494 apresentam naturalmente menores níveis de lipídeos danificados em relação à levedura laboratorial, evidenciando maior resistência das leveduras de alambiques a peroxidação.

Quando expostas a 100 mg.L⁻¹ (0,5 mM) de CdCl₂ as linhagens UFMG-A829, UFMG-A905, UFMG-A1003, UFMG-A1007, UFMG-A1386, UFMG-A2097, UFMG-A2255, UFMG-A2382 e UFMG-A2494 tiveram menos lipídeos peroxidados que a levedura W303-

WT na mesma situação, o que mostra, novamente, menor sensibilidade dessas linhagens frente aos danos causados pela bioacumulação de cádmio.

Observou-se que sete das dez leveduras isoladas da fermentação da cachaça bioacumularam maior quantidade de cádmio, porém sofreram menores danos celulares quando avaliado o indicador lipídico, ou seja, são mais resistentes aos efeitos do cádmio no interior da célula se comparadas à linhagem de laboratório, sendo por excelência preferenciais ao processo de biorremediação.

TABELA 05. Determinação dos níveis de peroxidação de lipídeos

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Controle (picomoles de MDA/mg proteína/mL)	Células expostas ao cádmio (picomoles de MDA/mg proteína/mL)
W303-WT	84,22 ^(a) ±9,74 ^(b)	104,99±12,8 ^c
UFMG-A 829	52,34±9,92 ^d	40,13±4,95 ^e
UFMG-A 905	26,37±5,01 ^d	18,54±4,39 ^e
UFMG-A 1003	50,75±10,82 ^d	46,22±7,7 ^e
UFMG-A 1007	59,58±7,84 ^d	38,81±4,34 ^{c,e}
UFMG-A 1011	100,15±10,53	100,29±12,72
UFMG-A 1386	63,54±17,94	53,46±16,18 ^e
UFMG-A 2097	62,13±5,54 ^d	64,45±3,36 ^e
UFMG-A 2255	12,38±4,06 ^d	26,62±8,75 ^{c,e}
UFMG-A 2382	52,57±6,17 ^d	48,29±6,89 ^e
UFMG-A 2464	40,88±3,55 ^d	39,77±10,21 ^e

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

d – diferença significativa em relação a linhagem laboratorial, situação controle ($P < 0,05$)

e – diferença significativa em relação a linhagem laboratorial, situação 100 mg.L⁻¹ ($P < 0,05$)

5.7. Resíduos sulfidrílicos totais

Existem compostos celulares que apresentam em suas estruturas resíduos sulfidrílicos (grupos SH livres) como exemplo a glutatona, um indicador do estresse oxidativo, pois podem sofrer oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (DEMASI *et al.*, 2006, COSTA-MOREIRA, 2007). Estes compostos podem ser determinados pelo reagente Ellman's 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), (DTNB) capaz de reagir com grupos tiois reduzidos produzindo o 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) o qual pode ser quantificado a absorvância de 412nm (ELLMAN 1959; GERGEL, et al., 1997, DAVIDSON, 2001).

Os resultados da TAB.06 mostram que as leveduras W303-WT, UFMG-A829, UFMG-A1003, UFMG-A1007, UFMG-A1011, UFMG-A1386, UFMG-A2255 e UFMG-A2464, após exposição ao cádmio, aumentaram significativamente os níveis dos resíduos sulfidrílicos em 17%, 22%, 17%, 20%, 42%, 70%, 43% e 44%, respectivamente. As leveduras isoladas da fermentação da cachaça de modo geral apresentaram um aumento percentual maior nos níveis de resíduos sulfidrílicos, em relação à linhagem laboratorial, representando uma maior estimulação dos mecanismos de defesa frente ao estresse ocasionado pelo cádmio. A resistência celular ao cádmio é mediada pelo aumento nos níveis de metalotioneínas e glutatona (BRENNAN & SCHIESTL, 1996).

Cd^{2+} reage com tiois intracelulares, como cisteína e glutatona, levando ao estresse oxidativo indireto por monopolizar as defesas contra os radicais livres gerados pelo metabolismo celular. A exposição a baixas concentrações de cádmio pode aumentar a resistência de leveduras, pela indução dos mecanismos de defesa (BRENNAN & SCHIESTL, 1996), o que é também demonstrado neste trabalho. Conforme Costa-Moreira (2007), linhagens *S. cerevisiae* incubadas com 50 ppm (0,25 mM) de cloreto de cádmio apresentaram aumento nas defesas antioxidantes não-enzimáticas, retratado por um aumento da concentração de grupos tiois livres.

TABELA 06. Determinação dos níveis de resíduos sulfidrílicos totais.

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Controle (μmoles/mg proteína/mL).	Células expostas ao cádmio (μmoles/mg proteína/mL).
W303-WT	11,30 ^(a) \pm 0,51 ^(b)	13,33 \pm 0,35 ^c
UFMG-A 829	11,64 \pm 0,43	14,22 \pm 0,72 ^c
UFMG-A 905	9,10 \pm 0,62	9,76 \pm 0,99
UFMG-A 1003	3,51 \pm 0,11	4,12 \pm 0,31 ^c
UFMG-A 1007	7,83 \pm 0,34	9,40 \pm 1,15 ^c
UFMG-A 1011	7,39 \pm 0,28	10,51 \pm 0,71 ^c
UFMG-A 1386	2,37 \pm 0,19	4,03 \pm 0,53 ^c
UFMG-A 2097	13,74 \pm 1,93	14,62 \pm 1,52
UFMG-A 2255	10,02 \pm 1,01	14,39 \pm 1,26 ^c
UFMG-A 2382	8,49 \pm 0,60	9,07 \pm 1,29
UFMG-A 2464	8,19 \pm 0,94	11,84 \pm 0,01 ^c

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

5.8. Determinação do status antioxidante total das linhagens pelo radical DPPH•

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias, dentre elas destaca-se o método de inibição de radical livre DPPH•. Este método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila de coloração púrpura, que por ação de um antioxidante é reduzido a difenil-picril-hidrazina de coloração amarela, fenômeno que pode ser determinado espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância a 517 nm (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2006; DUARTE-ALMEIDA, 2006; SOUSA *et al.*, 2007).

Segundo os resultados obtidos na TAB.07, as linhagens isoladas de alambiques apresentam níveis iguais ou menores de antioxidantes totais em relação à linhagem laboratorial. As leveduras UFMG-A829, UFMG-A1003, UFMG-A1011, UFMG-A1386, UFMG-A2097, UFMG-A2255 e UFMG-A2464 apresentaram na situação controle, 12%, 9%, 20%, 8%, 16%, 3%, 5% e 20% menos atividade antioxidante do que a linhagem W303-WT. Este resultado indica que as linhagens isoladas da fermentação da cachaça são naturalmente mais resistentes, não pela capacidade antioxidante total, mas sim por outros mecanismos de defesas enzimáticos e/ou não enzimáticos que não são visualizados por esta técnica. Costa-Moreira (2007) relata que não há diferença significativa entre três linhagens de *S. cerevisiae* quanto aos níveis de defesas antioxidantes totais como determinado pelo radical DPPH•.

TABELA 07. Determinação do status antioxidante total utilizando o radical DPPH•

Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Controle (% de inibição do radical DPPH•.)
W303-WT	67,35 ^(a) ±0,8 ^(b)
UFMG-A 829	59,92±2,62 ^c
UFMG-A 905	61,60±3,86
UFMG-A 1003	54,39±3,91 ^c
UFMG-A 1007	68,03±1,38
UFMG-A 1011	62,50±1,87 ^c
UFMG-A 1386	56,71±3,28 ^c
UFMG-A 2097	65,43±0,72 ^c
UFMG-A 2255	63,81±1,6 ^c
UFMG-A 2382	61,41±3,69
UFMG-A 2464	54,15±2,36 ^c

a – média de experimento em triplicata

b – desvio padrão

c – diferença significativa em relação à linhagem laboratorial, situação controle ($P < 0,05$)

5.9. Determinação da biossorção de cádmio por células tratadas com hidróxido de sódio

Várias técnicas analíticas são utilizadas para determinar a biossorção de metais por *S. cerevisiae*. A Espectrofotometria de Absorção Atômica é largamente empregada para este estudo (WANG & CHEN, 2006).

Para determinar a quantidade de íons metálicos adsorvidos, foi realizado o balanço de massa apresentado na equação abaixo:

$$Q_e = \frac{(C_o - C_e) \cdot V}{M}$$

Onde Q_e é a concentração no equilíbrio de íons metálicos adsorvidos na levedura, C_o é a concentração inicial na fase líquida, C_e é a concentração na fase líquida no equilíbrio, V é o volume da solução e M é a massa de adsorvente.

S. cerevisiae apresenta parede celular rígida e estruturalmente complexa o que representa um sítio adicional de biossorção, em relação às células desprovidas de parede (Brady *et al.*, 1994). O sequestro de íons metálicos pelas paredes celulares é constituído por duas fases. A primeira constitui uma ligação direta aos grupos funcionais expostos na superfície e a segunda composta por uma interação físico-química, que é chamada de fenômeno de adsorção (GADD, 1990; DEL RIO, 2004; VOLESKY, 2007).

A biomassa pré-tratada com NaOH a 5% foi mais eficiente na captação de cádmio (FIG.21). Gonçalves, (2006) utilizou células mortas de *S. cerevisiae* pré-tratadas com NaOH, para captação de urânio.

Crist e colaboradores (1988) demonstraram que a acumulação de cádmio por células não-viáveis pode ocorrer em aproximadamente 2 horas, o que pode ser comprovado no resultado deste estudo, onde ocorreu uma estabilização da biossorção de íons, o que também foi constatado por Adamis e colaboradores (2003) e Del Rio (2004).

Este trabalho demonstrou que células pré-tratadas são mais eficientes na captação de cádmio. Resultado obtido por técnicas analíticas diferentes e por pré-tratamentos distintos. Tratamentos alcalinos da biomassa fúngica podem aumentar significativamente a capacidade de captação de metal. Entretanto tratamentos ácidos da biomassa aparentemente não influenciam na biossorção de metal (WANG, 2000a; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1997; WANG & CHEN, 2006).

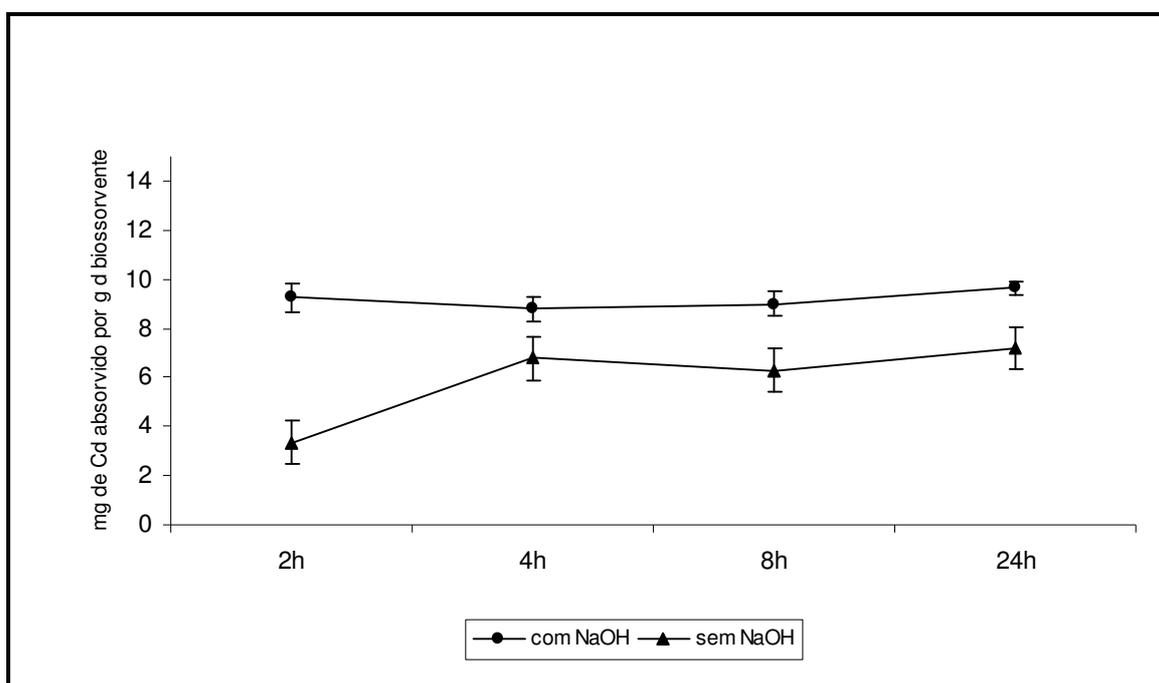


FIGURA 21. Biossorção de cádmio por células de *S. cerevisiae* W303-WT intactas e pré-tatadas com NaOH 5%.

6. CONCLUSÕES

- As linhagens isoladas da fermentação da cachaça incorporam mais cádmio que a linhagem laboratorial de referência;
- Cinco das dez leveduras isoladas de alambiques foram mais eficientes na captação de cádmio por biossorção;
- As células viáveis das linhagens UFMGA-1007 e UFMGA-1011 foram as mais eficientes na remoção do metal de meio líquido;
- O pré-tratamento com selênio e com NaOH aumentaram a capacidade de incorporação de cádmio por células não-viáveis;
- Existe uma relação entre incorporação de cádmio e efluxo de íons potássio nas leveduras. Dentre as linhagens, a laboratorial perdeu maior quantidade de K^+ , demonstrando maior susceptibilidade à perda de homeostase.
- A técnica de EDS demonstrou que o cádmio se liga a componentes presentes na parede celular de leveduras;
- As leveduras de alambiques são capazes de crescer em concentrações de $CdCl_2$ até 100 mg.L^{-1} (0,5 mM), resultado não observado na linhagem de comparação (laboratorial);
- As leveduras da fermentação são mais tolerantes ao cádmio do que a linhagem W303-WT;
- Os níveis de lipídeos peroxidados são naturalmente menores nas linhagens da cachaça, o que demonstra maior resistência das mesmas a danos celulares;
- Quando expostas ao cádmio as leveduras de alambiques sofreram menores danos celulares, expresso como peroxidação de lipídeos;
- Os níveis de resíduos sulfidrílicos totais aumentaram na maioria das linhagens após a exposição ao metal, representando uma maior estimulação dos mecanismos de defesa frente ao estresse ocasionado pelo elemento;
- A resistência celular das linhagens não está relacionada diretamente com o conteúdo antioxidante das mesmas, isso quando não-expostas ao fator de estresse aqui estudado;
- A biossorção máxima de cádmio por biomassa morta ocorre aproximadamente em até 2 horas de contato com a solução.

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIS, P.D.S., PANEK, A.D., ELEUTHERIO, E.C.A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. **Toxicology Letters**, v.173, p.1-7, 2007.

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

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. **Public Health Statement. Cadmium**. 2008. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>> Acesso em 04 de fevereiro de 2009.

ALBERTINI, S. Isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.21, p.134-138, 2001.

ARAÚZ, I.L.C., AFTON, S., WROBEL, K., CARUSO, J.A., CORONA, J.F.G., WROBEL, K. Study on protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic acid bacteria: An advanced application of ICP-MS. **Journal of Hazardous material**, v.153, p.1157-1164, 2008.

AVERY, S.V., TOBIN, J.M. Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.2851-2856, 1993.

BAUDOIN-CORNU, P., LABARRE, J. Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. **Biochimie**, v. 88, p.1673-1685, 2006.

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

- BEDNARSKA, S., LEROY, P., ZAGULSKI, M., BARTOSZ, G. Efficacy of antioxidants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* correlates with their effects on protein thiols. **Biochimie**, v.90, p.1476-1485, 2008.
- BERTIN G., AVERBECK D. Cadmium: cellular effects, modification of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v.88, p.1549-1559, 2006.
- BERTL, A., BIHLER, H., REID, J.D., KETTNER, C., SLAYMAN, C.L. Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, Duk1 (Tok1), in situ. **Journal of Membrane Biology**, v.162, p.67-80, 1998.
- BIHLER, H., SLAYMAN, C.L., BERTL, A. Nsc1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v.432, p.59-67, 1998.
- BISHOP P.L. **Pollution prevention: fundamental and practice**. [s.l]: McGraw-Hill Companies, 1999.
- BLACKWELL, K.J., SINGLETON, L., TOBIM, J.M. Metal cation uptake by yeast: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.579-584, 1995.
- BOGUSZ-JUNIOR S., KETZER D.C., GUBERT R., ANDRADES L., GOBO A.B. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.793-798, 2006.
- BOOPATHY R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, p. 63-67, 2000.
- BORÉM, A., GIÚDICE, M.P.D. **Biotecnologia e meio ambiente**. 2.ed. Viçosa: Ed. Suprema, 2008.

BORJERSON J., BELLANDER T., JÄRUP L., ELINDER C.G., MATTSON S. *In vivo* analysis of cadmium in battery workers versus measurements of blood, urine and work place air. **Journal of Occupational Environmental Medicine**, v.54, p.424-431, 1997.

BRADY, D., DUNCAN, J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.1, p.149-159, 1994.

BRENNAN, R.J., SCHIESTL, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research**, v. 356, p. 171-178, 1996.

CARDOSO, D.R., SOBRINHO, L.G.A., LIMA-NETO, B.S., FRANCO D.W. A rapid and sensitive method for dimethylsulphide analysis in brazilian sugar cane sugar spirits and other distilled beverages. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.15, p.277-281, 2004.

CIPAK, A., JAGANJAC, M., TEHLIVETS, O., KHLWEIN, S.D., ZARKOVIC, N. Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1781, p.283-287, 2008.

COSTA, V., MORADA-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001.

COSTA-MOREIRA, L.M. **Papel da trealose na proteção durante o estresse oxidativo causado por cádmio e a resposta adaptativa ao estresse em *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 111p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2007.

CRIST, R.H., OBERHOLSER, K., SCHWARTZ, D., MARZOFF, J., RYDER, D., CRIST, D.R. Interactions of metals and protons with algae. **Environmental Science and Technology**, v.22, p.755-760, 1988.

CZAUADERNA, M., MAKOWSKA, E., SMOLINKSKI, S. Use of INAA to study the effect of selenium on uranium accumulation in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.177, p.393-401, 1994.

CZAUADERNA, M., PEPOWSKI, S., SMOLINSKI, S. Effect of selenium on the Hg, Zn, Fe and Co content of yeast cells. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.58, p.455-462, 1992.

CYRNE, L., MARTINS, L., FERNANDES, L., MARINHO, H.S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p. 385-393, 2003.

DAVIDSON, J.F., SCHIESTL, R.H. Cytotoxic and Genotoxic consequences of heat stress are dependent on the presence of oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.4580–4587, 2001.

DAVIDSON, J.F., WHYTE, B., BISSINGER, P.H., SCHIESTL, R.H. Oxidative stress is involved in heat-induced death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 5116–5121, 1996.

DEL RIO, D. T. **Biosorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. 66p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo Piracicaba, 2004.

DE WINDE, J.H., THEVELEIN, J.M., WINDERICK, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: MAGER, W.H. (Ed.) **Yeast stress responses**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997, p.7-52.

DEMASI, A. P. D., PEREIRA, G. A. G., NETTO, A. E. S. Yeast oxidative stress response – Influences of cytosolix thioredoxin peroxidase I and the mitochondrial functional state. **FEBS Journal**, v. 273, p. 805-816, 2006.

DÖNMEZ, G., AKSU, Z. The effects of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeast. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 135-142, 1999.

DÖNMEZ, G., AKSU, Z. Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida sp.* **Water Research**, v.35, p.1425-1434, 2000.

DORDEVIC, S., PETROVIC, S., DOBRIC, S., MILENKOVIC, M., VUCICEVIC, D., ZIZIC, S., KUKIC, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v.109, p.458-463, 2007.

DOSTALEK P., PATZAK M., MATEJKA P. Influence of specific limitation on biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.54, p.203-207, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J.M., SANTOS, R.J., GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.446-452, 2006.

EDIE, D.J. Functional genomics and metal metabolism. **Genome Biology**, v.10, p.10281-10283, 2001.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p.70-77, 1959.

ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., AYKIN-BURNS, N. Toxic Metals and oxidative stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, p. 529-539, 2001.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p. 81-128, 1991.

FERREIRA A.L.A., MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203-1209, 1998.

FRIDOVICH, I. **Oxygen and living processes**. New York: Springer Verlag, 1981.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.334-361, 1998.

GADD, G.M. Fungi and yeast for metal accumulation. In: **Microbial Mineral Recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990, p.249-275.

GALINARO C.A., CARDOSO D.R., FRANCO D.W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in brazilian sugar cane spirits: Discrimination between cachaças produced from nonburned and burned sugar cane crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3141-3147. 2007.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidantes e mutagenicas/antimutagenica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Diagnostico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, 2005.

GODOI, A.F.L., RAVINDRA, K., GODOI, R.H.M., ANDRADE, S.J., SANTIAGO-SILVA, M., VAECK, L.V., GRIEKEN, R.V. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal of Chromatography**, v.1027, p.49-53, 2004.

GOMES, D.S., FRAGOSO L.C., RIGER, C.J., PANEK, A.D., ELEUTHERIO E.C.A. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1573, p.21-25, 2002.

GONÇALVES, C.R. **Remoção de manganês e recuperação de urânio presentes em águas ácidas de mina**. 2006. 75p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2006.

COSSICH, E. S. **Biossorção de Cromo (III) pela Biomassa da Alga Marinha *Sargassum* sp.** 2000. 147p. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, 2000. Disponível em <http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/MonografiasTeneria/capitulovii.htm> Acesso em 10 janeiro de 2009.

GUERRA, J.B., ARAÚJO, R.A.C., PATARO, C., FRANCO, G.R., MOREIRA, E.S.A. MENDONÇA-HAGLER, L.C., ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of artisanal brazilian cachaça. **Letter Applied Microbiology**, v. 33, p.106-111, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Journal. Biochemie**, v.219, p.1–14, 1984.

HOWLETT, N. AVERY, S. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2971-2976, 1997a.

HOWLETT, N. AVERY, S. Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.539-545, 1997b.

JÄRUP, L. Cadmium overload and toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.17, p.35-39, 2002.

JÄRUP, L. BERGLUND M., ELINDER C.G., NORDBERG G., VAHTER M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature an a risk estimate. **Scandinavian Journal of Work Environment & Health**, v.24, p.1-51, 1998.

JAYAPRAKASHA, G.K., NEGI, P.S., JENA, B.S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p. 246–250, 2006.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption – an alternative treatment: Option for heavy metal bearing wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v.53, p.195-206, 1995.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Heavy metals biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.61, p.221-227, 1997.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T., CULLIMORE, D.R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. **Bioresource Technology**, v.70, p.95-104, 1999.

KEFALA, M.I., ZOURBOULIS, A.I., MATIS, K. A. Biosorption of cadmium ions by *Actinomyces* and separation by flotation. **Environmental Pollution**, v.104, p.283-293, 1998.

KO, C.H, GABER, R.F. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.11, p4266-4273, 1991.

LANE, T.W., SAITO, M.A., GEORGE, G.N., PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., MOREL, F.M. M. Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. **Nature**, v.435, p.42-42, 2005.

LAPATHITIS, G., KOTYK, A. Univalent cation fluxes in yeast. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v.44, p.371-380, 1998.

LIU, J., ZHANG, Y., HUANG, D., SONG, G. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.208, p.139-145, 2005.

MADRID Y., CAMARA C. Biological substrates for metal preconcentration and speciation. **Trends in Analytical Chemistry**, v.16, p.36-44, 1997.

MALLICK, N., MOHN, FH. Reactive oxygen species: response of algae cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MARQUES P.A., PINHEIRO H. M., TEIXEIRA J.A., ROSA M. F. Removal efficiency of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} from aqueous solution by waste brewery biomass. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.135-141, 2000.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.M. **Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados à solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1997. 197p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1994.

MENEZES, M.ÂB.C., JACIMOVIC, R. Optimised k_0 -instrumental neutron activation method using the TRIGA MARK I IPR-R1 reactor at CDTN/CNEN, Belo Horizonte, Brazil. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research**, v.564, p.707-715, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Decreto N° 4062 de 21 de dezembro de 2001. Brasília, 2001. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1014>> Acesso em 02 fev. 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°13, de 29 de julho de 2005. Brasília, 2005. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14175>> Acesso em 02 fev. 2009.

MORAIS, P.B., ROSA C.A., LINARDI, V.R., PATARO C., MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane cachaça. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.241-243, 1997.

NATURAL AND ACCELERATED BIOREMEDIATION RESEARCH. **Bioremediation of metals and radionuclides: what it is and how it works?**. 2nd ed. Berkeley, [s.n] 2003.

NAGY, Z., MONTIGNY, C., LEVERRIER, P., YEH, S., GOFFEAU, A., GARRIGOS, M., FALSON, P. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. **Biochimie**, v.88, p.1665-167, 2006.

NAKAJIMA, A. Effect of selenium on uranium biosorption. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 247, p.347-350, 2000.

NEVES, M. J., TERENCE, H. F., LEONE, F.A., JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with conidial trehalase from thermophilic fungus *Hemicella grisea var. thermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.17-19, 1994.

OSUMI M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. **Micron**, v.29, p.207-233, 1997.

PARK J.K., LEE J.W., JUNG J.Y. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Enzyme Microbiology Technology**, v.33, p.371-378, 2003.

PATARO C., GUERRA J.B., PETRILLO-PEIXOTO M.L., MENDONÇA-HAGLER L.C., LINARDI V.R., C.A. ROSA. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PATARO, C., GUERRA, J.B., GOMES F.C.O., NEVES, M.J., PIMENTEL P.F., ROSA C.A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.202-208, 2002.

PARK, J. K., LEE, J. W., JUNG, J. Y. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.371-378, 2003.

PEREGOL P., HOWELL S. B. Molecular mechanism controlling sensitive to toxic metal ions in yeast. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.8, p.147-312, 1997.

PEREIRA, M.D., PANEK, A.D., ELEUTHERIO, E.C.A. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiology**, v.1:11, p.1-10, 2001.

PEREZ-CORONA T., MADRID Y., CAMARA C. Evaluation of selective uptake of selenium (Se (IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V)) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). **Analytica Chimica Acta**, v.55, p.345:249-255, 1997.

PODGORSKII V.S., KASATKINA T.P., LOZOVAIA, O.G. Yeast-biosorbents of heavy metals. **Mikrobiologicheskii zhurnal**, v.66, p.91-103, 2004.

RETTORI, D., VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v.23, p.257-261, 1999.

REZANKA, T., SIGLER K. Biologically active compounds of semi-metals. **Phytochemistry**, v.69, p.585-606, 2008.

RIBEIRO, J.C.G.M. **Fabricação Artesanal da Cachaça Mineira**. Belo Horizonte: Ed. Perform, 1997.

RICE-EVANS, C.A., DIPLOCK, A.T., SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: North-Holland, v.22, p.1-278, 1991.

ROLLAND, F., WINDERICKX, J., THEVELEIN J.M. Glucose-sensing and – signaling mechanism in yeast. **FEMS Yeast Research**, v.1457, p.1-19, 2002.

ROMANDINI, P., TALLANDINI, L., BELTRAMINI, M., SALVATO, B., MANZANO, M., BERTOLDI, M., ROCCO, G.P. Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. **Comparative biochemistry and physiology**, v.103, p.255-262, 1992.

SCHOTT, E.J., GARDNER, R.C. Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, v.254, p.63-72, 1997.

SERAFÍN-MUÑOZ, A.H. WROBEL, K. GUTIERREZ-CORONA, J.F., WROBEL, K. The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. **Mycological Research**, v.3, p.626-632, 2007.

SERERO A., LOPES J., NICOLAS A., BOITEUX S. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. **DNA Repair**, v.7, p.1262-1275, 2008.

SHIRAIISHI, E., INOUBE, M., JOHO, M., TOHOYAMA, H. The cadmium-resistant gene, *CAD2*, which is a mutated putative copper-transporter gene (*PCAI*), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.37, p.79-86, 1999.

SIES, H., JONES, D. Oxidative Stress In: **Encyclopedia of Stress**. 2nd ed. [S.l]: Academic Press, v.3, p.102-104, 2007.

SINGLETON, I., SIMMONS, P. Factors affecting silver biosorption by and industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.65, p.21-28, 1995.

SMEITINK, J., VAN DEN HEUVEL, L., DIMAURO, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nature Genetics**, v.2, p.342-352, 2001.

SOUSA C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JUNIOR, G.M., C. AYRES, M.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO D.S., CAVALCANTE L.D., BARROS E.D.S., M. ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO M.S., CHAVES M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007.

SRIVASTAVA, M., MA, L.Q., RATHINASABAPATHI, B., SRIVASTAVA, P. Effect of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Bioresource Technology**, v.100, p.1115-1121, 2009.

SUH, J.H., KIM, D.S, YUN, J.W., SONG, S.K. Process of Pb^{2+} accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letter**, v.20, p.153-156, 1998.

SUH, J.H., YUN, J.W., KIM, D.S. Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 383-387, 1999.

SYCHROVÁ H. Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. **Physiological Research**, v.53, p.91-98, 2004.

VIANNA C.R. **Efeito do estresse térmico e alcoólico no metabolismo da trealose e na expressão das proteínas de choque térmico em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante a produção da cachaça mineira.** 2003. 91p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Microbiológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

VEGLIO, F., BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v.44, p.301-316, 1997.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v.41, p.4017-4029, 2007.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: **Biosorption of Heavy Metal**. Florida: CRC Press, cap.1.1, p.3-6, 1990a.

VOLESKY, B. Biosorption by fungal biomass. In: **Biosorption of Heavy Metal**. Florida: CRC Press, cap.2.3, p.139-171, 1990b.

VOLESKY, B., MAY, H., HOLAN, Z.R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.826-829, 1992.

VOLESKY, B., HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology of Heavy Metals**, v.11, p.235-250, 1995.

VOLESKY, B., MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p.797-806, 1995.

WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.79, p.241-244, 2000.

WAIHUNG, L., CHUA, H., LAM, K., H., BI, S. P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, v. 49, p.345-355, 1999.

WANG, J.L. **Microbial Immobilization techniques for biocatalysts and water pollution control**. Beijing: Science Press, 2002a.

WANG J.L. Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v.37, p.847–850. 2002b.

WANG, J., CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427-451, 2006.

WANG, J., CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, p.195-226, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria n° 134: cadmium**. 1989. Disponível em: <www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je01.htm>. Acesso em 14 janeiro de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO food additives series n° 24: toxicological evaluation of certain food additives and contaminants**. 1992. Disponível em: <www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso em 14 janeiro de 2009.

ZAMPERLINI, G.C.M., SILVA, M.R.S., VILEGAS, W. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in sugar cane soot by gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, v.46, p.655-663, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)