

# ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE CÁDMIO POR *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1</sup>

Silvana ALBERTINI<sup>2</sup>, Leandro Francisco do CARMO<sup>2</sup>, Luiz Gonzaga do PRADO FILHO<sup>3,\*</sup>

## RESUMO

Com o objetivo de determinar as isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*, foram utilizados os sais cloreto e nitrato de cádmio nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100mg L<sup>-1</sup>. A biomassa foi produzida a partir de uma cultura "starter" de *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904. Após o contato de 16h entre o microrganismo e as soluções em estudo, a biomassa foi separada por centrifugação e o teor de cádmio residual foi determinado no sobrenadante por espectrofotometria de absorção atômica. Para os dois sais empregados foi observado um acúmulo crescente de cádmio nas concentrações de 5, 10, 20 e 40mg L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 60, 80 e 100mg L<sup>-1</sup> foi observado que a levedura acumulou teores menores do metal, evidenciando danos na parede celular, nem sempre acompanhados de iguais danos da membrana citoplasmática, tais alterações da parede visualizadas por microscopia eletrônica de varredura.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*; cádmio; adsorção; isoterma.

## SUMMARY

ISOTHERMS OF CADMIUM ADSORPTION BY *Saccharomyces cerevisiae*. With the objective of determining the isotherms of cadmium the adsorption by *Saccharomyces cerevisiae*, the chloride and nitrate salts were used in the concentrations of 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100mg L<sup>-1</sup>. The biomass was produced from a starter culture of *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904. After a 16h contact between the microorganism and solutions of study the biomass was separated by a centrifuge and the cadmium residue content was determined at the supernatant by atomic adsorption spectrophotometry. For the two salts used a growing accumulation of cadmium was observed at concentrations of 5, 10, 20, and 40mg L<sup>-1</sup>. In the concentrations of 60, 80 and 100mg L<sup>-1</sup> a decreasing of the accumulation of the metal was observed, evidencing damages of the cellular wall, which they're not accompanied always by damages of the cytoplasmic membrane, visualized by scanning electron microscopy.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; cadmium; adsorption; isotherm.

## 1 – INTRODUÇÃO

Os metais são componentes integrantes do meio ambiente e dos seres vivos. Com relação ao uso de metais, o crescimento industrial decorrente do desenvolvimento tecnológico após a Segunda Guerra Mundial foi de grande importância para humanidade. Por outro lado contribuiu para a poluição ambiental, pois

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 17/12/98. Aceito para publicação em 31/07/01.

<sup>2</sup> Alunos de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola – Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP

<sup>3</sup> Prof. Tit. Dr. – Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP Av. Pádua Dias, 11. C.P. 09. CEP 13418-900 – Piracicaba, S.P.

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

foi o responsável pela crescente introdução de diversos metais no ambiente, sendo o homem a sua principal vítima. Desta forma aumentou o interesse dos pesquisadores pelo estudo das interações desses elementos no meio ambiente.

Os metais podem entrar na cadeia alimentar através da poluição ambiental causada pelo próprio ser humano, ou naturalmente, pela ocorrência em solos, águas e plantas, ou ainda pela migração desses metais presentes nos materiais de embalagens. Do ponto de vista alimentar, os casos de contaminação por cádmio estão diretamente relacionados com a capacidade acumulativa do metal no organismo [4]. As principais vias de exposição ao cádmio podem ser identificadas como: exposição ocupacional envolvendo principalmente inalação de poeira e fumaça; exposição ocupacional incluindo a entrada oral ou a exposição a este elemento; exposição crônica através dos alimentos, ar e água [13, 14]. Os principais alimentos que contribuem como veículo deste metal contaminante para o homem são os vegetais, cereais e alimentos do mar. As embalagens plásticas também podem ser fonte de contaminação por cádmio, uma vez que este metal pode estar presente em pigmentos e estabilizantes destas embalagens e utensílios cerâmicos vidrados, decorados e coloridos com pigmentos à base de compostos de cádmio que, quando em contato com alimentos ácidos, podem eventualmente solubilizar esse metal, permitindo sua migração para o alimento, contaminando-o [4, 10].

A ingestão máxima semanal tolerável de cádmio recomendado é 7mg de Cd/Kg de peso corpóreo [11].

A identificação do cádmio como elemento químico data de 1817. Sua toxicidade foi logo reconhecida e os sintomas foram descritos primeiramente por Marmé em 1867. Apesar disso, sais de cádmio foram usados como anti-helmínticos, anti-sépticos, acaricidas e nematocidas, tendo sido citados em várias farmacopéias do início do século XX [13].

O cádmio é um elemento altamente tóxico e vem sendo descrito como um dos elementos traços mais perigosos de todos os metais contaminantes presentes nos alimentos e no ambiente do homem, não apenas pelos altos níveis de toxicidade, mas também devido a sua ampla distribuição e aplicações industriais [12].

A produção industrial é relativamente pequena, em torno de 2000ton ano<sup>-1</sup> [12], mas vem aumentando em função das novas aplicações industriais [16]. Cerca de 34% do consumo total de cádmio é aplicado em revestimentos metálicos, sendo seus principais usuários as indústrias automobilística, espacial e de telecomunicação. A segunda maior aplicação, cerca de 23% do con-

sumo total de cádmio destina-se à produção de pigmentos para tintas, vernizes e plásticos com base de sulfeto e sulfoselenito de cádmio. Outra aplicação importante do cádmio é na indústria de PVC e plásticos afins, onde 15% do consumo total de cádmio é empregado como estabilizador, inibindo a degradação do PVC. Em menores proporções o cádmio aparece como componente de acumuladores alcalinos, constituintes de soldas e ligas de baixa fusão, produção de cabos de alta condutividade, como endurecedor para o cobre, na cura da borracha, na indústria do vidro, na fotografia, na litografia e, em processos de gravura. O cádmio também é utilizado como constituinte de amálgama e como anti-helmíntico para aves e suínos [4, 9].

Métodos alternativos de remoção e/ou recuperação do metal estão sendo empregados com base nas propriedades seqüestrantes de materiais naturais de origem biológica [17].

A utilização de biomassa microbiana residual, produzida industrialmente, pode ser uma via econômica de material adsorvente de metal. Como produto residual de fermentações industriais, *Saccharomyces cerevisiae* pode ser obtida em grandes quantidades e a baixo custo, suprimindo uma fonte viável para aplicação em larga escala nos processos de remediação [1, 2, 5].

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

Todos os utensílios utilizados nos experimentos foram previamente lavados com água e detergente, descontaminados com solução de HNO<sub>3</sub>, HCl e H<sub>2</sub>O – na proporção 1:2:9 por um período de 4h e finalmente enxaguados com água deionizada [8].

#### 2.1.1 – Levedura

A levedura testada foi *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904 da coleção de culturas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP.

#### 2.1.2 – Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para produção de biomassa foi caldo GLT (glucose – extrato de levedura – tripton) [6].

#### 2.1.3 – Sais de cádmio

Foram utilizados cloreto e nitrato de cádmio, ambos com pureza superior a 99%.

### 2.2 – Métodos

#### 2.2.1 – Delineamento estatístico

O experimento foi realizado segundo o delineamento estatístico casualizado com 2 sais, 7 concentrações e 3 repetições [3]. Os resultados foram analisados pelo programa SANEST [18].

#### 2.2.2 – Produção de biomassa

A partir de uma cultura estoque de *Saccharomyces cerevisiae* foi preparada uma cultura “starter” em tubos

de ensaio contendo aproximadamente 10mL de caldo de cultura GLT (glucose, extrato de levedura – tripton) mantidos a uma temperatura de 21°C em estufa por 24h [6]. A cultura “starter” foi transferida dos tubos de ensaio para erlenmeyers de 500mL contendo 200mL de caldo de cultura GLT, mantidos sob agitação na faixa de temperatura de 26 a 28°C, por 48h em agitador orbital.

#### 2.2.3 – Separação da biomassa

A biomassa produzida foi separada por centrifugação a 1500 gravidades por 15 min.

#### 2.2.4 – Determinação da matéria seca

A matéria seca foi determinada por processo indireto [15].

#### 2.2.5 – Contato biomassa-solução de cádmio

Foram preparadas soluções de cloreto e nitrato de cádmio nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100mg L<sup>-1</sup>. 50mL de cada solução foram transferidos, em triplicata, para erlenmeyers de 125mL. A cada amostra foi adicionado o peso exato de 1,0g de levedura úmida. O contato entre a biomassa e a solução em estudo foi sob agitação por um período de 16h, na faixa de temperatura de 26 a 28°C, [16].

#### 2.2.6 – Determinação dos pontos da isoterma de adsorção

Após o contato de 16h, o conjunto biomassa-solução foi centrifugado a 1500 x g por 15 min., separando-se o sobrenadante, no qual foi determinado o teor de cádmio residual por espectrofotometria de absorção atômica. Por cálculo foi quantificado o cádmio adsorvido pela levedura, expressando-se os resultados em mg Cd g<sup>-1</sup> de matéria seca.

#### 2.2.7 – Exame da integridade da parede celular

Amostras de massas celulares obtidas por centrifugação foram preparadas e examinadas por microscopia eletrônica de varredura [7].

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis das isotermas de adsorção do metal em estudo pela levedura são mostrados na *Figura 1*. Comparadas ponto a ponto, as duas isotermas apresentam perfis qualitativamente semelhantes porém, quantitativamente diferentes. As diferenças estatísticas, ao nível de 1%, dos teores de cádmio nas diversas concentrações dos dois sais, em cada concentração estudada, é mostrada na *Tabela 1*. As diferenças estatísticas nos teores acumulados, em cada concentração dos sais, demonstra que o sal portador do metal tem influência no acúmulo deste pela levedura. Na concentração de 40mg L<sup>-1</sup> na solução teste o cádmio do cloreto foi acumulado com maior eficiência que o cádmio do nitrato.

Na concentração de 60, 80 e 100mg L<sup>-1</sup> na solução teste o cádmio do nitrato potencializa um acúmulo es-

taticamente superior ao do cloreto. Os perfis semelhantes das duas isotermas de adsorção do cádmio, com diminuição na quantidade de metal acumulado a partir de 40mg L<sup>-1</sup> na solução teste pode ser compreendido a vista das microfotografias feitas nas células após cada experimento. – Figuras 2 a 8.

As microfotografias mostram danos nas paredes celulares, os quais não são sempre acompanhadas de igual dano nas membranas citoplasmáticas. O fato de células, expostas a concentrações acima de 40mg L<sup>-1</sup>, como entidades fisiológicas funcionais estarem danificadas e, nestas condições acumularem menos cádmio possibilita inferir que, até as doses de 40mg L<sup>-1</sup> parte do metal acumulado foi por adsorção às paredes celulares e outra parte por absorção ativa com emprego de energia pelas células.

Embora as células danificadas acima da concentração de 40mg L<sup>-1</sup> – Figuras 2 a 8 – não estejam vivas e funcionais, suas paredes continuam presentes na solução teste. Se as paredes celulares estão presentes e se fossem as paredes as únicas responsáveis pelo acúmulo de cádmio via adsorção, a concentração do metal, na solução teste, deveria variar pouco se o metal tivesse sido acumulado apenas por adsorção às paredes.

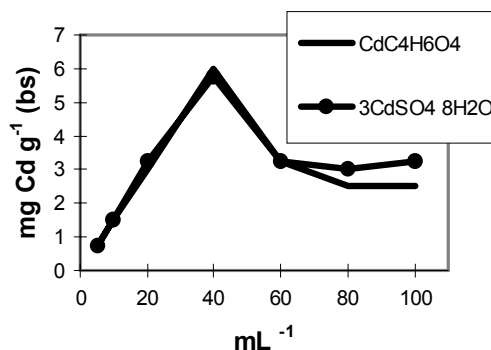
Portanto, fica evidente que até a dose de 40mg L<sup>-1</sup> na solução teste, nos experimentos realizados, parte do metal ficou acumulado no interior das células de levedura. Entretanto a quantificação da contribuição individual dos fenômenos de adsorção e de absorção para acúmulo de cádmio pela levedura, nas condições experimentais, não foi determinada com exatidão.

Devido ao longo tempo de contato não pode ser determinado se menores tempos de contato seriam menos prejudiciais às células, mesmo nas concentrações mais elevadas onde, no presente estudo, foram constatados danos irreversíveis nas paredes celulares.

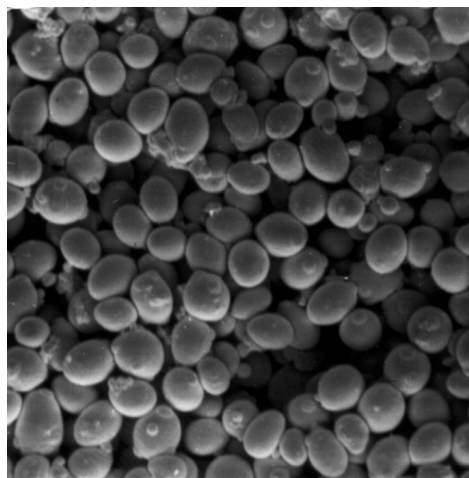
**TABELA 1.** Concentrações de cádmio adsorvido por *Saccharomyces cerevisiae* após contato de 16h com soluções de diferentes concentrações do metal à temperatura média de 26 a 28°C.

Sais	CdCl <sub>2</sub> . 2½H <sub>2</sub> O	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O
Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	mg Cd g <sup>-1</sup> biomassa seca	mg Cd g <sup>-1</sup> biomassa seca
5	0,98A	0,99A
10	1,98A	2,01A
20	3,42B	4,25A
40	5,75B	5,27C
60	2,98C	5,00A
80	2,50B	3,00A
100	2,25D	2,82B

As médias, seguidas de uma mesma letra, em uma mesma linha, não diferem entre si segundo Tukey a 1% de significância.

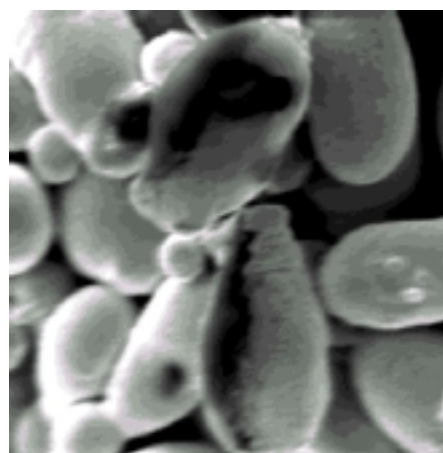


**FIGURA 1.** Isotermas de adsorção de sais de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*.



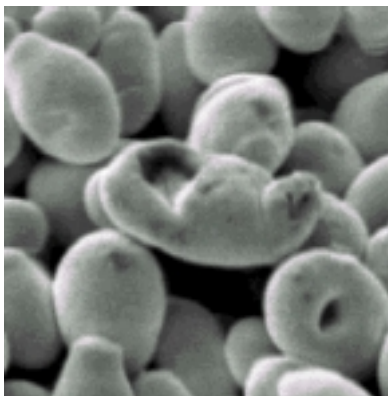
Água deionizada x 3.000

**FIGURA 2.** Células de *Saccharomyces cerevisiae* após contato com água deionizada por 16h a 26-28°C. Água deionizada x seguido do número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



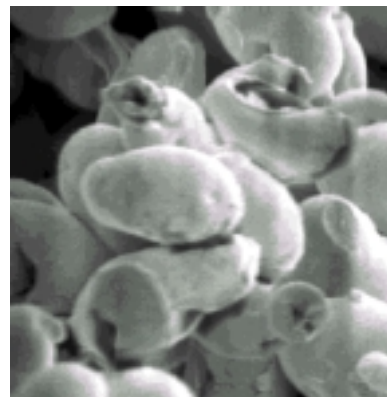
Cl 60 x 10.000

**FIGURA 3.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 60mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio por 16h a 26-28°C. Cl seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



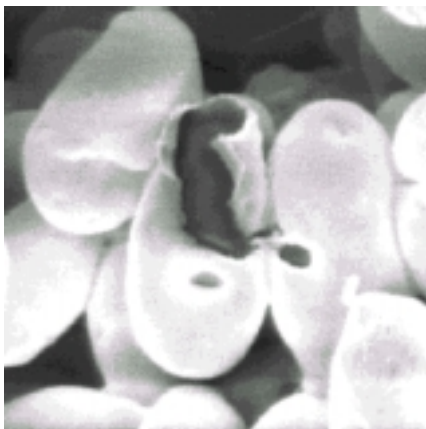
Cl 80 x 10.000

**FIGURA 4.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 80mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio por 16h a 26-28°C. Cl seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



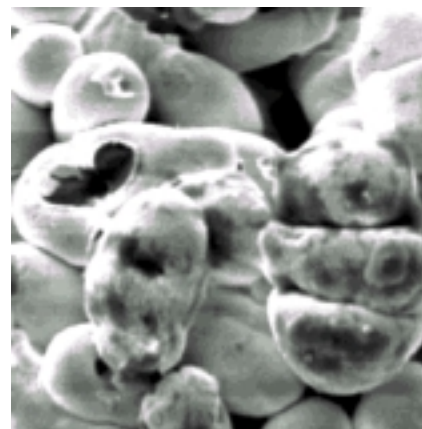
N 80 x 10.000

**FIGURA 7.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 80mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cádmio por 16h a 26-28°C. N seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



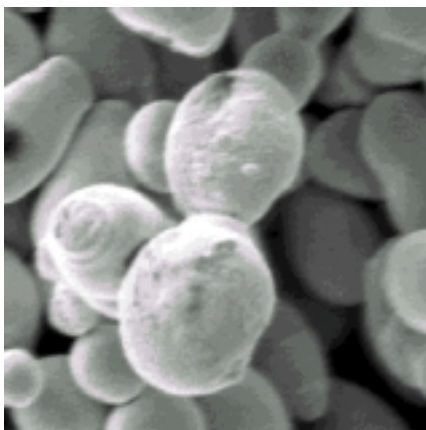
Cl 100 x 13.000

**FIGURA 5.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 100mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio por 16h a 26-28°C. Cl seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



N 100 x 10.000

**FIGURA 8.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 100mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cádmio por 16h a 26-28°C. N seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.



N 60 x 10.000

**FIGURA 6.** Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 60mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cádmio por 16h a 26-28°C. N seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

#### 4 – CONCLUSÕES

- *Saccharomyces cerevisiae* acumulou cádmio em quantidades crescentes até a concentração de 40mg L<sup>-1</sup> na solução teste.
- Os dois sais de cádmio empregados mostraram-se altamente prejudiciais às células da levedura, nas concentrações de 60; 80 e 100mg L<sup>-1</sup>.
- Os sais empregados como fontes de cádmio – cloreto e nitrato – têm influência nos níveis de acúmulo do metal pelas células de levedura.
- Até a concentração de 40mg L<sup>-1</sup> parte do metal acumulado foi por absorção dentro das células e não apenas por adsorção às paredes celulares.

#### 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRADY, D; ROSE, P. D.; DUNCAN, J. R. The use of hollow fiber cross-microfiltration in bioaccumulation and continuous

- removal of heavy metals from solution by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology & Bioengineering**, v.44, n.11, p.1362-1366, 1994.
- [2] BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, n.1, p.149-154, 1994.
- [3] GOMES, F. P. **Estatística Experimental**. 13. ed. Piracicaba: ESALQ, 1990. 468 p.
- [4] HARRISON, N. Metals. In: WATSON, D. A. **Safety of Chemicals in Foods: Chemical Contaminants**. NEW YORK: Ellis Horwood, 1993. Cap.7, p.109-139.
- [5] HOLAN, Z. R.; VOLESKY, B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marina algae. **Biotechnology & Bioengineering**, v.43, n.11, p.1001-1009, 1994.
- [6] LODDER, J.; DE LEY, L. **The Yeast**. Amsterdam: North Holland, 1971. p.448-454.
- [7] KITAJIMA, E. W. **Curso Introdotório de Microscopia Eletrônica de Varredura**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 37 p.
- [8] MARTIN, T. D.; CREED, J. T.; LONG, S. E. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements. In: **Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples**. BOCA RATON: C. K. SMOLEY, 1992. Cap.2. p. 15-24.
- [9] MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E. Comportamento de Cobre, Cádmiio, Cromo, Níquel e Zinco Adicionados a Solos de Clima Tropical em Diferentes Valores de pH. Piracicaba, 1994. 197p. Tese [Livre-docência], Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP).
- [10] MURATA, L. T. F.; PASCUET, N. S.; NUNES, M. C. D. *et al.* Importância do Controle de Metais Pesados em Alimentos. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v.9, n.1, p.10-12, 1999.
- [11] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos Traço na Nutrição e Saúde Humanas**. São Paulo: ROCA, 1998. Cap. 16, p. 172-190.
- [12] REILLY, C. **Metal Contamination of Food**. London: Elsevier Applied Science, 1991. Cap.6, p.131-151.
- [13] ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. Cadmium: toxicology and analysis. **Analyst**. v.116, n.6, p.549-568, 1991.
- [14] SANDHU, S. S. Trace element distribution in various phases of aquatic systems of the savannah river plant. In: VANDERGRIFT, G. F.; REED, D. T.; TASKER, I. R. **Environmental Remediation**. Washington: American Chemical Society, 1992. cap.18, p.242-261. (ACS Symposium Series, 509).
- [15] SILVA, D. J. **Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, Cap.1, p.1-11: Conceitos gerais sobre análise de alimentos e determinação da matéria seca.
- [16] VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990a. Cap.1.1, p.3-6.
- [17] VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990b. Cap. 1.2, p.7-43.
- [18] ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST 2: Sistema de Análise Estatística para Computadores**. Piracicaba: SEI, 1992 (Softwear) .