

Determinação de isotermas de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* empregando acetato e sulfato de cádmio

Cadmium adsorption isotherms by Saccharomyces cerevisiae using cadmium acetate and sulphate

Silvana ALBERTINI^{1*}, Leandro Francisco do CARMO², Luiz Gonzaga do PRADO FILHO¹

Resumo

Para determinar as isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*, foram utilizados os sais acetato e sulfato de cádmio, nas concentrações de 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 mg.L⁻¹. A biomassa foi produzida a partir de uma cultura "starter" de *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904. Após o contato de 16 horas entre o microrganismo em estudo e as soluções teste, a biomassa foi separada por centrifugação e o teor de cádmio residual foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica diretamente no sobrenadante. Os dois sais testados demonstraram acúmulo crescente do metal nas concentrações de 5; 10; 20 e 40 mg.L⁻¹. Porém, nas concentrações de 60; 80 e 100 mg.L⁻¹, foi observado um acúmulo decrescente do metal, mostrando assim danos da parede celular, nem sempre evidenciados em nível de membrana citoplasmática, visualizados por microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: levedura; cádmio; metal pesado; adsorção; isoterma.

Abstract

To determine the isotherms of the adsorption of cadmium for *Saccharomyces cerevisiae*, acetate and sulphate salts were used at the concentrations of 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 mg.L⁻¹. The biomass was produced from a starter culture of *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1904. After the contact of 16 hours among the microorganism study and the solution-test, the biomass was separated by a centrifugation and the cadmium residue content was determined directly in the supernatant by atomic absorption spectrophotometry. For the two salts which were used, a growing accumulation of cadmium was observed at concentrations of 5, 10, 20, and 40 mg.L⁻¹. In the concentrations of 60; 80 and 100 mg.L⁻¹ a decrease in the accumulation of the metal was observed, showing damage to the cellular wall, not always observed at the membrane cytoplasmic's level, visualized by a scanning electron microscopy.

keywords: yeast; cadmium; heavy metal; adsorption; isotherm.

1 Introdução

O desenvolvimento tecnológico referente ao uso de metais foi de grande importância no contexto socioeconômico da humanidade. Por outro lado, contribuiu decisivamente para a poluição ambiental, afetando todas as formas de vida, pois eles são integrantes do meio ambiente e dos seres vivos²¹. Enquanto alguns dos metais são considerados benéficos, outros são danosos aos sistemas biológicos, dependendo da dose e da forma química.

Com exceção dos casos de exposição a altos níveis de poluição pelos efluentes ou emissões industriais ricas em metais pesados, o alimento e a água são as principais fontes de chumbo, cádmio e mercúrio. A proporção destes metais que alcançam o homem através dos alimentos e da água potável é de 80% para o cádmio, 40% para o chumbo e 98% para o mercúrio²².

O homem, estando no ápice da cadeia alimentar, consome alimentos provenientes do meio ambiente, e a presença de metais muitas vezes está associada à localização geográfica ou

diretamente aos níveis de metais existentes na água e no solo. A presença destes metais pode ser controlada pela limitação do uso de: produtos agrícolas que contenham metais, águas e solos contaminados destinados à produção de alimentos^{20,26}.

Métodos alternativos de remoção e/ou recuperação de metais estão sendo empregados com base nas propriedades sequestrantes de materiais naturais de origem biológica²⁹. 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* poderia ser obtida em grandes quantidades e a baixo custo, suprimindo uma fonte viável para aplicação em larga escala nos processos de remediação^{5,6,14}.

O cádmio é freqüentemente encontrado associado ao zinco. Assim, muitos compostos de zinco comercialmente disponíveis podem conter cádmio em baixos níveis¹³.

A concentração de cádmio encontrada na maioria dos alimentos¹⁷ é inferior a 0,15 mg.kg⁻¹, com exceção dos mariscos, cuja concentração de cádmio é da ordem de 1 a 2 mg.kg⁻¹, e dos rins, que apresentam uma concentração de cádmio em torno de 0,5 mg.kg⁻¹. O conteúdo de cádmio presente nas plantações de vegetais e cereais depende exclusivamente do tipo de solo utilizado, ou seja, se poluído por resíduos industriais ou urbanos ricos em cádmio ou se derivado de material geológico que contenha o minério de zinco ao qual o cádmio se encontra associado, a esfarelita²².

O cádmio é um elemento altamente tóxico e vem sendo descrito como um dos elementos traço mais perigosos de

Recebido para publicação em 22/03/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001702)

¹ Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba - SP, Brasil, albertin@esalq.usp.br

² Faculdade de Ciências da Saúde, Nutrição, Universidade Metodista de Piracicaba, Rua Tenente Florencio Pupo Netto, 300, Jardim Americano, CEP 16400-000, Lins - SP, Brasil, E-mail: lfcarmo@unimep.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

todos os metais contaminantes presentes nos alimentos e no ambiente do homem, não apenas pela sua toxicidade, mas também pela larga distribuição e aplicações industriais²⁶. O cádmio e outros compostos têm sido amplamente empregados na indústria com concomitante poluição ambiental. A emissão deste elemento ao ar se dá pelas minas, fundições do metal e indústrias usando compostos de cádmio para fabricação de ligas, baterias, pigmentos e plásticos¹³.

A ingestão máxima semanal tolerável de cádmio recomendada é de 7 µg.kg⁻¹ de peso corpóreo.^{32,33}

Fredrich Stromeyer, em 1817, fez a identificação do elemento químico cádmio como sendo uma impureza presente no carbonato de zinco²³. Os efeitos tóxicos produzidos pelo metal no organismo humano foram descritos primeiramente por Sovet em 1858²⁶, e a sintomatologia, por Marmé em 1867. Apesar disso, sais de cádmio foram usados como antihelmínticos, antissépticos, acaricidas e nematocidas, tendo sido citados em várias farmacopéias do início do século 20²⁴.

Até 1950, existiam poucas informações sobre o aspecto toxicológico do cádmio, apesar de sua crescente utilização a partir da primeira guerra mundial. Somente nas últimas décadas, houve um aumento significativo no número de estudos científicos sobre este metal. Este aumento de informações científicas ocorreu não apenas pela necessidade de se avaliarem os agentes químicos contaminantes do ambiente, mas também pelos avanços tecnológicos que colocaram à disposição dos pesquisadores equipamentos que permitiram avaliações mais precisas e exatas. O cádmio tornou-se um dos metais mais pesquisados, não só pelo fato de ser um elemento de excreção lenta, mas por apresentar uma meia-vida biológica longa em todo o organismo humano²⁶.

A biosorção é uma nova tecnologia para a remoção e recuperação de metais pesados de efluentes industriais. É um processo no qual se utilizam sólidos de origem vegetal ou microrganismos na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido⁹.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de retirar metais pesados da água, podendo ser usada como bioacumulador destes metais, sendo uma ótima alternativa para a descontaminação ambiental⁴.

O estudo das interações entre os microrganismos e os metais pesados tem um alto interesse científico. Dentre os fungos, as leveduras são as mais exploradas cientificamente devido ao fato de serem organismos eucariotos, de fácil manipulação, sendo consideradas um excelente modelo para o estudo de muitos problemas de considerada importância dentro da biologia dos eucariotos^{7,18}.

O cádmio pode interagir com as leveduras de forma ativa e/ou passivamente¹⁰ e, ainda que em baixas concentrações, prejudica o crescimento das leveduras em decorrência da formação de complexos que modificam a atividade biológica de componentes celulares como ácidos nucleicos, enzimas ou aminoácidos²¹, bem como danos em nível da parede celular^{1,3,28}. Estudos recentes¹¹ demonstraram que a presença de cádmio reduziu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em 88,6%.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (Resolução nº 20, 1986) – estabelece uma classificação para águas, de acordo com a sua utilização⁸: abastecimento doméstico; irrigação de hortaliças, de pastagens e aquicultura, em que os níveis de cádmio, se encontram entre 0,001 e 0,01 mg.L⁻¹. Os efluentes de indústrias, como o de galvanoplastia entre outras atividades, somente poderão ser lançados em corpos de água desde que obedeçam ao valor máximo de 0,2 mg Cd.L⁻¹

2 Material e métodos

2.1 Material

Todos os utensílios utilizados nos experimentos foram previamente lavados e secos, em seguida, descontaminados com solução de HNO₃, HCl e H₂O - na proporção 1 : 2 : 9 por um período de 4 horas – e, finalmente, enxaguados com água deionizada¹.

Levedura

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

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para produção de biomassa foi caldo GLT (glucose - extrato de levedura - triptona)⁶.

Sais de cádmio

Foram utilizados acetato e sulfato de cádmio, ambos com pureza superior a 99%.

2.2 Métodos

Delineamento estatístico

O experimento foi realizado segundo o delineamento estatístico casualizado com 2 sais, 7 concentrações e 3 repetições¹³. Os resultados foram analisados pelo programa SANEST³¹.

Produção de biomassa

A partir de uma cultura estoque de *Saccharomyces cerevisiae*, foi preparada uma cultura “starter” em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de caldo de cultura GLT, mantidos a uma temperatura de 21 °C em estufa por 24 horas. A cultura “starter” foi transferida dos tubos de ensaio para erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo de cultura GLT, mantidos sob agitação numa faixa de temperatura de 26 a 28 °C, por 48 horas em agitador orbital¹⁵.

Separação da biomassa

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

Determinação da matéria seca

A matéria seca foi determinada por processo indireto²³.

Contato biomassa-solução de cádmio

Foram preparadas soluções de acetato e sulfato de cádmio nas concentrações de 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 mg.L⁻¹. Cinquenta mililitros de cada solução foram transferidos, em triplicata, para erlenmeyers de 125 mL. A cada amostra foi adicionado o peso exato de 1,0 g de levedura úmida. O contato entre a biomassa e a solução em estudo foi sob agitação por um período de 16 horas, numa faixa de temperatura de 26 a 28 °C²⁰.

Determinação dos pontos da isoterma de adsorção

Após o contato de 16 horas, o conjunto biomassa-solução foi centrifugado à 1500 gravidades por 15 minutos, separando-se o sobrenadante, no qual foi determinado o teor de cádmio residual por espectrofotometria de absorção atômica. O cádmio absorvido pela levedura foi quantificado e os resultados expressos em mg Cd.g⁻¹ de matéria seca.

Exame da integridade da parede celular

Amostras de massas celulares obtidas por centrifugação foram preparadas e examinadas por microscopia eletrônica de varredura.¹⁶

3 Resultados e discussão

Os perfis das isotermas de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se acetato e sulfato de cádmio como sais contaminantes são mostrados na Figura 1.

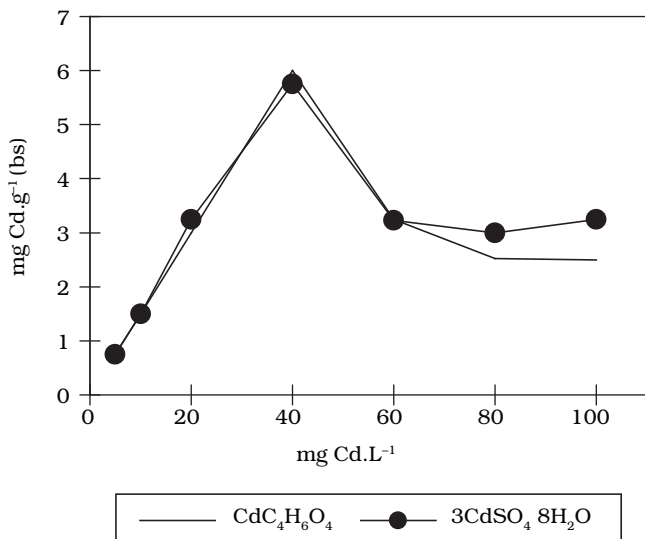


Figura 1. Isotermas de adsorção de sais de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* em solução de contato após 16 horas.

A Tabela 1 mostra as diferenças estatísticas, em nível de 1%, dos teores de cádmio acumulados pela levedura nas diversas concentrações para os dois sais em estudo. As diferenças estatísticas demonstram que o sal portador do metal tem influência no acúmulo deste pela levedura.

Nas concentrações de 40 e 60 mg.L⁻¹ na solução teste, o teor de cádmio acumulado pelos dois sais foi o mesmo. Porém

nas concentrações de 80 e 100 mg.L⁻¹, o cádmio do sulfato foi acumulado com uma eficiência superior ao do cádmio do acetato. Os danos causados às leveduras pela adsorção/absorção do cádmio, para os dois sais em estudo, podem ser observados através das microfotografias feitas nas células após cada experimento (Figuras 2 a 8).

As microfotografias mostram danos nas paredes celulares, nem sempre observados em nível de membranas citoplasmáticas. Nas concentrações superiores a 40 mg.L⁻¹, as células se apresentam danificadas e acumulando menos cádmio. Ainda que acima da concentração de 40 mg.L⁻¹ as células danificadas - Figuras 2 a 8 - não estejam vivas e funcionais, suas paredes continuam presentes na solução teste. Assim, se as paredes celulares fossem as únicas responsáveis pelo acúmulo de cádmio por adsorção, a concentração do metal, na solução teste, deveria variar pouco. Portanto, fica evidente que, até a dose de 40 mg.L⁻¹ na solução teste, ocorreu acúmulo do metal pela levedura tanto por adsorção às paredes celulares como por absorção ativa com gasto de energia pelas células². Porém, a contribuição quantitativa de cada um dos fenômenos, nas condições experimentais, não pode ser determinada com exatidão.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou capaz de reter o metal presente nas soluções, tendo potencial para ser utilizada na descontaminação de efluentes com concentrações de cádmio de até 40 mg.L⁻¹, reduzindo a quantidade deste metal em condições laboratoriais.

Tabela 1. Concentrações de cádmio adsorvido por *S. cerevisiae* em contato com soluções com diferentes concentrações deste elemento, durante 16 horas à temperatura média de 26 a 28 °C.

| Sais | CdC ₄ H ₆ O ₄ 2H ₂ O | 3CdSO ₄ 8H ₂ O |
|-------------------------------------|---|---|
| Concentrações (mg.L ⁻¹) | mg Cd.g ⁻¹ biomassa seca | mg Cd.g ⁻¹ biomassa seca |
| 5 | 0,75 ^b | 0,75 ^b |
| 10 | 1,50 ^b | 1,50 ^b |
| 20 | 3,00 ^d | 3,25 ^b |
| 40 | 6,00 ^a | 5,75 ^b |
| 60 | 3,25 ^b | 3,23 ^b |
| 80 | 2,52 ^b | 3,00 ^a |
| 100 | 2,50 ^c | 3,25 ^a |

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

4 Conclusões

Saccharomyces cerevisiae acumulou cádmio em quantidades crescentes até a concentração de 40 mg.L⁻¹ na solução teste.

Os dois sais de cádmio empregados mostraram-se altamente prejudiciais à integridade das células de levedura, em concentrações de 60; 80 e 100 mg.L⁻¹.

Os sais empregados como fontes de cádmio - acetato e sulfato - têm influência nos níveis de acúmulo do metal pelas células de levedura.

Até a concentração de 40 mg.L⁻¹ o acúmulo do metal pela levedura ocorreu das duas formas, ou seja, por adsorção às paredes celulares e por absorção, com gasto de energia.

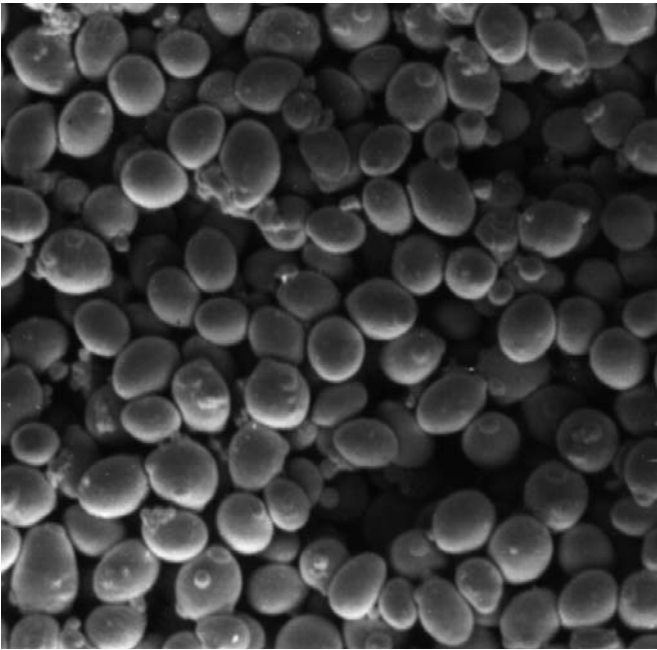


Figura 2. Água deionizada x 3.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com água deionizada por 16 horas a 26-28 °C. Água deionizada x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

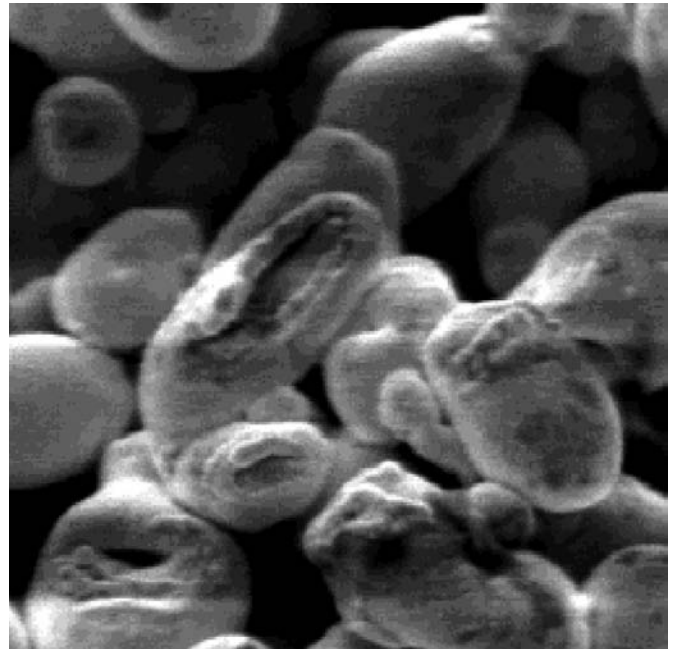


Figura 4. Ac 80 x 10.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 80 mg.L⁻¹ de acetato de cádmio (Ac) por 16 horas a 26-28 °C. Ac seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

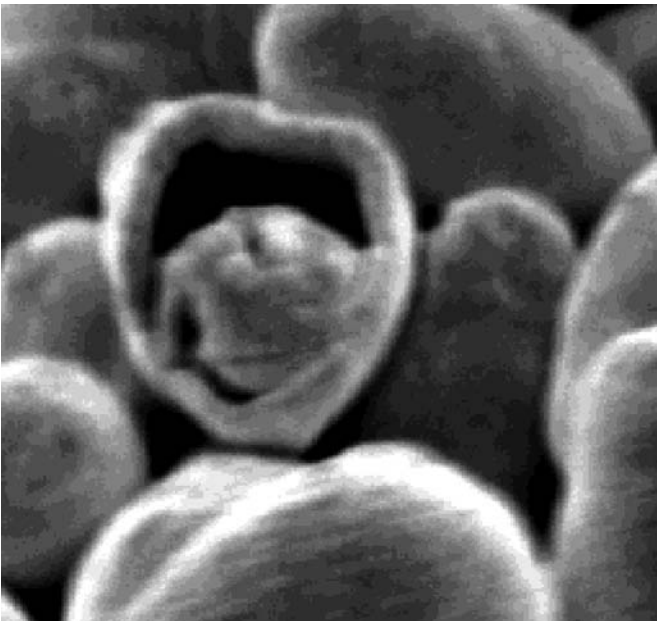


Figura 3. Ac 60 x 20.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 60 mg.L⁻¹ de acetato de cádmio (Ac) por 16 horas a 26-28 °C. Ac seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

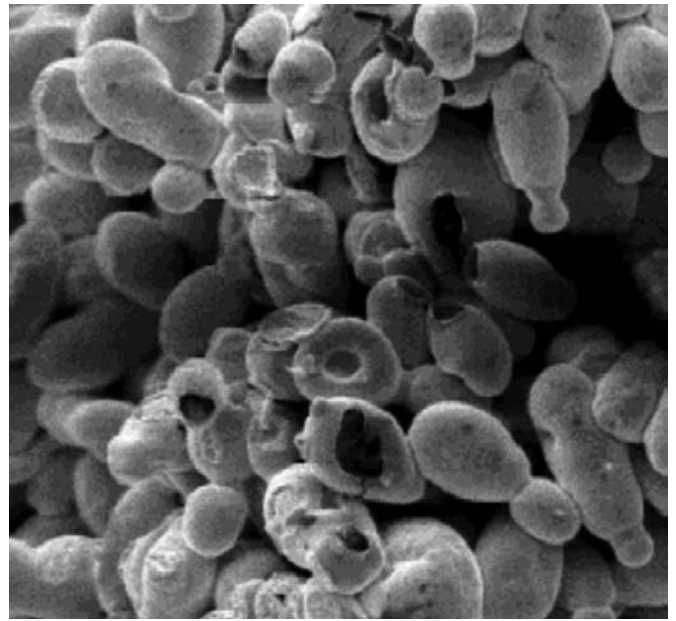


Figura 5. Ac 100 x 5.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 100 mg.L⁻¹ de acetato de cádmio (Ac) por 16 horas a 26-28 °C. Ac seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura em 12 jan. 2004.

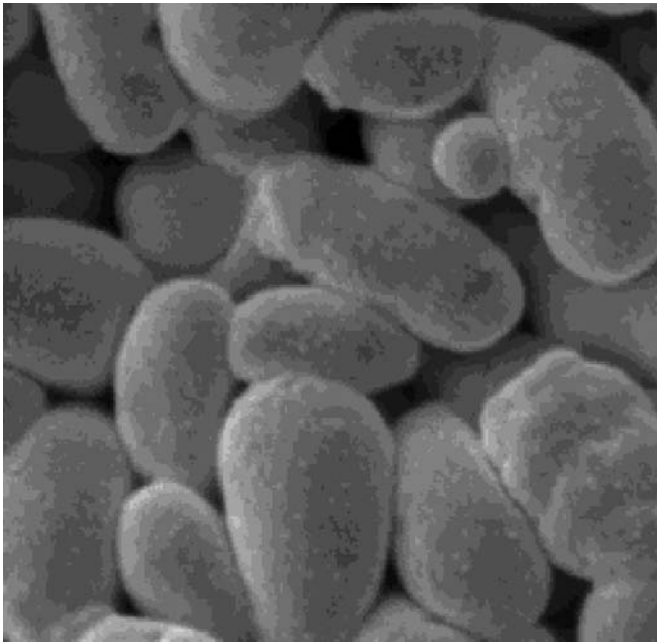


Figura 6. S 60 x 10.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 60 mg.L⁻¹ de sulfato de cádmio (S) por 16 horas a 26-28 °C. S seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

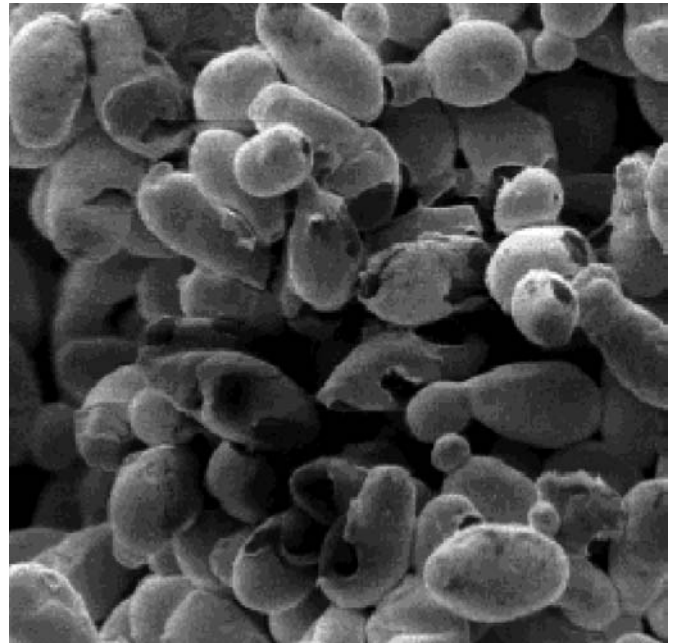


Figura 8. S 100 x 5.000 Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 100 mg.L⁻¹ de sulfato de cádmio (S) por 16 horas a 26-28 °C. S seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

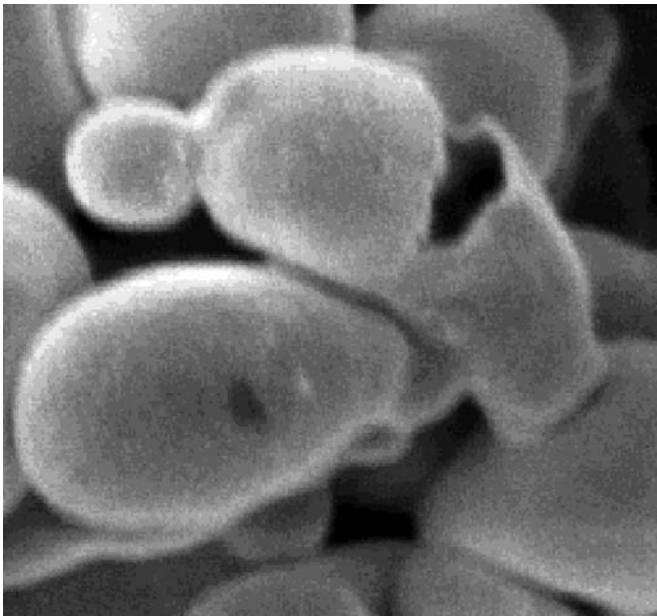


Figura 7. S 80 x 15.000 - Células de *S. cerevisiae* após contato com soluções a 80 mg.L⁻¹ de sulfato de cádmio (S) por 16 horas a 26-28 °C. S seguido de número = concentração do metal na solução x seguido de número = aumento empregado na microscopia eletrônica por varredura.

Referências bibliográficas

1. ALBERTINI, S. **Isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1999. 54 p.
2. ALBERTINI, S.; PRADO-FILHO, L. G. Isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 134-138, 2001.
3. ASSMANN, S.; SIGLER, K.; HÖFER, M. Cd²⁺ Induced damage to yeast plasma membrane and its alleviation by Zn⁺²: studies on *Schizosaccharomyces pombe* and reconstituted plasma membrane vesicles. **Archive of Microbiology**, v. 165, n. 4, p. 279-284, 1996.
4. BAYAN, Y. K.; KESKINLER, B.; ÇAKICE, A. LEVENT, M.; AKAY, G. Removal of divalent heavy metal mixtures from water by *Saccharomyces cerevisiae* using crossflow microfiltration. **Water Resource**, v. 35, n. 9, p. 2191-2200, 2001.
5. 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.
6. BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 1994.

7. BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINCO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**, 7^o ed. New Jersey, Prentice Hall, 1994. 909 p.
8. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 20 de 31 de junho de 1986. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86res2086.htm>. Acesso em 16 nov. 2006.
9. COSSICH, E. S.; TAVARES, C. R. G.; TAVARES, C. R. G.; SILVA, E. A.; RAVAGNANI, T. M. K. Bissorção de cromo. Disponível em http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/Monografias_Teneria/capitulovii.htm. Acesso em 10 jan. 2004
10. DALLAQUA, M.; TRAVAIOLI, J. A.; CARTES, C. L.; BASSO, L. C.; MARIANO-DA-SILVA, S. Efeitos de diferentes níveis de pH na ação tóxica do cádmio sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. In: Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 7. Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, 10, Congresso de Iniciação Científica da ESALQ, 17; 2000. **Resumos...** Piracicaba: ESALQ/USP, 2000.
11. FREITAS, F. P. P.; BASSO, L. C. Uso da vinhaça na atenuação da toxidez de cádmio e níquel utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* como indicador biológico. In: Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 8. Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, 11, Congresso de Iniciação Científica da ESALQ, 18; 2000. **Resumos...** Piracicaba: ESALQ/USP, 2000.
12. GOMES, F. P. **Estatística Experimental**. 13^o ed. Piracicaba: ESALQ, 1990. 468 p.
13. HARRISON, N. Metals. In: WATSON, D. A. **Safety of Chemicals in Foods: Chemical Contaminants**. NEW YORK: Ellis Horwood, 1993. Cap.7, p.109-139.
14. 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.
15. LODDER, J.; DE LEY, L. **The Yeast**. Amsterdam: North Holland, 1971. p. 448-454.
16. KITAJIMA, E. W. **Curso Introductório de Microscopia Eletrônica de Varredura**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 37 p.
17. LAGRIFFOUL, A. MOCQUOT, B. VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) **Plant and soil**, v. 200, n. 2, p. 241-250, 1998.
18. MARIANO-DA-SILVA, S.; BASSO, L. C. Efeitos do Cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p.16-22, 2004.
19. 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.
20. MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Biosorption of metals using nonliving biomass. **Minerals and Metallurgical Processing**, v. 12, n. 4, p. 189-195, 1995.
21. 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.
22. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos Traço na Nutrição SSS Humanas**. São Paulo: ROCA, 1998. Cap. 16, p. 172-190.
23. REILLY, C. **Metal Contamination of Food**. London: Elsevier Applied Science, 1991. Cap.6, p. 131-151.
24. ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. Cadmium: toxicology and analysis. **Analyst**. v. 116, n. 6, p. 549-568, 1991.
25. ROMANDINI, P.; TALLANDINI, L.; BELTRAMINI, M. SALVATO, B.; MANZANO, M.; De 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-C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 103, n. 2, p. 255-262, 1992.
26. SALGADO, P. E. Metais em Alimentos. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap. 52, p.442-460.
27. SILVA, D. J. **Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1981. Cap. 1, p. 1-11: Conceitos gerais sobre análise de alimentos e determinação da matéria seca.
28. SILVA, S. M. G. **Efeitos do cádmio sobre a fermentação alcoólica e o uso da vinhaça para atenuar a sua ação tóxica**. Piracicaba, 2001. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001. 142 p.
29. VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990a. Cap. 1.1, p. 3-6.
30. VOLESKY, B. **Biosorption of Heavy Metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990b. Cap. 1.2, p. 7-43.
31. ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST 2: Sistema de Análise Estatística para Computadores**. Piracicaba: SEI, 1992 (Software).
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental health criteria nº 134: Cadmium. Disponível em www.inchem.org/documents/jefca/jefmono/v024je01.htm. Acesso em 08 jan. 2004.
33. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food additives series nº 24. Disponível em www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm