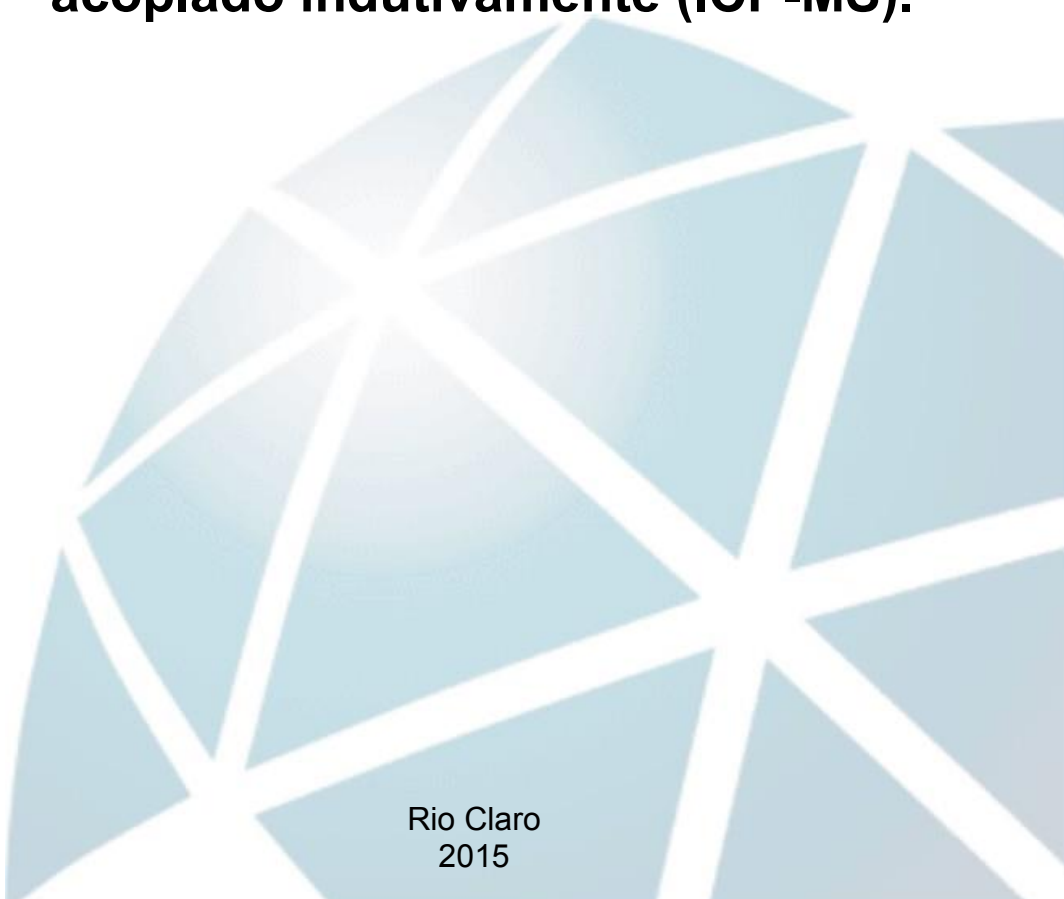

Ciências Biológicas

Felipe Takayanagi Todo

**Especiação de Cádmio (Cd) em citosol
utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e
espectrometria de massas com plasma
acoplado indutivamente (ICP-MS).**



Rio Claro
2015

Felipe Takayanagi Todo

**Especiação de Cádmio (Cd) em citosol utilizando
Saccharomyces cerevisiae e espectrometria de massas
com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)**

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2015

576 Todo, Felipe Takayanagi
T639e Especiação de cadmio (Cd) em citosol utilizando
Saccharomyces cerevisiae e espectrometria de massa com
plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) / Felipe
Takayanagi Todo. - Rio Claro, 2015
20 f. : il., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro
Orientador: Amauri Antonio Menegário

1. Microorganismos. 2. Saccharomyces cerevisiae. 3.
ICP-MS. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Especiação de Cádmio (Cd) em citosol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Resumo

O cádmio (Cd) é um metal tóxico considerado não essencial nos organismos. As principais vias de exposição e contaminação pelo metal vem de atividades antrópicas. Há evidências suficientes de que o Cd e seus compostos são carcinogênicos, tendo como principais órgãos afetados: rins, ossos, pulmões e próstata. No citosol o Cd pode estar na forma “livre” (genericamente, como complexos inorgânicos lábeis) ou ligado com metalotioneínas (genericamente, ligado a proteínas). A relação do Cd (“livre” ou lábil) com patogenicidades faz com que seja de grande importância a elaboração de métodos para especificação do metal. Este projeto teve como objetivo propor um método para determinação seletiva do Cd lábil em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) utilizando um substrato biológico como material sorvente (*S. cerevisiae*). A utilização da *S. cerevisiae* tem sido recomendada para pré-concentração e especificação de metais em água e materiais biológicos. No entanto, estes métodos não proporcionam limites de detecção (LD) suficientes para determinação seletiva de Cd lábil em algumas situações, particularmente quando se procura estabelecer uma relação desta fração do metal com algumas patogenicidades. O método desenvolvido consiste, basicamente, em amostrar o Cd lábil no citosol pela levedura. Depois de digestão ácida em sistema pressurizado (micro-ondas) e/ou da eluição, a espécie retida pela levedura foi determinada por ICP-MS. O uso da ICP-MS permitiu atingir LD suficientes para detecção de Cd, sendo para retenção $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ e para a eluição $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras-chave: Especificação de cádmio, *Saccharomyces cerevisiae*, ICP-MS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Toxicidade do Cd	4
1.2 Retenção do Cd	6
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2 OBJETIVO	8
3 METODOLOGIAS	8
3.1 Equipamentos e Acessórios	8
3.2 Reagentes e Soluções	9
3.3 Procedimento de tratamento da levedura	9
3.4 Procedimento de digestão ácida em sistema pressurizado do material biológico (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) da fase sólida	9
3.5 Procedimento de extração em fase sólida.....	10
3.6 Procedimento de eluição	11
3.7 Extração do citosol de fígado de boi / Determinação Cd (“livre” ou lábil) com levedura	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Tratamento da levedura (“lavagem” ácida)	12
4.2 Análise da fase líquida / Retenção de Cd na <i>S. cerevisiae</i>	13
4.3 Análise da eluição do Cd da <i>S. cerevisiae</i>	14
4.4 Análise da concentração de Cd no citosol de fígado de boi / Determinação do Cd (“livre” ou lábil) com levedura	14
5 CONCLUSÃO	15
5 BIBLIOGRAFIA	16

1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um elemento químico de número atômico 48 e massa atômica equivalente a 112,4u que foi descoberto em 1817 por Friedrich Strohmeyer. Trata-se de um metal de transição branco azulado de toxicidade semelhante à do mercúrio cujo uso principal se dá na fabricação de baterias de níquel-cádmio. O Cd pode ser encontrado naturalmente como sulfeto de Cd (mineral denominado Greenockite), em associação com o zinco, em baixas concentrações em águas de lençóis freáticos e águas superficiais não contaminadas (concentração menor que 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em alguns alimentos (CHASIN; CARDOSO, 2003; REEVES; CHANEY, 2008).

As principais vias de exposição e contaminação por Cd vem de atividades antrópicas como extração de minérios, indústrias siderúrgicas, utilização de fertilizantes fosfatados e lodo de esgoto na agricultura, vazamentos de aterros sanitários, uso de baterias níquel-cádmio, pigmentos (como por exemplo o sulfeto de cádmio, utilizado para fabricação de pigmentação amarela), plásticos e processos de galvanização. O Cd também está presente na fumaça de cigarro, sendo esta uma fonte significativa de exposição ao metal e tornando seu estudo particularmente importante para a área da saúde pública (SALDIVAR et al., 1991; STACEY; KLAASSEN, 1997; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1998; CHASIN; CARDOSO, 2003).

1.1 Toxicidade do Cd

O Cádmio (Cd) é um metal tóxico considerado não essencial, não exercendo uma função biológica no organismo. Dessa forma sua atividade no organismo pode causar reações adversas, agravadas pela sua característica organocumulativa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992; REEVES; CHANEY, 2008). Alguns metais tóxicos, denominados antimetabólitos, apresentam características químicas (eletronegatividade, configuração eletrônica) semelhantes aos metais essenciais e interagem com o organismo inibindo as funções das células, incluindo a divisão

celular (BRZÓSKA; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001). Estudos apresentam um importante alvo de ação Cd. Os íons de Cd^{2+} apresentam toxicidade, interferindo na captação dos metais essenciais, como Zinco, Cálcio, Ferro (ROMERO-ISART; VASAK, 2002; REEVES; CHANEY, 2008).

Os principais órgãos afetados pelo Cd são rins, ossos e pulmões, sendo os principais meios de exposição via oral (por ingestão de água e alimentos contaminados) e por inalação, particularmente no caso de fumantes expostos à fumaça do cigarro. Existem evidências suficientes de que o Cd e seus compostos são carcinogênicos; o aumento nas taxas de cânceres de testículo, próstata e pulmão em animais relacionadas com a exposição ao Cd tem sido descrito na literatura (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008). Ratos, quando expostos à alta dose de Cd, apresentaram hemorragia testicular, necrose, perda da produção de testosterona e hiperplasia e neoplasia das células intersticiais do testículo. (GOYER; LIU; WAALKES, 2004).

CONAMA. Resolução 357 (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que dispõe sobre a classificação de corpos de água – Águas classe 1: padrões para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo, a concentração de Cd aceitável é de 0,001 mg/L. Águas classe 3: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; à dessedentação de animais, estipula que a concentração de Cd aceitável é de 0,01 mg/L (CONAMA, 2005).

Níveis significativamente maiores de câncer de próstata, em homens, foram encontrados em locais contaminados por Cd (0,2 a 0,7 mg L⁻¹) em relação àqueles considerados não contaminados (0,02 a 0,1 mg L⁻¹) no Japão. Tal como a incidência de hiperplasia de próstata (SHIGEMATSU et al., 1982).

Estudos sobre a relação entre a taxa de câncer de próstata, no homem, e a ocorrência de Cd no ambiente (amostra de água doce, águas residuais, solo, trigo e cevada) no Canadá mostraram que a cidade com maior incidência de câncer de próstata tinha as maiores concentrações de Cd nas amostras ambientais, enquanto que a cidade com menor incidência apresentou menores concentrações de Cd nas

amostras (BAKO et al., 1982).

Alguns trabalhos relacionaram a exposição ocupacional ao Cd e a incidência do câncer de próstata em locais de trabalho vinculados à indústria de mineração, de papel e madeira, medicina e ciência (ELGHANY et al., 1990).

O Cd (“livre” ou lábil) é um elemento tóxico de lenta excreção pelo organismo humano, até mesmo em baixas concentrações (MENA et al. 1996), e em alguns organismos pode ser acumulado, interagindo efetivamente com a proteína metalotioneína (MT) (FRIBERG et al. 1979).

As proteínas metalotioneínas (MTs) são proteínas monoméricas compostas de dois domínios globulares com alto conteúdo de cistinas em sua estrutura, permitindo a formação de *clusters* tiol-metal capazes de se ligarem a metais divalentes (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). O estresse oxidativo pode ser a causa da ocorrência de Cd (“livre” ou lábil) nas células, que ocorre por substituição de metais de ligação pela saturação de sites de metalotioneínas ou liberação do íon acumulado em Cd-MT (BISCARO, MENEGARIO, 2007; MENEGÁRIO et al., 2007).

1.2 Retenção do Cd

São encontrados na literatura alguns métodos baseados na retenção do metal Cd (“livre” ou lábil) em sorventes inorgânicos (VASSILEVA; PROINOVA; HADJIIVANOV, 1996), resinas adsorptivas (ABOLLINO et al., 1990; SARAÇOGLU; ELÇI, 2002), quelantes (SAXENA; SINGH; SAMBI, 1994; TEWARI; SINGH, 1994; SAXENA; SINGH, 1997; PAI; WHUNG; LAI, 2002) e catiônicas (MENEGÁRIO; GINÉ, 2000). São encontrados também métodos alternativos para pré-concentração e retenção do metal utilizando substratos biológicos como microrganismos, dentre eles algumas algas (MAJIDI; HOLCOMBE, 1988; MAJIDI; HOLCOMBE, 1989; MAHAN; MAJIDI; HOLCOMBE, 1992), bactérias (BAG; TURKER; LALE, 2000) e fungos (ELMAHADI; PUCHADES, 1994; BAG; TURKER; LALE, 1999; MAQUIEIRA; BISCARO; MENEGARIO, 2007; MENEGARIO et al., 2007).

Este trabalho por sua vez realiza a retenção do Cd utilizando a *S. cerevisiae*, que apresenta vantagem que serão discutidas a seguir.

1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, levedura. **Classificação:**

- Reino: *Fungi*
- Filo: *Ascomycota*
- Classe: *Saccharomycetes*
- Ordem: *Saccharomycetales*
- Família: *Saccharomycetaceae*
- Gênero: *Saccharomyces*
- Espécie: *Saccharomyces cerevisiae*

Organismo eucarionte unicelular. A levedura comumente utilizada na produção de pães e bebidas fermentadas.

A utilização da *Saccharomyces cerevisiae* se justifica pela sua capacidade de retirar metais “pesados” (metais não essenciais) da água, podendo ser usada como bioacumulador desses metais (BISCARO; MENEGARIO, 2007). Além disso, apresenta sensibilidade a outros metais “pesados”, alta capacidade de sorção e rápida sorção quantitativa (MAQUIEIRA; ELMAHADI; PUCHADES, 1994; BAG; TURKER; LALE, 1999), e é um sorvente sólido (CAMEL, 2003). Uma outra característica interessante que recorre a partir do uso de um substrato biológico como material sorvente em extrações em batelada é uma possível determinação do analito em uma suspensão em fase sólida, podendo-se eliminar as etapas de eluição do analito e condicionamento do material, agilizando e simplificando o processo de separação (SMICHOWSKI et al., 2000; BISCARO; MENEGARIO, 2007). Outro aspecto é que a levedura pode ser adquirida desidratada e em grande quantidade, sendo um material barato, além de não apresentar patogenicidade (BISCARO; MENEGARIO, 2007).

A relação do Cd (“livre” ou lábil) com patogenicidades como cânceres faz com que seja de grande importância a elaboração de métodos que permitam a sua quantificação em baixas concentrações (ng L^{-1}) e especiação do elemento (“livre” e/ou lábil ou na forma orgânica, ligado). Isto requer procedimento de pré-concentração e/ou separação dos analitos da amostra antes da determinação, até

mesmo quando são utilizadas técnicas analíticas sensíveis como espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O desenvolvimento de ferramentas analíticas e análises de especiação de metais envolve a busca por protocolos simples, de baixo custo, robustos e que possibilitem a compreensão da dinâmica das espécies metálicas (estabilidade, mobilidade e labilidade).

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo propor um método para a determinação e especiação de Cd (“livre” ou lábil) em baixas concentrações (níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$) utilizando substrato biológico - a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) - e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

3 METODOLOGIA

3.1 Equipamentos e acessórios

1. Espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Thermo XSERIES 2, Germany).
2. Agitador (Labnet – Orbit 300).
3. Centrífuga (tubos 15ml).
4. Centrífuga (tubos 50ml).
5. Micro-ondas em sistema pressurizado (Berghof speedwave, Germany).
6. Estufa de Secagem e Esterilização (Mod. 320 – SE Circulação Mecânica FANEM – São Paulo - Brasil).
7. Vidrarias e frascos comumente utilizados em laboratórios de química.

3.2 Reagentes e Soluções

1. Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comércio local (“Fermix”).
2. Ácido nítrico 60% (m/m) (Merck, Darmstadt, Germany).
3. Ácido clorídrico 1 molar (Merck, Darmstadt, Germany).
4. Solução “Tris” [tris(hydroxymethyl) aminomethane] (Sigma-Aldrich).
5. Água purificada, resistividade 18 M Ω (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).
6. Soluções padrão Cd (High-Purity Standards, Charleston, USA).
7. Tecido animal, fígado de boi (CRM – Agro. Embrapa - Pecuária Sudeste).

3.3 Procedimento de tratamento da levedura

Consiste em adicionar uma quantidade estabelecida do substrato biológico, *Saccharomyces cerevisiae* (0,400g), em um tubo de centrífuga (15mL), completar o volume para 10ml, acidificar com ácido clorídrico um molar (HCl 1M). Os tubos foram colocados em um agitador por 40 minutos a 60 rpm. As fases sólidas e líquidas foram separadas através da centrífuga (4200rpm por 10 min.). Após a separação foram efetuadas mais 4 vezes o procedimento com água Mili-Q com o intuito de retirar todo o ácido. Para a comparação foram adicionados tubos com a mesma quantidade estabelecida do substrato e o mesmo volume, completados com água Mili-Q (18 Ω). A fase sólida foi secada na estufa antes da utilização e posteriormente digerida em sistema ácido pressurizado e analisado no ICP-MS para a validação do procedimento.

3.4 Procedimento de digestão ácida em sistema pressurizado do material biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) da fase sólida

Foi adicionado 4 ml de ácido nítrico concentrado (HNO₃) à biomassa, mantendo em temperatura ambiente durante 20min em tubos de digestão em micro-ondas.

Tabela 01. Programa estipulado para a digestão ácida em sistema pressurizado das amostras de levedura ($0,4000g \pm 0,0300g$)

STEP	Temp. °C	RAMPA (min)	PRESSÃO (bar)	TEMPO (min)	Magnetron %
STEP 1	170,0	10	35,0	10	80,0
STEP 2	200,0	1	35,0	5	80,0
STEP 3	50,0	2	35,0	1	0,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

O resíduo foi completado com água Mili-Q ($18M\Omega$) a um volume final de 40ml e analisado no ICP-MS.

3.5 Procedimentos de extração em fase sólida

Método baseado no procedimento de BISCARO; MENEGARIO, 2007. Adaptado o necessário para conseguir atingir os limites de detecção em baixas concentrações.

Consiste em adicionar uma alíquota (10mL) em um tubo de centrifuga (15mL) contendo uma quantidade estabelecida do substrato, *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizado uma solução “TRIS” com pH 7 e a mistura foi agitada (60 rpm, 40 min). As fases líquidas e sólidas foram separadas por centrifugação (4200 rpm, 10 min).

A fase sólida passou por um processo de eluição. A fase líquida foi analisada diretamente no ICP-MS.

3.6 Procedimento de eluição da levedura

A fase sólida passou por um procedimento de eluição com ácido nítrico dois molar (HNO_3 2M), volume de 2ml, colocado no agitador por 2 horas à 60 rpm. As fases líquidas e sólidas foram separadas por centrifugação e posteriormente a fase líquida foi analisada no ICP-MS.

3.7 Procedimento de extração do citosol de fígado de boi (material certificado) / Determinação e especificação de Cd (“livre” ou Lábil) utilizando substrato biológico, levedura

O material certificado foi colocado em uma solução “TRIS” (pH 7) numa razão de 1g por 50 ml (tubos falcon 50 ml) e agitado por 2 horas para a hidratação e posteriormente a fase líquida foi separada por centrifugação (15000g, 30 min à 4°C) colocados em tubos de 15ml num volume final 10ml (solução “TRIS” pH 7) e analisada no ICP-MS.

Para a determinação do Cd (“livre” ou lábil), foi introduzido na solução o micro-organismo *S. cerevisiae* (levedura) com o intuito de reter o metal. Foi utilizado uma alíquota de 10 ml em tubos de centrifuga de 15 ml contendo 0,0650g da levedura. Os tubos foram agitados manualmente por 30s. Em seguida, as fases sólidas e líquidas foram separadas por centrifugação (4200rpm durante 7 min). A fase líquida foi transferida para outro tubo de 15 ml e analisado no ICP-MS e a fase sólida passou pelo processo de eluição descrita anteriormente e analisado em ICP-MS.

Testes de recuperação foram feitos para a validação do procedimento.

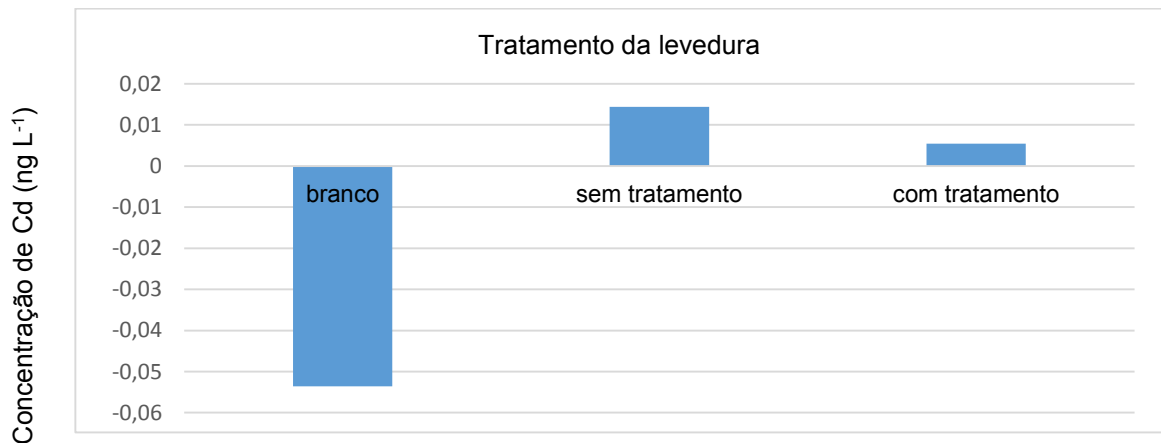
O Centro de Estudos Ambientais / UNESP (CEA/UNESP) dispõe de todos os equipamentos e acessórios necessários para realização do Projeto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados e discutidos nas figuras 1, 2 e 3.

4.1 Tratamento da levedura (“lavagem” ácida)

Figura 01. Concentrações de Cd apresentada pela levedura com o tratamento e sem o tratamento. Concentrações $\mu\text{g L}^{-1}$.

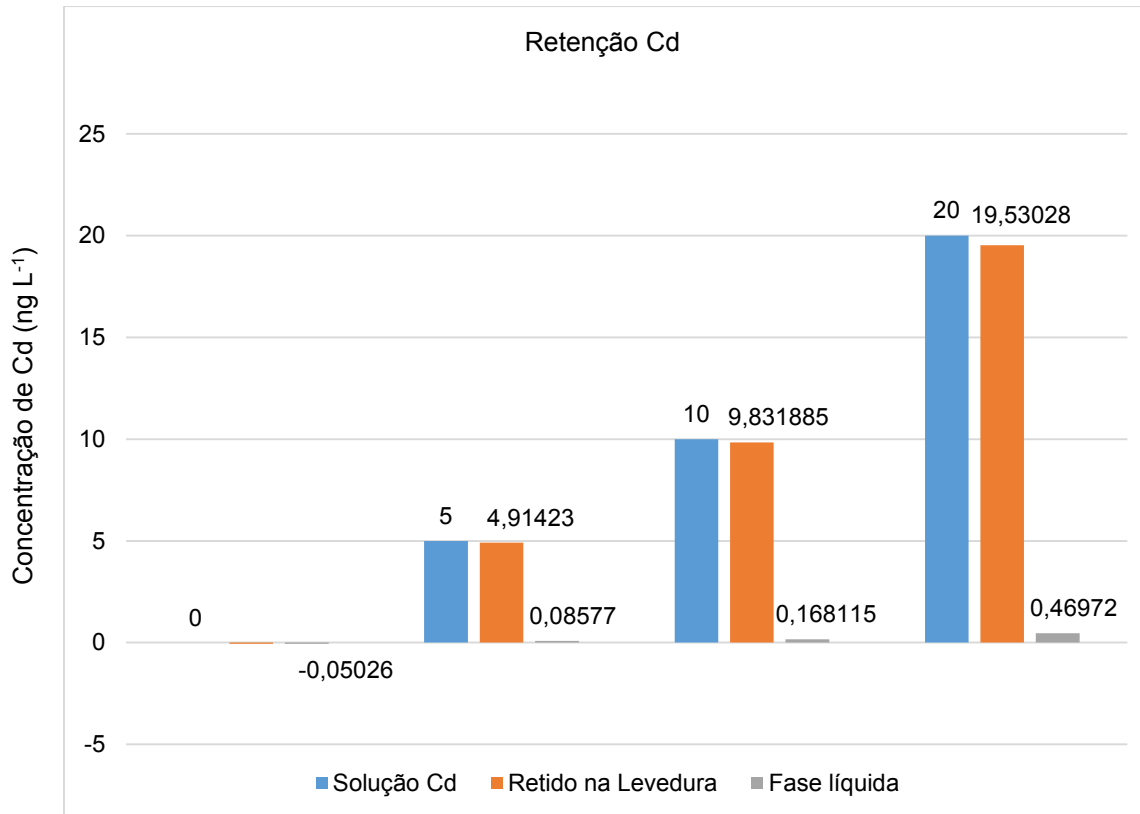


Fonte: Elaborada pelo autor.

O tratamento apresentou-se efetivo. O limite de detecção (LD) foi de $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando uma menor concentração de Cd na levedura que passou pelo tratamento. A concentração da levedura sem o tratamento foi de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, desvio padrão de $0,08$ e com o tratamento foi de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$, desvio padrão de $0,068$.

4.2 Análise da fase líquida / Retenção de cádmio na levedura

Figura 02. Concentrações de Cd retidas pela levedura ($0,2500\text{g}\pm 0,0200\text{g}$). Concentrações testadas ($5\ \mu\text{g L}^{-1}$, $10\ \mu\text{g L}^{-1}$, $20\ \mu\text{g L}^{-1}$).



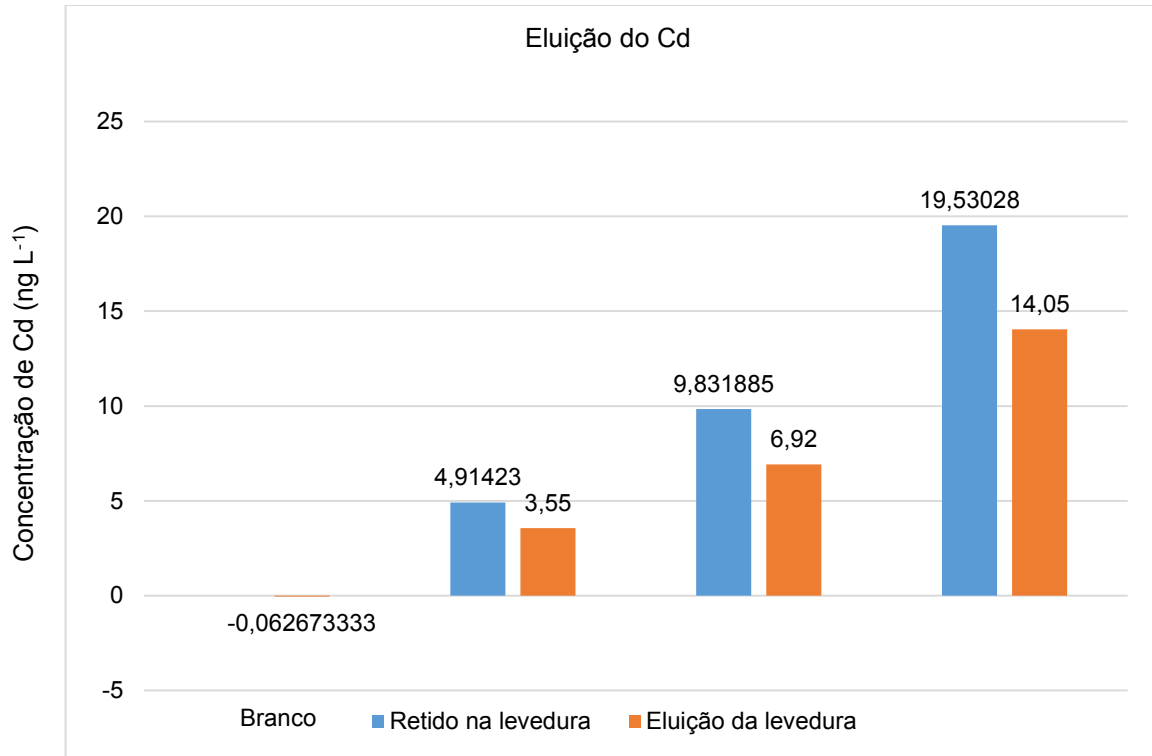
Fonte: Elaborada pelo autor.

A levedura apresentou um alto grau de retenção do metal Cd. O LD da análise da fase líquida foi de $0,004\ \mu\text{g L}^{-1}$.

Quando exposta à concentração de $5\ \mu\text{g L}^{-1}$ a fase líquida referente analisada apresentou uma concentração de $0,085\ \mu\text{g L}^{-1}$ com desvio padrão de 0,038, demonstrando que a levedura reteve 98,28% do metal. Na concentração de $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ a fase líquida referente apresentou uma concentração de $0,16\ \mu\text{g L}^{-1}$, com desvio padrão de 0,008, demonstrando que 98,31% do metal foi retido na levedura. Na concentração de $20\ \mu\text{g L}^{-1}$ a fase líquida apresentou $0,46\ \mu\text{g L}^{-1}$ com desvio padrão de 0,072 mostrando que 97,65% do metal ficou retido na levedura.

4.3 Análise da eluição da levedura

Figura 03. Concentrações de Cd eluído da levedura ($0,2500\text{g} \pm 0,0200\text{g}$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A recuperação do Cd a partir da eluição da levedura de concentração $4,91 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 72,23% com desvio padrão de 0,037, na levedura de concentração $9,83 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 70,38% com desvio padrão de 0,081 e na levedura de concentração $19,53 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 71,93% com desvio padrão de 0,19.

4.4 Análise da concentração de Cd do citosol de fígado de boi (material certificado) / Determinação e especificação de Cd (“livre” ou lábil) no citosol utilizando a levedura

Os resultados das análises ainda estão sendo investigados.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a levedura empregada demonstrou-se um ótimo bioacumulador e um ótimo instrumento de especificação do metal Cd, apresentando mais de 97% de retenção até mesmo em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$).

O método de eluição demonstrou-se efetivo, com 2 horas de agitação em ácido HNO_3 2M mais de 70% do metal foi recuperado.

O uso da ICP-MS permitiu atingir o LD de $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ para a eluição da levedura e LD de $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ para a retenção, suficientes para detecção de Cd (“livre” ou lábil) em algumas situações, quando se procurou estabelecer uma relação desta fração do metal em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) em material biológico.

Os sucessos dos resultados obtidos fornecem uma base para futuros estudos de retenção e especificação de Cd e outras possibilidades a serem investigados (por exemplo com a utilização de outros metais) e também para a utilização desta metodologia em situações reais de análises de materiais biológicos e até mesmo em situações de remediação de ambientes contaminados.

BIBLIOGRAFIA

ABOLLINO, O.; MENTASTI, E.; PORTA, V.; SARZANINI, C. Immobilized 8-oxine units on different solid sorbents for the uptake of metal traces. **Anal Chem**, v. 62, n. 21, 1990.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological Profile for Cadmium**. Atlanta, U.S. Public Health Service, 1998.

BAG, H.; TURKER, A. R.; LALE, M. Determination of trace metals in geological samples by atomic absorption spectrophotometry after preconcentration by *Aspergillus niger* immobilized on sepiolite. **Anal Sci**, v. 15, n. 12, p. 1251-1256, 1999.

BAG, H.; TURKER, A. R.; LALE, M. Determination of Cu,Zn,Fe, Ni and Cd by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration by *Escherichia coli* immobilized on sepiolite. **Talanta**, v. 51, n. 5, 2000.

BAKO, G.; SMITH, E.S.; HANSON, J.; DEWAR, R. The geographical distribution of high cadmium concentrations in the environment and prostate cancer in Alberta. **Can J Public Health** v. 73, n. 2, p. 92-94, 1982.

BISCARO, P. A.; MENEGÁRIO, A. A. Pré-concentração de cádmio com *Saccharomyces cerevisiae* e determinação em águas fluviais usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. **Quim Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 323-326, 2007.

BROZÓSKA, M. M.; MONIUSKO-JAKONIUK, J. Interactions between cadmium and zinc in organism. **Food Chem Toxicol**, v. 29, p. 967-980, 2001.

CHASIN, A. A. M.; CARDOSO, L. M. N. Cádmio. In: DE AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Eds). **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003, cap. 10.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochim Acta**, Part B, v. 58, n. 7, p. 1177-1233, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução Nº 357, de 18 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **DOU 053**, p.58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 20/01/2015.

ELGHANY, N. A.; SCHUMACHER, M. C.; SLATTERY, M. L.; WEST, D. W.; LEE, J. S. Occupation, cadmium exposure and prostate cancer. **Epidemiology**, v. 1, p. 107-115, 1990.

FRIBERG, L.; KJELLSTROM, T.; NORDBERG, G.; PISCATOR, M. Cadmium. In: **Handbook on the toxicology of metals**, Amsterdam: Elsevier, 1979, 355p.

GOYER, R. A.; LIU, J.; WAALKES, M.P. Cadmium and cancer of prostate and testis, **BioMetals**, v. 17, n. 5, p. 555–558, 2004.

MAHAN, C. A.; MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J. A. Preconcentration of trace metals using silica-immobilized algae cells in a chromatographic separation procedure, **Anal Chem** v. 47, n. 13, p. 1483-1495, 1992.

MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J. A. Separation and preconcentration of cadmium by biological organisms and analysis by graphite furnace atomic absorption. **Spectrochim Acta**, Part B, v. 43, n. 12, p. 1423-1429, 1988.

MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J. A. Pre-concentration of cadmium from environmental samples by an alga and analysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal At Spectrom**, v. 4, p. 439-442, 1989.

MAQUIEIRA, A.; ELMAHADI, H. A. M.; PUCHADES, R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* in flow injection atomic absorption spectrometry for trace metal preconcentration. **Anal Chem**, v. 99, n. 66, p. 1462-1467, 1994.

MENA, C.; CABRERA, C.; LORENZO, M. L.; LÓPEZ, M. C. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. **Sci Total Environ**, v. 181, p. 201-208, 1996.

MENEGÁRIO, A. A.; GINÉ, M. F. Micro-scale flow system for on-line multielement preconcentration from saliva digests and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochim Acta**, Part B, v. 56, n. 10, p. 1917-1925, 2000.

MENEGÁRIO, A. A.; TONELLO, P. S.; BISCARO, P.A.; BROSSI-GARCIA, L. A. Determination of Cd(II) and Cd-metallothioneins in biological extracts using baker's yeast and inductively coupled plasma optical emission spectrometry, **Microchimica Acta**, v. 159, n. 3-4, p. 247-254, 2007.

PAI, S. C.; WHUNG, P. Y.; LAI, R. L. Pre-concentration efficiency of chelex-100 resin for heavy metals in seawater: part 1. Effects of pH and salts on the distribution ratios of heavy metals. **Anal Chim Acta**, v. 211, p. 257-270, 1988.

REEVES, P. G.; CHANEY, R. L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: a review. **Sci Total Environ**, v. 398, n. 1-3, p. 13-19, 2008.

ROMERO-ISART, N.; VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **J Inorg Biochem**, v. 88, n. 3/4, p. 388-96, 2002.

SALDIVAR, R. L.; LUNA, M.; REYES, E.; SOTO, R.; FORTUL, T. Cadmium determination in Mexican-produced tobacco. **Environ Res**, v. 55, n. 1, p. 91-96, 1991.

SARAÇOĞLU, S.; ELÇI, L. Column solid-phase extraction with Chromosorb-102 resin and determination of trace elements in water and sediment samples by flame atomic absorption spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 452, n. 1, p. 77-83, 2002.

SAXENA, R.; SINGH, A. K. Pyrocatechol Violet immobilized Amberlite XAD-2: synthesis and metal-ion uptake properties suitable for analytical applications. **Anal Chim Acta**, v. 340, n. 1-3, p. 285-290, 1997.

SAXENA, R.; SINGH, A. K.; SAMBI, S. S. Synthesis of a chelating polymer matrix by immobilizing Alizarin Red-S on Amberlite XAD-2 and its application to the preconcentration of lead(II), cadmium(II), zinc(II) and nickel(II). **Anal Chim Acta**, v. 295, n. 1-2, p. 199-204, 1994.

SHIGEMATSU I, KITAMARU S, TAKEUCHI J, MINOWA M, NAGAI M, USUI T, FUKUSHIMA M. A retrospective mortality study on cadmium exposed populations in Japan. In: WILSON, D.; VOLPE, R. A. (Eds.). **Edited Proceedings of the Third International Cadmium Conference**. New York: Cadmium Association/Cadmium Council, p. 115-118.

SMICHOWSKI, P.; MARRERO, J.; LEDESMA, A.; POLLA, G.; BATISTONI, D. A. Speciation of As(III) and As(V) in aqueous solutions using baker's yeast and hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination. **J Anal At Spectrom**, n. 15, p. 1493-1497, 2000.

STACEY, N. H.; KLAASSEN, C. D. Interaction of metal ions with cadmium-induced cellular toxicity. **J Toxicol Environ Health**, v. 7, n. 1, p. 149-158, 1981.

TEWARI, P. K.; SINGH, A. K. Thiosalicylic acid-immobilized Amberlite XAD-2: metal sorption behaviour and applications in estimation of metal ions by flame atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 125, n. 12, p. 2350-2355, 2000.

VASSILEVA, E.; PROINOVA, I.; HADJIIVANOV, K. Solid-phase extraction of heavy metal ions on a high surface area titanium dioxide (anatase). **Analyst**, v. 121, n. 5, p. 607-612, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria n. 134: Cadmium**. Geneva: International Program on Chemical Safety, 1992. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso em: 20 jan. 2015.

Aluno: Felipe Takayanagi Todo

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário