

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

THIAGO QUEIROZ JARDIM RODRIGUES

USO DA BIOMASSA VIVA E MORTA DE LEVEDURA CERVEJEIRA *Saccharomyces cerevisiae* kveik NA REMOÇÃO DE NÍQUEL E ZINCO DE SOLUÇÕES AQUOSAS

VOLTA REDONDA
2023

THIAGO QUEIROZ JARDIM RODRIGUES

**USO DA BIOMASSA VIVA E MORTA DE LEVEDURA CERVEJEIRA
Saccharomyces cerevisiae kveik NA REMOÇÃO DE NÍQUEL E ZINCO DE
SOLUÇÕES AQUOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

Volta Redonda, RJ
2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM
Gerada com informações fornecidas pelo autor

R696u Rodrigues, Thiago Queiroz Jardim
USO DA BIOMASSA VIVA E MORTA DE LEVEDURA CERVEJEIRA
Saccharomyces cerevisiae kveik NA REMOÇÃO DE NÍQUEL E ZINCO DE
SOLUÇÕES AQUOSAS / Thiago Queiroz Jardim Rodrigues. - 2023.
91 f.: il.

Orientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta
Redonda, Volta Redonda, 2023.

1. Biorremediação. 2. Bioacumulação. 3. Metais Tóxicos.
4. Efluentes. 5. Produção intelectual. I. Teodoro, Carlos
Eduardo de Souza, orientador. II. Universidade Federal
Fluminense. Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de
Volta Redonda. III. Título.

CDD - XXX

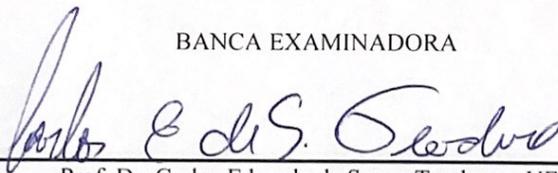
THIAGO QUEIROZ JARDIM RODRIGUES

USO DA BIOMASSA VIVA E MORTA DE LEVEDURA CERVEJEIRA
Saccharomyces cerevisiae kveik NA REMOÇÃO DE NÍQUEL E ZINCO DE
SOLUÇÕES AQUOSAS

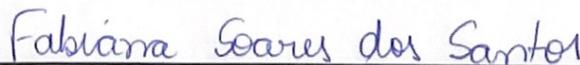
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 09 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro – UFF
Orientador



Prof.(a). Dr.(a) Fabiana Soares dos Santos – UFF



Prof.(a). Dr.(a) Aline Chaves Intorne - IFRJ

Volta Redonda
2023

*A minha família, amigos e professores
que sempre acreditaram em meus
sonhos e estiveram ao meu lado me
incentivando.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aquele velho ditado que diz: “acompanhado, a gente vai mais longe” é a descrição perfeita para toda experiência que tive nos últimos dois anos de mestrado. São tantas pessoas a agradecer!

Primeiro, agradeço ao meu Deus. Por muitas vezes estive em falha com Ele e, ainda sim, Ele jamais falhou comigo. Obrigado por me amar, me guiar e me colocar no caminho que eu devo andar. Sem a sua força, nada sou!

Aos meus orientadores, sim, aos dois: Prof. Dr. Carlos Eduardo e Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Martinazzo, minha eterna gratidão. Foram oito anos de convívio, que se transformaram em admiração, respeito e carinho. Obrigado por todo conhecimento passado e por todos os conselhos dados, desde a graduação. Vocês investiram em mim, pesado, e eu espero retribuir dando orgulho a vocês e a nossa instituição.

As minhas avós, Helena Queiroz e Zélia Jardim, meu amor incondicional. Todo esforço que fiz até aqui foi por vocês. E meus avôs, Sérgio Queiroz e, falecido avô, Altair Rodrigues, me orgulho tanto de vocês! Espero ser metade do homem que vocês são/foram.

Aos meus pais, Luciane Queiroz e Altair Jardim, e irmã, Bruna Queiroz, que sempre me motivaram a seguir meus sonhos, que estavam sempre prontos para dizer “quanto orgulho eu tenho de você” e que pra isso, me deram condições de chegar até aqui, amo vocês! Obrigado por todo apoio físico, moral, financeiro e principalmente emocional.

Aos meus parceiros de laboratório, Pedro Saturno, Alef Souza e Thiago Guimarães, não tenho nem o que dizer, a gente se deu tão bem né. Que privilégio é poder continuarmos juntos. Obrigado por estarem sempre prontos a me ajudar! Tenho certeza que todos os trabalhos desenvolvidos aí no laboratório, são NOSSOS, isso mesmo, no coletivo. Aprendemos muito uns com os outros e olhe quão longe chegamos, vamos ser mestres e em questão de tempo, doutores! Obrigados meninos, vocês são top!

As minhas companheiras do laboratório de Biotecnologia, Luiza Garcia e Paula Alexandra, obrigado pelos cafés, chocolates, mas principalmente, por tornarem aquele lugar, um ambiente descontraído, com boas histórias, músicas, cheio de risadas e de alegrias. Vocês são as reais definições de pessoas de luz. Aos companheiros dos laboratórios vizinhos, Mateus Peixoto, Samara e Gabriela Azevedo, pela boa companhia e troca de conhecimento durante o mestrado.

A minha melhor amiga e incentivadora Brenda Azevedo Souza, você merece um parágrafo só seu. Só você sabe quão doido foi vivenciar tudo isso, quão corrido e quão cansativo. Obrigado por sempre me dizer que eu era capaz! A verdade, é que você sempre esteve aqui para me fazer ser. Seu cuidado é especial, sorte de quem o tem!

Aos meus amigos da Universidade Federal Fluminense, que se transformaram em família ao longo de todos os anos, serei sempre grato pela amizade de vocês. Larissa Cerqueira, Laisa Souza, Ariany Franco e Pedro Henrique. Obrigado por se fazerem presentes mesmo com toda a distância. Vocês foram e ainda são meus maiores presentes dessa UFF.

Aos técnicos de laboratório, Mateus, Alexandre, Everson e Lívia, eu prometo nunca mais pedir um reagente, um equipamento ou um preparo de uma solução. Vocês são feras demais! Obrigado pelo suporte nesses anos!

À professora Fabiana Soares por todo apoio durante os experimentos e por sempre estar disposta a sanar minhas dúvidas e ao seu esposo professor Gilmar Clemente por me incentivar a buscar alvos maiores para minha vida acadêmica.

À professora Mônica e aos técnicos Eduardo e Edgard, do departamento de Química da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), por cederem de seu tempo e recursos ao ajudarem analisar minhas amostras para que eu pudesse terminar minha pesquisa.

Por fim, a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental, a Universidade Federal Fluminense e todo os colaboradores ali presentes, obrigado por contribuir com a minha formação.

“ Temos que continuar aprendendo... E temos que estar prontos para espalhar nosso conhecimento a fim de chegar a uma compreensão mais elevada da realidade. ”

Thich Nhat Hanh

RESUMO

A contaminação por metais tóxicos no ambiente, oriundos de efluentes líquidos industriais, tem recebido cada vez mais atenção devido a influência negativa que esses promovem aos mais diversos ecossistemas. Técnicas convencionais de descontaminação são, na maioria das vezes, de baixa eficiência e onerosas. A bioadsorção com biomateriais, tem sido observada como uma alternativa promissora devido à alta eficiência de remoção, baixo custo e fácil aplicação. Subproduto da indústria da cerveja, as leveduras, representam mais de 310 mil toneladas geradas, todos os anos no Brasil. Células de leveduras *S. cerevisiae* Kveik, empregadas principalmente em cervejarias artesanais, apresentam características próprias como floculação e alta resistência a diferentes estresses, o que a torna uma excelente opção para uso como bioadsorvente. O objetivo principal do trabalho foi avaliar a eficiência do uso da biomassa viva e morta da levedura *S. cerevisiae* Kveik na remoção de níquel e zinco presente em soluções aquosas. Além disso, visou-se avaliar a resistência da Kveik a diferentes metais, em crescentes concentrações, e a sua influência na morfologia da colônia e da célula após estresse. Inicialmente, um ensaio de resistência a cádmio, cobalto, cobre, chumbo, níquel e zinco, em diferentes concentrações, foi promovido em meio sólido. Visando identificar a influência da biodisponibilidade dos metais sobre o crescimento do organismo, realizou-se também um ensaio em meio líquido. Ensaio de remoção dos metais testaram os efeitos da concentração inicial do adsorvente (2 e 5g), da concentração inicial do adsorvato zinco (0, 200, 300, 400 ppm) e níquel (0, 100, 200 e 300 ppm), além do efeito do tempo de contato na eficiência de remoção. Os parâmetros ajustados para os ensaios foram pH igual a 6, temperatura (30 e 25 °C) e agitação de 175 rpm, para a remoção com células vivas e mortas, respectivamente. Os resultados observados evidenciaram que a levedura Kveik possui alta resistência aos metais cobalto e cádmio, mas principalmente, a níquel e zinco (600 e 800 ppm) em meio sólido e (300 e 400 ppm) em meio líquido. Não houve formação de colônias para chumbo e cobre em todas as concentrações testadas. Os estudos com células vivas indicaram baixa capacidade de remoção, com valores inferiores a 2% tanto para o zinco como para o níquel, em ambos os tratamentos com 2 e 5g, para todas as concentrações estudadas. A maior parte da remoção ocorreu nas primeiras 24 h para ambos os metais. Os ensaios com células mortas demonstraram capacidade de remoção superior as células vivas, com maior eficiência para o zinco. Melhores desempenhos foram observados quando empregados 5g de biomassa morta, com remoções de 64,66, 72,74 e 79,94 ppm, nas concentrações de 200, 300 e 400 ppm de zinco, respectivamente, frente a 25,30, 27,05 e 33,19 ppm, para as concentrações de 100, 200 e 300 ppm de níquel. A maior parte da remoção ocorreu nos 30 primeiros minutos para ambos os metais. Logo, é possível concluir que o emprego da cepa morta de levedura cervejeira Kveik como material bioadsorvente é um método eficiente, com alto potencial de aplicação a bioremediação.

Palavras-chave: Adsorção. Biorremediação. Bioacumulação. Efluentes. Metais tóxicos.

ABSTRACT

Contamination by toxic metals in the environment, from industrial liquid effluents, has received increasing attention due to the negative influence that these promote to the most diverse ecosystems. Conventional decontamination techniques are, in most cases, of low efficiency and costly. Biosorption with biomaterials has been seen as a promising alternative due to its high removal efficiency, low cost and easy application. By-product of the beer industry, yeasts represent more than 310 thousand tons generated every year in Brazil. *S. cerevisiae* Kveik yeast cells, used mainly in craft breweries, have their own characteristics such as flocculation and high resistance to different stresses, which makes it an excellent option for use as a bioadsorbent. The main objective of this work was to evaluate the efficiency of the use of live and dead biomass of the yeast *S. cerevisiae* Kveik in the removal of nickel and zinc present in aqueous solutions. Furthermore, we aimed to evaluate the resistance of Kveik to different metals, in increasing concentrations, and its influence on colony and cell morphology after stress. Initially, a test of resistance to cadmium, cobalt, copper, lead, nickel and zinc, in different concentrations, was carried out in solid medium. In order to identify the influence of the bioavailability of metals on the organism's growth, a test was also carried out in liquid medium. Metal removal tests tested the effects of the initial concentration of the adsorbent (2 and 5g), the initial concentration of the adsorbate zinc (0, 200, 300, 400 ppm) and nickel (0, 100, 200 and 300 ppm), in addition to the effect of contact time on removal efficiency. The parameters adjusted for the assays were pH equal to 6, temperature (30 and 25 °C) and agitation at 175 rpm, for removal with live and dead cells, respectively. The observed results showed that the Kveik yeast has high resistance to cobalt and cadmium metals, but mainly to nickel and zinc (600 and 800 ppm) in solid medium and (300 and 400 ppm) in liquid medium. There was no formation of colonies for lead and copper in all tested concentrations. Studies with living cells indicated low removal capacity, with values below 2% for both zinc and nickel, in both treatments with 2 and 5g, for all concentrations studied. Most of the removal occurred in the first 24 h for both metals. Tests with dead cells showed a superior removal capacity than live cells, with greater efficiency for zinc. Better performances were observed when 5g of dead biomass was used, with removals of 64.66, 72.74 and 79.94 ppm, in concentrations of 200, 300 and 400 ppm of zinc, respectively, compared to 25.30, 27.05 and 33.19 ppm, for concentrations of 100, 200 and 300 ppm of nickel. Most of the removal occurred in the first 30 minutes for both metals. Therefore, it is possible to conclude that the use of dead strain of Kveik brewer's yeast as a bioadsorbent material is an efficient method, with high potential for application to bioremediation.

Keywords: Adsorption. Bioremediation. Bioaccumulation. Effluents. Toxic metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01 – Mapa de crescimento da indústria cervejeira no Brasil dos últimos 20 anos, p. 20
- Figura 02 – Fluxograma do processo produtivo da cerveja, p. 22
- Figura 03 – Microscopia óptica de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Kveik. Aumento de (1000x), células coradas com azul de lactofenol, p. 25
- Figura 04 – Regiões de origem das linhagens originárias da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik, p. 26
- Figura 05 – Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido acrescido de maltose, incubada a 30 °C por 36 h sob agitação constante (175 rpm), p. 50
- Figura 06 – Efeito das diferentes concentrações dos metais Co, Cd, Ni e Zn no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik em meio YEP sólido, incubadas a 30 °C por 5 dias, p. 51
- Figura 07 – Morfologia das colônias de *S. cerevisiae* Kveik crescida por 5 dias em meio YEPD com concentrações crescentes de níquel e zinco, p. 54
- Figura 08 – Crescimento da *S. cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido com diferentes concentrações de níquel, p. 55
- Figura 09 – Crescimento da *S. cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido na presença de diferentes concentrações de zinco, p. 57
- Figura 10 – Valores de pH obtidos no processo de absorção com 100 ppm (A e B), 200 ppm (C e D) e 300 ppm (E e F) de níquel, empregando 2 e 5g de biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik, respectivamente, p. 60
- Figura 11 – Rendimento da biomassa de levedura *S. cerevisiae* Kveik, no processo de absorção de níquel, empregando 2g e 5g do bioadsorvente em meio suplementado com 100 ppm (A e B), com 200 ppm (C e D) e 300 ppm (E e F), p. 62
- Figura 12 – Valores de pH obtidos no processo de absorção com 200 ppm (A e B), 300 ppm (C e D) e 400 ppm (E e F) de zinco, empregando 2 e 5g de biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik, respectivamente, p. 65
- Figura 13 – Rendimento da biomassa seca de levedura *S. cerevisiae* Kveik, no processo de absorção de zinco, empregando 2g e 5g do bioadsorvente em meio suplementado com 200 ppm (A e B), com 300 ppm (C e D) e 400 ppm (E e F), p. 68
- Figura 14 – Morfologia de células de *S. cerevisiae* Kveik crescida em meio YED, por 72 h, na ausência de metal (A), suplementado com zinco nas concentrações de 200 ppm (B), 300 ppm (C) e 400 ppm (D) e níquel nas concentrações de 100 ppm (E), 200 ppm (F) e 300 ppm (G). Microscopia óptica de campo claro. Aumento de 1000x, p. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Fatores determinantes no desempenho de processos de bioadsorção, p. 38

Tabela 02- Proteínas associadas ao transporte de zinco transmembrana, p. 40

Tabela 03- Principais diferenças associadas ao uso de leveduras *S. cerevisiae* em processos de bioacumulação e bioadsorção, p. 41

Tabela 04- Adsorção dos metais zinco e níquel por diferentes formas adsorventes de *Saccharomyces cerevisiae*, p. 44

Tabela 05- Adsorção de níquel por biomassa viva de *S. cerevisiae* (2 e 5g), adicionada em meio de cultura contendo diferentes concentrações do metal, p. 58

Tabela 06- Adsorção de zinco por biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik (2 e 5g), adicionada em meio de cultura contendo diferentes concentrações do metal, p. 64

Tabela 07- Parâmetros da adsorção do níquel utilizando 2 e 5g de biomassa morta de *S. cerevisiae* Kveik como bioadsorvente após 360 min, p. 75

Tabela 08- Parâmetros da adsorção do zinco utilizando 2 e 5g de biomassa morta de *S. cerevisiae* Kveik como bioadsorvente após 360 min, p. 74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGT1	Alpha-glucoside transporter
ATSPR	Annual Transitional Services Plan and Report
°C	Graus Celsius
C _e	Concentração de equilíbrio
CDF	Cation diffusion facilitador
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIM	Concentração mínima inibitória
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CO ₂	Gás Carbônico
DO	Densidade óptica
FDC (1)	Follicular dendritic cells
FET4	Transportador de Fe ⁺² de baixa afinidade
IRT	Transportador regulado por ferro
L	Litros
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
MREs	Metal responsive elements

Ni	Níquel
PAD1	Ácido fenilacrilico descarboxilase
pH	Potencial hidrogeniônico
POF	Phenolic off flavor negative
PPM	Parte por milhão
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SINDCERV	Sindicato Nacional da Industria de Cerveja
RDA	Ingestão dietética recomendada
RPM	Rotação por minuto
YPD	(Extrato de Levedura/Peptona/Glicose)
Zap	Regulador transcricional de Zinco
Zip	Proteínas Zrt e Irt
Zn	Zinco
ZRT	Transportador regulado por zinco
Zrt1	Transportador de alta afinidade de zinco
Zrt 2	Transportador de baixa afinidade de zinco
Zrt 3	Transportador de Zinco intravacuolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 INDÚSTRIA CERVEJEIRA	20
3.1.1 PROCESSO PRODUTIVO	21
3.1.2 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA	23
3.2 LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.2.1 LEVEDURAS KVEIK.	26
3.3 PROBLEMÁTICA DOS METAIS TÓXICOS.....	28
3.3.1 CÁDMIO	29
3.3.2 COBALTO.....	30
3.3.3 COBRE	31
3.3.4 CHUMBO	32
3.3.5 NÍQUEL.....	33
3.3.6 ZINCO	34
3.4 BIORREMEDIAÇÃO	36
3.4.1 BIODISSORÇÃO.....	37
3.4.2 BIOACUMULAÇÃO.....	39
3.3.3 DIFERENÇAS ENTRE MÉTODOS E EFICIÊNCIA.....	41
3.3.4 MICRORGANISMOS BIODISSORVENTES: <i>S. cerevisiae</i>	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 MICRORGANISMO UTILIZADO	45
4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO	45
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUES DE METAIS TÓXICOS.....	45

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA	45
4.5 ENSAIOS DE RESISTÊNCIA DA <i>S. cerevisiae</i> KVEIK A DIFERENTES METAIS EM MEIO SÓLIDO	46
4.6 CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>S. cerevisiae</i> KVEIK EM MEIO SUPLEMENTADO COM NÍQUEL E ZINCO.....	46
4.7 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM BIOMASSA VIVA	47
4.7.1 MICROSCOPIA ÓPTICA	48
4.8 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM BIOMASSA MORTA	48
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>S. cerevisiae</i> KVEIK	50
5.2 ENSAIOS DE RESISTÊNCIA DA <i>S. cerevisiae</i> KVEIK A DIFERENTES METAIS	51
5.3 CRESCIMENTO DA <i>S. cerevisiae</i> KVEIK EM MEIO LÍQUIDO SUPLEMENTADO COM NÍQUEL E ZINCO.....	54
5.3.1 NÍQUEL.....	54
5.3.2 ZINCO	56
5.4 REMOÇÃO DE ÍONS NÍQUEL E ZINCO POR CÉLULAS VIVAS DE <i>S. cerevisiae</i> KVEIK.....	58
5.4.1 NÍQUEL.....	58
5.4.2 ZINCO	63
5.4.3 MICROSCOPIA DAS CÉLULAS	70
5.5 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM CÉLULAS MORTAS.....	72
5.5.1 NIQUEL.....	73
5.5.2 ZINCO	75
6 CONCLUSÃO	77
7 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira vem atuando significativamente na economia brasileira, demonstrando crescimento nos últimos dez anos. Com quase 1.600 estabelecimentos em atividade (microcervejarias, cervejarias artesanais e indústrias) registrados só no ano de 2018, o Brasil é atualmente o terceiro maior produtor da bebida no mundo, com uma produção estimada em 13,3 bilhões de litros por ano (CERVBRASIL, 2018; BRASIL, 2022).

Seguindo basicamente um mesmo processo produtivo, envolvendo etapas de malteação, fermentação e envase, produtores em todo o país utilizam água, cereais, lúpulo, leveduras cervejeiras e aditivos para compor a bebida (MORADO, 2009; BANDINELLI, 2015). Devido ao uso intensivo de matérias-primas e de recursos como energia e água, a indústria cervejeira enfrenta desafios ambientais atrelados a geração de uma gama de resíduos sólidos, subprodutos, efluentes líquidos e emissões atmosféricas (OLAJIRE, 2020).

As leveduras cervejeiras são tidas como o segundo maior resíduo da produção, logo após o *trub*, oriundo da etapa de fermentação da bebida, com uma quantidade estimado em 310 mil de toneladas por ano (MATHIAS, 2015). Representadas, principalmente, pelo gênero *Saccharomyces*, essas leveduras transformam açúcares fermentáveis presentes nos mostos em etanol e gás carbônico, por meio de seu metabolismo primário (VELOSO, 2019).

Podendo ser aplicadas em até seis ciclos produtivos, quando esgotadas, as leveduras tornam-se um subproduto de grande interesse as indústrias de alimento animal e humano, para fabricação de rações e probióticos. De fácil aquisição, baixo custo e alta resistência a ambientes contaminados, esses microrganismos têm sido tema de inúmeros estudos que visam agregar valor a subprodutos, além de fornecer uma destinação ambientalmente adequada. (PANDIT e MAJUMDER, 2014; MELO e AZEVEDO, 2018).

A biorremediação é um método alternativo que pode ser empregado na remoção e recuperação de íons metálicos. Empregando materiais naturais de origem biológica, tais como as leveduras, que promovem a absorção ou adsorção de potenciais contaminantes. Estudos com *S. cerevisiae* sob formas de células vivas/mortas, ativadas, intactas, imobilizadas e pré-tratadas estão entre as principais propostas (MARQUES et al., 1999; PARK et al., 2003; PADMAVATHY; VASUDEVAN; DHINGRA, 2003; NASCIMENTO et al., 2019; SANTOS, 2022; BILLERBECK, 2021; RODRIGUES, 2022).

Pesquisas com diferentes linhagens e cepas do gênero tem demonstrado resultados sortivos positivos. Oriunda das “farmhouse” norueguesas, as cepas de leveduras *S. cerevisiae* Kveik, são uma proposta atrativa como adsorvente. Empregada em microcervejarias e

cervejarias artesanais, essas leveduras suportam diferentes estresses externos tais como temperaturas mais elevadas e altas concentrações de etanol, além de flocculantes (PREISS et al., 2018).

Em ambientes aquosos, em um processo ativo, as leveduras por meio de seu metabolismo, utilizam uma estratégia de bioacumulação, transportando os metais através de suas membranas celulares e armazenando-os em seus vacúolos (TAREKEGN et al., 2020). Por outro lado, na adsorção, os poluentes são retidos na superfície da parede celular da levedura, em um processo independente do metabolismo. Devido a presença de quitina e quitosana, ricas em grupos amina, amido e hidroxila, as leveduras oferecem uma gama de sítios ativos de ligações para diversos metais (CHOJNACKA, 2010).

Amplamente empregados em processos industriais, o níquel e o zinco, são dois metais tóxicos que, nos últimos anos, vêm sendo monitorados devido ao aumento de sua concentração no meio ambiente e a sua capacidade de bioacumulação em solos e águas (SOUZA; MORASSUTI; DEUS, 2018). Com potencial tóxico a plantas, animais e humanos, legislações específicas passaram a estabelecer diretrizes para o controle e mitigação dos danos, principalmente em corpos hídricos, tido como os mais afetados (PEIXOTO, 2018). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução Nº 430 de 13 de maio de 2011, estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes, entre os quais, estão o níquel (2,0 mg/L) e o zinco (5,0 mg/L) (BRASIL, 2011).

O emprego de resíduos e subprodutos industriais, tais como as leveduras cervejeiras, na remoção de metais tóxicos, representa uma oportunidade de agregar valor ao resíduo e de fornecer uma destinação correta e útil, sendo uma alternativa capaz de contribuir para o tratamento de efluentes e atendimento aos padrões admissíveis para seu descarte (WANG e CHEN, 2006; FADEL et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial da biomassa viva e morta da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik na remoção de Níquel e Zinco de soluções aquosas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a resistência da *Saccharomyces cerevisiae* Kveik aos metais cádmio, cobalto, cobre, chumbo, níquel e zinco, em diferentes concentrações.
- Avaliar o crescimento da levedura em meio líquido suplementado com diferentes concentrações dos metais níquel e zinco.
- Identificar possíveis alterações na morfologia da colônia e na estrutura das células sob estresse causadas pela exposição as diferentes concentrações de níquel e zinco.
- Comparar a eficiência dos processos de absorção e adsorção dos metais níquel e zinco pela biomassa viva e morta da levedura.
- Avaliar a influência da concentração inicial da biomassa, da concentração inicial do adsorvato e do tempo de contato no processo de biossorção de íons de níquel e zinco pela biomassa viva e morta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

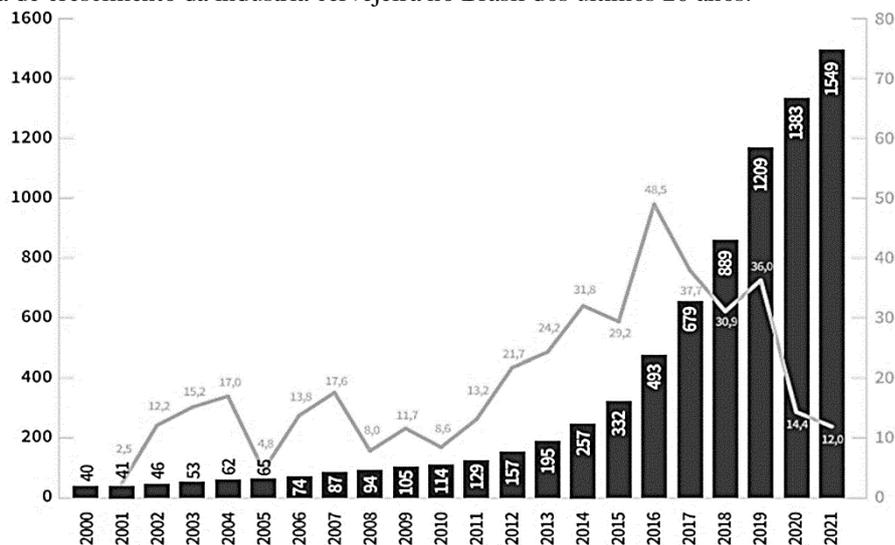
3.1 INDÚSTRIA CERVEJEIRA

Criado no Brasil em 1853, o setor cervejeiro, se tornou um dos mais relevantes na economia brasileira com um faturamento de R\$ 107 bilhões de reais só no ano de 2017. Ocupando o terceiro lugar no ranking produtivo mundial com 13,3 bilhões de litros, logo atrás da China (46 bilhões de litros) e dos Estados Unidos (22,1 bilhões de litros) (SINDICERV, 2021; BRASIL, 2022).

Com uma cadeia produtiva complexa, partindo do agronegócio e englobando mercados de embalagens, logística, maquinários, marketing e construção civil, até que alcance sua comercialização em pequenos e grandes varejos, a indústria cervejeira é descrita em números por mais de 117 mil hectares cultivados, gerando 2,2 milhões de empregos, no campo a indústria (CERVBRASIL, 2016).

Segundo o último Anuário da Cerveja (BRASIL, 2022), o número de estabelecimentos produtores no país em 2021 registrou um aumento de 12%, quando comparado ao ano anterior. Com ampla distribuição regional, atualmente são registrados 1.549 estabelecimentos (Figura 01), concentrados principalmente nas regiões sul e sudeste do país e mais de 35.700 variedades de cervejas.

Figura 01- Mapa de crescimento da indústria cervejeira no Brasil dos últimos 20 anos.



Fonte: Brasil (2022).

Quarta bebida mais consumida, logo após a água, o chá e o café, a cerveja é definida, de maneira geral, como qualquer bebida alcoólica carbonatada produzida a partir da fermentação de grãos. Entre os principais, a cevada se destaca pela forte presença em processos produtivos ao redor do mundo. No entanto, grãos comuns como milho, arroz, trigo, sorgo, painço, centeio

e aveia também são usados ocasionalmente em muitos processos industriais e tradicionais de produção de cerveja (OLIVER e MENDES, 2020).

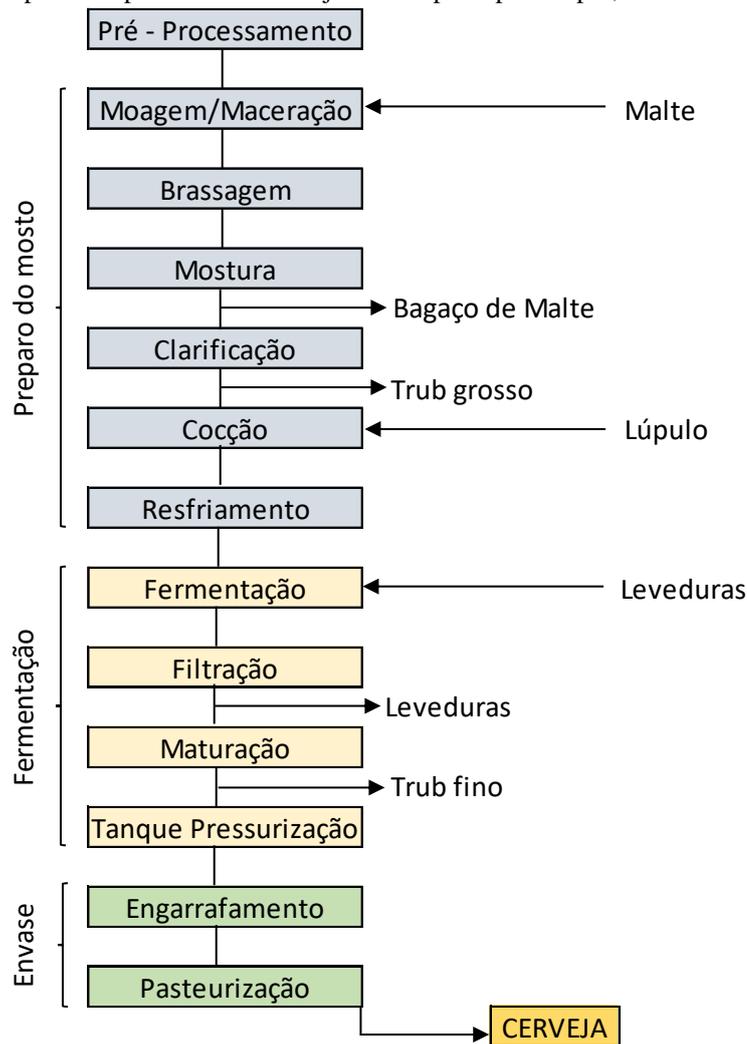
Além dos grãos associados ao malte, matérias-primas como água e lúpulo são tidas como as principais composições da bebida. Adicionados ao meio como forma de complementação benéfica ao produto, a cerveja pode conter ainda fontes de carboidrato para a produção de dextrinas e açúcares ou o próprio açúcar sob a forma de xaropes, cristal ou invertido, além dos extratos de malte e cevada (LIMA et al., 2001; BRIGGS et al., 2004; MATHIAS, 2015). Outras substâncias que podem ser adicionadas, em pequenas quantidades, estão relacionadas a melhorias no processo. Exemplos destas são as enzimas, os agentes clarificantes, antioxidantes, conservantes, acidulantes além de estabilizantes e aditivos de sabor ou cor (MATHIAS, 2015).

3.1.1 PROCESSO PRODUTIVO

Embora seja ampla a diversidade de cervejas produzidas no mundo, o processo produtivo segue basicamente um mesmo modelo de fabricação. Um pré-processo, tido como etapa inicial, é descrito pelo recebimento e seleção dos grãos. Nesta etapa, os grãos são limpos e separados de acordo com o seu tamanho, a fim de se obter um malte mais homogêneo (BRASIL, 1996). A malteação, segundo etapa do pré-processamento, é responsável pelo aumento do conteúdo enzimático necessário a conversão do amido (amilose e amilopectina) contido no grão, em açúcares fermentáveis. Dividida em três etapas, a malteação inclui processos de maceração e hidratação, responsável pelo rompimento do estágio de latência dos grãos, a germinação das radículas e secagem a temperaturas entre 45 e 50 °C (LIMA et al., 2001; CETESB, 2005; GUIDO, 2013; MATHIAS, 2015). As etapas que se seguem ao pré-processamento, estão representadas na Figura 02.

A preparação do mosto é iniciada com a moagem e esmagamento dos grãos de malte, pela adição de água e solubilização dos componentes presentes no grão. Etapa conhecida como brasagem, tem seu início na mostura, onde enzimas como a α -amilase e β -amilase atuam na hidrólise do amido em dextrina e maltose, respectivamente. Esses açúcares fermentáveis, são responsáveis pelo corpo da cerveja e pelo gosto levemente adocicado (MARTINS, 1991; VIEIRA, 2017). Na clarificação, o *trub* grosso, primeiro resíduo sólido gerado no processo, proveniente das cascas de malte, são removidos até que se obtenha um mosto límpido e brilhante. Essa mistura, rica em açúcares (65% dos quais maltose, maltotriose, glicose e dextrina), é então transferida para caldeiras (BRIGGS et al., 2004; MATHIAS, 2015).

Figura 02- Fluxograma do processo produtivo da cerveja com as principais etapas, entradas e saídas.



Fonte: Adaptado de CETESB (2005) e Mathias (2015).

Durante a cocção do mosto, a adição de aditivos e lúpulo garantem as características da cerveja. Processo rápido de 30 a 120 minutos, a cocção objetiva a destruição das enzimas, a coagulação e precipitação de proteínas, a desinfecção e eliminação de compostos voláteis, além de contribuir para a concentração e desenvolvimento da cor, sabor e aroma (CETESB, 2005; PRIEST e STEWART, 2006). Esse estágio encerra a preparação do mosto. Entre os processos de cocção e fermentação, promove-se um resfriamento a uma temperatura próxima a 12 °C e aeração, com saturação de O₂ entre 6 e 9 mg/L, são alcançados com trocadores de calor (BRIGGS et al., 2004; SILVA, 2005a).

Na fermentação, leveduras cervejeiras tais como *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. uvarum*, utilizam-se de um substrato orgânico como fonte de carbono e energia. Quando na ausência de oxigênio, esses microrganismos realizam o processo de fermentação dos açúcares presentes no mosto, transformando-os em etanol e CO₂, em grandes quantidades (MATOS,

2011). Subdividida em duas etapas, a fermentação conta com uma fase de adaptação e reprodução das leveduras, aumentando sua quantidade em até 6 vezes e uma segunda etapa da conversão do açúcar com uma duração de 6 a 9 dias (DRAGONE e SILVA, 2010). Ao final da fermentação, a cerveja apresenta bastante turbidez (proteínas de alto peso molecular, polifenóis, ácidos graxos e íons metálicos), que ao ser resfriada (0 °C), decantam essas partículas, antes em suspensão, dando origem ao *trub frio* (SILVA e FARIA, 2008).

Subprodutos como o levedo, são retirados na etapa de filtração, podendo ser armazenados e reinseridos em novos processamentos da bebida. Além disso, a filtração contribui para a cor desejada do líquido, dando um efeito brilhante e transparente (AMBEV, 2011). O ajuste da concentração de CO₂ ocorre no processo de carbonatação em tanques pressurizados. Compreendida todas as etapas anteriores, a cerveja agora pronta, é condicionada em latas e garrafas, lavadas e sanitizadas, e então pasteurizadas antes de serem comercializadas (HAMPSON, 2013).

3.1.2 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

A produção de cerveja industrial é marcada por um intensivo processamento de matérias-primas e uso de recursos e, como resultado, além da cerveja, têm-se a geração de resíduos sólidos, subprodutos, efluentes líquidos e emissões atmosféricas (OLAJIRE, 2020).

Compondo entre 90 e 95% da cerveja, a água é utilizada tanto como matéria-prima da bebida como insumo aplicada aos processos. Ainda que o consumo varie de acordo com o tipo de cerveja ou equipamento utilizado, estima-se que em uma cervejaria eficiente, para cada litro de cerveja, sejam gerados de 3 a 10 L de efluentes residuais. Embora possuam alto teor orgânico, não costumam ser tóxicos (KANAGACHANDRAN e JAYARATNE, 2006).

Os resíduos sólidos e subprodutos, por sua vez, são descritos como toda a matéria orgânica proveniente do processo que inclui os resíduos de grãos, lúpulo, *trub*, lodo e todo fermento excedente ou inviável (morto) (OLAJIRE, 2012). No Brasil, segundo Mathias (2015), a produção de cerveja é responsável pela geração anual de cerca de 2,5 milhões de toneladas de bagaço de malte, 37 mil toneladas de *trub* grosso (quente) e 310 mil toneladas de leveduras cervejeiras.

Gerado após os processos de mostura, esgotamento dos grãos e filtração, o bagaço de malte, é o resíduo sólido com maior volume, em geral, para cada 100 kg de grãos processados, estima-se a geração de 125 a 130 kg de bagaço úmido (80-85% de umidade). Quando extraído os compostos solúveis de interesse, restam basicamente as casas do malte, os restos embrionários, proteínas e minerais (OLIVER e MENDES, 2020). De grande valor comercial, esse subproduto

tem sido destinado, nos últimos anos, a alimentação animal devido ao seu valor nutricional. Rico em proteínas (15 a 26%) e fibras (70%), podendo conter ainda vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos (CARVALHO et al., 2021).

Composto predominantemente por proteínas insolúveis coaguladas (50-70%) e substâncias precipitadas como compostos de lúpulos (10-20%), polifenóis (5-10%), carboidratos (4-8%) além de minerais e ácidos graxos, o *trub* grosso (quente) é um resíduo sólido oriundo do processo de clarificação da cerveja. Em geral, para cada 100 L de cerveja produzida, estima-se a formação de 0,2 a 0,4 Kg de *trub* úmido, 80-90% de umidade (BRIGGS et al., 2004; PRIEST e STEWART, 2006).

Segundo maior volume de resíduo gerado entre os processos produtivos da indústria cervejeira, a levedura residual composta principalmente por células de *Saccharomyces* (*cerevisiae*, *uvarun* e *pastorianus*), corresponde, a 3% do volume total da cerveja produzida (OLAJIRE, 2012; GONÇALVES et al., 2017).

Responsável pela conversão do mosto em cerveja, a massa de levedura possui uma taxa de multiplicação de 3 a 5 vezes durante o processo. Após a fermentação, essa matéria é precipitada e removida. Ainda que a prática comum seja de reutilização desse material para novas inoculações em outros processos, existe uma limitação. Acredita-se que essa massa de células possa ser reempregada em até 6 ciclos produtivos, sem prejudicar a qualidade da bebida. Quando esgotadas, o volume dessa massa é em torno de 1,5 a 3 kg, com 85-90% de umidade, para cada 100 L de cerveja produzida (FERREIRA et al., 2010). Composto predominantemente por proteínas (35-60% em base seca), carboidratos (35-45%), lipídios (4-6%), vitamina e minerais (5-7,5%, dos quais: ferro, selênio, cromo, potássio e zinco), esse material deixou de ser considerado resíduo e passou a ser denominado como subproduto de alto potencial. Devido ao valor nutricional, a possibilidade de extração de compostos bioativos e as características intrínsecas das leveduras, vários estudos têm apontado sua utilização em setores alimentícios humano e animal, produção energética e mais recentemente, biotecnológicos aplicados a processos de biossorção (SCHLABITZ; LENH; SOUZA, 2022).

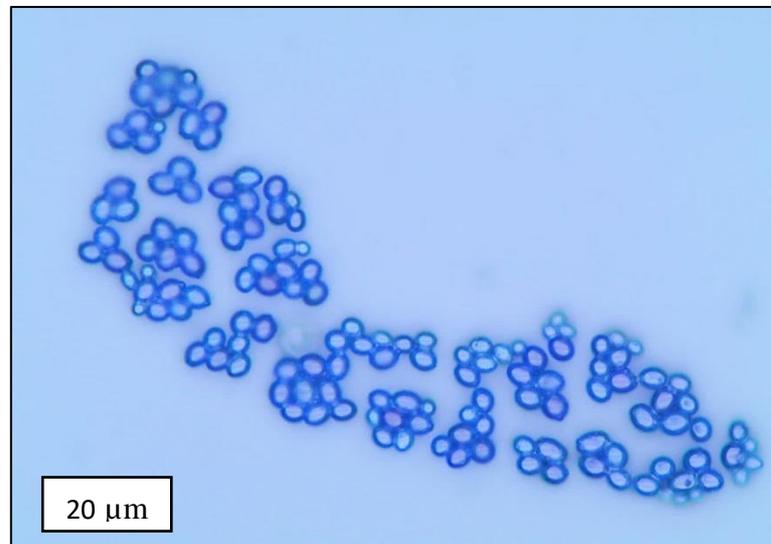
3.2 LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*.

Inicialmente descrita por Reess em 1870, as leveduras do gênero *Saccharomyces*, estão atualmente classificadas, junto aos bolores, pertencentes ao Reino Fungi. Mais especificamente, a espécie *cerevisiae* é enquadrada dentro do filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae* (REESS, 1870).

Amplamente encontrado em todo o mundo, o gênero *Saccharomyces* está presente em diversos ambientes, desde naturais e industriais, até em laboratórios de pesquisa. Algumas espécies inclusas nesse gênero são descritas por: *S. arboricolus*, *S. bayanus* (var. *bayanus* e var. *uvarum*), *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* (TOFALO et al., 2013; VAUGHAN-MARTIN e MARTINI, 2015).

Taxonomicamente, as leveduras são definidas como microrganismos eucariotos, unicelulares, teleomorfos, onde em sua fase assexuada, a reprodução ocorre por brotamento multilateral. Vaughan-Martini e Martini (2011) descrevem a espécie *S. cerevisiae*, como microrganismos com diferentes formas e tamanhos, podendo ser esférica, globular, oval e até alongada, com tamanhos que variam de 1 a 5 μm de largura por 5 a 30 μm de comprimento, sendo desprovidos de mecanismos de locomoção (Figura 03). Quase sempre associadas a processos de fabricação de alimentos e bebidas, devido a sua capacidade fermentativa vigorosa, esse gênero utiliza o processo de fermentação para a conversão de fontes de carbono, como os açúcares (glicose, sacarose, maltose), em etanol e gás carbônico (CO_2) (SICARD e LEGRAS, 2011).

Figura 03- Microscopia óptica de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Kveik. Aumento de (1000x), células coradas com azul de lactofenol.



Fonte: Própria, 2023.

Devido a facilidade de cruzamento entre as espécies, influências humanas e ambientais, híbridos com características distintas vêm sendo observados (CAMARASA et al., 2011). Algumas cepas tidas como linhagens domesticadas, têm ganhado notoriedade não somente em indústrias cervejeiras e alcooleiras pelo excelente desempenho de fermentação, mas também, em outros segmentos devido a persistência e a prevalência em ambientes hostis (DELLABIANCA e GOMBERT, 2013). É o caso de uma linhagem conhecida como Kveik.

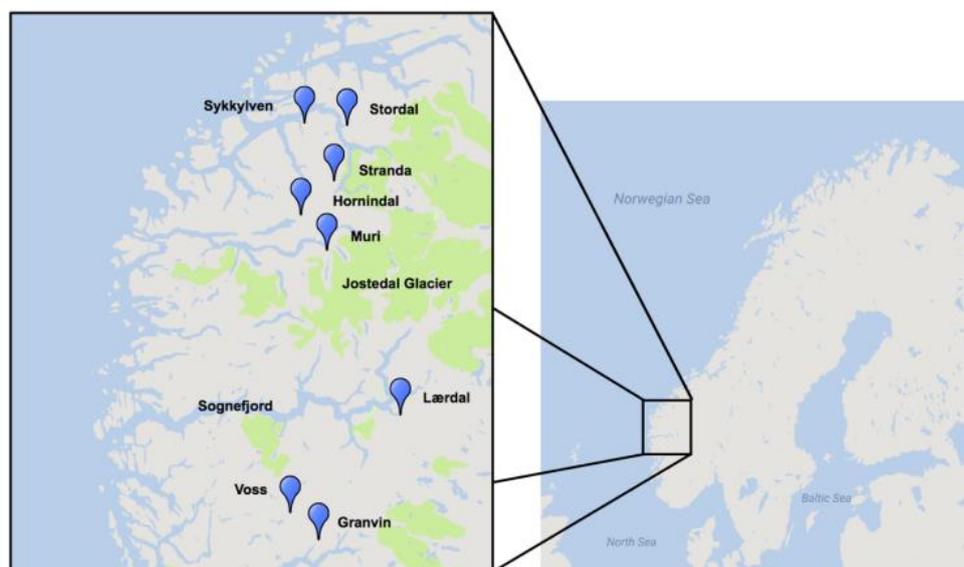
3.2.1 LEVEDURAS KVEIK.

Termo utilizado para designar as leveduras no dialeto local, a Kveik, é uma linhagem tradicional do oeste da Noruega e de partes da Escandinávia, que constitui um novo ramo na árvore genealógica de leveduras ale (PREISS; TYRAWA; VAN DER MERWE, 2017), não pertencentes as famílias ales inglesas, americanas ou alemãs. Divididas em dois grupos principais, as leveduras Kveik, possuem uma linhagem originária das regiões ao sul, Gravin, Laerdal e Voss, e outra em regiões ao norte, Sykkylven, Hornindal, Stranda e Stordal (Figura 04).

Empregadas nas Farmhouses ale, acredita-se que essas leveduras foram domesticadas pelos cervejeiros ao longo das gerações. Gallone et al. (2016) pontua que esta domesticação ocorreu devido a dois principais fatores: a reutilização (repitching) e o compartilhamento entre gerações de cervejeiros e produtores, seja em cervejarias industriais, seja em fabricações em fazendas.

Domesticação é um termo utilizado para definir uma seleção artificial, por meio de um ou mais processos de modificações genéticas de uma espécie selvagem, visando a obtenção de linhagens com características desejadas, aptas ao atendimento das necessidades humanas, logo, otimizadas ou aprimoradas, de forma que estas possam prosperar em ambientes artificiais (DOEBLEY; GAUT; SMITH, 2006).

Figura 04- Regiões de origem das linhagens originárias da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik.



Fonte: Preiss, Tyrana e Van der Merwe, 2017.

Alguns costumes locais podem estar associados ao processo de domesticação dessa linhagem. Segundo Preiss, Tyrawa e Van der Merwe (2017), as leveduras Kveik são

tipicamente inoculadas submergindo-as em mostos com temperaturas entre 30 e 40 °C, com um alto teor de açúcar. No entanto, a principal característica dessas leveduras não se relaciona com o processo produtivo, mas sim, com a sua forma de armazenamento, em toras de leveduras denominadas Kveikstokker, por longos períodos de tempos. Esse armazenamento específico, é descrito por Kawa-Rygielska et al. (2022) como estruturas de madeira (troncos) ou estruturas em formato oval, que são imersas no mosto de leveduras, após o processo fermentativo, seguidos de uma imersão em farinha ou cinzas. Quando secas, são armazenadas por períodos de um ou mais anos.

Diferente das leveduras tradicionais, as leveduras domesticadas Kveik, possuem características fenotípicas típicas, decorrentes de mecanismos evoluídos no que diz respeito a eficiência de fermentação de açúcares no mosto (maltose/maltotriose), a eliminação da produção de sabor fenólico (POF^o), a alta capacidade de floculação e atenuação, além da tolerância ao etanol e as altas temperaturas (PREISS et al., 2018). Gallone et al. (2016) associa a vantagem adquirida por essa linhagem na utilização de açúcares a presença de um homólogo transportador de maltose (MAL11), denominado AGT1, com afinidade por maltose/maltotriose, um dissacarídeo e um trissacarídeo, formados por duas e três moléculas de glicose, respectivamente. Presente nos grãos de malte, estes polissacarídeos, representam uma importante fonte de carbono para esses organismos modificados, conferindo uma vantagem energética, antes sub ou mal utilizados.

De maneira geral, a temperatura ideal para crescimento e fermentação das leveduras Kveik não é homogêneo. Garshol (2020) pontua a divergência entre as práticas de fabricação de cerveja pelos cervejeiros noruegueses, onde a temperatura de campo e os tempos de fermentações variavam, isso implica acreditar não só na adaptação as temperaturas elevadas, mas também, na existência de uma faixa de temperatura, sendo esta superior aos 30 °C.

Ainda sobre este aspecto, Kits e Garshol (2020) desenvolveram um estudo onde três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Kviek (Escarpa Laerdal Kveik, Omega Labs Lutra e Lalbrew Voss Kveik) foram submetidas a oito diferentes temperaturas de fermentação (20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33,5 °C, 37 °C, 40 °C e 42 °C) por 144 horas e, posteriormente, comparadas o seu desempenho com uma levedura Americana Ale. Observaram que, temperaturas superiores a 37 °C, inibiam completamente a fermentação na levedura Americana Ale, sendo a faixa de temperatura até 28 °C, aquela mais recomendada entre os fabricantes para esta cepa. Já para as três cepas da Kveik testadas, todas foram capazes de crescer e de realizar fermentação na faixa de temperatura submetida. Além disso, cada cepa possuía uma temperatura ideal onde o

desempenho na fermentação era otimizado, sendo as temperaturas descritas como 33,5 °C e 37 °C.

O conhecimento da temperatura de fermentação é um importante fator a ser determinado, uma vez que está associado a produção de álcoois superiores e compostos voláteis capazes de alterar o sabor da cerveja. Para as leveduras Kveik, Kits e Garshol (2020) ainda sugerem em seu estudo que, a excelente tolerância térmica demonstrada por essas leveduras, pode indicar uma menor quantidade de produção de metabólitos, associados ao sabor estranho, mesmo quando em temperaturas muito altas (acima de 37 °C). Ou ainda que, a abundância de outros compostos ativos de sabor (ésteres), sobressaia os metabólitos, impactando menos na percepção do sabor.

Em geral, famílias de leveduras domesticadas tendem a ser POF⁻, devido a uma perda de função dos genes PAD1 e FDC1, ou seja, não realizam a conversão do ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol como produto final, um dos causadores do sabor desagradável e indesejado nas cervejas (GONÇALVES et al., 2016). Devido a essa característica, Kawa-Rygielska et al. (2022) descreve um aumento no potencial antioxidativo da cerveja.

3.3 PROBLEMÁTICA DOS METAIS TÓXICOS

Diversos metais e metaloides fazem parte do nosso dia a dia e estão amplamente difundidos no ambiente. Identificados a partir de suas propriedades químicas, tais como elevada massa atômica, número atômico e massa específica que variam entre 3,5 e 7,0 g/cm³, esse grupo de elementos é situado entre os metais Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (LIMA e MERÇON, 2011; HOSINER et al., 2014). Caracterizados pela capacidade de persistirem na natureza, os metais têm sua toxicidade associada a fatores como concentração (dose), tempo e vias de exposição (SILVA et al., 2007a).

Nos últimos anos, o aumento desses metais nos mais diversos ambientes tem sido monitorado, uma vez que, afetam a qualidade dos ecossistemas. Proveniente de diversos setores industriais, tais como metalurgia, agronegócios, indústrias químicas, incineração de resíduos, efluentes, entre outras fontes antropogênicas e naturais, os metais promovem o fenômeno de bioacumulação em solos e águas, e por meio da cadeia alimentar, a biomagnificação em organismos vivos, podendo causar diversas doenças. Alguns dos metais com maiores efeitos deletérios à saúde são o cádmio, o cobre, o chumbo e, no entanto, quando em dosagens mais altas, demais elementos como cobalto, níquel e zinco (SOUZA; MORASSUTI; DEUS, 2018; MOSCHEM e GONÇALVES, 2020). A seguir, são discutidos alguns conceitos fundamentais, bem como os efeitos negativos desses metais.

3.3.1 CÁDMIO

Elemento químico de número atômico 48 e massa atômica igual a 112,4, o cádmio é um metal de transição, enquadrado no grupo IIB pela classificação periódica. Identificado pela sua coloração branco-prateado, maciez, maleabilidade e insolubilidade em água, o metal é encontrado, normalmente, combinado a outros elementos como oxigênio (óxido de cádmio), cloro (cloreto de cádmio) ou enxofre (sulfato de cádmio, sulfureto de cádmio) (ASTDR, 2012).

Presente no meio ambiente de forma natural, decorrente de atividades vulcânicas, erosão de rochas sedimentares e incêndios florestais, o cádmio tem como principal rota de inserção as atividades agrícolas e industriais. Atividades antrópicas como mineração, incineração de resíduos, reciclagem de lixo eletrônico, combustão de combustíveis fósseis estão, juntamente com a fertilização, entre as principais responsáveis pela contaminação e acumulação do metal no ambiente (GENCHI et al., 2020). Devido a propriedades como maleabilidade, ductilidade e alta resistência química mecânica e a corrosão, o cádmio é empregado em indústrias para revestimento de polímeros, em ligas de aço e indústrias de pigmentos. Por ser um ótimo condutor elétrico e de calor, também se faz presente em baterias níquel-cádmio (recarregáveis) e na fabricação de componentes eletrônicos (WHO, 2003).

Segundo o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (ATSDR, 2012) até 50% de todo cádmio que entra em contato com o corpo humano, acontece por meio da respiração do metal, sendo alojados nos pulmões. Menos de 10% ocorre por meio da ingestão de alimentos e água contaminada e praticamente nenhuma absorção é decorrente do contato dérmico. Considerado tóxico, uma vez que não possui nenhuma função biológica para seres vivos, quando ingerido, a maior parte do cádmio é armazenado nos rins e no fígado, onde podem permanecer por muitos anos e, outra pequena parte, é excretado lentamente pela urina e fezes. De maneira geral, o corpo humano é capaz de promover uma alteração no elemento, de forma a torna-lo não prejudicial, no entanto, quando em concentrações elevadas, os rins e o fígado perdem essa capacidade e o metal pode vir a causar, doenças pulmonares, doenças renais, doenças cardíacas, fragilidade nos ossos, além de afetar os testículos e pâncreas, causando em casos mais graves, morte (SEGANTINI, 1996).

Em organismos biológicos, tais como as leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, metais como o cádmio são tidos como não essenciais. Segundo Baudouin-Cornu e Labarre (2006) o cádmio é responsável por gerar um estresse oxidativo indireto nas células, diminuindo as defesas antioxidantes enzimáticas, o que acarreta na perda de funções de proteínas, danos à membrana e morte celular. Apesar disso, por meio de um mecanismo conhecido como mimetismo químico, assimilação de elementos por similaridade química

(configuração espacial, raio iônico e número de oxidação), o cádmio pode ser transportado para o interior das células (MARTELLI et al., 2006). A principal rota de entrada do elemento ocorre por meio de transportadores localizados na membrana celular, proteínas de membrana envolvidas na captação de metais essenciais como manganês, zinco e ferro (KERN et al., 2005). Muitas famílias de proteínas como a ZIP e a Nramp, estão associadas a esse processo de transferência para o interior da célula.

Já os mecanismos de remoção, responsáveis pelo aumento da tolerância ao estresse, são descritos por outros conjuntos de proteínas: as metalotioneínas e as glutations (MOREIRA, 2011). Associada ao processo antioxidante, a glutatona (GSH) possui um papel na biotransformação e eliminação de potenciais causadores de estresse nas células. Essa molécula, se liga a íons de cádmio (Cd^{2+}) formando um complexo denominado cádmio-bis-glutationato ($\text{Cd}(\text{GS})_2$), sendo este, transportado para o interior do vacúolo pela proteína Ycf1 p (*Yeast cadmium fator 1*) (Li et al., 1997). Outro mecanismo utilizado pela levedura e o escoamento para o ambiente extracelular com auxílio de proteínas de membrana. Entre estas, a Pca1 (*P-type cation-transporting ATPase*), Alr1 (*Aluminium resistance 1*) e a Yor1p (*Yeast oligomycin resistance 1*) (ADLE et al., 2007; KERN et al., 2005; NAGY et al., 2006).

3.3.2 COBALTO

Elemento de transição, de número atômico 27, o cobalto é um metal relativamente raro no ambiente, encontrado sob forma de minérios (cobaltita (CoS_2), linacita (Co_3S_4), esmaltita (CoAs_2) e eritrita ($3\text{CoO} \cdot \text{As}_2\text{O}_5 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)) associados a outros elementos metálicos, tais como níquel, cobre, chumbo e ferro. De cor branco-acinzentado, em temperatura ambiente o Co é encontrado no estado sólido (MEDEIROS, 2013).

Na natureza, participa da constituição de rochas e solos, podendo ser encontrado em águas, plantas e animais em quantidade traço. A contaminação, de forma natural, é descrita por atividades vulcânicas e incêndios florestais, no entanto, as atividades como queima de combustíveis fósseis, uso de bio-sólidos e fertilizantes fosfatados, mineração e fundição de minérios são tidas como as de maior relevância (ATKINS, 2018).

Encontrado em uma gama de produtos de uso industrial e doméstico, o Co é destinado principalmente a indústrias metalúrgicas para a produção de ligas metálicas, no entanto, podem ser vistos em indústrias de vidro e cerâmico sob a forma de pigmentos, em industriais de tintas e vernizes, atuando como agente secante e até mesmo na área da saúde, sendo empregado em tratamentos de alguns tipos de câncer (NASCIMENTO e SOARES, 2019).

Estudos como o de Lustigman, Lee e Weiss-Magasic (1995), El-Sheekh et al. (2003) e Reis (2019) demonstraram que águas contaminadas com Co em concentrações de ordem micromolar são capazes de provocar efeitos negativos no crescimento de algas de diversos gêneros (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Monoraphidium minutum*, *Nitzschia perminuta* e *Raphidocelis subcapitata*). Rodrigues (2021), observou o efeito do contato do cobalto com peixes das espécies *Oreochromis niloticus* e *Geophagus brasiliensis*, após o rompimento da Barragem do Fundão. Segundo a autora, estresses oxidativos, ocorrência de cistos espermatogênicos e mudanças associadas a peso e comprimento, foram alguns dos problemas evidenciados.

A interação do Co com seres humanos é prejudicial tanto em sua deficiência, uma vez que compõem vitaminas B12, podendo causar anemia perniciosa, tanto quanto em excesso sendo associado a doenças como inflamação da nasofaringe, rinite alérgica, dermatites, lesões cerebrais, além de efeitos carcinogênicos e genotóxicos. As principais vias de absorção são pelos tratos gastrointestinais e via respiratória, sendo captado por todos os tecidos e armazenados principalmente no fígado (20%). A saída, em contrapartida, é descrita pela urina (80%) e fezes (15%) em uma fase rápida que pode durar poucos dias. Não há indicações de que o Co se acumule no organismo com o passar dos anos (BAL e KASPRZAK, 2002; ALVES e ROSAS, 2003).

3.3.3 COBRE

Metal de transição, de número atômico 29, o cobre quando em temperatura ambiente se encontra no estado sólido, com uma coloração avermelhada. Na natureza, se faz presente em uma grande variedade de minerais como a calcocita (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2) e malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$), podendo ser encontrado também em sua forma metálica (BARCELOS, 2008).

Metal dúctil e maleável, o Cu tem sido usado na fabricação de ligas metálicas conferindo maiores resistências ao produto contra corrosões, além do amplo emprego em componentes elétricos, tais como geradores e transformadores, fios, cabos condutores e conectores, entre outros (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). Compostos contendo o elemento são utilizados na agricultura, no tratamento de água para controle de algas, na preservação de madeira, couros e tecidos, além de aditivos em alimentos (CETESB, 2012).

Em seres humanos e animais, o Cu é tido como essencial, em quantidades traços, atua como cofator de várias enzimas (cupro-dependentes) associadas a produção de energia durante a respiração celular, a síntese de proteínas estruturais como o colágeno e a elastina, além da síntese de noradrenalina, do pigmento melanina e na defesa contra radicais livres

(DELGADINHO, 2014). Efeitos agudos oriundos do contato dérmico ou inalação são raros, no entanto quando ingerido, sintomas como queimação, náuseas, vômitos e diarreias podem ser observados. Em casos mais graves, lesões no trato gastrointestinal e anemias (CETESB, 2012).

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, assim como em seres humanos, o Cu também atua como co-fator de inúmeras enzimas como c-oxidase e Cu-Zn dismutase. A faixa tida como ideal varia entre 1 a 10 μ M, favorecendo o crescimento e as atividades fermentativas das leveduras. Em maiores concentrações, são registrados diversos efeitos nocivos (FERREIRA, 2015).

3.3.4 CHUMBO

Metal de número atômico 82 na tabela periódica, o chumbo é um metal de cor cinza-azulado, que na natureza é encontrado, geralmente, associado a outros elementos formando carbonato de chumbo (PbCO₃), o sulfato de chumbo (PbSO₄), o cromato de chumbo (PbCrO₄) e sulfeto de chumbo (PbS) que é um dos mais abundantes (MAVROPOULOS, 1999).

Quinto metal de maior utilização na indústria, o Pb é empregado em ligas metálicas, em produtos como tintas, corantes e esmaltes, mas principalmente em baterias de automóveis. Seu ingresso no ambiente se dá pela queima de resíduos, uso em pesticidas, deposição de resíduos contaminados em aterros, fragmentos de tintas e poeiras oriundas da queima de combustíveis que ainda utilizam a chumbo em sua composição (ATSDR, 2007).

A toxicidade exercida pelo Pb quase sempre é associada a morte de animais, microrganismos e até seres humanos (ALVES et al., 2008). Quando em água, o chumbo inorgânico é capaz de promover alterações morfológicas, efeitos genotóxicos e neurotóxicos em diversas espécies de peixes (RODRIGUES et al., 2022). Em solos, por sua vez, a contaminação tende a afetar desde a fauna até plantas, seja na germinação, no crescimento, na redução da transpiração e pressão osmótica ou até mesmo na absorção e transporte de nutrientes minerais. Entre as mais afetadas, as hortaliças, apresentam menor qualidade e ameaçam a segurança alimentar (ALMEIDA et al., 2007; RIBEIRO e BORGES, 2022).

Tido como um dos elementos químicos mais tóxicos e, conseqüentemente, mais perigosos à saúde humana, o Pb quando inorgânico está associado a doenças nas vias respiratórias e digestivas, já o orgânico é absorvido pela pele. Os principais sintomas estão associados a náuseas, dores abdominais, vômitos, fadiga, anemia, anorexia, irritabilidade, convulsões e até morte (SCHIFER; JUNIOR; MONTANO, 2005).

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o Pb está associado a perda da capacidade proliferativa, inibição da atividade metabólica, inibição da síntese proteica, além de alterações

morfológicas e produção de espécies reativas de oxigênio, que podem causar a morte celular. A principal forma de defesa contra a toxicidade do metal é associada a presença de glutatona, a mecanismos de efluxos, quelatação e sequestração vacuolar (SOUSA, 2013).

3.3.5 NÍQUEL

Metal de transição, simbolizado pela sigla Ni, o níquel é o 28º elemento da tabela periódica com uma massa atômica de 58,69u. Comumente encontrado na forma de compostos com metais como cloro, enxofre e oxigênio, quando dissolvidos em água, tendem a apresentar uma coloração tipicamente esverdeada, já quando puro, branca-prateada (MCKEAN, 2011).

Presente no solo, água e ar, o Ni pode ser oriundo de diversas fontes naturais e antropogênicas e tem sua dispersão atrelada a processos físico-químicos. O transporte e distribuição de níquel é influenciado pelo tamanho de suas partículas. Segundo Azevedo e Chasin (2003), quando finas, estas tendem a permanecer mais tempo na atmosfera e serem carregadas a longas distâncias, em contrapartida, quando grandes essas partículas se depositam próximas a suas fontes de emissão.

Com propriedades associadas a altas temperaturas, resistência à corrosão e oxidação, dureza e ductilidade, o Ni pode ser aplicado em diferentes setores industriais, desde a tradicional siderurgia e galvanoplastia até os setores de eletrônicos, construção civil e aeroespaciais. Devido à alta difusão de produtos contendo níquel em sua composição, à poluição do meio ambiente decorrente de introduções crescentes ao meio ambiente, produção e descarte, torna-se inevitável (SILVA, 2005b). Estudos como o Benvenuti et al. (2012) demonstram que, muitas vezes, resíduos e efluentes oriundos dessas atividades, não atingem os limites de descarte pela legislação, mesmo após tratamentos. Machado et al. (2009), apontam ainda, que alguns desses efluentes líquidos, como os de galvanoplastia, podem conter até 100 mg/L de níquel no meio. Já Beltrão (2019) ao analisar os teores de zinco de efluentes de galvanoplastia observou teores de 5576 mg.L⁻¹, um valor superior a 1.100 vezes a capacidade permitida pela legislação.

Inúmeros problemas ambientais estão associados a contaminação por esse metal. Alves (2018), observou a influência das altas concentrações de Ni em solos e o desenvolvimento de plantas. Segundo o autor, o metal era capaz de influenciar nas atividades biológicas e enzimáticas das plantas, provocar estresse nas comunidades microbianas, além de bioacumular e causar morte. Já Nabinger (2017) demonstrou que mesmo em concentrações próximas a 15 mg.L⁻¹, algumas espécies de peixes apresentavam redução nos batimentos cardíacos e alterações morfológicas (tamanho e área ocular).

De difícil absorção pelo organismo humano, o níquel tende a ser menos tóxico se comparado a outros metais. Quando inalado, dependendo do tamanho da partícula, pode ficar retido tanto no nariz como nos pulmões. A ingestão, por sua vez, é tida como a principal rota de entrada desse metal no corpo humano, quando da ingestão de água e alimentos contaminados. Uma vez no corpo, o níquel pode ser transportado na corrente sanguínea e ser armazenado em todos os órgãos, com predominância dos rins (ATSDR, 2005).

Em pessoas que não são sensíveis ao níquel, efeitos na saúde só são observados quando da ingestão/inalação ou contato com altas concentrações. Dependendo da dose e da exposição ao metal, sintomas como dermatites, doenças cardiovasculares, asma, fibrose pulmonar e câncer no trato respiratório, podem ser observados. Algumas das rotas de saída deste metal são as fezes quando ingerido e a urina quando presente no sangue (ORR e BRIDGES, 2017).

Em microrganismos, o níquel é um elemento benéfico, em quantidade traço, atuando na constituição de várias enzimas. Rogsdale (1998) cita ao menos seis enzimas, são elas: níquel superóxido dismutase, uréase, hidrogenase, metil-coM redutase, CO desidrogenase e acetil-CoA isomerase.

3.3.6 ZINCO

Pertencente à família 12 (2B), de número atômico 30 e massa atômica 65,38u, o zinco é caracterizado por ser um metal brilhante, de coloração branco-azulado a azul-acinzentado. Em temperatura ambiente, se apresenta sob um estado sólido, frágil e mais maleável. Pode ser encontrado em formas distintas, como cloretos, óxidos e sulfatos de zinco sendo as formas mais comuns, a livre (Zn^{2+}) e as formas complexadas ($Zn(OH)_2$ e $Zn(CO)_3$) (ATSDR, 2005).

Devido a excelentes propriedades físicas e elétricas, o zinco é empregado em diversos segmentos industriais, como na metalurgia (galvanização e composição de ligas metálicas), indústrias bélicas, farmacêutica e de cosméticos, na produção de tintas, borrachas e eletroeletrônica (MAPELLI; MALFATTI; OLIVEIRA, 2014).

Elemento comum no meio ambiente, 23º mais abundante, teve nos últimos anos, uma maior biodisponibilidade, decorrente das intensas atividades antrópicas. A mineração, a produção do aço, a queima de carvão e de lixos, além de resíduos e efluentes industriais, estão entre as principais atividades poluidoras de solos e corpos de água com zinco na atualidade (OLIVIER, 2006). Foram observados que, em processos como banhos de zinco, muito utilizados em indústrias metalúrgicas, concentrações de até 49 g/L de zinco podem ser empregadas e seus efluentes concentrados, antes do tratamento, podem conter até 150 g/L de sulfeto de zinco (PEREIRA, 2006).

Alexandre et al. (2012), descrevem os efeitos da contaminação por zinco em plantas. Segundo os autores, redução na produção de biomassa de parte aérea e radicular, necroses, mortes de plântulas e inibição de crescimento vegetal, estão entre as principais consequências, no entanto, quando em solo o metal também é responsável por afetar a microbiota, em doses mais elevadas. Efeitos similares podem ser observados em macrófitas aquáticas em concentrações próximas a 10 mg.L^{-1} , com danos morfológicos e desenvolvimento de necroses (WOLFF et al., 2009).

Em humanos, o metal entra no organismo por meio da ingestão de alimentos, água e pelo ar. De acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (ATSDR, 2005), a ingestão dietética recomendada (RDA) de zinco para homens é de 11 mg/dia e de 8 mg/dia para mulheres. Entre as principais funções associadas a esse elemento estão o crescimento, a participação no metabolismo da vitamina A e de hormônios tireoidianos, além da participação nos sistemas nervoso e imunológico (CRUZ e SOARES, 2011).

Quando em altas concentrações, 10 a 15 vezes o valor da RDA, o zinco está associado a má absorção de outros elementos metálicos como o cobre, fundamental ao sistema imune, além da promoção de alergias e irritações quando inalado e de vômitos e diarreias, quando ingeridos. Quando exposto a grandes quantidades por um período prolongado pode provocar ocorrência de anemias, danos no pâncreas, alterações no colesterol e até esterilidade (ATSDR, 2005).

Assim como para humano, em microrganismos, o zinco também atua como um micronutriente essencial ao crescimento e em diversas funções biológicas do organismo microbiano, entre elas, Luna et al. (2010), apontam a presença do metal como constituinte de mais de 300 enzimas e coenzimas, como: álcool desidrogenase, que atua no processo fermentativa, superóxido dismutase, anidrase carbônica, fosfatase alcalina e muitas outras proteases). Além disso, participa em diversos processos bioquímicos como divisão celular, expressão gênica, transcrição genética, estabilidade estrutural e morte celular. Sua ausência bem como a alta concentração, por sua vez, podem contribuir para a paralisação celular, diminuição do crescimento e redução das atividades fermentativas (REGALLA e LYONS, 2006).

A demanda intracelular de zinco em células eucarióticas é de ordem micromolar, segundo Eide (2006), a faixa ideal de zinco para microrganismos varia de 0,1 a 0,5 mmol/L, e seu balanço é realizado por uma regulação homeostática mediada por diversos mecanismos, entre as quais, macromoléculas como as metalotioneínas e as fitoquelatinas. Quanto ao armazenamento, Zheng et al. (2008) aponta os compartimentos intracelulares, como os

vacúolos e lisossomos. Em condições normais, o zinco fica armazenado e, essa quantidade, é suficiente para suprir as necessidades celulares (EIDE, 2009).

3.4 BIORREMEDIAÇÃO

Uma vez presente no meio ambiente, a degradação de poluentes como os metais tóxicos é impossível e a maneira mais viável de tratamento é a remoção. Existem vários métodos aplicados a remoção de íons metálicos, sendo os mais comuns a precipitação, a troca iônica, a filtração por membranas, a evaporação e a filtração. No entanto, esses métodos são continuamente descritos como sendo de alto custo e baixa eficiência para altos volumes de efluentes, além de gerarem resíduos secundários de difícil destinação. Esses fatores, impulsionam a busca por novas tecnologias mais eficazes. Os métodos biotecnológicos estão entre as alternativas mais promissoras. (ZABOCHNICKA-SWIATEK e KRZYWONOS, 2014; EL-GENDY e EL-BONDKLY, 2016).

Definida como o uso de microrganismos (bactérias, algas, fungos e leveduras) para remoção, contenção, transformação ou redução de poluentes de solos, águas e gases, a biorremediação, tem sido usada de forma natural, não intencional, em tratamentos de águas residuais durante séculos. Mas recentemente, tem recebido maior destaque, já que utiliza de propriedades naturais desses organismos (KUMAR e BHARADVAJA, 2020).

Considerada uma tecnologia segura, limpa e econômica para descontaminação de uma ampla variedade de poluentes, a biorremediação é ainda uma tecnologia em desenvolvimento. Pouco se sabe dos mecanismos de interação entre cada metal e gênero de microrganismos. O uso de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e de leveduras como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Yarrowia* na remoção de metais tóxicos, já são registrados por diversos autores, devido à forte resistência a toxicidade, que permite além da garantia do seu desenvolvimento, a possibilidade de interação e remoção do poluente. Além destes, cianobactérias e microalgas também são relatados como opções promissoras de biossorventes (BHATNAGAR e KUMARI, 2013; HUSSEIN et al., 2019; LIRA, 2020).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* já consta em estudos de remoção de chumbo e níquel (INFANTE; ARCO; ANGULO, 2014), cádmio e molibdênio (SALIMI e MAHZOUNIEH, 2015), mercúrio (HADIANI et al., 2018), zinco (FOROUGH et al., 2022), entre outros metais.

Dentre os vários mecanismos que descrevem a interação das leveduras com os metais, Ledin (2000) aborda a imobilização, por meio da biossorção e bioacumulação.

3.4.1 BIOSSORÇÃO

A biossorção é um método de tratamento empregado desde os anos 80 em processos de descontaminação de íons metálicos e corantes industriais em água residuais (ÇOLAK et al., 2009). Definido como um processo físico-químico, a biossorção, é um processo passivo, sem gasto de energia, que tem como princípio geral, a interação entre um sorvato (material a ser removido do meio) e um material tido como adsorvente, com locais específicos de ligação. O resultado do processo é o acúmulo do material na interface do adsorvente e consequente redução da sua concentração na solução (CHOJNACKA, 2010).

O processo de adsorção é constante até que se atinja uma fase de equilíbrio (C_e), ou seja, até que ocorra a saturação dos sítios ativos do adsorvente. A qualidade do adsorvente, por sua vez, é avaliada pela capacidade de atração e retenção do adsorvato (AKAR e TUNALI, 2005).

A natureza deste biossorvente pode estar associada a diferentes materiais de origem biológica, como matéria orgânica vegetal, animal e microbiana, podendo ainda ser utilizadas vivas ou mortas (ABBAS et al., 2014). Para que seja considerado uma opção viável, o biossorvente deve atender alguns critérios. Beni e Esmaeili (2020) ressaltam que: 1) Deve possuir alta capacidade de biossorção cinética; 2) Ter tamanho, forma e propriedades físicas adequadas; 3) Ser barato e de fácil aquisição; 4) Resistência mecânica, química e estabilidade térmica e 5) Ser regenerável e reutilizável.

Como o processo de biossorção envolve principalmente a superfície celular, sua eficiência é determinada por um conjunto de fatores que envolvem tanto o material adsorvente (área superficial, porosidade, densidade, grupos funcionais), quanto o material a ser adsorvido (polaridade, tamanho da partícula e solubilidade), e as características operacionais (temperatura, pH e natureza do solvente) (FIYADH et al., 2019). Na Tabela 01 estão listados os principais fatores, bem como suas implicações no processo.

O pH é um dos parâmetros mais importantes quando se trata de biossorção devido a influência direta nas propriedades químicas dos metais e na disponibilidade de grupos funcionais da biomassa. De maneira geral, em pH aumentado, a biossorção de cátions é favorecida, não em uma relação linear, já que para pH maiores que sete, podem ser observados precipitações de complexos metálicos. Uma faixa ótima para o processo é relatada entre 5 e 9 a depender do metal a ser adsorvido (PARK et al., 2010).

Tabela 01- Fatores determinantes no desempenho de processos de bioadsorção.

FATOR	APLICABILIDADE
Área Superficial.	A capacidade adsorptiva é proporcional à área superficial disponível.
Presença de outros íons.	Competição pelos sítios ativos de ligação.
Temperatura	Influência na velocidade do processo de adsorção, ainda que na faixa de 20 a 35 °C não o afete significativamente.
pH	Podem influenciar nos sítios ativos de ligação, bem como danificar a estrutura do material bioadsorvente.
Tempo de contato	O equilíbrio no processo tende a ser atingido durante os primeiros minutos de sorção
Concentração da biomassa	Quando em alta concentração, a taxa de remoção também é alta. Existe a possibilidade da formação de agregados celulares que dificultaram o processo de adsorção.

Fonte: Adaptado de Wang e Chen (2006).

Em leveduras, suas superfícies são carregadas negativamente devido a presença de grupo funcionais, que favorecem a ligação do metal. Grupos carboxila, fosfato, sulfidril, amina e hidroxila, são capazes de atuar na remoção de cátions metálicos de forma mais eficiente quando em pH próximo a 6 (HUGHES e POOLE, 1989). Guler e Sarioglu (2013) descrevem os principais grupos associados ao mecanismo de adsorção do níquel como sendo as carboxilas (COO^-) e as hidroxilas (OH^-), contidas em maiores frações nas superfícies da parede celular da levedura.

A bioadsorção é caracterizada pela não formação de lodo tóxico e pela facilidade em se regenerar o bioadsorvente para uma possível reutilização em novos ciclos de sorção (GIRIJAN e KUMAR, 2019). Para que o processo se torne ainda mais atrativo, o uso de biomassas naturais ou derivadas de resíduos industriais e de processos produtivos estão sendo analisados como uma forma de agregar valor ao resíduo e dar uma destinação ambiental mais adequada (PANDIT e MAJUMDER, 2014).

Entre as principais vantagens do uso da *Saccharomyces cerevisiae* em processos de bioadsorção está relacionada a alta relação superfície/volume apresentada por esses microrganismos. Apesar de pequenas em tamanho, as leveduras proporcionam uma grande área de contato para interação com os íons metálicos presente na solução (SOARES e SOARES, 2012). Além disso, quando no uso de células mortas, fatores tidos como limitantes como toxicidade e necessidades nutricionais, são desconsiderados, reduzindo os custos de operação (MASSOUD et al., 2020).

Bons resultados sortivos pela *S. cerevisiae* são descritos por Billerbeck empregando 1,5g de levedura morta, com remoção de 57% de cromo e 75,2% de ferro em efluentes com concentrações iniciais de 1880 e 3040 mg/L de Cr e Fe, respectivamente, atingindo equilíbrio próximo a 1 h de contato adsorvente-adsorvato. Nascimento (2015) obteve remoção de 76% de cobre em solução com concentrações iniciais de 100 mg/L e pH=5,0. Já Ferreira (2006), obteve valores de remoção de 210, 5 mg.g⁻¹ e 1486,88 mg.g⁻¹ para os metais cádmio e chumbo, em 48 h.

O uso de leveduras cervejeiras é registrado por Ramírez-Paredes et al. (2011), com resultados sortivos satisfatórios para diferentes metais. Segundo os autores, 1 g de levedura liofilizada imobilizada da biomassa foi capaz de remover 44,52 mg/L (53%) de cobre, 84 mg/L (100%) de alumínio e 4,73 mg/L (43%) manganês, alcançando equilíbrio em aproximadamente 15 min. Já Riordan e Mchale (1998), utilizando 2g de biomassa viva e morta de levedura cervejeira, obtiveram remoção de 38 e 139 mg/g de chumbo, respectivamente.

3.4.2 BIOACUMULAÇÃO

A bioacumulação, por sua vez, é definida como um processo de acúmulo intracelular, com alto gasto de energia e de maior complexidade. Dividido em duas etapas, a bioacumulação, possui uma fase rápida semelhante à da bioadsorção e uma fase mais lenta, dependente da atividade metabólica das células, onde o sorvato é transportado para o interior da célula por meio da parede celular e da membrana plasmática, pela mesma rota dos nutrientes (CHOJNACKAK, 2009).

CHOJNACKA (2010) aborda essa divisão de etapas como uma vantagem do processo de bioacumulação frente a adsorção. Isso porque a medida em que os íons metálicos são conduzidos para o interior da matriz celular, novos sítios ativos ficam disponíveis e, assim, menores concentrações residuais podem ser alcançadas. Além disso, a concentração da biomassa tende a aumentar durante o processo, o que permite uma maior interação com os sorvatos.

De maneira geral, a bioacumulação envolve a absorção de íons metálicos e acúmulo em organelas específicas, tais como vacúolos. A concentração máxima de metal internalizado é regulado por sistemas de homeostase do metal. Mecanismos como bioprecipitação e biotransformação, também podem estar presentes durante a bioacumulação como uma forma de reduzir a biodisponibilidade do metal (HASSLER et al., 2004).

Estudos de bioacumulação de zinco por cepas de levedura *S. cerevisiae* são registrados por Tuszynski e Pasternakiewicz (2000), com capacidade de bioacumulação entre 0,1 a mais

de 6,0 mmol por grama de peso seco da levedura. Já Tsekova, Kaimaktchiev e Tzekova (1998) observaram remoção de 6,12 mg por grama de levedura.

O transporte de zinco para dentro ou fora da célula é mediado por proteínas de membrana. Rivera (2007) descreve a existência de, ao menos 6 famílias, associadas ao transporte de zinco em seres eucariontes, tendo a ZIP como principal família de captação, composta por proteínas Zrt (zinc-regulated transporter) e Irt (iron-regulated transporter) e a CDF (Cátion difusão facilitador). Enquanto o primeiro atua no transporte de metais do meio extracelular para o citoplasma, o segundo, atua no caminho inverso, ou seja, do citoplasma para o espaço extracelular.

Em leveduras, a captação de zinco é mediada por dois sistemas que utilizam proteínas dessa família, o primeiro de alta afinidade ao zinco, regulado pelo gene ZRT1 e o segundo, de baixa afinidade ao zinco, regulado pelo gene ZRT2. Na célula, o metal pode ser armazenado nos vacúolos, em uma forma que pode ser reutilizado e também menos tóxica ou no citoplasma. A Tabela 02 traz alguns genes já identificados que atuam no transporte de zinco transmembrana e vacuolares, sendo eles: Zrt1, Irt, Smf2 e Fet4 (LYONS et al., 2000).

Tabela 02- Proteínas associadas ao transporte de zinco transmembrana.

PROTEÍNA	METAIS TRANSPORTADOS	REFERÊNCIA
Zrt1	Cádmio e Zinco.	GOMES et al., 2002; GITAN et al.,
Irt	Cádmio e Zinco.	2003.
Smf2	Cádmio, Cobre, Cobalto, Ferro e Zinco.	KERN et al., 2005; ROTOLO et al., 2008; WYSOCKI e TAMÁS, 2010.
Fet4	Cádmio, Cobre, Ferro e Zinco	JENSEN e CULOTTA, 2002.

Fonte: Própria, 2023.

Já a absorção de níquel foi observada por Stoll e Duncan (1998), onde 0,5g de levedura *S. cerevisiae* em meio suplementado com glicose, foi capaz de absorver 24,4 µg do metal, em um período de 5 h. E o mecanismo de transporte é descrito por proteínas de cátions que atravessam o citosol. O níquel se liga à metaloproteínas em seus vacúolos e interagem com componentes celulares (ácidos orgânicos, nucleotídeos, aminoácidos e fosfolipídios). Em presença de grandes concentrações, afeta o equilíbrio de outros nutrientes, podendo causar distúrbios fisiológicos e bioquímicos (SILVA e BASSO, 2007).

Uma limitação encontrada na bioacumulação está na complexidade do processo. Inúmeros fatores associados a composição do meio de crescimento (pH, temperatura, presença de outros compostos) podem atuar inibindo ou reduzindo o processo. Outro fator limitante, quando no

uso de microrganismos (bactérias e fungos), está no fornecimento de fontes de carbono essenciais ao metabolismo, esta suplementação pode representar uma desvantagem quando comparado a outros bioissorvente como plantas e algas fotossintéticas (PRASANNA; JAISWAL; KAUSHIK, 2008).

Além disso, a interação entre organismos vivos e metais tóxicos, foram descritas por Yilmazer e Saracoglu (2009) e Siloniz et al., (2002) como capazes de promover mudanças significativas na morfologia e fisiologia das células, prejudicando sua integridade e função.

3.3.3 DIFERENÇAS ENTRE MÉTODOS E EFICIÊNCIA

A principal diferença entre os dois métodos está associada a natureza do adsorvente, enquanto na bioacumulação o adsorvente são células vivas, já que o processo requer atividade metabólica, na bioadsorção o adsorvente são células mortas (SOUSA et al., 2007). Outras diferenças são descritas na Tabela 03.

Tabela 03- Principais diferenças associadas ao uso de leveduras *S. cerevisiae* em processos de bioacumulação e bioadsorção.

PROPRIEDADE	BIOACUMULAÇÃO	BIOADSORÇÃO
Adaptação	Afetada pelas altas concentrações do metal.	Não é afetada pela concentração do metal.
Custo	Alto custo. (Manutenção das condições adequadas a vida do organismo).	Baixo custo. (Bioissorventes não demandam condições de controle). Utilização de resíduos industriais.
Energia	Processo ativo.	Processo passivo.
Ligação	Depende da toxicidade do poluente.	Em condições favoráveis, a probabilidade de ligação é alta.
Meio de crescimento	Alta exigência nutricional e operacional.	Exigência nutricional apenas na fase de crescimento do sorvente.
Recuperação/reutilização do adsorvente.	Devido a acumulação no interior da célula, a possibilidade de regeneração e reuso é limitado.	Alta probabilidade de reutilização em ciclos

Fonte: Adaptado de Beni e Esmaili (2020).

Os mecanismos tidos como não dependentes do metabolismo, ou seja, aqueles associados a biomassas mortas, são descritos como rápidos, uma vez que as ligações ocorrem em grupos funcionais na superfície celular, ao contrário do que é descrito para mecanismos de remoção

em células vivas, onde a captação intracelular ocorre em velocidades mais baixas (PAPIRIO et al., 2017).

3.3.4 MICRORGANISMOS BIOSORVENTES: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

De maneira geral, microrganismos como fungos e bactérias possuem capacidade de se adaptarem e de se desenvolverem em condições extremas como temperaturas elevadas, estresse salino ou altas concentrações de metais no meio extracelular (NASCIMENTO; LEITE; RIZZO, 2016). Estudos com fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e leveduras *Saccharomyces* e *Rhodotorula*, já comprovaram ser resistentes a toxicidade e eficientes na remoção de íons metálicos, mesmo em altas concentrações (BLUMER, 2002).

Em particular, a espécie *S. cerevisiae*, tende a ser utilizadas em processos de biossorção e bioacumulação devido as vantagens que apresentam frente a outros adsorventes. Além de possuírem genoma completamente sequenciado, que permite manipulação e aquisição de conhecimentos mais avançado. Verma e Kuila (2019) apontam a facilidade de obtenção e o baixo custo, uma vez que, estes podem ser obtidos como subprodutos da indústria de fermentação de bebidas, tais como cerveja, com rendimentos de biomassa superiores àqueles encontrados em indústrias farmacêuticas e enzimáticas. Wang e Chen (2006), descreve ainda a facilidade de cultivo em larga escala, por meio de técnicas não sofisticadas e meios de crescimento barato, além da garantia de fornecimento contínuo e da manipulação segura, já que a espécie *S. cerevisiae*, não oferece riscos a saúde do manipulador.

Melo e Azevedo (2008), abordam a resistência destes organismos a ambientes com altas concentrações de metais. Por meio de suas vias metabólicas (respiração, fermentação e co-metabolismo), os microrganismos tendem a se adaptar a seus efeitos nocivos, utilizando estratégias de bioacumulação, biossorção e biomineralização (TAREKEGN et al., 2020). A presença de grupos químicos distintos oferece uma gama de sítios de ligações para diversos metais. Grupos carboxilatos, hidroxilatos, fosfanatos e aminas, além de materiais intracelulares liberados após tratamentos ou morte celular, estão associados a formação de complexos químicos que removem os íons metálicos das soluções. Em fungos e leveduras, a parede celular rica em quitina e quitosana, estão associadas a presença de grupos amina, amido e hidroxila e por isso, propriedade de ligação com cátions e ânions em sua superfície (CHOJNACKA, 2010).

A vantagem frente ao uso de outros organismos, é que leveduras flocculentas, tais como a Kveik, tendem a apresentar maiores quantidades de sítios ativos de ligação. Machado et al. (2009) explicam que a flocculação envolve a interação entre proteínas específicas, presentes na parede celular, conhecidas como lectinas. A presença dessas proteínas fornece locais, ou sítios

de ligação adicionais, aumentando assim a capacidade de acúmulo e remoção de metais. Soares et al. (2002) demonstraram isso ao comparar a capacidade de remoção de íons Cu^{2+} , onde uma cepa floculenta removeu 81 mmol mg^{-1} peso seco frente a 30 mmol. mg^{-1} peso seco, de uma cepa não floculenta.

Alguns fatores específicos que podem atuar na capacidade absorptiva das leveduras estão associados as condições do ambiente, a idade celular, as variáveis dietéticas, a especificidade da biomassa viva e do íon metálico disponível no meio. Além disso, em células vivas, a absorção é limitada pela capacidade da levedura de suportar a toxicidade do metal que pode conduzir a morte celular (RASHEED et al., 2020).

Alguns tratamentos e pré-tratamentos físicos e químicos (aquecimento, congelamento, liofilização, lavagem com detergentes e solventes orgânicos), além do uso da engenharia genética na construção de linhagens mais resistentes (supressão ou repressão de gene) buscam contornar esses empecilhos e potencializar os resultados sortivos com *S. cerevisiae* (JÚNIOR, 2011).

Navarro (2012), desenvolveu uma linhagem de leveduras que apresentavam proteínas da família Mers ancoradas a superfície celular externa. Essas proteínas são responsáveis pela ativação de genes associados a captação extracelular de metais, como o zinco e cádmio, aumentando a concentração intracelular. O aumento da expressão de genes como ZRT1, ZRT2 e FET4 permite aumentar a capacidade de absorção de zinco pela célula em mais de 100 vezes (SIMM et al., 2007).

Pankiewicz, Sujka e Jamroz (2015) estudaram a utilização de células tratadas com campos elétricos pulsados (PEF) na sorção de íons de zinco. Devido a formação de poros nas membranas, que permitem um aumento da sua permeabilidade, os resultados encontrados, apontaram uma absorção de 15,57 mg/g do metal, o dobro do valor quando comparada a células não tratadas com PEF.

Li et al. (2013), demonstraram a importância da suplementação dos meios de crescimento, ao introduzir 60 g/L de cloreto de sódio e obter um aumento na resistência aos metais cádmio e zinco, além de promover uma melhoria na capacidade bioacumulativa do zinco, registrando remoções de 8 mg/g sem tratamento e 12,25 mg/g com tratamento.

Fontes de energia, tais como os açúcares, também é relatado por Naik et al. (2022) ao descrever que a captação de íons ocorre na fermentação, apenas nos estágios iniciais, enquanto ainda há disponibilidade de fontes energéticas, já que o transporte é mediado por ATPases da membrana plasmática. A suplementação com fontes de carbono, alimenta as ATPases da membrana plasmática que atuam no transporte do zinco para o meio intracelular (MACHADO

et al., 2009). Salão (2001) observou ainda que, meios de crescimento suplementados com monossacarídeos, registravam melhores desempenhos de absorção, quando comparado a dissacarídeos. Stoll e Duncan (1996), por sua vez, pontua a interferência de metais na assimilação do açúcar pelas células.

Vadkertiová e Slavikova (2006) apresentam resultados satisfatórios quanto a capacidade de leveduras das espécies (*C. krusei*, *C. maltosa*, *C. lambica*, *P. anomala*, *P. americana*, *S. cerevisiae*, entre outras) de tolerarem metais tóxicos como zinco, cobre, níquel e cádmio, em faixas que variam de 0,1 a 20 mmol/L, podendo ser empregadas em processos de biorremediação de áreas contaminadas e de efluentes industriais.

Estudos como o de Zinicovscaia et al. (2020) demonstraram alta eficiência de remoção do zinco presente em efluentes de indústrias de galvanoplastia por leveduras inativadas do gênero *Saccharomyces*, com remoção acima de 85% em pH = 6,0. Machado, Soares e Soares (2010) relataram reduzir 89, 91 e 94% de Ni, Cu e Zn, em pH=6,0, de efluentes industriais utilizando biomassa morta de uma linhagem de leveduras cervejeiras *S. cerevisiae* floclulenta.

Várias referências comprovam a eficiência da *S. cerevisiae* na remoção de metais tóxicos, em soluções aquosas. Na Tabela 04, são descritas algumas referências do uso da levedura, sob diferentes formas, como adsorvente para os metais níquel e zinco.

Tabela 04- Absorção dos metais zinco e níquel por diferentes formas adsorventes de *Saccharomyces cerevisiae*.

METAL	FORMA	REFERÊNCIA
Níquel	Levedura residual da indústria de fermentação (autoclavada a 120°C)	Bakkaloglu et al. (1998)
	Células livres	Al-Saraj et al. (1999)
	Células cultivadas em laboratório (secas a 100°C)	Özer e Özer (2003)
	Leveduras protonadas	Padmavathy et al. (2003)
Zinco	Levedura residual da indústria de fermentação (autoclavada a 120°C)	Bakkaloglu et al. (1998)
	Células livres	Al-Saraj et al. (1999)
	Células imobilizadas em sepiolita	Bag et al. (1997)
	Células reticuladas de formaldeído em biorreatores de coluna	Zhao e Dunncan (1997)

Fonte: Adaptado de Wang e Chen (2006).

Jin et al. (2008) pontuam ainda que as células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, não respondem a presença do metal diretamente, mas sim, aos danos secundários induzidos por esses, uma vez que não existem sensores celulares específicos para isso.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda, da Universidade Federal Fluminense, situada em Volta Redonda, Rio de Janeiro.

4.1 MICRORGANISMO UTILIZADO

Saccharomyces cerevisiae Voss Kveik (M12) foi obtida da empresa Mangrove Jack´s – Albany, Nova Zelândia.

4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Kveik seca foi hidratada em 200 mL de água destilada estéril por 20 min em temperatura ambiente. Após hidratação, 5 mL da solução foram transferidas para Erlenmeyers contendo meio líquido YEP adaptado (2% Maltose, 2% Peptona de Caseína e 1% Extrato de Levedura) e crescida em incubadora refrigerada com agitação orbital (TECNAL/TE-42I) a 30 °C e 175 rpm por 24 h.

Para o preparo das culturas estoque, uma alçada de 10 µL foi inoculada em meio YEP sólido, acrescido de maltose, em placas de Petri. As placas foram incubadas por 24 h a 30 °C em estufa bacteriológica (TECNAL - TE-392/2). Após crescimento das colônias, as placas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUES DE METAIS TÓXICOS

Para os ensaios de estresse, absorção e adsorção com metais pesados, soluções estoques foram preparadas com os sais: Cloreto de Cobre II ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Cloreto de Chumbo (PbCl_2), Cloreto de Cobalto II ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cloreto de Cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Cloreto de Níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cloreto de Zinco (ZnCl_2), em água destilada e esterilizada. Todos os sais foram adquiridos da empresa VETEC QUÍMICA FINA Ltda.

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA

A levedura *S. cerevisiae* kveik foi crescida em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura YEP líquido, em incubadora tipo shaker (TECNAL/TE-42I) sob agitação a 175 rpm e 30 °C de temperatura, por um período de 24 h, tendo seu crescimento medido em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800).

Para a construção da curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* Kveik, frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEP líquido mais inóculo em uma densidade

óptica inicial de 0,1 ($DO_{-600nm} - 10^7$ células/mL), foram colocados em incubadora tipo shaker orbital (TECNAL/TE-42I) sob agitação a 175 rpm e 30 °C. Amostras foram coletadas a cada 2 horas, por um período de 36 h, e lidas no espectrofotômetro (600 nm). A quantificação celular foi estimada através da absorbância (DO_{-600nm}). Foram feitas três repetições.

4.5 ENSAIOS DE RESISTÊNCIA DA *S. cerevisiae* Kveik A DIFERENTES METAIS EM MEIO SÓLIDO

O crescimento de *S. cerevisiae* Kveik em meio de cultura contendo diferentes concentrações de metais, foi utilizado para avaliar a resistência desta levedura aos metais cobre, chumbo, cobalto, cádmio, níquel, zinco. O ensaio consistiu na deposição de uma alíquota de 10 µL de uma cultura de *S. cerevisiae* Kveik em fase logarítmica de crescimento sobre o meio YEP sólido modificado (2% Maltose, 2% Peptona de Caseína, 2% Agar e 1% Extrato de Levedura) contendo concentrações crescentes de Cobre (0, 50, 100, 200, 300 e 600 ppm), Chumbo (0, 50, 100, 200, 300 e 600 ppm), Cádmio (0, 50, 100, 150, 200 e 300 ppm), Cobalto (0, 50, 100 e 200 ppm), Níquel (0, 150, 300, 600 e 900 ppm) e Zinco (0, 400, 800 e 1200 ppm). As placas foram incubadas por 5 dias em estufa bacteriológica e o diâmetro das colônias medidos diariamente (24, 48, 72, 96 e 120 h) com um paquímetro (King Tools – 300mm). Foram registradas imagens no decorrer dos cinco dias e calculado suas áreas.

A maior resistência da levedura *S. cerevisiae* Kveik aos metais foi determinado baseado na capacidade de formação de colônias. Foram feitas três repetições.

4.6 CURVA DE CRESCIMENTO DA *S. cerevisiae* Kveik EM MEIO SUPLEMENTADO COM NÍQUEL E ZINCO

Para avaliar o efeito dos metais níquel e zinco no crescimento de *S. cerevisiae* Kveik, frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura YEP líquido mais inóculo em uma densidade óptica inicial de 0,1 ($DO_{-600nm} - 10^7$ células/mL), foram suplementados com concentrações crescentes de níquel (0, 150, 300, 600 e 900 ppm) e zinco (0, 200, 400, 600 ppm), definidas a partir de ensaios prévios de resistência. O pH do meio foi ajustado para 6,0 após a adição dos metais. Os frascos erlenmeyers foram colocados em incubadoras tipo shaker orbital (TECNAL/TE-42I) sob agitação a 175 rpm e 30 °C de temperatura.

O crescimento celular foi monitorando, medindo-se a densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm (SHIMADZU UV-1800), em tempos nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h.

Foram realizadas três repetições.

4.7 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM BIOMASSA VIVA

Para a análise da absorção dos íons de níquel e zinco, pela levedura *S. cerevisiae* Kveik, foram verificados o efeito do tempo, da concentração da biomassa viva e da concentração dos metais no meio de cultura. O ensaio de absorção ocorreu em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura líquido YEP com maltose, acrescido das diferentes concentrações dos metais níquel (0, 100, 200 e 300 ppm) e zinco (0, 200, 300 e 400 ppm), separadamente, mais biomassa viva da levedura em base úmida (2 e 5g). O pH do meio foi inicialmente ajustado em 6,0.

Os frascos Erlenmeyers foram colocados em incubadoras tipo shaker (TECNAL/TE-42I) sob agitação a 175 rpm e 30 °C de temperatura. Alíquotas de 10 mL do meio foram coletadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h de exposição ao metal. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas (CIENITEC – CT6000R) a 3500 rpm por 15 min para a separação do sobrenadante. O sobrenadante coletado foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN AA240) para a determinação das concentrações de Zn e Ni em solução.

A determinação da concentração de metal absorvido pela célula foi calculada pela razão entre a concentração do íon inicialmente colocado no meio e a concentração residual do mesmo Eq. (01), encontrado no sobrenadante centrifugado, livres de células, em cada tempo do tratamento (APHA, 2005).

$$R\%abs = \left\{ \frac{(\text{íon inicial}) - (\text{íon final})}{\text{íon inicial}} \right\} \times 100 \quad \text{Eq. (01)}$$

O material sedimentado, após a separação do sobrenadante, foi ressuspenso em 5 mL de água destilada e, por fim, homogeneizado. Essa mistura, foi então transferida para recipientes, previamente pesados e levados a estufas a 105 °C, até atingirem peso constante. A matéria seca foi então pesada em balança analítica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2019). O cálculo da massa seca é descrito pela Eq. (02):

$$MS = PA - PV \quad \text{Eq. (02)}$$

Onde: MS = Massa seca em gramas do material

PA = Peso do recipiente mais amostra seca

PV = Peso do recipiente

Foram realizadas três repetições.

4.7.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

A fim de se observar possíveis mudanças morfológicas, células da levedura *S. cerevisiae* Kveik submetidas ao estresse por zinco e níquel e células isentas de estresse foram observadas em microscópio óptico (OLYMPUS/BX51M – 1000x). Para isso, alíquotas de 2 mL foram coletadas nas diferentes concentrações com metais ao final das 72 h de experimento. As células foram centrifugadas a uma velocidade de 3500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado ressuspensionado em 2 mL de água destilada. Uma amostra de 10 µL foi espalhada sobre uma lâmina e corada com Azul de Lactofenol (SIDRIM e ROCHA, 2004).

4.8 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM BIOMASSA MORTA

Para a adsorção de Zinco e Níquel em solução, foram verificados o efeito do tempo, da concentração da biomassa morta e da concentração inicial dos metais. Para tal, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Kveik foram crescidas em meio YEP e autoclavadas a 121 °C por 15 min. Em seguida, o meio de cultura contendo as células mortas foi centrifugado a uma velocidade de 3500 rpm por 15 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado contendo as células morta, separado para uso.

Frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL das soluções de zinco nas concentrações 200, 300 e 400 ppm e níquel 100, 200 e 300 ppm, separadamente, mais a biomassa morta da levedura úmida (2 e 5g) foram mantidas sob agitação a uma velocidade de 175 rpm e temperatura de 25 °C. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 min e centrifugadas a uma velocidade de 3500 rpm por 15 min (CIENITEC – CT6000R). O sobrenadante coletado foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica (VARIAN AA240) para a determinação das concentrações de Zn e Ni em solução (APHA, 2005).

A taxa percentual de remoção R% do metal em solução, foi calculado pela expressão Eq. 03

$$R\% = \left(\frac{co - ce}{co} \right) * 100 \quad \text{Eq. (03)}$$

Foram realizadas três repetições.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

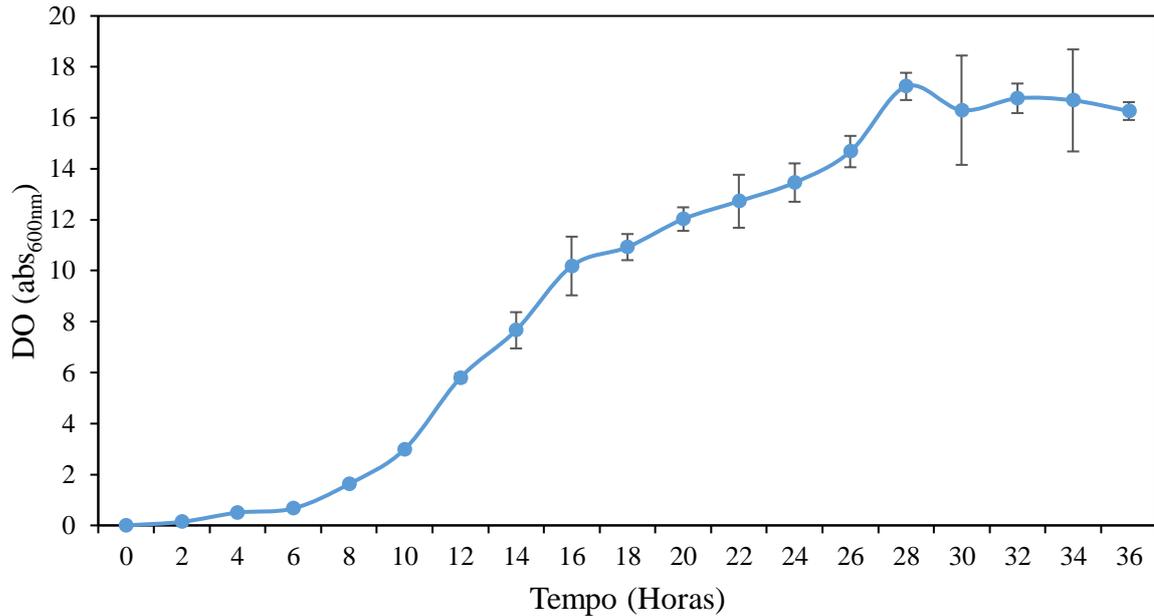
Os dados expressos nas tabelas e gráficos são descritos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software SISVAR[®], com análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CURVA DE CRESIMENTO DA *S. cerevisiae* Kveik

A curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* Kveik é representado na Figura 05.

Figura 05- Crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido acrescido de maltose, incubada a 30 °C por 36 h sob agitação constante (175 rpm).



Fonte: Própria, 2023.

O crescimento e reprodução de leveduras, em parte, dependem da capacidade de assimilação dos açúcares fermentáveis presente no meio. Para leveduras cervejeiras, em geral, o consumo da maltose é mais lento. Já para a cepa Kveik, no entanto, a eficiência de assimilação dessa fonte de carbono é mais rápida, o que contribui para a aceleração do crescimento das células (PREISS et al., 2018). Observa-se que em condições normais de cultivo, as seis primeiras horas são caracterizadas pela adaptação da levedura ao meio (fase lag), e que sua fase log de crescimento é observada entre 8 e 28 horas, sendo seguida pela fase estacionária.

Foster et al. (2021), observaram resultados semelhantes a esses, com o início da fase de crescimento após as seis horas e redução no crescimento após as 24 h, devido ao esgotamento de cerca de 90% da maltose presente no meio.

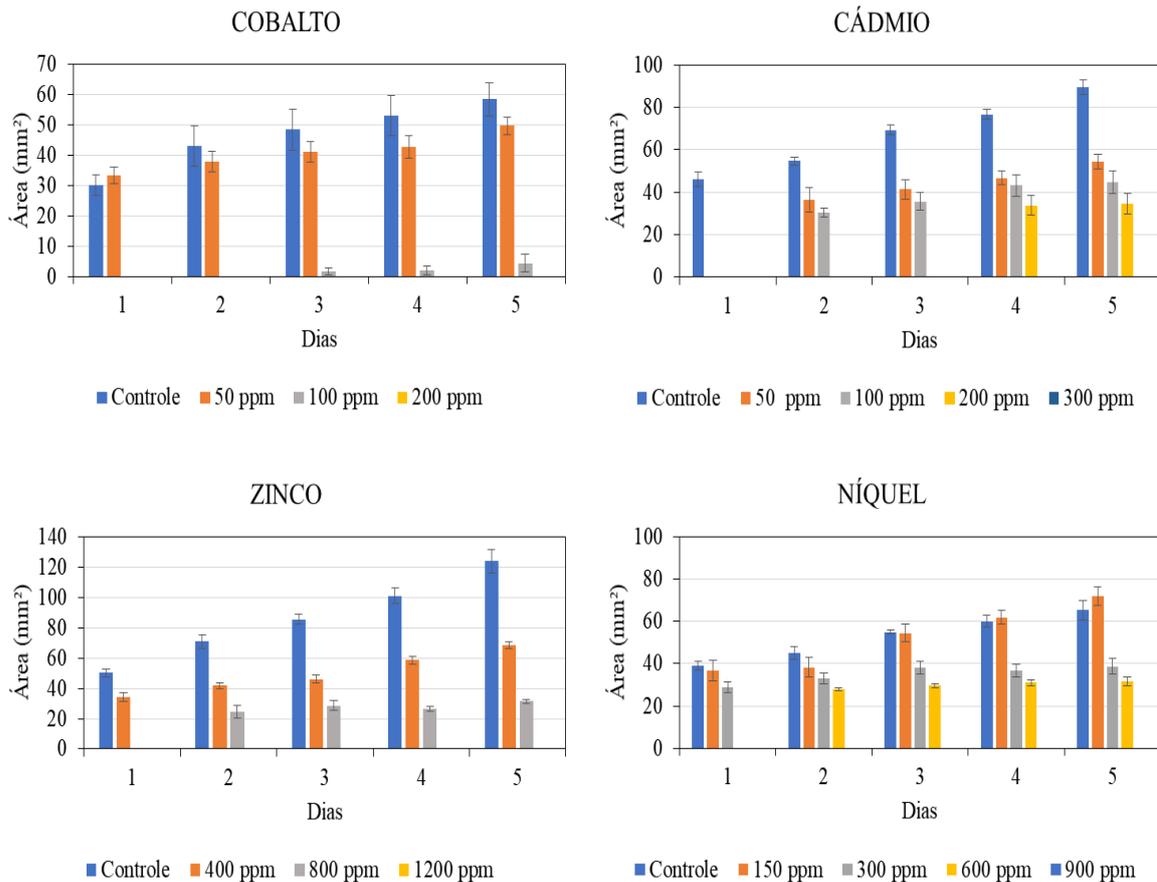
A compreensão do comportamento de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* é fundamental no processo de biossorção de metais tóxicos, já que a idade celular é capaz de influenciar no desempenho sortivo. Células em fase log ou em estágio exponencial de crescimento, possuem uma capacidade de biossorção maior quando comparado as fases lag e

estacionária (WANG e CHEN, 2006). Este intervalo de tempo de crescimento encontrado (8-28 h), correspondente a fase log, foi escolhido para realização dos ensaios de bioacumulação e adsorção.

5.2 ENSAIOS DE RESISTÊNCIA DA *S. cerevisiae* Kveik A DIFERENTES METAIS

O comportamento frente ao estresse a metais tóxicos em diferentes concentrações de Co, Cd, Ni e Zn no crescimento da levedura *S. cerevisiae* Kveik são observados na Figura 06.

Figura 06- Efeito das diferentes concentrações dos metais Co, Cd, Ni e Zn no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik em meio YEP sólido, incubadas a 30 °C por 5 dias.



Fonte: Própria, 2023.

Cobre e chumbo foram tóxicos em todas as concentrações testadas, não registrando formação de colônias. Possíveis explicações são dadas por Souza (2013), ao analisar o efeito da exposição de células de *S. cerevisiae* a concentrações inferiores a 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo, observou modificações celulares associadas a perda da capacidade proliferativa, perda da integridade membranar e mutações no vacúolo, principal organela associada a desintoxicação do metal na célula. Já Romandini et al. (1992) apontaram danos oxidativos as proteínas celulares e a funções enzimáticas, quando expostas ao cobre. Cordeiro (2016) aponta que metais

como chumbo e cobre potencializam a produção de espécies reativas de oxigênio, que danificam enzimas, proteínas e lipídeos, causando a morte da célula.

Analisando a Figura 06, nota-se que a resistência a cádmio e cobalto foram bem menores quando comparados aos metais zinco e níquel. Enquanto o crescimento da colônia ocorreu até 100 ppm para o Co, sendo inibida em 200 ppm, para o Cd, a inibição do crescimento só ocorreu em 300 ppm e a maior resistência foi observada em meio contendo 200 ppm. Esses resultados podem ser explicados pelos efeitos tóxicos dos metais ao microrganismo. Muthukumar e Nachiappan (2010) apontam a redução de biomassa e perda da viabilidade celular, quando em contato com cádmio. Além disso, espécies reativas de oxigênio, têm seus níveis aumentados quando os organismos são submetidos a concentrações elevadas do metal, provocando danos aos ácidos nucleicos, além de comprometerem a translocação da membrana (LANDOLFO et al., 2008).

Para os metais níquel e zinco, nota-se resistência em concentrações de 600 e 800 ppm respectivamente. Além disso, a formação de colônias já é observada nas primeiras 24 h de crescimento, para concentrações de 400 ppm de zinco e 300 ppm de níquel. Nota-se ainda que, para as concentrações de 100 ppm de cobalto e 200 ppm cádmio, maiores concentrações avaliadas, antes da inibição, a formação das colônias se deram no terceiro e quarto dia, respectivamente.

Esse perfil de resistência ao metal descrito por $Zn > Ni > Cd > Co > Cu/Pb$, se assemelha ao trabalho de revisão de Massoud et al. (2019), ao descreverem uma ordem de resistência para a *Saccharomyces cerevisiae* como sendo $Zn > Cd > Co > Cu$. No entanto, trabalhos como o de Özer e Özer (2003), apontam uma maior resistência por Pb do que por Ni para o mesmo gênero de leveduras, o que nos sugere entender que, cada cepa possui um perfil próprio de resistência.

Analisando melhor os dados do zinco, tidos como o metal com maior afinidade, observa-se pela Figura 06 um crescimento significativo do tratamento controle, obtendo a maior média com uma área de 123,94 mm², ao final do experimento. Entre os tratamentos contendo o metal, as concentrações de 400 ppm e 800 ppm, apresentaram uma área média de 68,49 mm² e 31,46 mm², respectivamente, ao final do quinto dia. Nota-se crescimento em todos os tratamentos aplicados, com exceção da concentração de 1200 ppm (inibitória).

Resultados semelhantes foram encontrados por Belluco (2008), onde em seu estudo de enriquecimento de leveduras *S. cerevisiae* vivas com os micronutrientes ferro e zinco, demonstrou que quando inoculada em meio de cultura YEPD sólido com concentrações crescentes de zinco (200, 400, 800, 1000 e 1200 mg), essa apresentava uma forte resistência ao metal, com crescimento nas concentrações de 400 e 800 ppm em 48 h. Concentrações superiores

testadas (1000 e 1200 ppm) inibiam seu crescimento. Diferente da cepa utilizada por Belluco, a cepa Kveik apresentou crescimento na concentração de 400 ppm já nas primeiras 24 h.

Para o níquel, nota-se que a concentração de 150 ppm apresentou uma maior média de crescimento (71,92 mm²) quando comparado ao tratamento controle (65,23 mm²), ao final do quinto dia. Além disso, é possível observar diferença no crescimento entre todos os tratamentos aplicados. Com excessão do tratamento de 150 ppm, a medida em que se aumentava a concentração do metal no meio, menor era o crescimento observado. A concentração de 900 ppm, não registrou crescimento de colônias, logo foi tida como inibitória.

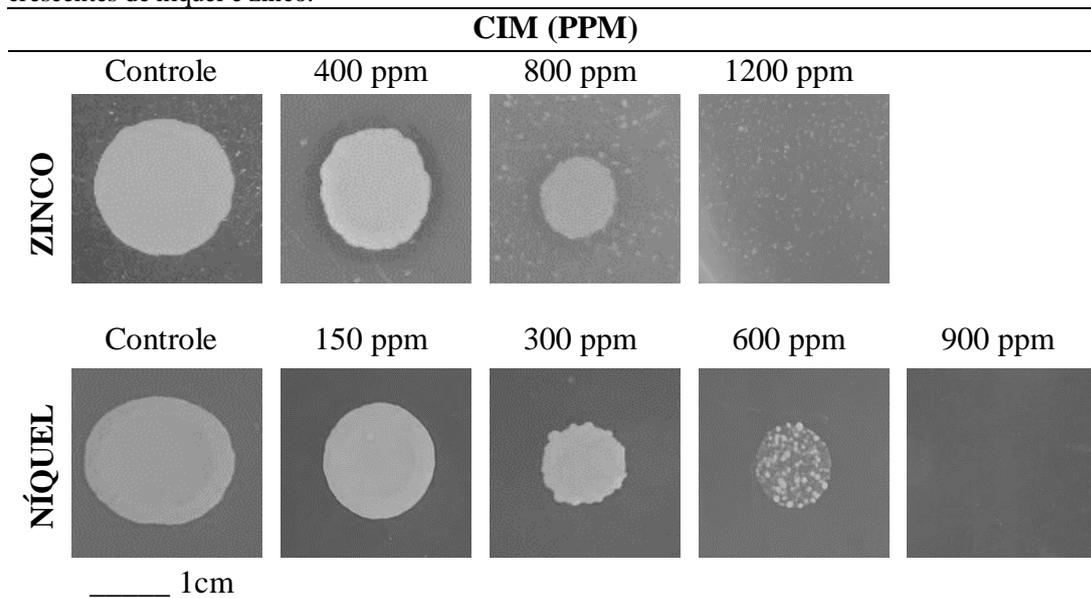
Hussein, Garabulli e Alhadad (2022) pontou os efeitos do níquel em diferentes concentrações no crescimento e divisão celular de células de leveduras comercial *S. cerevisiae*. Segundo os autores, em tratamento com 100 ppm e 200 ppm, foram observadas diminuições no número de células. Quando comparados ao presente estudo, nota-se que a redução no número de células só ocorre em concentrações superiores a 300 ppm. Na concentração com 600 ppm, a formação de colônias só ocorreu após as 24 h.

A resistência ao metal, no entanto, não parece seguir um padrão para as mais diversas variedades de linhagens existentes. Mahalaksmi et al. (2010) apontaram uma forte resistência da espécie *S. cerevisiae* ao níquel, com uma CIM igual a 3500 ppm, enquanto Banerjee et al. (2022) obteve uma concentração mínima inibitória próximo a 5500 ppm. Essa alta resistência ao metal, encontrada por esses autores, e também no presente trabalho é o primeiro passo para tornar a *Saccharomyces cerevisiae* um material com forte potencial para biossorção.

Ao final do quinto dia de avaliação, pode-se observar pela Figura 07, mudanças morfológicas nas colônias.

Observando a Figura 07, é possível acompanhar as respostas as diferentes concentrações dos metais testados. Além das variações no tamanho das colônias, resultante da sensibilidade ao aumento nas concentrações dos metais, os tratamentos tidos como controles e o tratamento com 150 ppm de Zn, apresentam uma forma circular regular, com bordas inteiras bem delimitadas. Já para as colônias submetidas a maiores concentrações dos metais, nota-se a formação de bordas mais irregulares, lobuladas, em concentrações superiores a 300 ppm para o níquel e 400 ppm para o zinco. A concentração de 600 ppm de níquel apresentou forma puntiforme. A textura, por sua vez, cremosa e de superfície brilhante foi observado em todas as colônias para ambos os metais. Já a elevação apresentou diferença entre os metais, sendo o zinco convexa e o níquel papilada.

Figura 07- Morfologia das colônias de *S. cerevisiae* Kveik crescida por 5 dias em meio YEPD com concentrações crescentes de níquel e zinco.



Fonte: Própria, 2023.

A pigmentação das colônias não apresentou distinção, visualmente, entre os tratamentos, com uma coloração mais próxima ao creme, com exceção da concentração de 600 ppm para o níquel, onde foram formadas pequenas colônias mais esbranquiçadas. Belluco (2008) demonstrou que colônias de *Meyerozyma sp.* crescidas em meio de cultura com cobre (5 e 10 mmol/L) apresentavam mudanças na coloração, de bege leitoso para acizentadas, além de bordas mais irregulares.

5.3 CRESCIMENTO DA *S. cerevisiae* Kveik EM MEIO LÍQUIDO SUPLEMENTADO COM NÍQUEL E ZINCO

Para o ensaio de resistência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik aos metais níquel e zinco, foram tomadas condições de processo considerando a combinação dos fatores: melhores condições de desenvolvimento para um organismo vivo e valores encontrados na literatura para efluentes composto por zinco e níquel. Para tal, utilizou-se o pH = 6,0 e temperatura de 30 °C (ÖZER e ÖZER, 2003; MAPOLO e TORTO, 2004; FOROUGH et al., 2022).

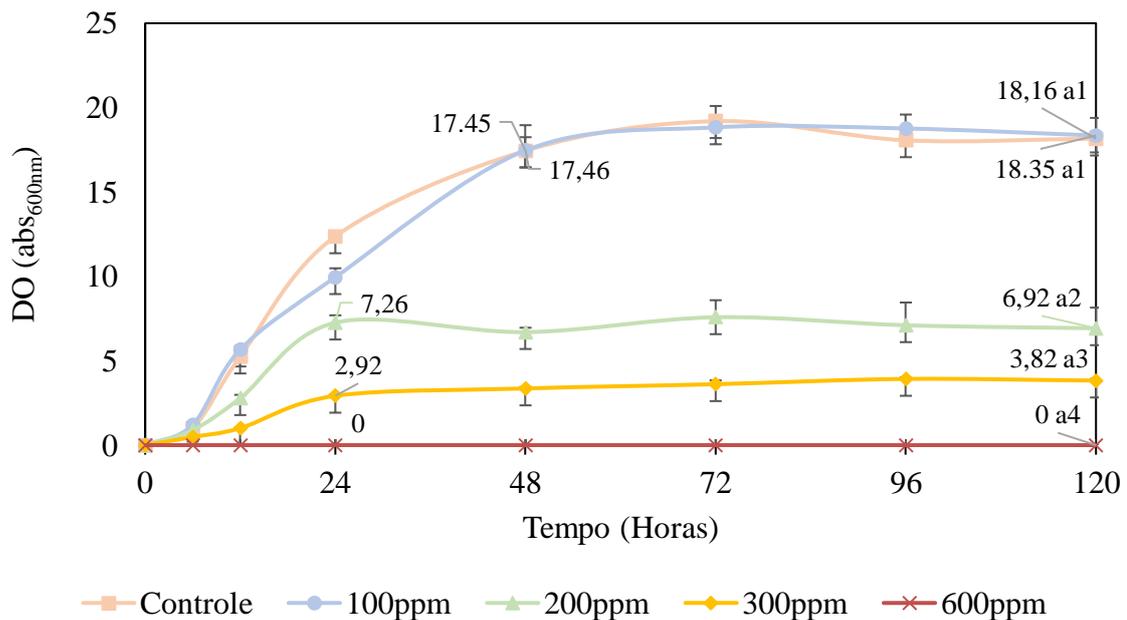
5.3.1 NÍQUEL

O crescimento da levedura Kveik em meio líquido, quando comparado ao crescimento em meio sólido, se distingue no que diz respeito a concentração de inibição. A concentração de 600 ppm, que nos ensaios em meio sólido registraram um baixo crescimento, foi capaz de

inibir o crescimento do microrganismo quando em meio líquido, registrando valores próximos a 0 DO_(600abs).

As curvas de crescimento da *S. cerevisiae* Kveik estão representadas na Figura 08. As letras seguidas das médias indicam, segundo o teste de tukey ($p < 0,05\%$), que os tratamentos controle e 100 ppm, não diferiram entre si ao final do crescimento. Já os tratamentos com 200, 300 e 600 ppm, diferiram entre si e dos tratamentos controle e 100 ppm.

Figura 08- Crescimento da *S. cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido com diferentes concentrações de níquel, incubada a 30 °C por 144 h sob agitação constante (175 rpm).



Fonte: Própria, 2023.

Pela Figura 08, pode-se observar que as concentrações controle e 100 ppm, apresentaram comportamento similar da curva, com uma fase lag de 6 h, seguida de uma fase exponencial compreendida das 6 às 48 h. Após esse tempo, as leveduras entraram em estado estacionário até o final do experimento (120 h), onde as médias de crescimento foram 18,16 e 18,35 DO_(600abs), respectivamente.

Já os tratamentos contendo 200 e 300 ppm apresentaram diferenças significativas entre si e também quando comparados aos tratamentos controle e 100 ppm. O meio suplementado com 200 ppm, apresentou uma fase lag de aproximadamente 9 h e crescimento até as 24 h, enquanto o meio contendo 300 ppm de níquel, apresentou a maior fase de adaptação (12 h), e uma fase de crescimento exponencial encurtada, sendo compreendida entre 12 e 24 h. A redução no crescimento da levedura, quando comparados ao tratamento controle, foram de 62 e 79%, para 200 e 300 ppm, respectivamente.

Hussein, Fauzia e Aml (2022), demonstraram resultados diferentes de crescimento ao estudar o efeito do sulfato de níquel na divisão celular de leveduras *S. cerevisiae*. Segundo os autores, em concentrações de 100 e 200 ppm, os valores obtidos de densidade óptica foram de aproximadamente 7 e 3 DO_(600abs) em 48 horas de crescimento. Esses valores observados, são bem inferiores aos encontrados para a cepa Kveik utilizada nesse estudo, onde em 48 h apresentaram crescimento de 17,47 e 6,7 DO_(600abs), para os meios com 100 e 200 ppm, respectivamente.

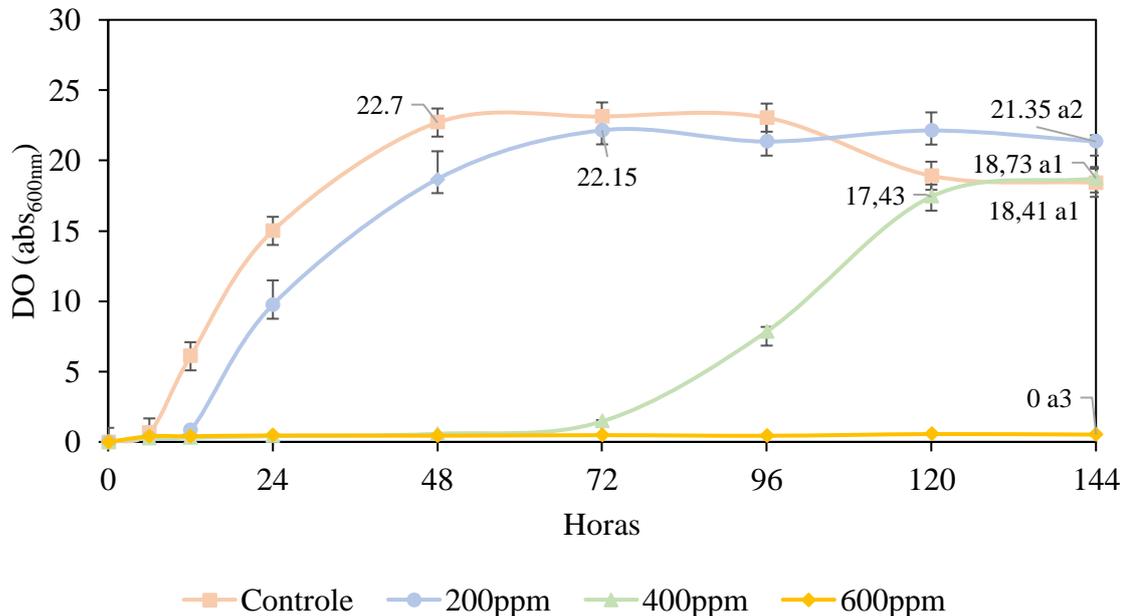
O tratamento contendo 600 ppm de níquel em solução foi tido como inibitório, não registrando nenhum crescimento.

5.3.2 ZINCO

Foi observado que nas concentrações testadas (0, 200, 400, 600 ppm), a *S. cerevisiae* Kveik apresentou crescimento apenas em 200 e 400 ppm de zinco, sendo esse último, metade do valor encontrado no crescimento em meio sólido (800 ppm). Adams et al. (2015) pontua o aumento da disponibilidade dos íons para interação, quando em fase líquida, já que, quando crescidos em meio sólido, os contaminantes tendem a estar mais fortemente sorvidos a outros compostos, o que impede a interação com o microrganismo. A toxicidade dos metal, de maneira geral, depende de uma combinação de fatores, entre os quais, a sua solubilidade e biodisponibilidade. Entendida como a porção elementar disponível, a biodisponibilidade, está relacionada com a especiação do metal e com a quantidade de íons livres capazes de serem assimilados por um organismo (SCHUBAUER-BERIGAN et al., 1993).

As curvas de crescimento da *S. cerevisiae* Kveik estão representadas na Figura 09. É possível observar que o tratamento controle apresentou uma menor fase de latência (9 h), seguido de um período de crescimento exponencial, compreendido entre 9 e 48 h. Ao final das 144 h, o tratamento apresentou uma redução no crescimento celular com uma média de 18,73 DO_(600abs), similar a encontrada pelo meio suplementado com 400 ppm do metal com 18,41 DO_(600abs). As letras seguidas das médias indicam, segundo o teste de tukey ($p < 0,05\%$), que os tratamentos controle e 400 ppm de zinco não diferiram significativamente ao final do crescimento. Já os tratamentos com 200 e 600 ppm, diferiram entre si e dos tratamentos controle e 400 ppm.

Figura 09- Crescimento da *S. cerevisiae* Kveik em meio YEP líquido na presença de diferentes concentrações de zinco, incubada a 30 °C por 144 h sob agitação constante (175 rpm).



Fonte: Própria, 2023.

Para o tratamento com 200 ppm, nota-se que a fase de adaptação é superior a controle e inferior ao tratamento com 400 ppm, sendo identificada próxima a décima segunda hora. A fase de crescimento, por sua vez, foi superior ao tratamento controle, com aumento na quantidade de células sendo geradas até as 72 h. Ao final do experimento, nota-se que esse tratamento apresentou um maior crescimento com 21,35 $DO_{(600abs)}$, registrando um aumento de 15,96% quando comparado aquele isento de metal.

Dodic, Popov e Markov (2000) relataram que leveduras *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio Sabouraud suplementado com concentração de 220 mg/L de zinco, apresentaram um efeito positivo no crescimento das células, quando em pH tamponado em 6, aumentando o rendimento de biomassa. Ainda que nesse experimento o pH tenha sido ajustado apenas inicialmente, os crescimentos observados foram similares, com um maior rendimento de biomassa sendo gerada na concentração de 200 ppm.

O tratamento contendo 400 ppm de zinco apresentou a maior fase de latência da levedura, com início de crescimento após as 72 h. Esse longo período pode ser associado a adaptação ao estresse promovido pelo metal ao microrganismo. Sua fase exponencial de crescimento teve duração de 48 h, onde deu-se início a um estado estacionário. A concentração de 600 ppm foi tido como inibitório para o crescimento do microrganismo crescido em meio líquido, com valores inferiores a 1,0 $DO_{(600abs)}$.

O estudo da cinética da levedura em meio líquido contendo zinco nos permite observar que mesmo quando submetidas a concentrações crescentes do metal, a *Saccharomyces cerevisiae* Kveik, aumenta seu tempo de adaptação, mas resiste aos efeitos tóxicos do mesmo.

5.4 REMOÇÃO DE ÍONS NÍQUEL E ZINCO POR CÉLULAS VIVAS DE *S. cerevisiae* Kveik

O comportamento da absorção e a afinidade pela levedura *S. cerevisiae* Kveik aos metais níquel e zinco, são discutidos a seguir, separadamente.

5.4.1 NÍQUEL

Na Tabela 05 estão descritos os resultados de absorção do níquel utilizando 2 e 5g de levedura viva de *Saccharomyces cerevisiae* Kveik como bioadsorvente. Nota-se um resultado parecido ao encontrado para o zinco, onde em todas as concentrações de níquel testadas, foram observados acúmulos do metal na levedura. Os valores no entanto, foram inferiores a 2% de remoção para ambas as doses de adsorvente testadas (2 e 5g). As médias de remoção observadas, não diferiram estatisticamente entre as horas analisadas, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05\%$)

Tabela 05- Absorção de níquel por biomassa viva de *S. cerevisiae* (2 e 5g), adicionada em meio de cultura contendo diferentes concentrações do metal.

Conc. (ppm) / Biom. (g)	TEMPO							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
	Ci (ppm)	Cf (ppm)	R(%)	Cf (ppm)	R(%)	Cf (ppm)	R(%)	
100	2g	106,271±0,18	105,428±0,24	0,79 ^a	105,051±0,23	1,14 ^a	104,995±0,28	1,20 ^a
	5g	110,296±0,11	108,745±0,39	1,4 ^a	108,459±0,41	1,66 ^a	108,419±0,46	1,70 ^a
200	2g	201,430±0,32	200,708±0,37	0,35 ^a	200,701±0,22	0,36 ^a	200,674±0,18	0,37 ^a
	5g	201,588±0,61	200,962±0,54	0,31 ^a	200,347±0,53	0,61 ^a	200,194±0,53	0,69 ^a
300	2g	300,679±0,35	300,276±0,33	0,13 ^a	300,095±0,32	0,19 ^a	300,01±0,32	0,22 ^a
	5g	301,306±0,12	300,561±0,24	0,24 ^a	300,308±0,38	0,33 ^a	300,178±0,29	0,37 ^a

Fonte: Própria, 2023. Ci = Concentração inicial; Cf = Concentração final; R(%) = Taxa de remoção. Valores seguidos pelo desvio padrão referente a média de três repetições. Letras minúsculas iguais em uma mesma linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nota-se que, a maior remoção ocorreu no tratamento de 200 ppm, com remoções de 1,27 e 1,87 ppm, para os tratamentos com 2 e 5g. As primeiras 24 h de contato adsorvente-

adsorvato foram tidas como a de maior remoção com valores iguais a 0,84 e 1,55 ppm, valores estes, correspondendo a mais de 60% de toda bioacumulação. Perfil semelhante de remoção foram observados para as concentrações de 200 e 300 ppm, onde a dose do adsorvente promoveu uma melhoria na capacidade bioacumulativa.

Em contrapartida, o aumento na dose do adsorvato influenciou negativamente na taxa de remoção. Quando comparados as taxas de 100 e 300 ppm para ambos os tratamentos (2 e 5g), observa-se uma redução de 6 e 4 vezes na capacidade da levedura em bioacumular o metal. Uma possível justificativa a esse fato é explicada por Silva et al (2007b), que observaram uma menor viabilidade de células de *Saccharomyces cerevisiae*, a medida em que se aumentava o nível de níquel de 118 para 322 ppm.

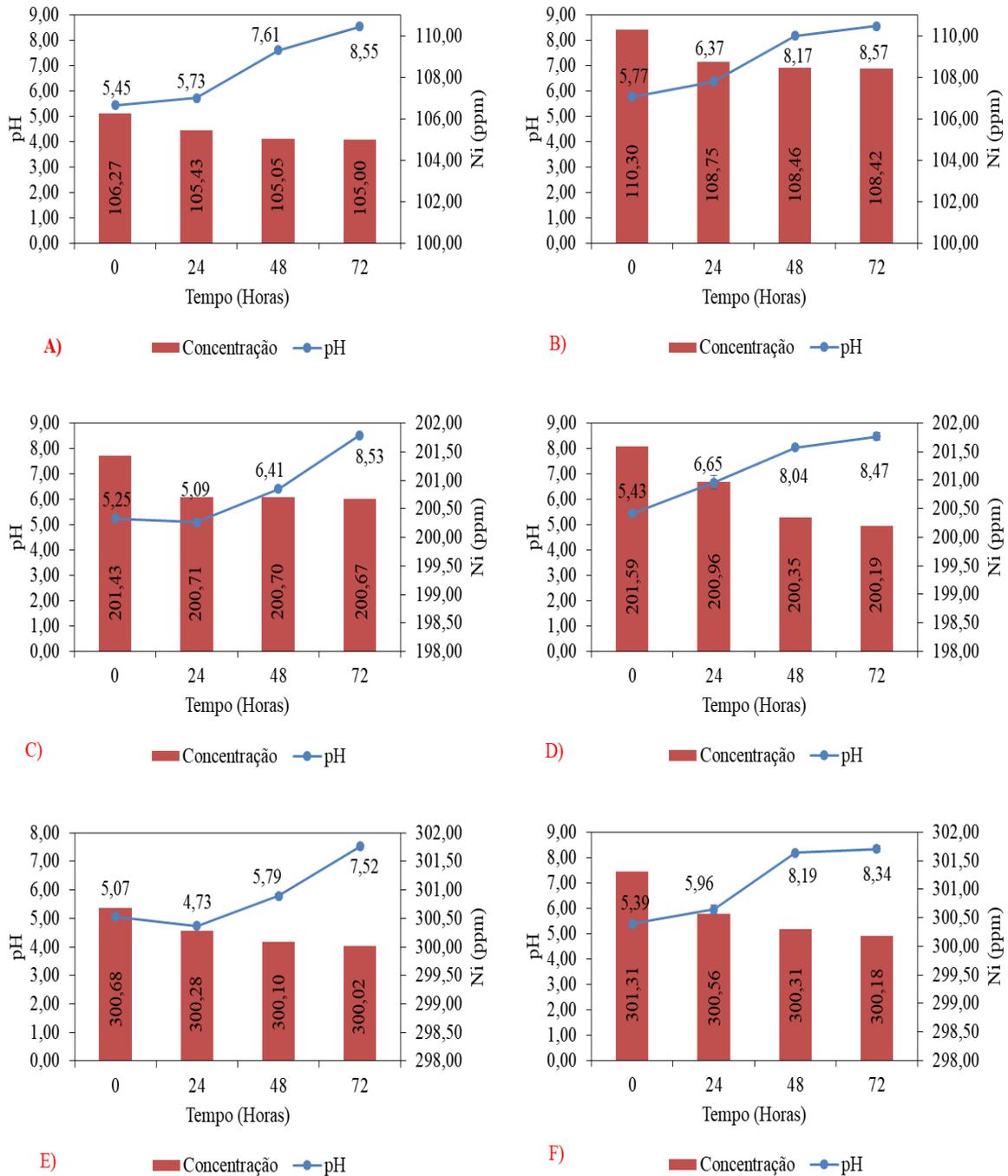
O resultado adsorptivo, embora baixo, demonstrado nesse estudo, foi superior ao encontrado por Stoll e Duncan (1996), onde 1g da levedura foi capaz de absorver 56 µg de Ni de um efluente de galvanoplastia, inicialmente contendo 15,6 mg/L, em pH variando, após 15 h de exposição.

Já Al-Saraj et al. (1999) demonstrou um potencial de absorção superior a desse estudo utilizando 1g de levedura viva de *S. cerevisiae*, onde a taxa de remoção em 24 h de exposição foi igual a 7,98 mg, quando em pH tamponado 6. Quando comparado os dados obtidos nesse estudo, nota-se que a absorção encontrada pelos autores foi superior em 6 e 4 vezes quando na utilização de 2 e 5g de levedura. O efeito do pH foi observado pelos autores como de maior influência na capacidade adsorptiva por células livres e, junto a toxicidade do metal ao microrganismo, pode ser uma das justificativas associadas ao baixo desempenho de remoção desse estudo.

Cabe ressaltar a influência do níquel no sistema de absorção de fontes de carbono presentes no meio, por células de *S. cerevisiae*. Segundo Borst-Pauwels (1981) o níquel é capaz de promover interferência no processo, reduzindo sua capacidade de absorção e conseqüentemente, utilização para fins metabólicos. A impossibilidade de absorção de açúcares disponíveis, influencia negativamente na capacidade adsorptiva do metal, já que, assim como exposto para o zinco, o processo de translocação de metal do meio extracelular para o meio intracelular ocorre por canais transmembrana que dependem de energia.

Outro fator que pode estar associado ao baixo desempenho é o pH do meio, que variou ao longo das 72h de experimento, demonstrando um comportamento de acidificação imediata após a introdução do metal, seguido de uma crescente alcalinidade. Os resultados monitorados são descritos nas Figuras 10 para as concentrações de 100, 200 e 300 ppm, respectivamente.

Figura 10- Valores de pH obtidos no processo de absorção com 100 ppm (A e B), 200 ppm (C e D) e 300 ppm (E e F) de níquel, empregando 2 e 5g de biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik, respectivamente.



Fonte: Própria, 2023.

Observa-se na Figura 10 que, o pH de ambos os tratamentos, 2 e 5g, apresentaram um comportamento similar ao registrar uma acidez inicial até as 24 h, sendo seguido por uma tendência a alcalinidade do meio até as 72h, sendo registrados, ao final do experimento, pH iguais a 8,55 e 8,57. Nota-se também que, enquanto ácido, a remoção dos íons de níquel pela levedura era favorecida, em contrapartida, após as 48 h quando o pH registrado era neutro ou alcalino, a concentração pouco variou.

Esse comportamento de pH, foi observado por Can e Jianlong (2008) e está associado a interação com o metal. Segundo os autores, quando em contato com zinco, as leveduras liberam íons Potássio e Sódio de forma contínua e crescente, metais alcalinos, que contribuem para o aumento do pH. Em seu estudo o pH inicial medido foi de 5,65 e após 24 já apresentava um pH neutro tendendo a alcalinidade. Além dos íons, matéria orgânica como proteínas contendo nitrogênio também são liberadas pela biomassa.

A indisponibilidade do metal para interação com o organismo pode ser tida como uma das possíveis causas para baixas remoções após as 24 h. Yoshito et al. (2004), observaram que em pH superior a 7,0 o níquel tende a se ligar a ânions OH^- , formando hidróxido de níquel. Ligação mais forte do que a promovida pelos sítios ativos, a formação de hidróxidos diminui a disponibilidade de íons em solução, afetando a eficiência do processo. A medida em que esse pH se torna ainda mais alcalino, a porcentagem de precipitação do metal no meio é acentuada. Além disso, como visto, matérias orgânicas liberadas pela biomassa viva podem competir com os íons, tornando-os indisponíveis para absorção.

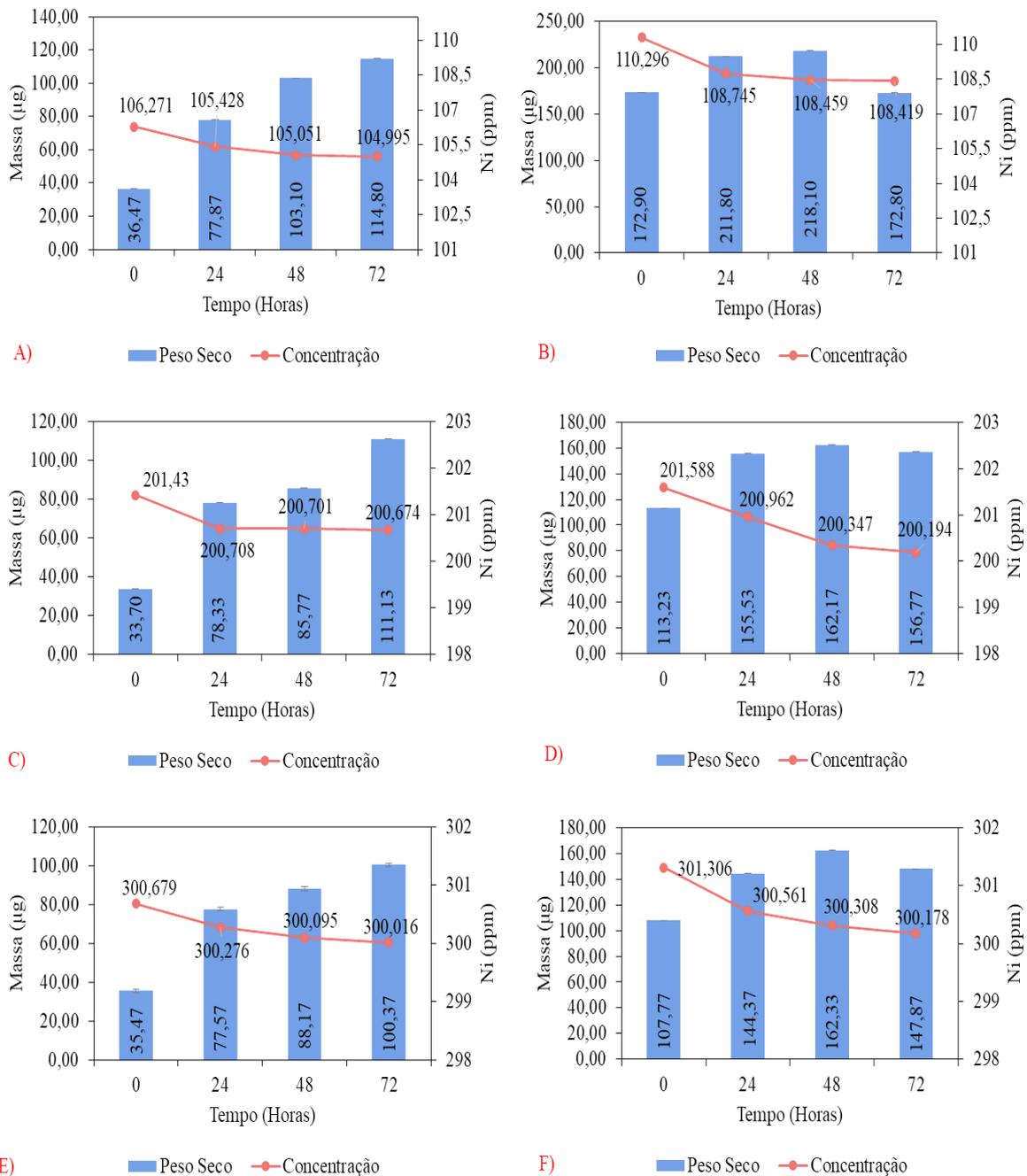
O comportamento do pH para a concentração de 200 ppm (Figura 10 - C) apresentou um comportamento distinto do observado na concentração de 100 ppm, pelo menos para o tratamento envolvendo 2g de levedura, onde o pH se manteve ácido até as 48 h e após esse tempo registrou um pH alcalino. Nota-se ainda que, a concentração de metal no meio apresentou pouca variação após as 24 h, ainda que em pH ácido, demonstrando quase nenhuma remoção do metal, com valores próximos. Para o tratamento com 5g (Figura 10 - D), no entanto, o meio se tornou alcalino em um menor tempo, logo após as 24 h, quando comparado ao tratamento com 2g. Observa-se ainda que variação na concentração entre os tempos de 48 e 72 h foi de 0,16 ppm. Silva et al. (2007b) pontuam a influência do pH na toxicidade do metal a leveduras do gênero *S. cerevisiae*, para valores de pH superior a 6,5, com uma menor toxicidade do metal ao microrganismo resultante de uma menor interação entre eles pela indisponibilidade do metal.

O comportamento do pH para a concentração de 300 ppm de níquel é observado nas Figura 10 (E e F). Nota-se para o tratamento empregando 2g de levedura, um comportamento semelhante ao observados na concentração de 200 ppm, onde o pH em 24 h registrou um menor valor (4,73), quando comparado ao pH inicial, apresentando uma tendência a neutralidade ao final das 72 h. A concentração variou pouco ao longo das horas, com as maiores remoções ocorrendo até as 48 h. Quando na utilização de 5g de biomassa de levedura viva, o comportamento foi similar aos demais tratamentos com o meio acidificado inicialmente e um pH alcalino após as 48 h. Quando associado o pH a concentração do meio, nota-se que quando em meio acidificado, a remoção era maior.

5.4.1.1 RENDIMENTO DA BIOMASSA SECA APÓS CONTATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NÍQUEL.

O efeito das diferentes concentrações de níquel (100, 200 e 300 ppm) sobre o rendimento de células de *S. cerevisiae* Kveik, bem como esses se relacionam com a eficiência na remoção do metal, são demonstrados na Figura 11.

Figura 11- Rendimento da biomassa de levedura *S. cerevisiae* Kveik, no processo de absorção de níquel, empregando 2g e 5g do bioadsorvente em meio suplementado com 100 ppm (A e B), com 200 ppm (C e D) e 300 ppm (E e F).



Fonte: Própria, 2023.

O comportamento da biomassa seca para os tratamentos com 2 e 5 g apresentaram padrões semelhantes ao encontrado para o zinco, onde a medida em que se aumentava a concentração do metal no meio menores rendimentos de biomassa eram obtidos. Além disso, enquanto o tratamento de menor concentração do adsorvente (2g), observou-se um rendimento crescente da biomassa, o tratamento com maior concentração (5g), notou-se um aumento no rendimento até as 48 h, sendo reduzida em 72 h. Diferenças significativas foram observados entre os tratamentos, tendo a concentração de 100 ppm a maior média e as concentrações de 200 e 300 ppm, não diferindo entre si estatisticamente, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05\%$) para os tratamentos com 2 e 5g.

Observa-se que, para o tratamento contendo 100 ppm de níquel e 2g de levedura viva, um maior rendimento de biomassa é observado em 24 h, onde o peso seco mais do que dobrou. Nos tempos subsequentes, a taxa de crescimento foi reduzindo para 33% em 48 h e 11% em 72 h. Já para o tratamento com 5g, os crescimentos foram de 22 e 3% para 24 e 48 h e uma redução de aproximadamente 20% para as 72 h.

Comportamento similar foi apresentado para a concentração de 200 e 300 ppm, em ambos os tratamentos (2 e 5g) para as horas iniciais do experimento onde o rendimento foi superior a 100%. Já as reduções no rendimento foram de 20 e 3%, para 200 e 300 ppm respectivamente.

5.4.2 ZINCO

Na Tabela 06 estão descritos os resultados de absorção de zinco utilizando 2 e 5g de levedura viva de *Saccharomyces cerevisiae* Kveik como bioadsorvente.

Em todos os níveis de contaminação foram observadas remoções do metal pelas células vivas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Kveik. Esses valores, no entanto, indicam uma baixa capacidade de remoção de zinco em solução, com valores inferiores a 1% em todas as concentrações testadas para 2g de levedura.

Apesar de apontar uma melhora na capacidade adsorptiva, decorrente da maior disponibilidade de células viáveis capazes de promoverem o transporte do meio extracelular para o meio intracelular, as porcentagens de acúmulo do metal para o tratamento com 5g de levedura, seguem sendo baixas.

Tabela 01- Absorção de zinco por biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik (2 e 5g), adicionada em meio de cultura contendo diferentes concentrações do metal.

Conc. (ppm) / Biom. (g)	TEMPO							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
	Ci (ppm)	Cf (ppm)	R(%)	Cf (ppm)	R(%)	Cf (ppm)	R(%)	
200	2g	204,94±0,01	203,79±0,02	0,55a	203,57±0,02	0,66a	203,24±0,01	0,83a
	5g	204,39±0,01	201,53±0,00	1,39a	200,77±0,00	1,76a	200,23±0,01	2,03a
300	2g	299,16±0,07	298,24±0,03	0,30a	297,97±0,01	0,39a	297,92±0,00	0,41a
	5g	300,84±0,00	298,20±0,01	0,87a	297,95±0,00	0,96a	297,21±0,00	1,20a
400	2g	396,07±0,05	395,70±0,05	0,09a	395,12±0,00	0,24a	394,93±0,00	0,28a
	5g	401,94±0,02	400,19±0,01	0,43a	399,45±0,01	0,61a	399,19±0,01	0,68a

Fonte: Própria, 2023. Ci = Concentração inicial; Cf = Concentração final; R(%) = Taxa de remoção. Valores seguidos pelo desvio padrão referente a média de três repetições. Letras minúsculas iguais em uma mesma linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados de absorção semelhantes são relatados por Bakkaloglu et al. (1998) onde 1g da cepa da levedura *S. cerevisiae* de origem inglesa, utilizada no estudo, foi capaz de remover 1,95 mg (5%) de zinco do meio, inicialmente com 40,8 mg/L de concentração, valor este, superior a maior taxa de remoção encontrada nesse estudo de 1,70 ppm (0,83%), no meio suplementado com 200 ppm.

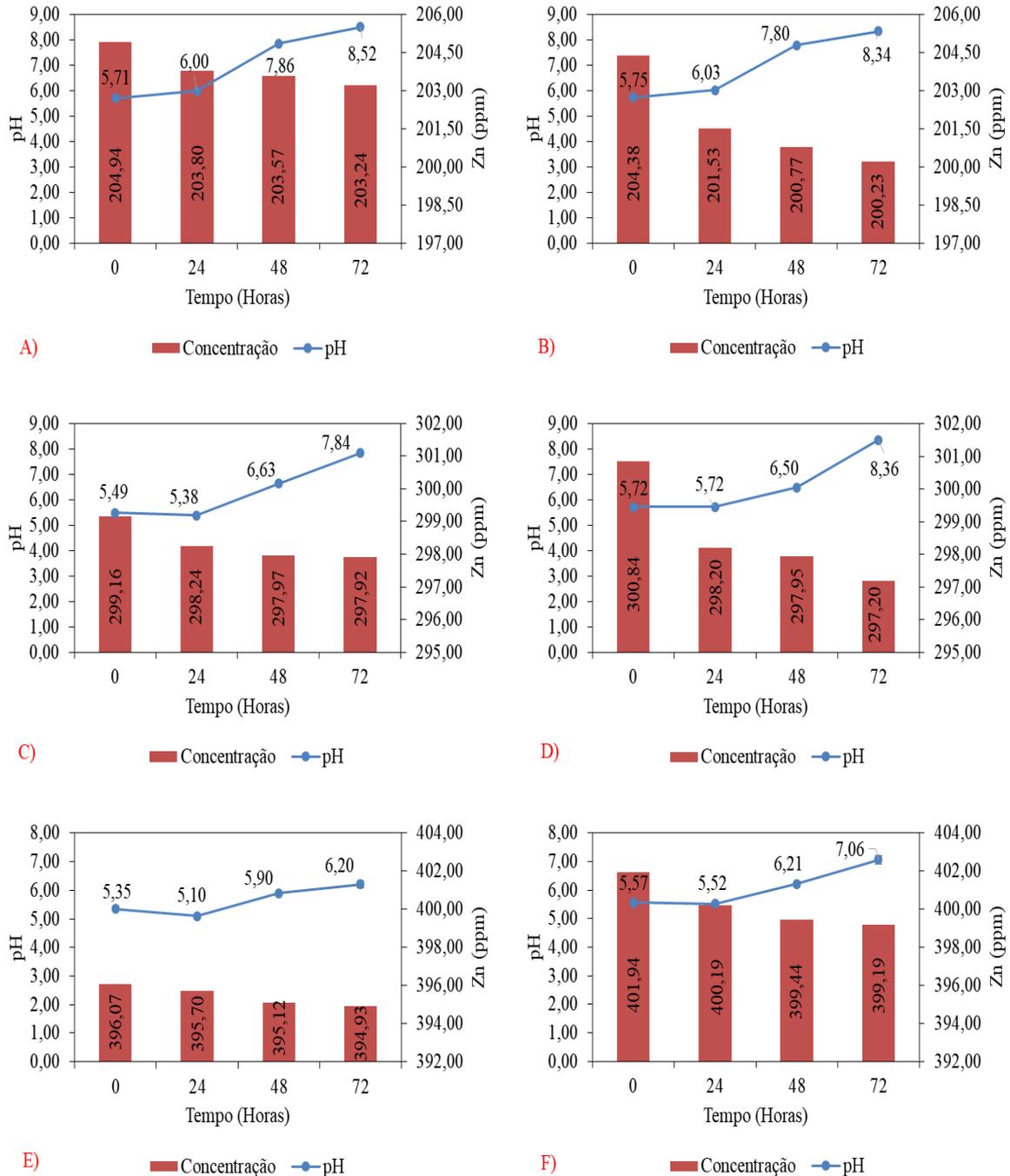
Nota-se ainda que, a maior parte do processo de acúmulo do metal, ocorre nas primeiras 24 h, com 1,15 ppm e 2,86 ppm, para os tratamentos com 200 ppm, 0,92 e 2,64 ppm, para os tratamentos com 300 ppm e 0,37 e 1,75 ppm para o tratamento com 400 ppm para 2 e 5g, respectivamente. Nota-se ainda que as taxas não diferiram significativamente ao longo das horas analisadas, para ambos os tratamentos, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para a concentração com 400 ppm, o comportamento também se mostrou similar ao observado na cinética de crescimento, onde a adaptação da levedura ao estresse do meio foi maior, o que justificaria uma absorção mais lenta e gradativa. Além disso, o pH do meio pareceu demonstrar influência nos resultados sortivos do zinco. A Figura 12 traz a evolução do pH ao longo das 72 h de experimento. Nota-se uma acidificação inicial em todas as concentrações (200, 300 e 400 ppm) e tratamentos (2 e 5g), sendo seguidas por uma forte tendência a alcalinidade.

Observa-se na Figura 12 (A e B) que, independentemente da concentração inicial do adsorvente utilizado no experimento de bioacumulação com 200 ppm de zinco, os valores de

pH se mantiveram abaixo ou próxima da faixa, inicialmente ajustada em 6, apenas nas primeiras 24 h, tornando-se mais alcalino nas horas subsequentes, até o final do experimento, onde foram registrados pH = 8,52 e 8,34, para os testes com 2g e 5g de biomassa, respectivamente.

Figura 12- Valores de pH obtidos no processo de absorção com 200 ppm (A e B), 300 ppm (C e D) e 400 ppm (E e F) de zinco, empregando 2 e 5g de biomassa viva de *S. cerevisiae* Kveik, respectivamente.



Fonte: Própria, 2023.

Esses dados, quando correlacionados com as concentrações absorvidas, nos permite identificar que a maior eficiência da levedura no processo sortivo é registrada exatamente nessa mesma faixa de tempo (0-24 h) com uma remoção de 1,14 ppm em 2g e 2,85 ppm em 5g.

Esses valores de pH observados se enquadram na faixa descrita por Massoud et al. (2020), como aquela com melhores resultados de sorção para o zinco, sendo esta compreendidos entre 5 e 5,8.

O comportamento do pH no tratamento contendo 300 ppm de zinco (Figura 12 – C e D) se assemelhou ao tratamento com 200 ppm, ao registrar valores de pH abaixo de 6 nas primeiras 24 horas, com pouca ou nenhuma variação nos valores. Quando em 48 h, o meio começou a apresentar uma tendência a alcalinidade, sendo registrados valores de pH ao final do experimento, com 7,84 e 8,36 para 2 e 5g.

A remoção do metal no intervalo de tempo compreendido entre 48 e 72 h, praticamente não diferiram para o tratamento com 2g de biomassa da levedura, o que não é observado no tratamento com 5g de levedura, onde a remoção foi de 0,75 ppm, aproximadamente 20% da concentração total do metal absorvido. Farhan e Khadom (2015) demonstraram que, ainda que se obtenha um decréscimo na remoção do metal à medida em que se torna mais alcalino o meio, os valores de remoção tendem a permanecer satisfatórios. Ainda que os dados obtidos no presente estudo indiquem um acréscimo na remoção, esses valores não diferiram significativamente.

Diferente dos resultados observados nos dois outros tratamentos, com 200 e 300 ppm, o tratamento contendo 400 ppm (Figura 12- E) se manteve dentro da faixa de pH ajustada até as 48 h, expressando ao final do experimento, um pH ainda ácido. Para o tratamento com 5g (Figura 12 – F), observou-se um comportamento distinto, onde o pH permaneceu ácido até 48 h, se tornando alcalino em 72 h.

Embora os testes com 400 ppm permanecessem dentro da faixa de pH sugerida pela literatura durante a maior parte do experimento, quando observado a concentração de zinco removida do meio pela levedura *S. cerevisiae* Kveik, nota-se que esse tratamento apresentou um menor desempenho, com 1,13 ppm (2g) e 2,75 ppm (5g). Esses resultados sugerem que no processo de acúmulo do metal zinco por leveduras Kveik, todas as variáveis devem ser consideradas, sendo a concentração inicial do metal, um fator limitante ao processo de absorção. Além disso o pH pode ter afetado a química do metal em solução, causando complexação e precipitação. Ressalta-se ainda a capacidade de íons, antes associados, de se dissociarem dos sítios de ligação da biomassa para se ligarem a íons OH⁻ (ZINICOVSCAIA et al., 2020a).

Além da adaptação ao meio e do pH, Sun e Wang (2022) defendem duas outras possibilidades associadas a baixa capacidade absorptiva: a ocorrência de efluxos e a desaceleração da captação de íons devido a diminuição da capacidade de ligação do metal aos transportadores de membrana. Esses autores, demonstraram ainda que leveduras do gênero *Saccharomyces* quando submetidas a altas concentrações de zinco extracelular ($>5\text{mmol/L}$), descarregavam o Zn internalizado para o meio extracelular em um período de 4h, como forma de mecanismos de defesa. Naik et al. (2022) reforçam a possibilidade de efluxo por *S. cerevisiae*, como uma forma das células prevenirem a supersaturação do elemento e consequente toxicidade.

Li et al. (2013) aborda ainda, uma outra justificativa, associada a presença de cátions no processo de absorção. Segundo os autores, em condições de estresse tóxicas aos microrganismos, o rompimento da membrana celular permite a liberação de íons K^+ e Mg^{2+} ao meio, que por sua vez, passariam a inibir a absorção do zinco em outras leveduras ainda integras, já que disputariam pelo mesmo sítio ativo de ligação.

A eficiência de *S. cerevisiae* pode ainda ser comparada com a de outros microrganismos biosorventes. Marcante et al. (2014) demonstraram que micélios de *Agaricus subrufescens* não foram capazes de absorver o metal em concentrações superiores a 10 ppm, causando inclusive sua morte. Pereira et al. (2011) relataram a remoção de 3,585 e 3,315 mg de zinco para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*, respectivamente, após 120 h de contato, valores esses inferiores aos encontrados nesse estudo para o tratamento com 5g do bioadsorvente, obtendo remoção de 4,158 ppm ($\approx 4,158$ mg). Além disso, a cepa Kveik demonstrou uma resistência 40 vezes maior quando comparada ao fungo *A. subrufescens*.

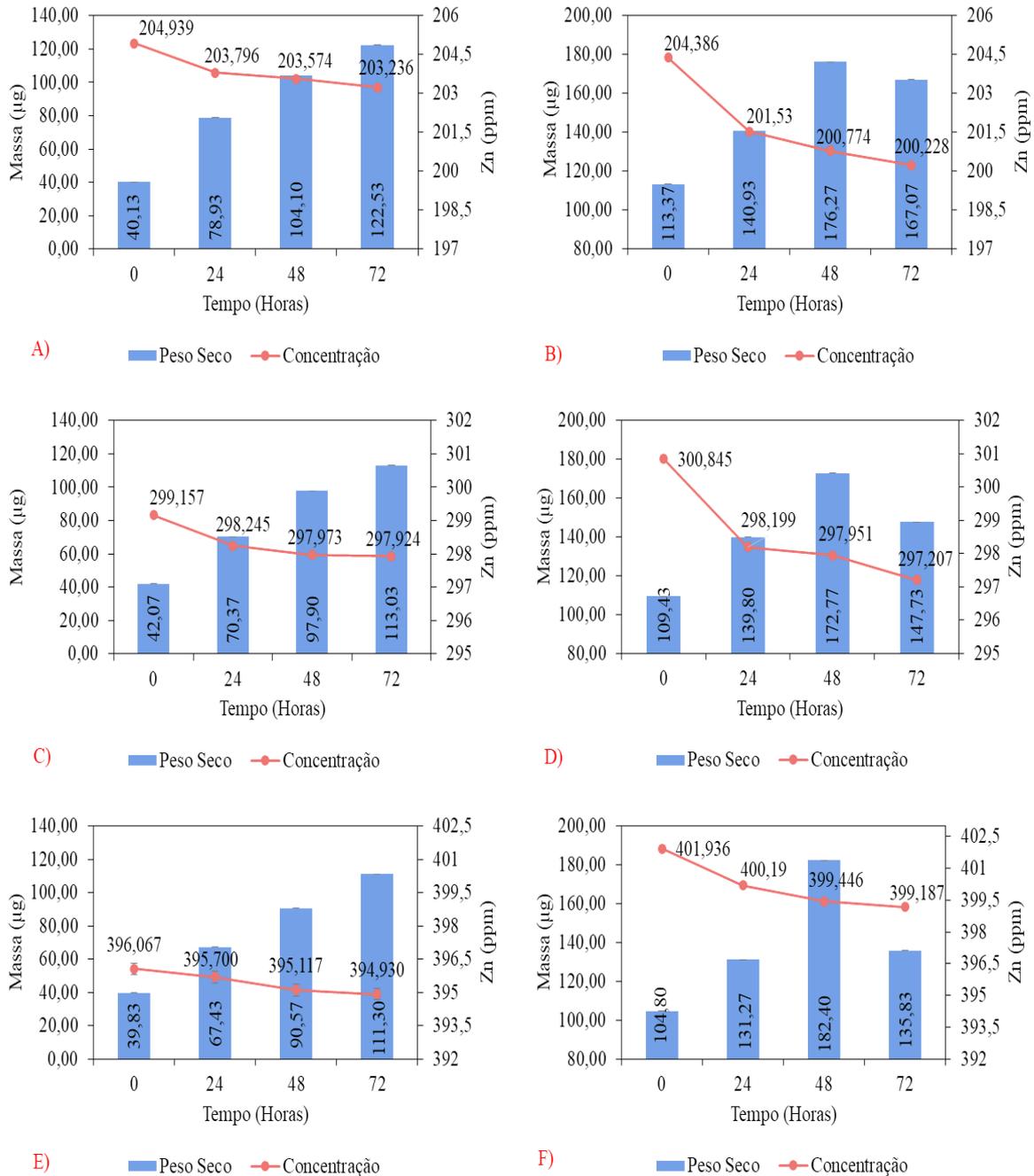
A utilização de células livres vivas da cepa Kveik nos permite observar que, ainda que exista uma forte resistência das leveduras a altas concentrações de zinco, os processos que envolvem metabolismo ativo, ainda são limitados por condições intrínsecas do organismo.

Nota-se que processos de remoção com células vivas é essencial considerar, além da espécie com capacidade de resistência a altas concentrações de poluentes, microrganismos que possuam mecanismos de defesa, que os protegem de efeitos negativos no interior de suas células. Mecanismos de ligação intracelular como proteínas (metalotioneínas e fitoquelatinas), são capazes de complexar os poluentes e evitar que esses participem de processos metabólicos. Fatores como as condições de processo, também podem atuar favorecendo ou impedindo que a acumulação de íons ocorra, entre elas: o pH, a disponibilidade de nutrientes e a concentração do poluente (AKSU e DONMEZ, 2005; CHOJNACKA, 2010).

5.5.2.1 RENDIMENTO DE BIOMASSA SECA APÓS CONTATO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZINCO.

O efeito das diferentes concentrações de zinco (200, 300 e 400 ppm) sobre o rendimento da células de *Saccharomyces cerevisiae* Kveik, bem como esses se relacionam com a eficiência de remoção do metal, são demonstrados na Figura 13.

Figura 13- Rendimento da biomassa seca de levedura *S. cerevisiae* Kveik, no processo de absorção de zinco, empregando 2g e 5g do bioadsorvente em meio suplementado com 200 ppm (A e B), com 300 ppm (C e D) e 400 ppm (E e F).



Fonte: Própria, 2023.

Em ensaios de biossorção dependentes do metabolismo, fatores como viabilidade celular e capacidade de reprodução, são de extrema relevância, já que a eficiência de absorção é influenciada pela capacidade não só de tolerar ao estresse, mas de acumular e sobreviver as altas concentrações (VOLESKY, 1990). Nos tratamentos submetidos ao estresse, em ambos os experimentos (2 e 5g), apresentaram um padrão de crescimento inversamente proporcional a concentração do metal no meio, onde a medida em que se aumentava a concentração, reduzia-se o rendimento de biomassa (Figura 13). Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos, tendo a concentração de 200 ppm, apresentando maior média de rendimento.

Além disso, nota-se um crescimento progressivo, em todas as concentrações, para o tratamento contendo 2 g da levedura, conforme se passavam as horas, tendo o rendimento da hora posterior sempre maior, do que a da hora anterior. Esse perfil, no entanto, não é observado para o tratamento contendo 5 g da levedura, onde os rendimentos médios das 72 h, foram inferiores aos das 48 h, para todas as concentrações de metal. Uma possível justificativa está no esgotamento de nutrientes e excesso de metabólitos secretados, que na prática, conduzem as células a um estado estacionário de crescimento.

Observa-se ainda que, para a concentração de 200 ppm, nas primeiras 24 h, a biomassa quase dobrou de valor. Ao passo com que se aumentava o tempo de contato da levedura com o meio suplementado com zinco, os valores de crescimento reduziam para 33 e 18% para 48 e 72 h, respectivamente (Figura 13 – A). Já para o tratamento com 5 g de levedura, observa-se um aumento de, aproximadamente, 24 e 25% para 24 h e 48 h e uma redução de 5,3% para 72 h. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos para a absorção do zinco pela levedura, onde o primeiro intervalo de tempo, compreendido entre 0 e 24 h, foi o que apresentou maior taxa de remoção no experimento. Além disso, nos permite afirmar que a redução na geração de novas células, somadas à saturação das células adultas presentes no meio, impossibilitam o acúmulo de maiores concentrações do metal.

As médias de rendimento da biomassa encontradas no tratamento com 300 ppm (Figuras 13 – C e D), apresentou comportamento similar ao encontrado no tratamento com 200 ppm, onde um maior rendimento de biomassa é registrado nas primeiras 24 horas, fase na qual também se tem também uma maior remoção do zinco. O maior rendimento da biomassa foi observado ao final das 72 h com 113,03 µg/mL para o tratamento com 2g e as 48 h para o tratamento com 5g com 172,77 µg/mL. Além disso, nos tempos de 48 e 72 h, o comportamento de absorção parece entrar em equilíbrio, registrando valores que não diferem entre si estatisticamente.

Observa-se pela Figura 13 (E) que a levedura apresentou crescimento até o final do experimento (72 h) quando em concentração de 400 ppm de zinco. Nota-se também, um menor crescimento até as 24 h, quando comparado aos tratamentos com 200 e 300 ppm. O rendimento médio final de crescimento, após as 72 h, foi de 111,30 $\mu\text{g/mL}$ e 135,83 $\mu\text{g/mL}$ de biomassa seca, para 2 e 5g, respectivamente.

Ainda que o peso seco indique crescimento da levedura no meio, a viabilidade das células não foram avaliadas, podendo conter nesses valores, células mortas. Essa diminuição do rendimento da biomassa, quando comparado os valores dos tratamentos, pode ser explicado pela toxicidade inevitável do zinco. Tal fato, justificaria portanto, os menores valores de absorção observados nos tratamentos com maiores concentrações de metal.

Os resultados de peso seco observados neste estudo estão de acordo com o trabalho de Azad, Shariatmandari e Torshizi (2014), onde os autores, ao submeterem leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a concentrações crescentes de metal (5, 10, 15, 30 e 60 mg.L^{-1}), registrarem menores rendimentos de biomassa à medida em que se aumentava a concentração do metal.

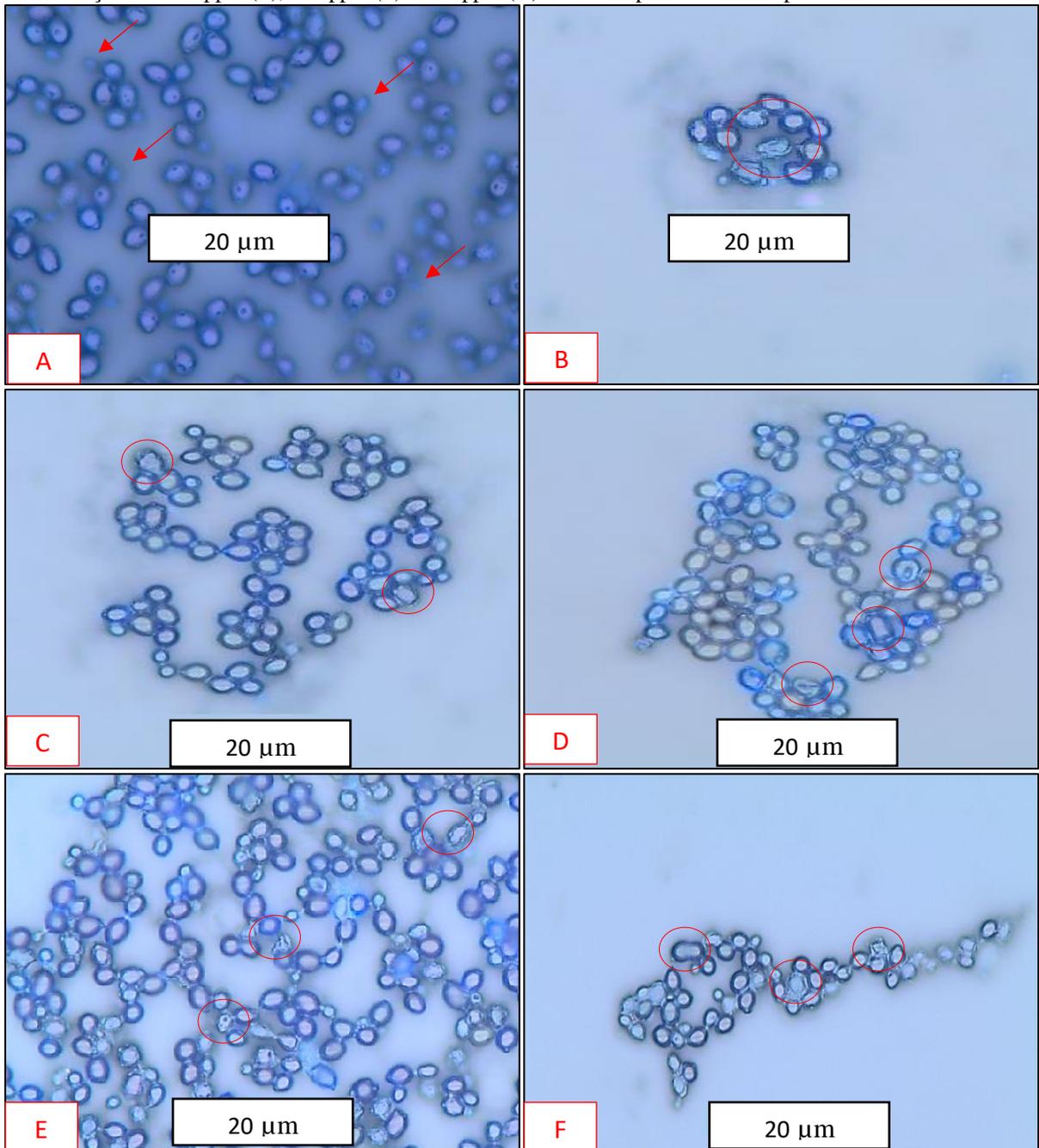
Esses resultados reforçam o fato de que, ainda que as leveduras sigam crescendo em meios suplementados com altas concentrações de zinco, essas não possuem boa capacidade para absorvê-los, demonstrando assim, apenas uma forte resistência/resiliência.

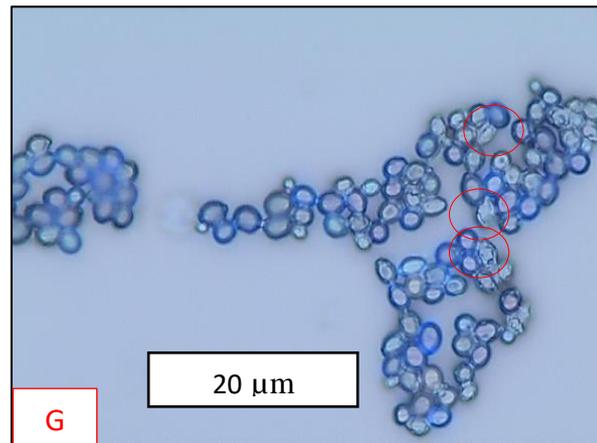
5.4.3 MICROSCOPIA DAS CÉLULAS

Células de leveduras quando submetidas a condições de estresse, tendem a apresentar mudanças em sua morfologia, que vão desde perda de sua conformação, redução ou aumento de tamanho, além de influenciar em seus processos metabólicos e reprodutivos (KURTZMAN et al. 2011).

Para avaliar possíveis mudanças morfológicas nas células estressadas com 200, 300 e 400 ppm de zinco, durante os estudos cinéticos, foram realizadas análises de microscopia ótica e comparadas com células crescidas em condições normais, sem estresse (Figura 14).

Figura 14- Morfologia de células de *S. cerevisiae* Kveik crescida em meio YED, por 72 h, na ausência de metal (A), suplementado com zinco nas concentrações de 200 ppm (B), 300 ppm (C) e 400 ppm (D) e níquel nas concentrações de 100 ppm (E), 200 ppm (F) e 300 ppm (G). Microscopia ótica de campo claro. Aumento de 1000x.





Fonte: Própria, 2023.

Observando a Figura 14 (A), é possível notar uma conformação mais ovalada típica da espécie *S. cerevisiae*. A presença de brotamentos (indicado pelas setas vermelhas), nas superfícies de quase todas as células adultas é um importante indício de viabilidade das células. Principal processo reprodutivo, o brotamento dá origem a novas células que mantêm o ciclo reprodutivo, desde que em condições nutricionais e ambientais adequadas (FERREIRA, 2005).

A utilização de células viáveis nos processos de remediação com metabolismo ativo (absorção), é de extrema importância, já que quanto maior a capacidade de reprodução, maiores oportunidades para que novos processos possam ocorrer.

Tipicamente identificadas por seu formato cilíndrico ou ovalado, as leveduras submetidas às concentrações crescentes de zinco e níquel, perderam em parte essa característica associada à sua forma. Quando submetida a estresse, danos podem ser identificados na parede celular do organismo, como a presença de estruturas mais rugosas e sem forma definida (Figura 14 – B, C, E e G) e de formatos mais alongados (Figura 14 – D e F). Can e Jianlong (2008) observaram fenômeno parecido quando expôs células de levedura *S. cerevisiae* ao zinco, onde as células observadas perderam sua conformação.

Machado et al. (2009), ao realizarem microscopia de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a 100 mg de zinco e níquel, não foram capazes de distinguir células vivas de células mortas. Em contrapartida, possíveis marcas de cicatrizes associadas ao brotamento eram bem visíveis nas células.

5.5 ENSAIOS DE REMOÇÃO COM CÉLULAS MORTAS

A absorção de metais por microrganismos como leveduras e bactérias, é descrita por um sistema bifásico, onde a primeira etapa é a retenção dos íons metálicos à superfície da célula,

mas especificamente, nas paredes celulares em leveduras. O processo é baseado em propriedades físico-químicas e não biológicas, já que são independentes do metabolismo. Em geral, os íons metálicos são atraídos a superfície da parede celular, de forma rápida e reversível (PALMIERI et al., 2002).

A utilização de biossorventes, tais como leveduras cervejeiras, são defendidas por autores como Savastru et al. (2022), que ao analisarem as características estruturais da *S. cerevisiae*, observaram que todos os grupos funcionais presentes na superfície da célula, podem ser considerados sítios de ligação. Por possuírem uma área superficial, relativamente grande, e uma superfície rugosa com seus sítios distribuídos uniformemente, o acesso dos íons aos sítios são favorecidos, aumentando o potencial de remoção.

O uso da *S. cerevisiae* Kveik como bioadsorvente foi analisado para as diferentes concentrações de níquel (100, 200 e 300 ppm) e zinco (200, 300 e 400 ppm). Os resultados são descritos separadamente a seguir.

5.5.1 NIQUEL

Assim como observado para o zinco, em todas as concentrações testadas para o níquel, foram registradas remoções do metal da solução. A maior parte dos íons de níquel presentes no meio se ligam aos sítios ativos da biomassa nos primeiros 30 minutos de contato, independente da concentração analisada (100, 200 e 300 ppm). O equilíbrio por sua vez foi observado após 60 minutos para todas as concentrações, onde a taxa de remoção não variou significativamente até os 360 min ($p < 0,05\%$). O tratamento contendo 5g de levedura apresentou comportamento similar.

O efeito do tempo de contato rápido também foi observado por Ibrahim et al (2021), onde os autores obtiveram maiores remoções de níquel em tempos inferiores a 25 min e baixa variação na taxa de adsorção até 180 min. Já Guler e Sarioglu (2013), observaram que leveduras pré-tratadas por autoclavagem, possuíam capacidade de remoção até os 60 min, entrando após em equilíbrio. Pequenas variações nas taxas de adsorção foram associadas a difusões intrapartículas, um segundo estágio da adsorção. De maneira geral, para a maioria dos íons metálicos, o equilíbrio de adsorção é alcançado até os 60 min. (ZINICOVSCAIA et al., 2022).

O efeito da concentração inicial do adsorvente e do adsorvato são descritos na Tabela 07.

Nota-se que, a medida em que se aumenta a concentração de níquel no meio, tem-se uma redução na taxa de remoção de 8,33 e 9,8% para as concentrações de 200 e 300 ppm,

quando comparado a concentração de 100 ppm, utilizando 2g de biomassa e 12,03 e 15,68% para o tratamento com maior quantidade de adsorvente (5g).

Tabela 07- Parâmetros da adsorção do níquel utilizando 2 e 5g de biomassa morta de *S. cerevisiae* Kveik como bioadsorvente após 360 min.

Biomassa (g)	Qtd inicial de metal (ppm)	Qtd de metal remanescente (ppm)	% de Remoção
2	109,846±0,153	88,303 ±0,044	19,612
	211,565±0,266	187,705±0,393	11,278
	286,813±0,240	260,773±0,173	9,812
5	99,396±1,106	74,094±0,167	25,455
	201,528±1,879	174,472±0,527	13,425
	339,595±0,820	306,403±0,179	9,774

Fonte: Própria, 2023.

A concentração inicial do adsorvente indicou uma melhoria na taxa de remoção de aproximadamente 6% quando na concentração inicial de 100 ppm de níquel. Para as demais concentrações foram observados que, um pequeno aumento na capacidade de adsorção quando em 200 ppm e nenhuma variação quando na maior concentração (300 ppm).

Guler e Sarioglu (2013) demonstraram em seu estudo de remoção de níquel de efluentes por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que, um aumento na dosagem do adsorvente de 1g para 10g, promovia um aumento na eficiência de até 15% na remoção quando em meio contendo concentração iguais as testadas no presente estudo (100, 200 e 300 ppm). Além disso quando aumentada a concentração inicial do poluente de 50 ppm para 300 ppm, era observada uma redução na eficiência de remoção, podendo chegar até 20%. Comportamentos semelhantes ao observado no presente estudo.

Em termos de capacidade de remoção por grama de adsorvente, nota-se que, para o tratamento contendo 2g de biomassa morta, as remoções foram de 10,77, 11,93 e 13,02 ppm/g de biomassa úmida. Já para o tratamento contendo 5g, as remoções obtidas foram de 5,06, 5,41 e 6,63 ppm/g de biomassa, indicando que, apesar de representar um aumento na capacidade sortiva, pela maior disponibilidade de sítios ativos, o aumento na concentração do adsorvente não implica em maior aproveitamento na capacidade de remoção. Os valores observados para o tratamento de 2g foram superiores ao encontrado por Zinicovskaia et al. (2022) que obtiveram remoção de 8,9 mg/g de Ni em efluentes reais de galvanoplastia.

Estudos onde a biomassa da levedura sofreu algum tipo de tratamento, seja ele químico ou físico, demonstraram capacidades de remoção superiores ao presente estudo. Guler e Ersan (2015) utilizando leveduras modificadas com nZVI (biossorventes magnéticos), observaram capacidade de remoção de 54,23 mg/g de níquel em solução aquosa. Banerjee et al. (2022), obtiveram remoção de 170,06 mg/g de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente para serem mais resistentes. Ibrahim et al. (2022) observaram remoção de 51 mg/g com leveduras mortas imobilizadas e Ramírez-Paredes et al. (2011), observaram remoção de 36,54 mg/g de níquel, empregando levedura cervejeira imobilizada.

5.5.2 ZINCO

Em todas as concentrações estudadas, foram observadas remoções de zinco pela biomassa da levedura morta. A maior remoção de íons da solução ocorreu nos primeiros 30 min de contato com a biomassa, independentemente da quantidade do adsorvente testado. Para a massa de 2g, foram removidos 29,04, 39,74 e 36,61 ppm, para as concentrações de 200, 300 e 400 ppm, respectivamente. Já para o tratamento contendo 5g de biomassa de levedura, as remoções foram de 53,90, 64,56 e 64,39 ppm. Após 2 h, todos os tratamentos entraram em um efeito platô quando na utilização da menor concentração de biomassa. Já para 5g, o equilíbrio foi alcançado logo após 1 h de contato adsorvente-adsorvato.

O efeito da concentração inicial do metal e da biomassa, podem ser observado na Tabela 08.

Tabela 08- Parâmetros da adsorção do zinco utilizando 2 e 5g de biomassa morta de *S. cerevisiae* Kveik como bioadsorvente após 360 min.

Biomassa (g)	Qtd inicial de metal (ppm)	Qtd de metal remanescente (ppm)	% de Remoção
2	215,900±0,003	172,316±0,013	20,18
	319,933±0,019	271,280±0,010	15,20
	426,400±0,007	374,826±0,005	10,84
5	214,800±0,022	150,131±0,007	30,10
	323,033±0,002	250,290±0,051	22,51
	419,733±0,007	339,783±0,009	19,04

Fonte: Própria, 2023.

O efeito do tempo de contato foi similar ao encontrado por Machado et al. (2009) ao estudar a remoção de zinco com 4g de leveduras *S. cerevisiae*, obtendo uma taxa de remoção de 44% de Zn em tempo inferior a 30 minutos e equilíbrio em 1 h, com uma concentração inicial

de 100 mg/L. Cabe ressaltar, no entanto, que embora as taxas de remoção se mantenham quase constantes após o equilíbrio, deposições de metal sobre a superfície da biomassa continuam ocorrendo de forma mais lenta e adicional, o que pode indicar ocorrência de mecanismos de ligação secundários (VOLESKY e HOLAN, 1995).

Nota-se que, a medida em que se tem o aumento na concentração de zinco no meio, tem-se uma redução na taxa de remoção, independentemente da dose de bioissorvente utilizado, sendo 4,98 e 9,34% para as concentrações de 300 e 400 ppm, quando comparado a concentração de 200 ppm, utilizando 2g de bioissorvente e 7,59 e 11,06% para a maior concentração do bioissorvente (5g).

O aumento na dose inicial do adsorvente, de 2 para 5g da biomassa morta da levedura, levou a uma melhoria significativa no rendimento de bioissorção, obtendo porcentagens de 20,18 e 30,10% de remoção no tratamento com 200 ppm, 15,20 e 22,51% para o tratamento com 300 ppm e 10,84 e 19,04 para o tratamento com 400 ppm, para 2 e 5g, respectivamente. Esse resultado pode ser considerado natural, uma vez que a introdução de uma maior quantidade de biomassa, implica em um aumento da quantidade de sítios de ligação disponíveis (GOH et al., 2019).

Em termos de capacidade de remoção por grama de adsorvente, nota-se que, para o tratamento contendo 2g de biomassa morta, a retenção foi de 21,5, 24,0 e 25,5 ppm por grama de biomassa úmida. Já para o tratamento com 5g de biomassa, os resultados obtidos foram 12,9, 14,5 e 15,9 ppm por grama de biomassa úmida.

Savastru et al. (2022) observaram uma capacidade de remoção de 37,45mg/g de biomassa seca em 60 min de tempo de contato, já Can e Jianlong (2010) obtiveram remoção de 8,99 mg/g de biomassa seca de levedura para o mesmo tempo.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observado que a cepa de levedura cervejeira *S. cerevisiae* Kveik possuía um perfil de resistência maior por metais como zinco e níquel, quando comparado a metais como cádmio, cobalto, chumbo e cobre.

Em ensaio de crescimento em meio sólido, a levedura testada foi capaz de resistir a concentrações de 800 e 600 ppm de zinco e níquel, respectivamente. No entanto, quando crescida em meio de cultura líquido, devido ao aumento da biodisponibilidade dos metais, os valores de resistência foram menores, sendo 400 e 300 ppm para zinco e níquel, respectivamente.

Mudanças na morfologia das colônias associadas ao formato, coloração e superfície, podem ser observadas quando a levedura é cultivada em meio de cultura ágar YEPD contendo diferentes concentrações de Zn e Ni.

Nos processos dependentes de metabolismo, foram observados uma baixa capacidade de absorção de íons de zinco e níquel em solução, com taxa de remoção inferiores a 2% para ambos os metais e concentrações de adsorventes testadas, sendo a maior parte da absorção, compreendida nas primeiras 24 h de experimento.

Nos processos independentes de metabolismo, foram observadas remoções superiores de metal quando comparados aos ensaios dependentes, com valores que variaram entre 43 a 51 ppm, empregando 2g de biomassa morta e 64 e 79 ppm com 5g de biomassa, para as concentrações de 200, 300 e 400 ppm do metal. Já para o níquel, as remoções foram de 21 a 26 ppm e 25 a 33 ppm, para 2 e 5g de biomassa morta, nas concentrações de 100, 200 e 300 ppm. A maior capacidade de remoção foi observada em tempo inferior a 30 min para ambos os tratamentos e um aumento na concentração do adsorvato implicou em redução nas taxas de remoção.

Quando comparados os métodos, a adsorção se mostrou mais eficiente na remoção de íons zinco e níquel em solução aquosa, com maior desempenho na remoção de zinco.

Diante do exposto, em pesquisas futuras de remoção de metais em soluções aquosas com *Saccharomyces cerevisiae* Kveik, podem ser verificados a influência na variação do pH inicial (tamponado), analisar diferentes concentrações iniciais do adsorvente, testar tratamentos químicos e físicos na biomassa visando melhorar as condições de remoção (lavagens ácidas, imobilização, liofilização e etc.), além da aplicação dos modelos cinéticos e isotérmicos para entendimento do comportamento de remoção.

7 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, J. R. et al. Zinco e ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo. **Natureza Online**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 2012.
- AL-SARAJ, M. et al. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol–gel entrapped microorganisms. **J Non Cryst Solids**, v. 248, p.137 - 140, 1999.
- ALIIMAM, S. S. et al. Comparative Study of Heavy Metal Bioremediation in soil by *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 47, p.1-7, 2016.
- ALMEIDA, A. A. F. et al. Tolerance and prospection of phytoremediator Woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, p. 83-98, 2007.
- ALVES, A. N. L.; ROSA, H. V. D. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 129-139, 2003.
- ALVES, J. et al. Absorção e distribuição de chumbo em plantas de vetiver, jureminha e algaroba. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, p. 1329-1336, 2008.
- ALVES, S. C. N. 2018. 98f. **Dinâmica do níquel em plantas de sorgo e em solo contaminado por diferentes fontes**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- AMBEV. Programa de formação técnica cervejeiros. Jacareí: AmBev, 2011. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **ABNT. NBR 10.004/2004**. Classificação de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004.
- APHA, **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. – SMEWW. American Public Health Association -AP–A, 21 ed., Washington, USA, 2005.
- ATKINS, P. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 7 ed. Porto Alegre ArtMed 2018.
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Zinco. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>. 2005
- ATSDR - Toxicological profile for lead. Agency for toxic substances disease registry (ATSDR) US Department of health and human services - Public health services 2007.
- AZAD, S. K.; SHARIATMANDARI, F.; TORCHIZI, M. A. K. Production of zinc-enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Elementology**, n. 19, v. 2, p. 313-326, 2014.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. 554p.
- BAG, H. et al. Determination of Cu, Zn and Cd in water by FAAS after preconcentration by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized on sepiolite. **Fresenius J Anal Chem**, v. 363, p. 224-230, 1999.
- BAKKALOGLU, I. et al. Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. **Water Sci Technol**, v. 38, n. 6, p. 269–277, 1998.

BAL, W.; KASPRZAK, K. S. Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. **Toxicol. Lett.**, v. 127, p. 55-62, 2002.

BANDINELLI, Paola Cunha. **Estudo de Caso de Melhoria no Processo de Mosturação de uma Cervejaria no RS**. 2015. TCC (Engenharia Química), UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

BANERJEE, J. et al. Development of Ni(II) resistant *S. cerevisiae* and its application: adsorption study and modeling. **Chemosphere**, v.309, n. 1, 2022.

BARCELOS, T. D. de J. 2008. 85f. **Cobre: vital ou prejudicial para a saúde humana?** Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

BHATNAGAR, S. KUMARI, R. Bioremediation: a sustainable tool for environmental management – a review. **Annual Review e Research in Biology**, v. 3, n. 4, p. 974-993, 2013.

BELLUCO, A. E. DE S. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótica**. 96 f. 2008. Tese (Doutorado - Programa de pós graduação em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2008.

BENI, A. A.; ESMAIELI, A. Biosorption, an efficient method for removing heavy metals from industrial effluents: a review. **Environmental Technology e Innovation**, v. 17, 2020.

BENVENUTI, T. et al. Tratamento de efluentes de eletrodeposição de níquel por fotoeletrooxidação. **Metalurgia e Materiais: Rer. Esc. Minas**, v. 65, n. 3, p. 349-356, 2012.

BELTRÃO, F. 2019. 56f. **Remoção de metais pesados de efluentes de galvanoplastia por meio de precipitação e membranas líquidas emulsionadas**. TCC (Graduação em Engenharia Química) –Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná.

BILLERBECK, T. N. 124 f. 2013. **Remoção de metais de efluentes de laboratórios de análise de solo por meio da biossorção com resíduos de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente Urbano e Industrial, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. Tese (Mestrado) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Ion transport In yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 650, n. 2-3, p. 88-127, 1981.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2010.-In Resoluções: 2010.

BRASIL, Resolução CONAMA nº430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da cerveja: 2021**. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA/das, 2022. 36 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Portaria nº 691, de 22 de novembro de 1996**.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and Practice**. Flórida: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Limited, 2004. 863p.

BRIN, M. Tranktolase: clinical aspects. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., ed. **Method in enzymology**. New York, AcademicPress, 1966. v.9, p.506- 14.

CAMARASA, C. et al. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

CAN, C.; JIANLON, W. Investigation the interaction mechanism between zinc and *Saccharomyces cerevisiae* using combined SEM-EDX and XAFS. **Environmental Biotechnology**, v. 79, p. 293-299, 2008.

CARVALHO, J. M. et al. Utilização do bagaço de malte como alimentação animal: uma alternativa para o pequeno produtor. **Cadernos UniFOA**, v. 16, n. 46, p. 1-7, 2021.

CERVBRASI. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2016**. São Paulo, SP: CervBrasil, 2016.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Mercado Cervejeiro**. São Paulo, SP: CervBrasil, 2018.

CESTESB – **Ficha de Informação Toxicológica: Cobre**. Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental, 2012.

CHEN, S. et al. Study on the adsorption of dyestuffs with different properties by sludge rice husk biochar: adsorption capacity, isotherm, kinetic, thermodynamics and mechanism. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 285, p.62-74, 2019.

CHOJNACKA K. **Biosorption and bioaccumulation in practice**, Nova Science Publishers Inc., New York, 2009.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. **Environment International**, v. 36, p. 299-307, 2010.

ÇOLAK, F.; ATAR, N.; OLGUN, A. Biosorption of acidic dyes from aqueous solution by *Paenibacillus macerans*: Kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, n. 1, p. 122-130, 2009.

CORDEIRO, A. C. R. G. **Dealing with copper toxicity: new insights into copper detoxification in yeast**. 63 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências, Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Portugal.

CRUZ, F. B. F.; SOARES, H. F. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e Ciência: Ciências biológicas, agrárias e da saúde**, v. 15, n. 1, p. 207-222, 2011.

DELGADINHO, M. J. C. 2014. 59 f. **Distúrbios do metabolismo do cobre, ferro e zinco**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

- DELLA-BIANCA, B. E., GOMBERT, A. K., 2013. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 104, v. 6, p. 1083–1095, 2013.
- DODIC, S. N.; POPOV, S. D.; MARKOV, S. L. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in medium rich in zinc. **Agris**, v. 31, p. 575-582, 2000.
- DOEBLEY, J. F.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. The molecular genetics of crop domestication. **Cell**, v. 127, p. 1309–1321, 2006.
- DOS SANTOS, B. A. **Compósito de zeólita A magnética sintetizada a partir das cinzas volantes do carvão para adsorção de poluentes metálicos**. 100 f. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- EIDE, D. Homeostatic and Adaptive Responses to Zinc Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 18565–18569, 2009.
- EIDE, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 18, p. 441–469, 1998.
- EL-GENDY, M. M. A. A.; EL-BONDKLY, A. M. A. Evaluation and enhancement of heavy metals bioremediation in aqueous solutions by *Nocardia* sp. MORSY1948, and *Nocardia* sp. MORSY2014. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 571-586, 2016.
- EL-SAYED, M. T. The use of *Saccharomyces cerevisiae* for removing cadmium (II) from aqueous waste solutions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 41, p. 6900-6910, 2012.
- EL-SHEEKH, M. M. et al. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 159-166, 2003.
- FADEL, M. et al. Biosorption of manganese from groundwater by biomass *Saccharomyces cerevisiae*. **Housing and Building Research Center**, v. 13, n. 1, p. 106-113, 2017.
- FARHAN, S. N.; KHADOM, A. A. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 6, p. 119-130, 2015.
- FERREIRA, A. V. B. Fungos os primórdios do sexo. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 218, p. 34-41, 2005.
- FERREIRA, D. S. 2015. 49f. **Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- FERREIRA, M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010.

- FOROUGH, S. et al. Application of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from industrial effluent for zinc biosorption and zinc-enriched SCP production for human and animal. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-8, 2022.
- FORSTER, B. et al. Kveik brewing yeasts demonstrate wide flexibility in beer fermentation temperature, flavor metabolite production, and exhibit enhanced trehalose accumulation. **BioRxiv**, p. 1-49, 2021.
- GALLONE, B. et al. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397-1410, 2016.
- GARSHOL, L. M. Pitch temperatures in traditional farmhouse brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, p. 181-186, 2020.
- GIRIJAN, S.; KUMAR, M. Immobilized biomass systems: an approach for trace organics removal from wastewater and environmental remediation. **Curr. Opin. Environ. Sci. Heal**, v. 12, p. 18–29, 2019.
- GLASAUER, S. M. et al. Metals and metalloids, transformation by microorganisms. **Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, 2013.
- GOH, C. L. et al. Adsorptive behaviour of palm oil mill sludge biochar pyrolyzed at low temperature for copper and cadmium removal. **Journal Of Environmental Management**, v. 237, p. 281-288, 2019.
- GONÇALVES, G. da C. et al. Utilization of brewery residues to produces granular activated carbono and bio-oil. **Journal of Clear Production**, v. 168, p. 908-916, 2017.
- GONÇALVES, M. et al. Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. **Current Biology**, v. 26, n. 20, p. 2750-2761, 2016.
- GUIDO, Luis F.. “Malting” em GUINÉ, Raquel, **Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products**, 1. Ed Porto: CRC Press, 2014, 367p.
- GULER, U. A.; SARIOGLU, M. Mono and binary component biosorption of Cu(II), Ni(II) and Methylene Blue onto raw and pretreated *S. cerevisiae*: equilibrium and Kinetics. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, p. 25-27, 2013.
- HADIANI, M. R. et al. Assessment of Mercury biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. Response surface methodology for optimization of low Hg(II) concentrations. **J. Environ. Chem. Eng.**, v. 6, p. 4980-4987, 2018.
- HAMPSON, T. **O Grande Livro da Cerveja: informações atualizadas sobre cervejas e as grandes cervejarias em todo o mundo**. São Paulo: Publifolha ,2014, título original: World Beer. 300 p.
- HASSLER, C. S. Some fundamental (and often overlooked) consideration underlying the free ion activity and biotic ligand model. **Environ Toxicol Chen**, v. 23, p. 283-291, 2004.
- HOSINER, G. et al. Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 8330-8344, 2014.

HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Metals and Microorganisms. **Springer Dordrecht**, v. 1, p. 412-424, 1989.

HUSSEIN, M. H. Characterization and chromium biosorption potential of extruded polymeric substances from *Synechococcus mundulus* induced by acute dose of gamma irradiation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 31, p. 31998-32012, Sep. 2019.

HUSSEIN, S. M.; FAUZIA, R. E. G.; AML, O. A. Effect of nickel sulfate on yeast growth and cell division. **Acta Scientific Microbiology**, v. 5, n. 1, 2022.

IBRAHIM, L. A. et al. Simultaneous removal of metal ions from Wastewater by a greener approach. **Water**, v. 14, p. 1-19, 2022.

INFANTE, C.; ARCO, D.; ANDULO, E. Removal of lead Mercury and nickel using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. MVZ Cordoba*, v. 19, p. 4141-4149, 2014.

JIN, Y. H. Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. 1000053-1000067, 2008.

JÚNIOR, C. L. L. de F. 174f. 2011. **Diversidade e aplicações biotecnológicas de leveduras e fungos filamentosos presentes em ambientes aquáticos contaminados com arsênio**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

KANAGACHANDRAN, K.; JAYARATNE, R. Utilization potential of brewery wastewater sludge as an organic fertilizer. **J. Inst. Brew.**, v. 112, n. 2, 2006.

KAWA-RYGIELSKA, J. et al. Characteristics of New England India pale ale beer produced with the use of Norwegian Kveik Yeasts. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2291-2309, 2022.

KITS, D.; GARSHOL, L. M. Norwegian Kveik brewing yeasts are adapted to higher temperatures and produce fewer off-flavours under heat stress than commercial *Saccharomyces cerevisiae* American Ale Yeast. **bioRxiv**, 2021.

KUMAR, L.; BHARADVAJA, N. Microbial remediation of heavy metals. **Springer**, p. 49-72, 2020.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The yeasts*. **Elsevier**, v. 1, p. 87–110, 2011.

LANDOLFO, S. et al. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 892-898, 2008.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal American Chemical Society**, 40, 1361-1403, 1918.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soli systems. **Earth Science Reviews**, v. 51, p. 1-31, 2000.

- LI, C. et al. Effect of NaCl on the heavy metal tolerance and bioaccumulation of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 46-52, 2013.
- LIMA, Luciana Leite De Andrade; FILHO, Artur Bibiano De Melo. **Tecnologia de bebidas**. Recife: UFRPE/CODAI, 2011. 126 p
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. V.4, Biotecnologia na Produção de Alimentos. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.
- LIMA, V. F.; MERÇON, F. Metais pesados no ensino da química. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 4, 2011.
- LIRA, M. M. A. 2020. 88f. **Potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de efluente têxtil para processos de biorremediação**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Biociências, Universidade Federal da Integração Latina - Americana, Foz do Iguação.
- LUNA, A. S.; COSTA, A. L. H.; COSTA, A. C. A.; HENRIQUES, C. A. Competitive biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*. **Biores Technol.** v. 101, n. 9, p. 5104– 5111, 2010.
- LUSTIGMAN, B.; LEE, L.; WEISS-MAGASIC, C. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bulletin of environment contamination and toxicology**, v. 55, n. 1, p. 65-72, 1995.
- LYONS, T. J. et al. Genome-wide characterization of the ZAP1P zinc-responsiv regulon in yeast. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 7957-7962, 2000.
- MACHADO, E. R. **Desenvolvimento e caracterização de cerveja artesanal com adição de cacau**. 46 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- MACHADO, M. D.; et al. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1972-1804, 2009.
- MACHADO, M. D.; SOARES, E. V.; SOARES, H. M. V. M. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: application to the treatment of real electroplating effluents containing multielements. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1353-1360, 2010.
- MAHALAKSHMI, T. ET AL. Effect of nickel stress on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Pollut. Control**, v. 25, p. 5-10, 2010.
- MAPELLI, R. F.; MALFATTI, C. de F.; OLIVEIRA, C. T. Zinco – Características e aplicações como elemento no desenvolvimento de tecnologia. **Tecnologia e Tendências**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.
- MARCANTE, R. de C. et al. Bioacumulação de zinco em micélio de *Agaricus subrufescences*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 17, n. 4, p. 249-252, 2014.

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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 1622, 2004.

MARTINS, Silvio De Melo. **Como fabricar cerveja**. São Paulo - SP: Ícone editora, 1991. 12-21 p.

MATHIAS, T. R. dos S. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos industriais cervejeiros**. 198 f. 2015. Tese – (Doutorado em Ciência) – Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. 105f. Dissertação – (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Toxicologia, São Paulo.

MCKEAN, B. A. Naturally-occurring, micronutrient nickel fundamental in ammonia conversion. *Nickel – The magazine devoted to Nickel and its applications*, v. 26, n. 2, p.16, 2011.

MEDEIROS, M. de A. Elemento Químico: Cobalto. **Química Nova na Escola**, v. 35, n. 3, p. 220-221, 2013.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia ambiental*. 2. ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MIMURA, A. M. S. et al. Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p.1279-1284, 2010.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

MOSCHEM, J. da C.; GONÇALVES, P. R. Impacto toxicológico de metais pesados: uma análise de efeitos bioquímicos e celulares. **Health and Biosciences**, v. 1, n. 2, p. 88-100, 2020.
MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **J. Sci. Food Agric.**, v. 94, p. 1264-1275, 2014.

MUTHUKUMAR, K.; NACHIAPPAN, V. Cadmium-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian J. Biochem Biophys**, v. 47, n. 6, p. 383-387, 2010.

NABINGER, D. D. 2017. 54f. **Exposição aguda e subcrônica ao níquel em peixe-zebra (Danilo rerio: avaliação de parâmetros morfológicos e comportamentais)**. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

NAIK, R. P. et al. Effect of different zinc source and concentration on the biomass yield of *Saccharomyces cerevisiae* **Yeast. Biol Trace Elem Res.**, v. 200, n. 9, p. 4171-4174, 2022.

NASCIMENTO, J. M.; LEITE, S. G. F.; RIZZO, A. C. de L. Estudo da remoção do íon cobre por meio de biossorção usando biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2016. 48p. il.: (Série Tecnologia Ambiental, 89).

NASCIMENTO, J. M. do. et al. Biosorption Cu (II) by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Reports**, v. 21, 2019.

NASCIMENTO, M.; SOARES, P. S. M. **Cobalto no Brasil: metalurgia extrativa, ocorrências e projetos**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2019. 35 p.

NASCIMENTO, R. F. do. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. 2 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020. Livro eletrônico.

NAVARRO, J. P. F. R. 127f. 2012. **Construção e caracterização de uma linhagem de levedura desenhada para a biorremediação de mercúrio**. Tese (Dourado em Biotecnologia) – Pós graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan – Universidade de São Paulo.

NEUSATZ GUILHEN, S. **Síntese e caracterização de biocarvão obtido a partir do resíduo de coco de macaúba para remoção de urânio de soluções aquosas**. 2018. 324p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and the environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 1-21, 2012.

OLAJIRE, A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, 2020.

OLIVEIRA, N. A. M. de. **Leveduras Utilizadas no Processo de Fabricação da Cerveja**. 2011. TCC (Especialização em Microbiologia), UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – MG.

OLIVER, G.; MENDES, I. **O guia Oxford da Cerveja**. São Paulo: Blucher, 2020.

OLIVIER, S. 135f. 2006. Avaliação dos impactos ambientais gerados pela produção de resíduos industriais do ramo metalúrgico: recuperação e reciclagem. Dissertação (Mestre em Gestão e Políticas Ambientais) – Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ORR, S. E.; BRIDGES, C. C. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

ÖZER, A.; ÖZER, D. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. **J Hazard Mater B**, v. 100, p. 219-229, 2003.

PADMAVATHY, V. et al. Biosorption of nickel (II) ions on baker's yeast. **Process Biochem**, v. 38, p. 1389–1395, 2003.

PALMIERI, M. C. et al. Biosorption of lanthanum using *Sargassum fluitans* in batch system. **Hydrometallurgy**, v. 67, p. 31-36, 2002.

PANKIEWICZ, U.; SUJKA, M. JAMROZ, J. Bioaccumulation of the selected metals ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells under treatment of the culture with pulsed electric field (PEF). **The Journal of Membrane Biology**, v. 248, p. 943-949, 2015.

PANDIT, V.; MAJUMDER, D. **Biosorption of heavy metals by dead fungal biomass**, v. 4, p. 11–20, 2014.

PAPIRIO, S. et al. Heavy metal removal from wastewaters by biosorption: mechanisms and modeling. **Sustainable heavy metal remediation**, p. 25-63, 2017.

PARK, D. et al. The past, present, and future trends of biosorption. **Biotechnol Bioprocess Eng**, v. 15, p. 86–102, 2010.

PARK, J. et al. Cadmium adsorption characteristics of biochars derived using various pine tree residues and pyrolysis temperatures. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 553, p.298-307, 2019

PEIXOTO, D. R. dos S. A importância da legislação ambiental para a gestão ambiental pública municipal e no setor privado. **Revista Internacional de Ciências**, v. 6, n. 2, p. 281-285, 2018.

PEREIRA, D. D. 146 f. 2006. **Recuperação de zinco presente em efluentes industriais produzidos pela Votorantim metis unidade Três Marias utilizando-se a técnica de extração líquido-líquido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PORTIS, I. G. et al. Influência do cobre no metabolismo de fungos. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, v. 3, n. 3, p. 188-192, 2020.

PORTO, P. D. **Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão**. 58f. Monografia (Engenheiro de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011

PRASANNA, R.; JAISWAL, P.; KAUSHIK, B. D. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability – promises and challenges. **Indian J Microbiol**, v. 48, p. 89-94, 2008.

PREISS, R.; TYRAWA, C.; KROGERUS, K.; GARSHOL, L.M.; VAN DER MERWE, G. Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated brewing yeasts. **Microbiology**, v. 9, p. 2137, 2018.

PREISS, R.; TYRAWA, C.; VAN DER MERWE, G. Traditional Norwegian Kveik Yeast: Underexplored Domesticated *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts. **bioRxiv**, 2017.

RAGSDALE, S. W. Nickel Biochemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol**, v. 2, p. 208– 215, 1998.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Florida: CRC Press and Taylor & Francis Group, 2006. 829p

RASHEED, A. et al. Immobilization of *Pseudomonas aeruginosa* static biomass on eggshell powder for on-line preconcentration and determination of Cr (VI). **Open Chem**, v. 18, p. 303–313, 2020.

REGALLA, L. M.; LYONS, T. J. Zinc in yeast: mechanisms involved in homeostasis. In: Tamas, M.J., Martinoia, E. (Eds.), *Molecular Biology of Heavy Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man*. Springer, p. 37–54, 2006.

REIS, L. L. dos. 2019. 54 f. **Efeitos do cádmio e do cobalto no crescimento e em parâmetros bioquímicos e fotossintéticos da clorofícea *Raphidocelis subcapitata***. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.

RIBEIRO, A. R. A.; BORGES, A. R. Relação entre os metais potencialmente tóxicos e o consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 7, p. 50445-50457, 2022.

RIORDAN, C.; MCHALE, A. P.; Removal of lead from solution using non-living residual brewery yeast. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 277-280, 1998.

RIVERA, C. B. P. 80f. 2007. **Dos proteínas que participan en la represión catabólica nitrogenada están relacionadas con la resistencia a zinc en *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Ciências e Biologia Molecular) Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí.

RODRIGUES, L. A. et al. Efeito sinérgico da interação entre nanopartículas de dióxido de titânio e chumbo inorgânico em peixes do ponto de vista toxicológicos. **Pluri Discente**, v. 1, p. 118-122, 2022.

RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Elemento Químico: Cobre. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012.

ROMANDINI, P. et al. Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. **Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol Toxicol**, v. 103, n. 2, p. 255-262, 1992.

ROSSI, A. de. 2015. 95 f. **Biossorção de metais tóxicos por *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

SALÃO, N. 208 f. 2001. **The influence of zinc on the physiology of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Filosofia) – Universidade de Abertay Dundee, Scotland, Reino Unido.

SALIMI, M.; MAHZOUNIEH, M. *Saccharomyces cerevisiae* on Mo and Cd removal. **J. Med Microbiol. Infect Dis.**, v. 3, p. 18-22, 2015.

SANTOS, B. A. P. DO. Ibuprofen biosorption by chemically activated *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Ambiente e Água**, v. 17, n. 5, p. 1-12, 2022.

SCHIFER, T. dos S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Infarma**, v. 17, n. 5/6, p. 66-72, 2005.

SCHLABITZ, C.; LENH, D. N.; SOUZA, C. F. V. de. A review of *Saccharomyces cerevisiae* and the application of its byproducts in dairy cattle feed: trends in the use of residual brewer's yeast. **Journal of Clear Production**, v. 332, 2022.

SEGANTINI, E. Aspectos toxicológicos da contaminação por metais pesados no ser humano. **Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL**, v. 8, n. 5, p. 1-5, 1996.

SICARD, D.; LEGRAS, J. L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu strictu* complex. **C. R. Biol.**, v. 334, n. 3, p. 229-36, 2011.

SIDIRM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 338 p.

SILONIZ, M. I de. et al. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. **Res Microbiol**, v. 153, p. 173-180, 2002.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 28, p. 902-906. 2008.

SILVA, C. S. Anuário Mineral Brasileiro 2005. Brasília: DNPM, 2005b.

SILVA, D. P. da. 2005a. Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia

SILVA, M. L. et al. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solos com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 527-535, 2007a.

SILVA, S. M. da. et al. Effects of nickel on the mineral composition of fleischmann-s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 3, p. 503-510, 2007b.

SIMM, C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. **Eukaryotic Cell – ASM Journal**, v. 6, n. 7, p. 1166-1177, 2007.

SINDICERV. **O setor em números - SINDICERV**. Disponível em: <https://sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/>. Acesso em: 27/12/2022.

SOARES, E. V. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for Cu⁺² removal from solution: the advantages of using a flocculent strain. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 663-666, 2002.

SOARES, E. V.; SOARES, H. M. V. M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 1066-1083, 2012.

SOUZA, C. F. A. **Estudo da toxicidade do chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 79 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Proteção Ambiental) – Instituto Superior de Engenharia do Porto – ISEP.

SOUSA, F. W. et al. Uso da casca de coco verde como adsorvente na remoção de metais tóxicos. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1153-1157, 2007.

STEWART, G. G.; OLIVER, G. **The Oxford Companion to Beer**. 1ª edição, USA: Oxford University Press, 2011.

STOLL, A.; DUNCAM, J. R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1209-1212, 1996.

SUN, A.; WANG, W. Insights into kinetics regulations of Zn bioaccumulation at trace levels: lighting up *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemosphere**, v. 2, 2022.

SUVASTRU, E. et al. Application of *Saccharomyces cerevisiae* in the biosorption of Co(II), Zn(II) and Cu(II) ions from aqueous media. **Water**, v. 14, n. 6, p. 976, 2022.

TAREKEGN, M. M. et al. Cogent Food & Agriculture Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment **FOOD SCIENCE &**

TECHNOLOGY | REVIEW ARTICLE Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. **Cogent Food Agric**, v. 6, 2020.

TOFALO, R. et al. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n.166, p. 1-13, 2013.

TOLEDO, I. L. C. J. **Cinética de bioacumulação do íon Pb+2 na macrófita aquática *Pistia stratiotes***. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

TUSZYNSKI, T.; PASTERNAKIEWICZ, A. Bioaccumulation of metal ions by yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 50, n. 4, p. 31-39, 2000.

VADKERTIOVÁ, R.; SLÁVIKOVÁ, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. **Journal of basic Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 145-152, 2006.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. Chapter 61- *Saccharomyces Meyen ex Reess* (1870). **The Yeasts**, v. 5, p. 733-746, 2011.

VELOSO, I. I. K. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2019.

VERMA, S.; KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology and Innovation**, v. 14, 2019.

VIANA, F. L. de. Indústria de bebidas alcoólicas. **Caderno Setorial ETENE**, v. 7, n. 216, p. 1-9, 2022.

VIEIRA, Emanuel da Silva. **Acompanhamento do processo produtivo de uma cervejaria artesanal em Mossoró**. 2017. Monografia de Graduação. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN.

- VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Cadmium Biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 8, p. 826-829, 1993.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 427-451, 2006.
- WOLFF, G. et al. Efeitos da Toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em soluções nutritivas. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, 2009.
- YILMAZER, P.; SARACOGLU, N. Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium(III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 84, p. 604–10, 2009.
- ZABOCHNICKA-SWIATEK, M.; KRZYWONOS, M. Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal. **Pol. J. Environ. Stud**, v. 23, n. 2, p. 551-561, 2014.
- ZHAO, H. et al. Regulation of Zinc Homeostasis in Yeast by Binding of the ZAP1 Transcriptional Activator to Zinc-responsive Promoter Elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 28713-28720, 1998.
- ZHAO M, DUNCAN JR. Use of formaldehyde cross-linked *Saccharomyces cerevisiae* in column bioreactors for removal of metals from aqueous solutions. **Biotechnol Lett**, v. 19, p. 953-955, 1997.
- ZHAO, X. Q. BAI, F. W.. Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. **Journal of Biotechnology**, v.158, n. 4, p. 176-183, 2011.
- ZHENG, D. et al. Regulation of ZIP and ZnT zinc transporters in zebrafish gill: zinc repression of ZIP10 transcription by an intronic MRE cluster. **Physiological Genomics**, v. 34, p. 205-214, 2008.
- ZINICOVSCAIA, I. et al. Efficient removal of metals from synthetic and real galvanic zinc-containing effluents by Brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Materials**, v. 14, n. 16, 2020.