



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

USO DE SACCHAROMYCES PARA LA REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DE CADMIO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: MÓNICA GABRIELA ANGELKOS PALACIOS

TUTOR/A ACADEMICO: RAFAEL GAVARA

DIRECTOR EXPERIMENTAL: VICENTA DEVESA Y DINORAZ VÉLEZ

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, 2 DE SEPTIEMBRE DE 2019

USO DE SACCHAROMYCES PARA LA REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DE CADMIO

Autores: Mónica Angelkos, Dinoraz Vélez, Vicenta Devesa

RESUMEN

El agua y los alimentos constituyen la principal forma de exposición a cadmio (Cd) para la población no fumadora. La absorción intestinal de este elemento juega un papel fundamental en su toxicidad, ya que determina la cantidad del tóxico que llega a la circulación sistémica (biodisponibilidad). Esta absorción está influenciada por diferentes factores, entre los que cabe destacar algunos componentes alimentarios y probióticos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para reducir la cantidad de Cd que se absorbe tras la ingesta. Para este fin se ha evaluado la capacidad de varias cepas de *S. cerevisiae* de uso alimentario de unir Cd en disolución acuosa (0.1 y 1 mg/L). Posteriormente se ha evaluado si las cepas son capaces de unir Cd durante la digestión gastrointestinal de patrones acuosos de Cd y de alimentos con elevados contenidos del metal. Finalmente, se ha ensayado si las cepas son capaces de reducir la cantidad de Cd que es absorbido por un modelo celular de epitelio intestinal (línea celular Caco-2).

Los resultados muestran que las levaduras son capaces de unir Cd, especialmente a la concentración más baja (82-100%). Las condiciones del proceso digestivo afectan la capacidad de interacción de las cepas de *S. cerevisiae* con el Cd. Cuando el Cd está en disolución acuosa, se observan captaciones importantes durante la digestión especialmente para las cepas 8, 9 y 10. Sin embargo, no se produce la interacción Cd-levaduras cuando el proceso digestivo se aplica a muestras de setas. Estos cambios en los porcentajes de interacción pueden ser consecuencia de las condiciones del proceso digestivo y/o de las características de la matriz alimentaria. La retención por parte de *S. cerevisiae* del Cd en disolución acuosa se traduce en una reducción de su absorción intestinal *in vitro*.

Los datos obtenidos sugieren que *S. cerevisiae* puede ser útil como estrategia de bioremediación del Cd en aguas y posiblemente alimentos líquidos, pero su uso como estrategia para reducir la absorción intestinal de Cd no es aplicable a todas las situaciones de exposición poblacional existentes, ya que la interacción Cd-Saccharomyces parece ser matriz dependiente.

Palabras clave: Cadmio, bioaccesibilidad, absorción intestinal, *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMEN

L'aigua i els aliments constitueixen la principal forma d'exposició a cadmi (Cd) per a la població no fumadora. L'absorció intestinal d'aquest element juga un paper fonamental en la seua toxicitat, ja que és la que determina la quantitat del tòxic que arriba a la circulació sistèmica (biodisponibilitat). Aquesta absorció està influenciada per diferents factors, entre els quals cal destacar alguns components alimentaris i probiòtics.

L'objectiu d'aquest estudi és avaluar la capacitat de *Saccharomyces cerevisiae* de reduir la quantitat de Cd que s'absorbeix després de la ingesta. Per a aquesta fi s'ha avaluat la capacitat de diverses soques de *S. cerevisiae* d'ús alimentari d'unir Cd en dissolució aquosa (0.1 i 1 mg/L). Posteriorment s'ha avaluat si els llevats són capaços d'unir Cd durant la digestió gastrointestinal de patrons aquosos de Cd i d'aliments amb elevats continguts del metall. Finalment, s'ha assajat si les soques són capaços de reduir la quantitat de Cd que és absorbit per un model cel·lular d'epiteli intestinal (línia cel·lular Caco-2).

Els resultats mostren que els llevats són capaços d'unir Cd, especialment a la concentració més baixa (82-100%). Les condicions del procés digestiu afecten la capacitat d'interacció dels llevats amb el Cd. Quan el Cd està en dissolució aquosa, s'observen captacions importants, especialment per a les soques 8, 9 i 10. No obstant això, no es produeix la interacció Cd-llevats quan el procés digestiu s'aplica a mostres de bolets. Aquests canvis en els percentatges d'interacció poden ser conseqüència de les condicions del procés digestiu i/o de les característiques de la matriu alimentària. La retenció del Cd per part de *S. cerevisiae* en dissolució aquosa es tradueix en una reducció de la seua absorció intestinal *in vitro*.

Les dades obtingudes suggereixen que *S. cerevisiae* pot ser útil com a estratègia de bioremediació del Cd en aigües i possiblement en aliments líquids, però el seu ús com a estratègia per a reduir l'absorció intestinal de Cd no és aplicable a totes les situacions d'exposició poblacional existents, ja que la interacció Cd-*Saccharomyces* sembla ser matriu dependent.

Paraules clau: Cadmi, bioaccessibilitat, absorció intestinal, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Water and food are the main form of exposure to cadmium (Cd) for the non-smoking population. The intestinal absorption of this element plays a central role in its toxicity, since it is what determines the amount of the toxic element that reaches the systemic circulation (bioavailability). This absorption is influenced by different factors, including some food components and probiotics.

The objective of this study is to evaluate the capacity of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce the amount of Cd that is absorbed after ingestion. For this purpose, the capacity of several strains of *S. cerevisiae* of food grade to bind Cd in aqueous solution (0.1 and 1 mg/L) was evaluated. Subsequently, it has been evaluated whether these strains are able to bind Cd during the gastrointestinal digestion of aqueous Cd solutions and foods with high Cd contents. Finally, it has been tested whether the strains are able to reduce the amount of Cd that is absorbed by a cellular model of intestinal epithelium (Caco-2 cell line).

The results show that the yeasts are able to bind Cd, especially at the lowest concentration (82-100%). The conditions of the digestive process affect the interaction capacity of the strains of *S. cerevisiae* with Cd. When Cd is in aqueous solution, important uptakes are observed especially for strains 8, 9 and 10. However, Cd-yeast interaction do not occur when the digestive process is applied to mushroom samples. These changes in the percentages of interaction may be a consequence of the conditions of the digestive process and/or due to the characteristics of the food matrix. Retention by *S. cerevisiae* of Cd in aqueous solution results in a reduction of its intestinal absorption *in vitro*.

The data obtained suggest that *S. cerevisiae* may be useful as a strategy of bioremediation of Cd in water and liquid foods, but its use as a strategy to reduce the intestinal absorption of Cd is not applicable to all the situations of exposure, since the Cd-*Saccharomyces* interaction seems to be matrix dependent.

Keywords: Cadmium, bioaccessibility, intestinal absorption, *Saccharomyces cerevisiae*

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	2
Exposición oral a cadmio	2
Toxicidad del cadmio	3
Factores dietéticos que modulan la toxicidad de cadmio	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como estrategia para reducir la biodisponibilidad de cadmio	4
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Condiciones de cultivo de <i>Saccharomyces</i>	5
Ensayos de captación de cadmio	5
Ensayos de bioaccesibilidad de cadmio	6
Ensayos de absorción intestinal de cadmio	7
ENSAYOS DE TRANSPORTE CELULAR DE CADMIO	7
Determinación de cadmio	9
Análisis estadístico	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
Estudios sobre la capacidad de <i>Saccharomyces</i> de unir cadmio	10
Estudios sobre la capacidad de <i>Saccharomyces</i> de unir cadmio durante el proceso de digestión gastrointestinal. Reducción de la bioaccesibilidad	12
BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN DISOLUCIONES ACUOSAS	12
BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN SETAS	13
Estudios sobre la capacidad de <i>S. cerevisiae</i> de disminuir el transporte intestinal <i>in vitro</i> de cadmio	15
CONCLUSIONES	16
AGRADECIMIENTOS	16
REFERENCIAS	17

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cepas de <i>Saccharomyces</i> empleadas en el estudio	5
TABLA 2. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de Cd mediante GF-AAS	9

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de absorción con células epiteliales del intestino	8
FIGURA 2. Captación de Cd (0.1 mg/L) por cepas de <i>S. cerevisiae</i>	11
FIGURA 3. Captación de Cd (1 mg/L) por cepas de <i>S. cerevisiae</i>	11
FIGURA 4. Retención de Cd por las levaduras durante la digestión gastrointestinal de disoluciones patrón de Cd (0.1 mg/L)	12
FIGURA 5. Retención de Cd por las levaduras durante la digestión gastrointestinal de disoluciones patrón de Cd (1 mg/L)	13
FIGURA 6. Contenido de Cd bioaccesible tras aplicar a muestras de setas una digestión gastrointestinal en ausencia o presencia de <i>S. cerevisiae</i> (4 OD)	14
FIGURA 7. Efecto de las levaduras sobre el transporte de Cd en disolución acuosa	15

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un metal cuya abundancia en la corteza terrestre se estima entre 0.1 a 0.2 mg/kg. Su llegada al medio ambiente se produce por causas naturales o antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen la actividad volcánica, la meteorización de las rocas, la quema de vegetación y la movilización del Cd depositado en suelos, sedimentos y vertederos. Las fuentes antropogénicas incluyen la minería y la fundición de minerales de zinc (Zn), la combustión de combustibles fósiles para electricidad y calefacción, la incineración de desechos municipales, industriales y agrícolas y la fabricación de fertilizantes con fosfato. Si bien las emisiones al medio ambiente han disminuido en los últimos años, siguen siendo un motivo de preocupación para los organismos reguladores. El Cd se moviliza fácilmente de suelos y agua, pudiendo ser absorbido por plantas y captado por organismos acuáticos. De hecho, para la población no fumadora, los alimentos son la principal fuente de exposición a este elemento.

Exposición oral a cadmio

El último informe sobre Cd del panel de contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009) pone de manifiesto que las principales fuentes dietéticas de este elemento son los cereales y derivados, vegetales, frutos secos, tubérculos y carne y derivados. Las concentraciones más elevadas se encuentran, sin embargo, en algas marinas, productos pesqueros, cacao y derivados, setas, aceites de semilla y vísceras.

Los estudios existentes sobre algas indican que las mayores concentraciones de Cd se presentan en determinadas especies: *Porphyra sp*, *Undaria pinnatifida* y *Hizikia fusiforme* (Almela et al., 2006; Dawczynski et al., 2007). En cuanto a los productos pesqueros, los valores más elevados se encuentran en crustáceos, especialmente en los moluscos bivalvos (Amiard et al., 2008; Bendell et al., 2009), que en ocasiones superan el límite establecido por la legislación (1 mg/kg; EU 488/2014). Dentro de los alimentos de origen vegetal, son las setas las que presentan los contenidos más elevados. Kalač y Svoboda (2000) reportan niveles de Cd en especies del género *Agaricus* de hasta 50 mg/kg peso seco. Los productos derivados del cacao, aunque no presentan concentraciones tan elevadas (0.09-1.8 mg/kg; Mounicou et al., 2003), son productos con cierta problemática debido al elevado consumo que existe entre la población infantil. Villa et al. (2014) ponen de manifiesto que el contenido en Cd es directamente proporcional a la cantidad de cacao en la formulación.

El grupo de expertos del panel de contaminantes de EFSA (2009) ha establecido para el Cd una ingesta semanal tolerable (IST) de 2.5 µg/kg peso corporal (pc). Las ingestas de Cd por la población europea oscilan entre 1.9 y 3.0 µg/kg pc/semana, valores en algunos casos superiores a la IST. Por otro lado, se han identificado grupos de riesgo, tales como vegetarianos y consumidores regulares de bivalvos o setas silvestres, cuyas ingestas de Cd (5.4, 4.6 y 4.3 µg/kg pc, respectivamente) son muy superiores a la IST recomendada (IARC, 2012). Estos datos han llevado a la

EFSA a emitir recomendaciones de reducción de los contenidos de este metal en la dieta (EFSA, 2009).

La absorción intestinal de Cd se caracteriza por una alta acumulación en la mucosa intestinal y un bajo índice de transferencia a la circulación sistémica (Elsenhaus et al., 1997). De hecho, la absorción de Cd en roedores es inferior al 8% cuando se dosifica en disolución salina. En humanos, la cantidad media absorbida también es muy baja y varía dependiendo del sexo (10% en hombres; 15% en mujeres) (Flanagan et al., 1978). Vahter et al. (1996) evalúan la absorción de Cd en mujeres alimentadas con una dieta en base a marisco (ingesta media de 22.3 µg Cd/día) y muestran una eliminación elevada por heces, lo que indica una baja absorción del Cd presente en los alimentos. Aunque no existe una elevada entrada a la circulación sistémica, su acumulación en el epitelio intestinal desencadena importantes efectos tóxicos a este nivel que pueden repercutir posteriormente en la absorción de éste y otros tóxicos.

Toxicidad del cadmio

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado los compuestos de Cd como carcinógenos humanos del grupo 1A, ya que existen pruebas suficientes que vinculan su exposición por inhalación con una mayor incidencia de cáncer de pulmón en humanos (IARC, 1993). La exposición vía oral, sin embargo, no está asociada a una mayor prevalencia de cáncer. El efecto crónico más grave de la exposición oral a este metal es la toxicidad renal. El primer signo de lesiones renales inducidas por Cd es la proteinuria tubular que resulta del daño a las células tubulares proximales (Järup et al., 1984). También se han reportado efectos sobre el sistema esquelético (Berglund et al., 2000) y el sistema reproductivo (Thompson y Bannigan, 2008). Los mecanismos de toxicidad de este metal son muy diversos (Waisberg et al., 2003; Matović et al., 2011; Bernhoft, 2013): inducción de estrés oxidativo, inflamación, interacciones con elementos esenciales como Zn y magnesio (Mg). alteración en la expresión génica, inhibición de la reparación del ADN, alteración de las vías de señalización celular.

Factores dietéticos que modulan la toxicidad de cadmio

En la actualidad numerosos estudios muestran que algunos de los componentes de la dieta podrían modular la toxicidad de los contaminantes alimentarios. Esta modulación puede producirse a diferentes niveles y ser, en algunos casos, beneficiosa al suponer una reducción de la toxicidad. Uno de los posibles mecanismos de modulación podría consistir en un efecto directo del componente dietario sobre la toxicocinética (digestión, absorción intestinal, acumulación tisular, excreción) del contaminante.

Se ha evidenciado que la absorción de Cd está influenciada por el contenido de hierro (Fe) corporal (Flanagan et al., 1978). Se cree que el aumento de la absorción de Cd cuando hay deficiencias de Fe se debe a la participación en el transporte intestinal de Cd del transportador DMT1

(SLC11A2), principal mecanismo de absorción intestinal de Fe (Park et al., 2002). La fibra dietaria también tiene un efecto sobre la absorción intestinal y la acumulación tisular de Cd. Berglund et al. (1994) reportan una excreción fecal de Cd de 73% en una dieta normal y del 100% en una dieta rica en fibra. El efecto de las proteínas en la absorción de Cd depende de la duración del tratamiento. Dietas ricas en proteínas administradas 24 h antes y después de una dosis única de Cd, conllevan reducciones de los niveles tisulares del metal en ratones (Revis y Osborne, 1984). En exposiciones a largo plazo, la dieta alta en proteínas se asocia, sin embargo, con altos niveles tisulares de Cd (Revis y Osborne, 1984).

Hay que destacar el papel que determinados probióticos pueden tener en la toxicocinética del Cd. Zhai et al. (2013) muestran que la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* produce un incremento de la eliminación por heces y una reducción de la acumulación en hígado y riñones del Cd en roedores expuestos al metal por vía intragástrica.

Saccharomyces cerevisiae como estrategia para reducir la biodisponibilidad de cadmio

Se ha puesto de manifiesto que levaduras del género *Saccharomyces* tienen una elevada capacidad de adsorber y/o captar diferentes tipos de contaminantes medioambientales y/o alimentarios. En los últimos años se han llevado a cabo estudios para desarrollar su aplicación en diferentes campos relacionados con la salud y la seguridad alimentaria. Se trata de microorganismos seguros y fáciles de cultivar a gran escala y son un subproducto bastante común de las industrias alimentarias. El hecho de ser microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) permite su aplicación tanto en muestras medioambientales como en alimentos o su uso como suplementos dietéticos, sin que esto suponga un riesgo para la población.

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sido evaluadas como posibles bioabsorbentes de metales (Wang y Chen, 2006). Volesky et al. (1993) evidencian un mayor potencial de *S. cerevisiae* frente a otras levaduras como *S. uvarium* y *Candida utilis* en la captación de Cd en disolución acuosa, con retenciones elevadas ($\leq 75\%$) a tiempos cortos (5 min). Si esta capacidad de captación se mantiene durante el tránsito de este elemento traza por el tracto digestivo, las levaduras podrían emplearse para disminuir la entrada de este contaminante alimentario a la circulación sistémica tras su ingesta con el agua y alimentos.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de cepas de *Saccharomyces* capaces de reducir la cantidad de Cd existente en agua y alimentos que puede absorberse en el tracto intestinal. Este objetivo general se va a alcanzar a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de la capacidad de cepas de *Saccharomyces* de unir Cd.
2. Evaluación de la eficacia de cepas de *Saccharomyces* en la reducción de la bioaccesibilidad (cantidad del elemento que se solubiliza durante la digestión y queda disponible para la absorción) de Cd desde agua y alimentos.
3. Evaluación de la eficacia de cepas de *Saccharomyces* en la reducción de la cantidad de Cd absorbida por las células intestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo de *Saccharomyces*

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas se describen en la tabla 1. Las levaduras fueron mantenidas en medio YPD (Yeast Peptone Dextrose) constituido por 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 1% (m/v) de peptona bacteriológica y 2% (m/v) de glucosa (Sigma).

TABLA 1. Cepas de *Saccharomyces* empleadas en el estudio.

Cepa	Nombre	Características
2	BY4743	Cepa de laboratorio diploide
3	T73	Cepa vínica
4	VRB	Cepa productora de manoproteínas
7	Ultralevura	Cepa dietética (UPSAMÉDICA SL)
8	YPS128	Cepa silvestre americana
9	UWOPS03-	Cepa silvestre de Malasia
10	Kyokai 6	Cepa de sake

Ensayos de captación de cadmio

Las cepas de *S. cerevisiae* se incubaron con disoluciones de Cd preparadas en tampón fosfato salino (PBS, Hyclone) a partir del estándar comercial de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (1000 mg/L, Merck). Las levaduras a una concentración aproximadamente 5×10^7 células/mL (4 OD), se incubaron a 37 °C en agitación con 10 mL de la disolución patrón de Cd a distintas concentraciones (0.1 y 1 mg/L) durante 120 min. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min. El contenido de Cd en el sobrenadante y en el pellet celular se analizó según el protocolo descrito en la sección "Determinación de cadmio".

Ensayos de bioaccesibilidad de cadmio

Para evaluar la bioaccesibilidad se empleó el modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal descrito por Jadán Piedra et al. (2017) con pequeñas modificaciones. En la aplicación del método se utilizaron los siguientes equipos: pH-metro (Consort modelo C830), agitador orbital (Stuart modelo SSL1), centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont). Se llevaron a cabo dos ensayos distintos:

- a) Estudio de la capacidad de unión de *Saccharomyces* al Cd durante la digestión gastrointestinal de disoluciones acuosas de Cd.
- b) Estudio de la capacidad de unión de *Saccharomyces* al Cd durante la digestión gastrointestinal de alimentos (setas de la especie *Tricholoma georgii*).

Etapa gástrica. Se pesó en un erlenmeyer el patrón de Cd preparado en agua miliQ (0.1 y 1 mg/L) o la muestra de setas (0.4 g); se adicionaron las cepas de *Saccharomyces* (4 OD) y se ajustó el pH a 2 con HCl (Merck). En ambos casos, el volumen final del proceso de digestión gastrointestinal fue de 20 mL. Para llevar a cabo la etapa gástrica se utilizó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L. Se adicionó al erlenmeyer el volumen necesario para proporcionar 4 mg pepsina/20 g de disolución. Posteriormente el erlenmeyer se incubó en agitación (120 golpes/min) a 37 °C durante 2 h.

Etapa intestinal. Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6.5 utilizando NH₃ (Scharlau) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad equivalente a 4 × especificaciones de Farmacopea de EEUU/mg de pancreatina) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares). Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NH₄CO₃ 0.1 mol/L (Merck). Se adicionó al digerido el volumen necesario para proporcionar 1 mg de pancreatina/20 g de disolución y 6 mg de extracto biliar/20 g de disolución. La mezcla se incubó nuevamente en agitación (120 golpes/min) durante 2 h a 37 °C. El digerido obtenido se centrifugó (10000 rpm/30 min para alimentos; 4000 rpm/5 min para disoluciones acuosas) para separar la fracción soluble o bioaccesible.

En la fracción soluble se cuantificó el contenido de Cd utilizando la metodología que se describe en la sección "Determinación de cadmio". Para la evaluación de la bioaccesibilidad se utilizó la ecuación 1.

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{\text{Contenido de Cd en la fracción bioaccesible}}{\text{Contenido de Cd en el alimento o patrón acuoso}} \times 100 \quad (1)$$

Ensayos de absorción intestinal de cadmio

Se empleó la línea celular Caco-2, procedente de un adenocarcinoma de colon humano. Esta línea celular es la más empleada como modelo de epitelio intestinal en estudios de absorción intestinal. En cultivo celular se diferencia espontáneamente dando lugar a una monocapa epitelial con las características morfológicas y funcionales de los enterocitos humanos maduros (Hidalgo et al., 1989).

MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202). Su mantenimiento se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionó 10 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) y L-glutamina (0.6 g/L) a pH 7.2. El DMEM se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin, 0.0025 mg/mL de anfotericina B, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) (DMEMc). Todos los ensayos se realizaron con células entre los pases 5 y 10.

Las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO₂ del 5%. Los medios de cultivo se cambiaron cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó aproximadamente el 80% de confluencia, las células se despegaron con una disolución de tripsina (0.5 mg/mL) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA, 0.2 mg/mL) y posteriormente se sembraron a una densidad de 5 × 10⁴ células/cm². Los reactivos utilizados para el mantenimiento de los cultivos fueron adquiridos a Hyclone.

ENSAYOS DE TRANSPORTE CELULAR DE CADMIO

Los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos con insertos de membrana de poliéster (diámetro 12 mm, tamaño de poro 0.4 µm, Transwell[®], Corning, Figura 1). En este sistema, las células se sembraron sobre la membrana porosa del inserto que separa el pocillo en dos compartimentos: apical (superior) y basolateral (inferior). Se sembraron las células (1.8 × 10⁵ células/cm²) en el lado apical en 0.5 mL de DMEMc. En el lado basolateral se adicionaron 1.5 mL de DMEMc. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C, con cambio de medio cada 2-3 días hasta los 11 días post-siembra.

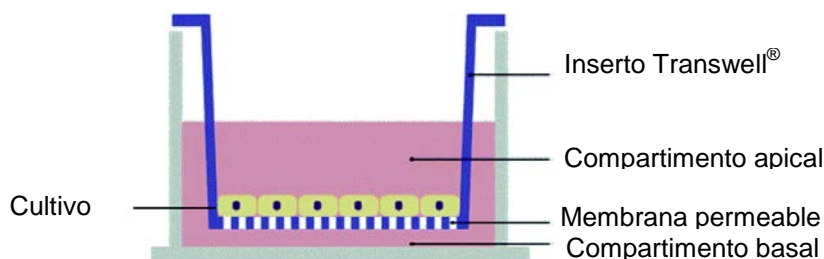


Figura 1. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de absorción con células epiteliales del intestino.

Para los ensayos de transporte a través de las monocapas de células se emplearon patrones de Cd (0.75 mg/L) preparados en disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Hyclone) suplementada con 10 mM HEPES (HBSS-HEPES 10 mM). Los patrones (0.5 mL) se adicionaron al compartimento apical con o sin la adición de las levaduras (1 OD). En el medio basolateral se adicionaron 1.5 mL de HBSS-HEPES 10 mM. A los tiempos estipulados (30, 45, 60 y 90 min), se recogieron alícuotas (1 mL) del compartimento basolateral y se reemplazaron por un volumen igual de HBSS-HEPES 10 mM. La concentración de Cd se determinó en las alícuotas tomadas en cada momento y en el medio apical recuperado al final del experimento. Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon utilizando la ecuación 2.

$$P_{app} = (dC/dt) (V_r/AC_0) \quad (2)$$

donde dC/dt es el flujo (ng/s) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que gobierna la variación de las concentraciones de Cd, corregidas por la dilución, en función del tiempo; V_r es el volumen del compartimento receptor (1.5 mL); A es la superficie ocupada por la monocapa celular (1.12 cm²); C_0 es la concentración de Cd adicionada inicialmente al compartimento apical (ng/L).

Para determinar la validez de los ensayos de transporte se evaluó la integridad de la monocapa celular durante el procedimiento mediante la evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) utilizando un voltímetro Millicell[®]-ERS (Millipore Corporation) y de la P_{app} de lucifer yellow (LY, Sigma), compuesto fluorescente que se transporta principalmente por vía paracelular. El LY se añadió a una concentración de 100 μ M en el compartimento apical al mismo tiempo que los tratamientos. La fluorescencia de la LY transportado al lado basolateral se midió con un lector de microplacas (Polarstar OPTIMA, BMG-Labtech) a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/520 nm. Los ensayos se consideraron válidos cuando: a) los valores de RET al final del ensayo no fueron superiores a un 25% del valor inicial; b) los P_{app} del LY fueron $\leq 1 \times 10^{-6}$.

Determinación de cadmio

Para la determinación de Cd, se aplicó una digestión asistida en horno microondas (modelo MARS, CEM) y una posterior cuantificación por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS, AAnalyst 600, Perkin-Elmer). Las muestras se digirieron en reactores de teflón, a los que se les adicionó 4 mL de HNO₃ 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H₂O₂ (30% v/v, Prolabo). Los reactores fueron irradiados en el horno microondas a 800 W de potencia (180 °C/15 min). Tras el proceso de digestión, los digeridos se llevaron a 12 mL con agua para su posterior cuantificación por GF-AAS siguiendo las condiciones instrumentales descritas en la tabla 2.

TABLA 2. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de Cd mediante GF-AAS.

Longitud de onda	228.8 nm			
Rendija	0.7 nm			
Volumen de muestra	10 µL			
Modificador de matriz	0.067 mg de HPO ₄ NH ₄ y 0.003 mg de Mg(NO ₃) ₂ en 10 µL de HNO ₃ 1% (v/v)			
Programa del horno de grafito				
Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tiempo permanencia (s)	Flujo de Ar (mL/min)
Secado	110	1	30	250
Secado	130	15	30	250
Mineralización	70	10	30	250
Atomización	1500	0	5	0
Limpieza	2450	1	3	250

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó aplicando el análisis de la varianza con un sólo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey HSD (SigmaPlot, versión 13.5). Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios sobre la capacidad de *Saccharomyces* de unir cadmio

La captación de Cd por parte de las levaduras es casi completa (82-100%) para todas las cepas ensayadas a la concentración de 0.1 mg/L (figura 2). Sin embargo, para la concentración más elevada (1 mg/L) hay diferencias entre cepas (figura 3). De modo que las cepas 2, 4 y 7 presentan retenciones que oscilan entre un 8-14%; mientras que las cepas 3, 8, 9 y 10 muestran captaciones más elevadas (medias: cepa 3: 41%; cepa 8: 57%; cepa 9: 86%; cepa 10: 51%). La reducción de la retención de Cd con el aumento de la concentración puede ser indicativa de que existe un mecanismo saturable implicado en esta retención.

La acumulación de metales en levaduras parece tener lugar a través de dos procesos con características bien diferenciadas. Hay una etapa inicial de acumulación rápida que no es dependiente del metabolismo, en la cual el catión metálico se une a los grupos cargados de la superficie de la levadura. A esta etapa le sigue un proceso de acumulación más lento, que depende del metabolismo celular y conlleva la internalización del metal (Suh et al., 1998). La pared celular de las levaduras se compone de varias capas que contienen numerosos grupos aniónicos. La capa interna, consistente en β -D-glucanos [β (1,3)- y β (1,6)-D-glucanos] y quitina, representa el 50-60% del peso seco de la pared. La capa externa está formada por manoproteínas altamente glicosiladas. Se ha identificado el papel de los fosfomananos y los grupos carboxílicos de las manoproteínas de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* en la unión de cationes metálicos (Seki et al., 2005). Asimismo, se han descrito algunos transportadores implicados en la internalización de los metales. Gomes et al. (2002) han evidenciado que Zrt1, un transportador de alta afinidad responsable de la absorción de Zn en levadura, también puede mediar la absorción de Cd. Este tipo de transporte mediado por transportador es, posiblemente, el que se satura cuando las incubaciones se realizan a concentraciones de Cd de 1 mg/L.

Independientemente del mecanismo de interacción Cd-levadura, los resultados obtenidos muestran que algunas cepas de *S. cerevisiae* (cepa 3, 8, 9 y 10) son eficaces captando Cd incluso a concentraciones elevadas y que por tanto podrían ser útiles para reducir la exposición poblacional a Cd o para ser empleadas como sistemas de bioremediación. En este sentido, ya se ha descrito la eliminación de Cd de zumos (Zhai et al., 2016) y de aguas residuales empleando microorganismos de uso alimentario como las bacterias lácticas.

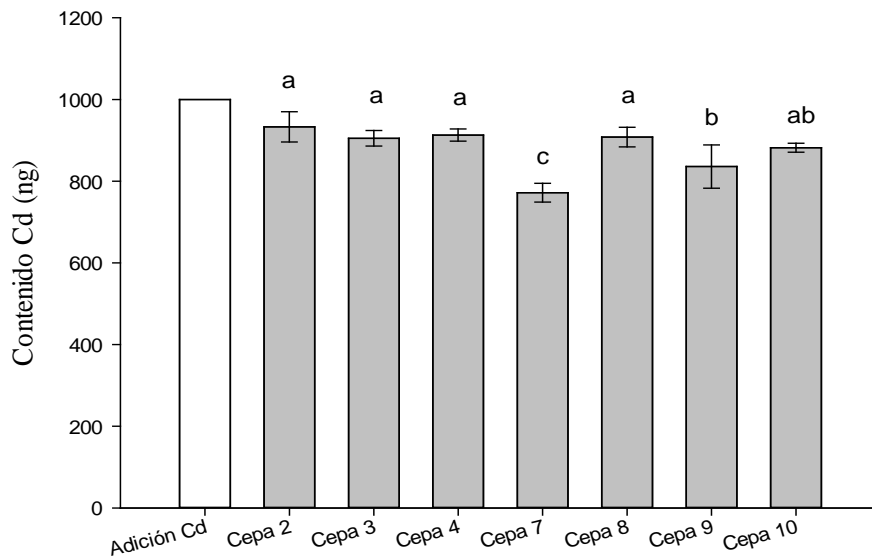


FIGURA 2. Captación de Cd (0.1 mg/L) por cepas de *S. cerevisiae*. Contenidos de Cd en el interior celular de levaduras tras 2 h de incubación a 37 °C con una disolución de Cd (0.1 mg/L). Valores expresados como ng de Cd (media \pm SD, n=3). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido intracelular entre cepas de levaduras.

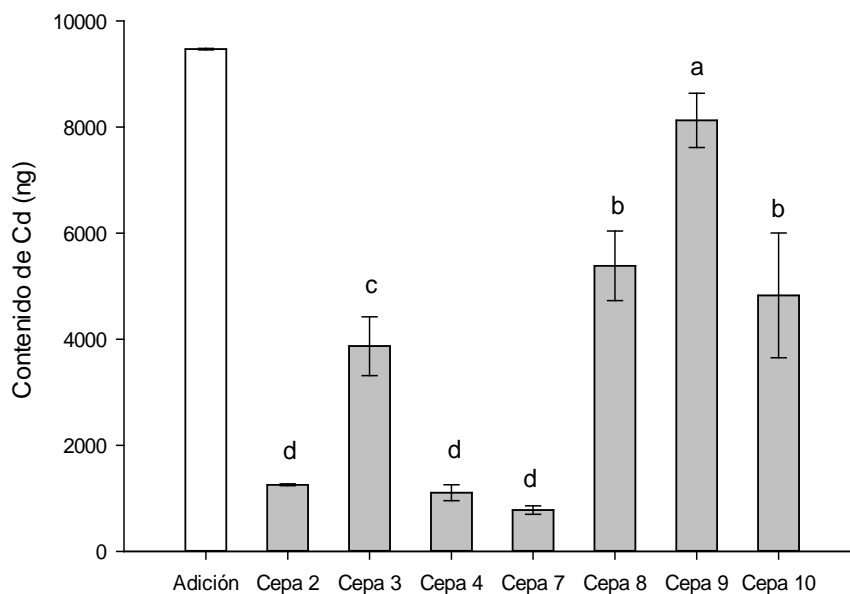


FIGURA 3. Captación de Cd (1 mg/L) por cepas de *S. cerevisiae*. Contenidos de Cd en el interior celular de levaduras tras 2 h de incubación a 37 °C con una disolución de Cd (1 mg/L). Valores expresados como ng de Cd (media \pm SD, n=3). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido intracelular entre cepas de levaduras.

Estudios sobre la capacidad de *Saccharomyces* de unir cadmio durante el proceso de digestión gastrointestinal. Reducción de la bioaccesibilidad

BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN DISOLUCIONES ACUOSAS

Las figuras 4 y 5 muestran la retención de Cd por las cepas de *S. cerevisiae* durante la digestión gastrointestinal de disoluciones acuosas de Cd de 0.1 mg/L y 1 mg/L respectivamente. Al igual que ocurría con las incubaciones, las retenciones son estadísticamente superiores a la concentración más baja (0.1 mg/L: 70-88%; 1 mg/L: 7-25%). En general, durante la digestión se observa una reducción de la retención de Cd por parte de las levaduras con respecto a las retenciones observadas en las incubaciones, especialmente para la concentración más alta (figuras 2 y 3).

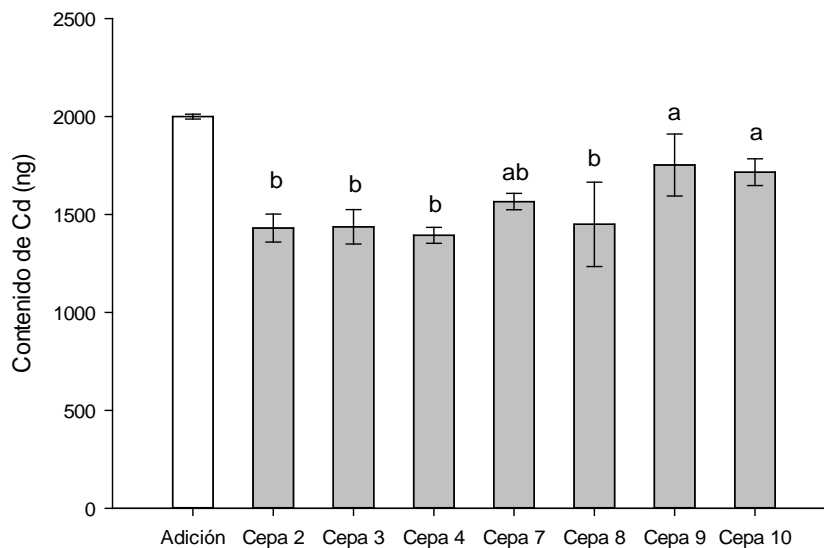


FIGURA 4. Retención de Cd por las levaduras durante la digestión gastrointestinal de disoluciones patrón de Cd (0.1 mg/L). Valores expresados como ng de Cd (media \pm SD, n=3). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido intracelular entre cepas de levaduras.

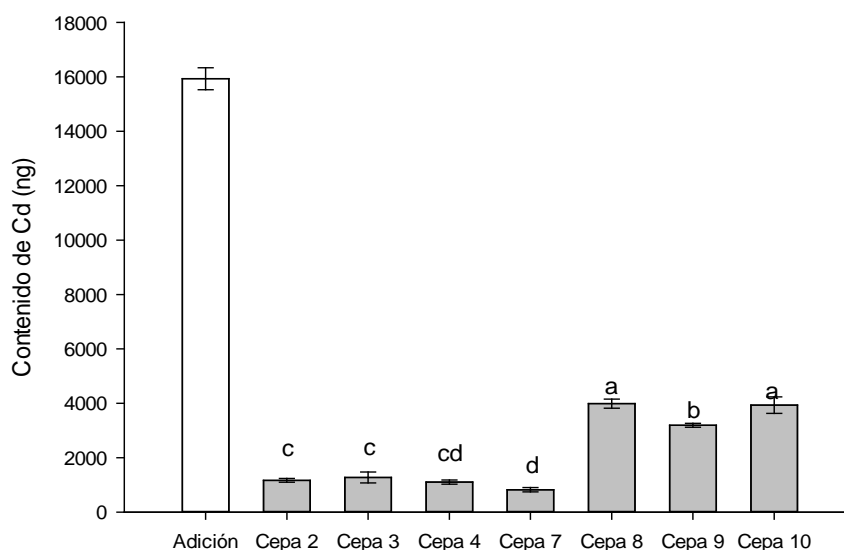


FIGURA 5. Retención de Cd por las levaduras durante la digestión gastrointestinal de disoluciones patrón de Cd (1 mg/L). Valores expresados como ng de Cd (media \pm SD, n=3). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido intracelular entre cepas de levaduras.

La menor retención durante la digestión gastrointestinal puede ser debida a las propias condiciones del proceso digestivo: variaciones de pH o presencia de actividades enzimáticas. Estas condiciones pueden variar la forma en la que se presenta el Cd en la fracción soluble o la carga neta de la superficie de la pared de la levadura, o pueden afectar los mecanismos de internalización por acción de los enzimas digestivos. Se requieren más estudios para identificar los factores responsables de esta menor retención. En cualquier caso, la retención a la concentración de Cd más baja es elevada y algunas cepas (8, 9 y 10) incluso mantienen una capacidad de retención importante a la concentración más elevada (20-25%). Este hecho sugiere que la presencia de las levaduras en el tracto digestivo puede reducir la bioaccesibilidad del Cd ingerido con agua y alimentos líquidos.

BIOACCESIBILIDAD DE CADMIO EN SETAS

La seta empleada en este estudio presenta contenidos de Cd (3.5 ± 0.4 mg/kg) por encima del valor límite propuesto por la legislación china (GB 2762-2012), único país que limita los contenidos en metales para todas las setas comestibles. En el caso del Cd, establece un contenido máximo de 0.2 mg/kg para setas frescas (2 mg/kg para setas deshidratadas) que se eleva a 0.5 mg/kg para la seta shiitake. Tras la digestión gastrointestinal un 28% del contenido (0.97 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$) es extraído de la matriz y está disponible para su absorción intestinal. La ingesta de una ración de 20 g de setas

deshidratadas supondría que 19.4 μg de Cd pueden estar disponibles para su posterior absorción intestinal.

La figura 6 muestra los contenidos de Cd solubilizados durante la digestión gastrointestinal de las setas en ausencia o presencia de varias cepas de *S. cerevisiae*. La adición de la levadura durante la digestión de setas no conlleva reducciones de la bioaccesibilidad de Cd.

Los resultados obtenidos indican que el Cd liberado durante la digestión de las setas no es retenido por las levaduras, al contrario de lo que ocurre cuando se digieren patrones acuosos de Cd en presencia de levaduras (figuras 4 y 5). Esta diferencia puede ser debida a la composición de la matriz o a la forma en la que se encuentra el Cd en las setas. La interacción a superficie y la internalización de Cd pueden verse afectadas por la presencia de otros minerales que compitan por estos mecanismos. Tal y como se ha indicado previamente, el Cd se internaliza por transportadores de otros minerales como el Zn; por tanto, en presencia de estos elementos, la entrada de Cd puede ser menor. De la misma manera la interacción en superficie también puede verse reducida en presencia de otros elementos catiónicos como el calcio (Ca), Zn o magnesio (Mg), los cuales también pueden unirse a los grupos cargados negativamente de la superficie de *Saccharomyces*. Por otro lado, el Cd puede estar en la matriz alimentaria unido a moléculas con grupos tiol (Ding et al., 2015) y en esta forma puede que su interacción con las levaduras no sea tan eficaz. Son necesarios más estudios para determinar los factores que afectan la interacción Cd-levaduras cuando el Cd forma parte de la seta. Esta baja eficacia en la interacción podría tal vez mejorar aumentando la cantidad de levaduras empleada; por otra parte, podría no ser útil para esta matriz, pero las levaduras podrían ser capaces de reducir la bioaccesibilidad en otras matrices consideradas problemáticas en lo que al Cd se refiere.

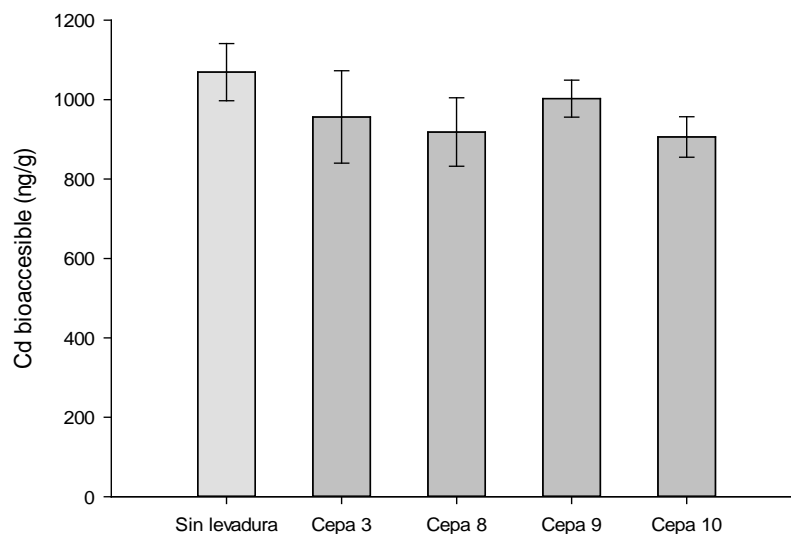


FIGURA 6. Contenido de Cd bioaccesible tras aplicar a muestras de setas una digestión gastrointestinal en ausencia o presencia de *S. cerevisiae* (4 OD). Valores expresados como ng Cd/g seta (media \pm SD; n=3).

Estudios sobre la capacidad de *S. cerevisiae* de disminuir el transporte intestinal *in vitro* de cadmio

La captación de Cd observada por las levaduras durante la digestión de disoluciones acuosas de Cd debería conllevar una reducción de la entrada de este metal a la circulación sistémica cuando se ingiere con agua o alimentos líquidos. Para evaluar este punto se ha analizado el transporte a través de células intestinales de disoluciones acuosas de Cd en ausencia y presencia de las cepas más efectivas (cepas 8, 9 y 10).

Todos los tratamientos ensayados presentan valores de P_{app} de LY y de RET dentro de los límites considerados válidos (datos no mostrados), por tanto, consideramos que las condiciones de ensayo no suponen alteraciones de la integridad de la monocapa celular. Tras el tratamiento de las células con las disoluciones de Cd (0.75 mg/L) en presencia de las cepas de levaduras testadas se observa una reducción significativa del P_{app} respecto al obtenido en ausencia de los microorganismos (61-73%) (figura 7).

Las reducciones del P_{app} de Cd pueden estar relacionadas con la capacidad de quelar este metal por parte de las cepas de *S. cerevisiae*, lo que conlleva una menor cantidad de Cd disponible para la absorción por las células intestinales. Por tanto, la interacción se traduce en una menor absorción cuando el Cd es vehiculado con el agua.

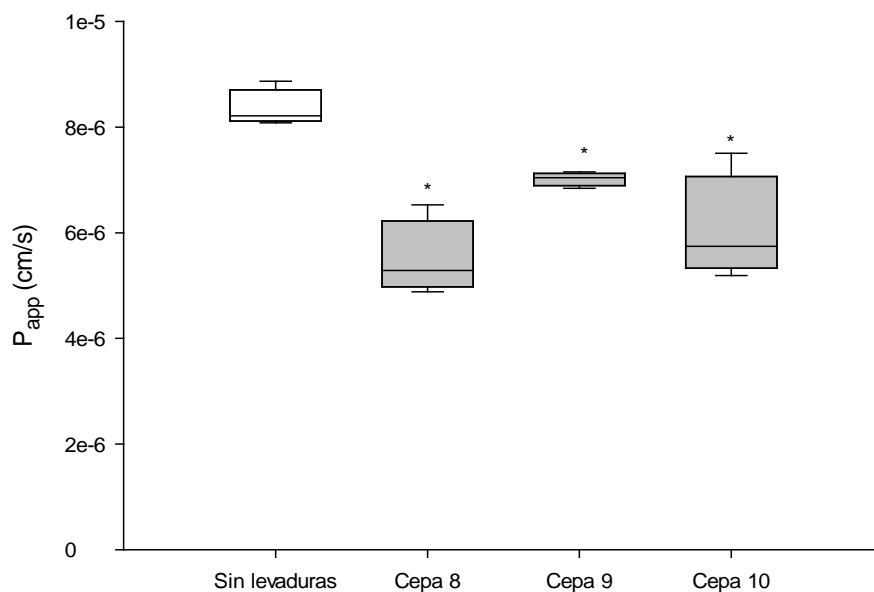


Figura 7. Efecto de las levaduras sobre el transporte de Cd en disolución acuosa. Las barras representan los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de monocapas intestinales expuestas a Cd (0.75 mg/L) en ausencia o presencia de cepas de *S. cerevisiae* (1 OD). Valores expresados en cm/s (media \pm SD. n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al transporte realizado sin levaduras ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten concluir que:

- Las levaduras del género *Saccharomyces* ensayadas tienen capacidad para adsorber/captar Cd en un amplio rango de concentraciones (0.1-1.0 mg/L), si bien son más efectivas a las concentraciones más bajas.
- La reducción de la retención de Cd con el aumento de la concentración puede ser indicativo de que existe un mecanismo saturable implicado en la retención, posiblemente un transportador.
- La capacidad de unión de las levaduras al Cd también se observa durante la digestión gastrointestinal de disoluciones acuosas, si bien estas retenciones son inferiores a las observadas durante la incubación. Este hecho sugiere que la presencia de las levaduras en el tracto digestivo puede reducir la bioaccesibilidad del Cd ingerido con agua y alimentos líquidos.
- La capacidad de reducción de la bioaccesibilidad no se pone de manifiesto en muestras de setas. Esto puede depender de factores relacionados con la matriz alimentaria y no tiene por qué ser aplicable a todos los alimentos con altos contenidos de Cd.
- La retención del Cd presente en disolución acuosa por las levaduras se traduce en un menor transporte de este metal a través de las células intestinales en un modelo *in vitro*. Este hecho sugiere que las levaduras podrían reducir la absorción intestinal del Cd vehiculado con agua o alimentos líquidos.
- Estos efectos *in vitro* de las levaduras podrían verse modificados *in vivo* debido a la composición e interacciones existentes en el lumen intestinal, más complejas que las emuladas con la digestión *in vitro* y los cultivos celulares. Por tanto, son necesarios estudios *in vivo* para confirmar lo hallado en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a Dios por haberme permitido cursar este año de preparación profesional exitosamente.

Gracias al apoyo de mis padres y hermana en todo momento, por el empuje y energía durante este trayecto y en todo momento tener fe en mí. Pero sobre todo gracias al equipo de investigación de este proyecto en especial a mis tutoras Vicenta Devesa y Dinoraz Vélez de quienes recibí todo el conocimiento, apoyo, soporte y disposición para poder realizar este trabajo. También a mi compañera y amiga Sandra Amor que fue de gran apoyo durante la realización de esta investigación día a día.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2015-68920-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

REFERENCIAS

- Almela, C.; Algora, S.; Benito, V.; Clemente, M.J.; Devesa, V.; Suñer, M.A.; Velez, D.; Montoro, R. 2002. Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(4)**:918-923.
- Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Charbonnier, L.; Mesnil, A.; Rainbow, P.S.; Wang, W.X. 2008. Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology*, **46(6)**: 2010-2022.
- Bendell, L.I. 2009. Survey of levels of cadmium in oysters, mussels, clams and scallops from the Pacific Northwest coast of Canada. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, **2(2)**: 131-139.
- Berglund, M.; Akesson, A.; Nermell, B.; Vahter, M. 1994. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environmental Health Perspectives*, **102(12)**:1058-1066.
- Berglund, M.; Akesson, A.; Nermell, B.; Vahter, M. 2000. Metal-bone interactions. *Toxicology Letters*, **112–113(15)**:219-225.
- Bernhoft, R.A. 2013. Cadmium toxicity and treatment. *Scientific World Journal*, **2013(7)**:394652.
- Dawczynski, C.; Schäfer, U.; Leiterer, M.; Jahreis, G. 2007. Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(25)**:10470-10475.
- Ding, X.; Hua, Y.; Chen, Y.; Zhang, C.; Kong, X. 2015. Heavy metal complexation of thiol-containing peptides from soy glycinin hydrolysates. *International Journal of Molecular Science*, **16(4)**:8040-8058.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Cadmium in food. Scientific opinion of the panel on contaminants (Question No EFSA-Q-2007-138). *EFSA J*, **80**:139 pp.
- EU 488/2014. COMMISSION REGULATION (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. Official Journal of the European Union L 138/75-79.
- Eisenhans, B.; Strugala, G.J.; Schäfer, S.G. 1997. Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Human Experimental Toxicology*, **16(8)**:429-434.
- Flanagan, P.R.; McLellan, J.S.; Haist, J.; Cherian, G.; Chamberlain, M.J.; Valberg, L.S. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology*, **74(5)**:841-846.
- GB 2762-2012. Maximum levels of contaminants in food. National Food Safety Standard. Ministry of Health of the People's Republic of China.
- Gomes, D.S.; Fragoso, L.C.; Riger, C.J.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1573(1)**:21-25.
- Hidalgo, I.J.; Raub, T.J.; Borchardt, R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96(3)**:736-749.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*, vol. 58, Lyon.
- IARC (International Agency for the Research on Cancer), 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. A review of human carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, vol. **100C**:121-141, Lyon.
- Jadán-Piedra, C.; Alcántara, C.; Monedero, V.; Zúñiga, M.; Vélez, D.; Devesa, V. 2017. The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry*, **228**:158-166.
- Järup, L.; Hellström, L.; Alfvén, T.; Carlssone, M.D.; Grubb, A.; Persson, B.; Pettersson, C.; Spång, G.; Schütz, A.; Elinder, C.G. 2000. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occupational Environmental Medicine*, **57(10)**:668-672.
- Kalač, P.; Svodoba, L. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, **69**: 273-281.

- Matović, V.; Buha, A.; Bulat, Z.; Đurić-Čosić, D. 2011. Cadmium toxicity revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **62(1)**:65-76.
- Mounicou, S.; Szpunar, J.; Andrey, D.; Blake, C.; Lobinski, R. 2003. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives and Contaminants*, **20(4)**:343-352.
- Park, J.D.; Cherrington, N.J.; Klaassen, C.D. 2002. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicological Science*, **68(2)**:288-294.
- Revis, N.W.; Osborne, T.R. 1984. Dietary protein effects on cadmium and metallothionein accumulation in the liver and kidney of rats. *Environmental Health Perspectives*, **54**:83-91.
- Seki, H.; Suzuki, A.; Maruyama, H. 2005. Biosorption of chromium (VI) and arsenic (V) onto methylated yeast biomass. *Journal of Colloid and Interface Science*, **281(2)**:261-266.
- Suh, J.H.; Kim, D.S.; Yun, J.W.; Song, S.K. 1998. Process of Pb²⁺ accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, **20(2)**:153-156.
- Thompson, J.; Bannigan, J. 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, **25(3)**:304-315.
- Vahter, M.; Berglund, M.; Nermell, B.; Akesson, A. 1996. Bioavailability of cadmium from shellfish and mixed diet in women. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **136(2)**:332-341.
- Villa, J.E.; Peixoto, R.R.; Cadore, S. 2014. Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62(34)**:8759-8763.
- Volesky, B.; May, H.; Holan, Z.R. 1993. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Bioengineering*, **41(8)**:826-829.
- Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, **192(2-3)**:95-117.
- Wang, J.; Chen, C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology Advances*, **24(5)**:427-451.
- Zhai, Q.; Wang, G.; Zhao, J.; Liu, X.; Tian, F.; Zhang, H.; Chen, W. 2013. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, **79(5)**:1508-1515.
- Zhai, Q.; Tian, F.; Wang, G.; Zhao, J.; Liu, X.; Cross, K.; Zhang, H.; Narbad, A.; Chen, W. 2016. The cadmium binding characteristics of a lactic acid bacterium in aqueous solutions and its application for removal of cadmium from fruit and vegetable juices. *RSC Advances*, **6(8)**:5990-5998.