



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Resposta à atrazina por *S. cerevisiae* UE-ME₃
e *S. cerevisiae* W303**

Rita Ferreira Nunes

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Resposta à atrazina por *S. cerevisiae* UE-ME₃
e *S. cerevisiae* W303**

Rita Ferreira Nunes

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Quadros	iv
Agradecimentos.....	v
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Fundamento Teórico.....	1
1.1. Indutores de stress oxidativo	1
1.1.1. Atrazina	1
1.1.2. Ácido acético	5
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo celular.....	6
1.3. As espécies reativas de oxigénio e o stress oxidativo.....	8
1.4. Combate ao stress oxidativo.....	14
1.5. Danos celulares.....	21
2. Problema e Objetivos.....	27
2.1. Problema	27
2.2. Objetivos gerais.....	28
2.3. Objetivos específicos.....	28
3. Metodologia	31
3.1. Estratégia	31
3.2. Diagrama do Trabalho	33
3.3. Procedimento Experimental.....	34
3.3.1. Material biológico e obtenção das culturas de células	34
3.3.2. Fracionamento celular.....	34
3.3.3. Determinação de conteúdos das frações celulares.....	35
3.3.3.1. Proteínas	35

3.3.3.2.	Malonodialdeído (MDA)	35
3.3.3.3.	Espécies reativas de oxigénio (ROS)	36
3.3.3.4.	Glutationo e dissulfureto de glutationo (GSH e GSSG).....	37
3.3.3.5.	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*)	38
3.3.3.6.	Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP).....	39
3.3.4.	Determinação de atividades enzimáticas das frações celulares	39
3.3.4.1.	Superóxido dismutase (SOD)	39
3.3.4.2.	Catalase A e T (CTA1 e CTT1).....	40
3.3.4.3.	Ascorbato peroxidase (APx)	41
3.3.4.4.	Glutationo peroxidase (GPx).....	41
3.3.4.5.	Glutationo redutase (GR).....	42
3.3.4.6.	Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	42
3.3.4.7.	Fosfatase alcalina (ALP).....	43
3.4.	Equipamento	45
3.5.	Reagentes	45
4.	Resultados e Discussão	47
5.	Conclusões.....	59
6.	Referências Bibliográficas	63
ANEXOS.....		73

Índice de Figuras

Fig. 1.1. Representação estrutural da atrazina.....	2
Fig. 1.2. Representação esquemática da ação da atrazina ao nível dos cloroplastos... 2	2
Fig. 1.3. Representação estrutural de dois metabolitos da atrazina	4
Fig. 1.4. Representação esquemática da ação da atrazina ao nível da cadeia transportadora de eletrões do mitocôndrio.....	5
Fig. 1.5. Representação estrutural do ácido acético.....	5
Fig. 1.6. Fatores exógenos e endógenos que levam à produção de ROS e respetivas respostas celulares.....	11
Fig. 1.7. Reação do DPPH.....	12
Fig. 1.8. Reação do FRAP	14
Fig. 1.9. Mecanismo catalítico do enzima GPx	17
Fig. 1.10. Interação dos enzimas SOD e CAT com o ciclo do glutathione.....	19
Fig. 1.11. Interação ciclo do ascorbato - ciclo do glutathione	20
Fig. 1.12 Esquema de reações ocorridas no processo de peroxidação lipídica.....	22
Fig. 4.1. Curvas de crescimento e sobrevivência de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e W303. ...	49
Fig. 4.2. Representação gráfica das cfu (A) e atividade enzimática ALP (B).....	50
Fig. 4.3. Conteúdo em tióis totais não-proteicos (A), GSH (B) e GSSG (C)	52
Fig. 4.4. Razão GSH/GSSG (A) e conteúdo em FRAP (B) e DPPH (C).....	53
Fig. 4.5. Conteúdo em ROS (A) e MDA (B).....	55
Fig. 4.6. Atividades dos enzimas SOD (A), APx (B), GPx (C), G6PD (D) e GR (E)	57
Fig. 4.7. Atividades dos enzimas CTT1 (A) e CTA1 (B)	58
Fig. A1. Representação gráfica da curva de calibração para quantific de proteínas ...	75
Fig. A2. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA... 75	75
Fig. A3. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS... 75	75
Fig. A4. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH... 76	76
Fig. A5. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG 76	76
Fig. A6. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de DPPH. 76	76
Fig. A7. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de FRAP . 77	77

Fig. A8. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática SOD	77
Fig. A19. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTA1 ..	78
Fig. A10. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTT1 ..	79
Fig. A11. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática APx	79
Fig. A12. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GPx.....	80
Fig. A13. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR	81
Fig. A14. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD .	81
Fig. A15. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP ...	82

Índice de Quadros

Quadro 1.1. Classificação taxonómica da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Quadro A1. Resultados da análise de variância (modelo – “ANOVA I”)	83

Agradecimentos

Aproxima-se o fim de mais uma etapa na minha vida, a qual não teria sido possível sem a enorme ajuda que tive. Um especial agradecimento ao Professor Doutor Rui Ferreira e à Professora Doutora Isabel Alves-Pereira, os meus orientadores nesta dissertação, por todo o conhecimento que me transmitiram ao longo deste projeto, pelo apoio e disponibilidade, proporcionando-me sempre o melhor ambiente e as melhores condições para a execução deste trabalho.

Gostaria também de agradecer ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) e à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do estágio. Agradeço também ao Departamento de Química da Universidade de Évora pelo apoio e pelas infraestruturas e equipamento disponibilizados.

Agradeço aos meus pais Rui Nunes e Paula Nunes, pois foram os pilares essenciais ao longo de todo o meu percurso académico, tendo sempre uma palavra amiga nos momentos difíceis da minha vida. Agradeço também à minha irmã Mariana e a toda a minha família pelo apoio que me têm dado ao longo de todos estes anos.

Um especial agradecimento ao meu amigo Hugo Tenda, pela ajuda incondicional ao longo do meu percurso académico. Agradeço toda a sua paciência e apoio prestado, tendo sempre uma palavra de conforto, ajudando-me muito nos momentos mais desesperantes da minha vida.

Por fim agradeço aos amigos e colegas no laboratório, com um especial agradecimento à Joana Pavoeiro e Cátia Roque pela amizade demonstrada ao longo destes anos.

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

ALP	Fosfatase Alcalina (EC 3.1.3.1)
APx	Aspartato Peroxidase (EC 1.11.1.11)
ATP	Adenosina trifosfato
ATZ	Atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina)
Cfu	Unidades formadoras de colónias
CO ₂	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q ou Ubiquinona
CTA1	Catalase A (EC 1.11.1.6)
CTT1	Catalase T (EC 1.11.1.6)
DCFH	2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
DEA	Dietilatrazina
DEDIA	Desetildi-isopropilatrazina
DEHA	Desetilhidroxiatrazina
DHA	Desidroascorbato
DHAR	Desidroascorbato redutase (EC 1.8.5.1)
DIA	Di-isopropilatrazina
DL ₅₀	Dose Letal 50
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUROSCARF	Do ingles, <i>EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional Analysis</i>
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina (forma oxidada)
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina (forma reduzida)
FRAP	Poder Antioxidante Redutor do Ferro
G6P	Glucose-6-fosfato
G6PD	Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GPx	Glutationo Peroxidase (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo Redutase (EC 1.6.4.2)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>Generally Regarded As Safe</i> (FDA, USA)
GSH	Glutationo (γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina)
GSSG	Dissulfureto de glutationo
GSTs	Glutationo S-transferases

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HÁ	Hidroxiatrazina
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50
IUPAC	Do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
MDA	Malonodialdeído
MDHA	Monodesidroascorbato
MDHAR	Monodesidroascorbato redutase (EC 1.6.5.4)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	Óxido nítrico
O	Oxigénio
O ₂	Dioxigénio
OPT	o-fetaldeído
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PQ	Plastoquinona
PS II	Fotossistema II
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SDS	Duodecilssulfato de sódio
SO ₂	Dióxido de enxofre
SOD	Superóxido Dismutase 1 (EC 1.15.1.1)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TUNEL	Do inglês, <i>TdT mediated dUTP nick end labeling</i>
USEPA	Do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
YPD	Do inglês <i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Resumo

O herbicida atrazina é considerado um poluente orgânico persistente pela sua parca degradação química e biológica, concentrando-se ao longo da cadeia alimentar humana. Embora de aplicação agrícola interdita em diversos países, permanece um problema de saúde ambiental devido à circulação de produtos alimentares. Assim, procurou-se avaliar os efeitos da atrazina (50 µM) no crescimento celular e resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados confirmaram a toxicidade do xenobiótico para a estirpe nativa UE-ME₃, atenuando o seu crescimento e sobrevivência celular aos 200 min de exposição. O perfil de resposta, à triazina e ao ácido acético (50 mM), em termos de conteúdo em glutatióno e espécies reativas de oxigénio ou de atividades enzimáticas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatióno peroxidase, glutatióno redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase e catalase peroxissomal, na estirpe nativa foi semelhante, embora parcialmente sobreponível com o detetado em células W303 onde o ácido acético é descrito como indutor de apoptose.

Response to atrazine by *S. cerevisiae* UE-ME3 and *S. cerevisiae* W303

Abstract

The atrazine herbicide is considered a persistent organic pollutant due his meager chemical and biological degradation, concentrating along the human food chain. Although their agricultural application is prohibited in many countries, remains an environmental health problem due to the food circulation. Thus, we sought to evaluate the effects of atrazine (50 mM) on cell growth and antioxidant response of *Saccharomyces cerevisiae*. The results confirmed the xenobiotic toxicity to the native strain UE-ME₃, diminishing its growth and cell survival until 200 min of exposure. The response profile to triazine and 50 mM acetic acid, in terms of content in glutathione and reactive oxygen species or enzyme activities superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and peroxisomal catalase was similar in the wild-type strain, though partly overlapping with the detected in the W303 cells where acetic acid has been described as an inducer of apoptosis.

1. Fundamento Teórico

1.1. Indutores de stress oxidativo

1.1.1. Atrazina

Os produtos fitofarmacêuticos são cada vez mais utilizados na agricultura para suprir as necessidades da população humana, uma vez que estes produtos exercem efeitos benéficos nas culturas, em termos da sua preservação e produtividade. Devido a serem bastante económicos são muitas vezes utilizados de forma abusiva, com consequências graves para a saúde pública, como o despoletar neoplasias, efeitos teratogénicos e disfunção hormonal (Belleville, 2004; Braconi, 2008; Baxter, 2013).

Entre os diversos produtos fitofarmacêuticos utilizados atualmente, destacam-se os herbicidas. O desenvolvimento de herbicidas sintéticos e a sua utilização na agricultura tem aumentado ao longo dos últimos 50 anos, pois estes desempenham um papel muito importante no controlo de infestantes. Uma das consequências desta excessiva utilização de produtos químicos é o escoamento de águas de superfície das terras agrícolas para os habitats de água doce, prejudicando assim o crescimento de animais aquáticos (McCarthy, 2008). Por esse motivo, a necessidade de se conhecer melhor o comportamento e/ou destino dos herbicidas nos diversos ecossistemas tem aumentado. O destino de um herbicida no ambiente depende de vários fatores tais como, o solo, as propriedades físico-químicas da molécula, as condições climáticas, a atividade e especificidade da população microbiana presente no solo, a dose utilizada e a época de aplicação (Peixoto, 2000; Astiz, 2011).

A classe de produtos fitofarmacêuticos denominada por triazinas é composta por inúmeros compostos que são amplamente utilizados na agricultura como herbicidas de pré e pós-emergência, seletivos para o controle de ervas daninhas de folha larga e de gramíneas anuais em culturas de milho, sorgo e produção de cana-de-açúcar. São produtos de elevada toxicidade e persistência, podendo contaminar o meio ambiente e as culturas (El Bestawy, 2013; Fang, 2014).

A atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$, ATZ), ou 6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (fig. 1.1) é um composto da família das triazinas que foi sintetizado pela primeira vez em 1958 nos laboratórios Geigy. A atrazina é o princípio ativo de muitos herbicidas utilizados atualmente e, por isso, possui um elevado potencial de estudo. Como se pode observar através da figura 1.2, a atrazina atua inibindo a fotossíntese no cloroplasto, bloqueando o fluxo de eletrões entre o fotosistema II (PS II) e a plastoquinona (PQ) (Baxter, 2013; Jin, 2014). O complexo PSII utiliza a radiação eletromagnética para oxidar a água, tendo como resultado desta reação a libertação de eletrões, que vão

contribuir para gerar um gradiente eletroquímico de prótons, sendo estes indispensáveis à síntese de adenosina trifosfato (ATP) e de equivalentes redutores, como o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (Arora, 2002). A atrazina, ao inibir o transporte de elétrons entre o PS II e a PQ, vai inibir a conversão de energia radiante em energia química, impedindo deste modo a síntese de ATP e de equivalentes redutores, como o NADPH, os quais são indispensáveis ao ciclo de Calvin, ou seja, impedindo a fixação do carbono e a síntese de compostos carbonados orgânicos a partir de carbono inorgânico (Takahashi, 2005; He, 2012; Baxter, 2013).

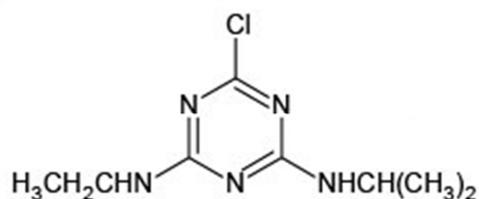


Fig. 1.1. Representação estrutural da atrazina (ou 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina). (Adaptado de Mendas, 2012)

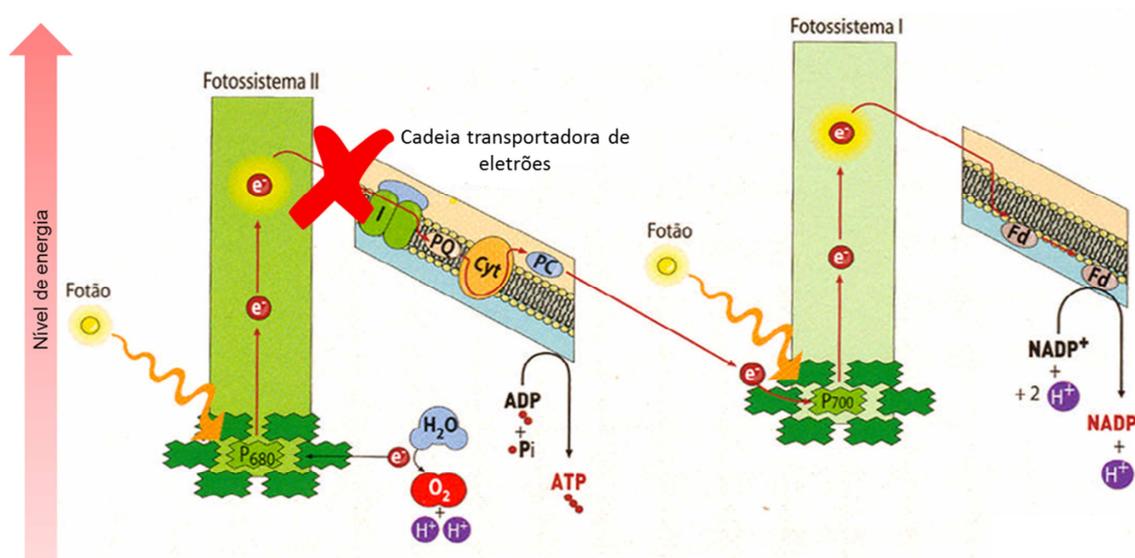


Fig. 1.2. Representação esquemática da ação da atrazina ao nível dos cloroplastos. (Adaptado de Baxter, 2013)

A atrazina possui massa molar de 215,69 g/mol, densidade de 1,23 g/cm³ a 22 °C, solubilidade em água de 33 mg/L a uma temperatura entre 20 e 25 °C, ponto de fusão entre 175 e 177 °C, ponto de ebulição de 205 °C, pressão de vapor de 3,0x10⁻⁷ mmHg à temperatura de 20 °C, constante de acidez (pKa) de 1,7, e coeficiente de partição octanol/água (k_{ow}) de 2,6. A atrazina é um composto polar, fracamente básico, sendo a sua estabilidade explicada pela configuração eletrônica do seu anel heterocíclico. Este composto é solúvel em solventes orgânicos, tais como o éter, a

acetona, o benzeno, o clorofórmio, o etanol e o acetato de etilo. Estudos mostram que o valor de dose letal 50 (DL₅₀) da atrazina em ratos é de 3080 mg/kg (Hanioka, 1998; Javaroni, 1999). A bibliografia refere ainda que o valor de concentração inibitória 50 % (IC₅₀) é de 0,014 µM para a levedura *Pichia pastoris*. (Lange, 2001).

Devido ao seu pka de 1,7, e ao facto de a parede celular das plantas apresentar um ambiente ácido, a atrazina possui maior facilidade para atravessar esta estrutura celular. Ao fazê-lo, o herbicida depara-se com a membrana citoplasmática, o último obstáculo antes de alcançar o citoplasma, onde poderá difundir-se até aos seus locais de ação. Apesar do seu carácter ácido que dificulta a sua passagem pelos sistemas membranares, onde o pH é próximo do neutro, a difusão simples da atrazina nesses sistemas é facilitada pelo seu elevado carácter lipofílico ($K_{ow}=2,6$). No interior celular (pH \approx 7,1) a atrazina ao ser ionizada estimula um fenómeno denominado “*ion trapping*” caracterizado pelo bombeamento de H⁺ por ATPases, do meio intracelular para o meio extracelular, de modo a manter o pH citoplasmático estável. A ionização da atrazina aumenta deste modo a exportação de prótons para o exterior celular, gerando uma força protomotriz que irá incrementar o seu influxo para o interior celular, e conseqüente acumulação endógena. Este fenómeno beneficia a ação dos herbicidas que atuam ao nível do fotosistema II, uma vez que a fotossíntese torna o pH do estroma alcalino (pH \approx 8,0), aumentando a ionização da atrazina e potenciando o fenómeno de “*ion trapping*”, facilitando a absorção do herbicida e potenciando o seu efeito.

Como referido anteriormente, a atrazina é muito utilizada no controlo de infestantes, e o seu tempo de meia vida varia entre 2 meses a 6 anos, dependendo das condições do meio onde se encontra. O primeiro mecanismo de dissipação deste composto no ambiente é a degradação biológica (Radosevich, 1995). Algumas plantas, animais e microrganismos metabolizam as clorotriazinas maioritariamente pelos enzimas do sistema citocromo P450 (CYP450), podendo levar à formação de diversos compostos hidroxilados e clorados, metabolitos bastante resistentes no ambiente, como por exemplo, a hidroxiatrazina (HA), a dietilatrazina (DEA) (fig. 1.3), a di-isopropilatrazina (DIA), a desetildi-isopropilatrazina (DEDIA), a desetilhidroxiatrazina (DEHA), entre outros, designados como POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes). Estes metabolitos diferem nos seus graus de toxicidade e tempo de meia vida, sendo este superior a um ano no solo e aproximadamente o dobro na água (Radosevich, 1995; Giddings, 2005; Ávila, 2009). É de referir que a ATZ pode também ser metabolizada pelos enzimas glutatióno S-transferases (GSTs) (Ross, 2006).

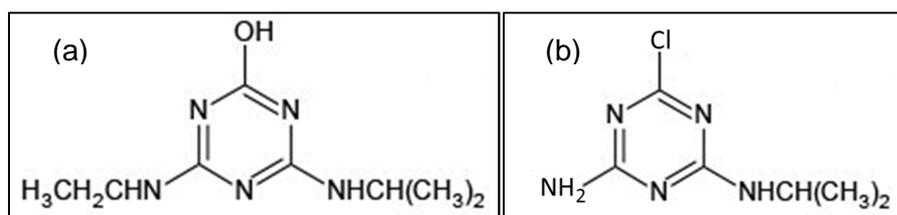


Fig. 1.3. Representação estrutural de dois metabolitos da atrazina: (a) Hidroxiatrazina, (b) Dietilatrazina.
(Adaptado de Hanioka, 1998)

A utilização abusiva de atrazina e a sua mobilidade no solo tem contribuído para a frequente deteção de níveis acima do limite permitido em águas de superfície, subterrâneas e pluviais em todo o mundo. Devido à sua elevada persistência ambiental e ao enorme potencial para contaminar reservas de água para consumo humano, a aplicação da atrazina foi proibida na União Europeia, nos Estados Unidos da América e no Japão. Como este fitofármaco é um composto de elevada toxicidade, foram estabelecidos limites máximos permitidos de atrazina em águas para consumo humano, sendo estes de 3,0 µg/L nos Estados Unidos da América (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) e 0,1- 0,5 µg/L na Europa (Comissão Europeia) (Radosevich, 1995; Ávila, 2009; Vonberg, 2014). Em países em que a utilização de atrazina não foi proibida, como os de África e da América do Sul, os níveis máximos admitidos são entre 0,6-2,7 µg/L (Armas, 2007). Mesmo em países onde a aplicação deste herbicida se encontra restringida, continua a haver contacto entre os seres humanos e a atrazina, devido essencialmente à globalização e à elevada exportação de produtos alimentares entre países onde a utilização do herbicida é permitida e outros em que esta é proibida, facto que torna o contacto entre os animais, incluindo o Homem, e a atrazina muito elevado. Embora não realizem a fotossíntese como o que acontece nas plantas, estes seres vivos possuem estruturas celulares com sistemas de transporte de eletrões, como é o caso da cadeia respiratória localizada na membrana interna do mitocôndrio (Menezes, 2014). Assim, a atrazina poderá atuar ao nível destas estruturas, nomeadamente entre o complexo II e a ubiquinona, também designada por coenzima Q (CoQ), impedindo a sua atividade normal, levando, deste modo, à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que em algumas situações, poderá despoletar stress oxidativo, provocando danos ao nível das estruturas celulares (fig. 1.4).

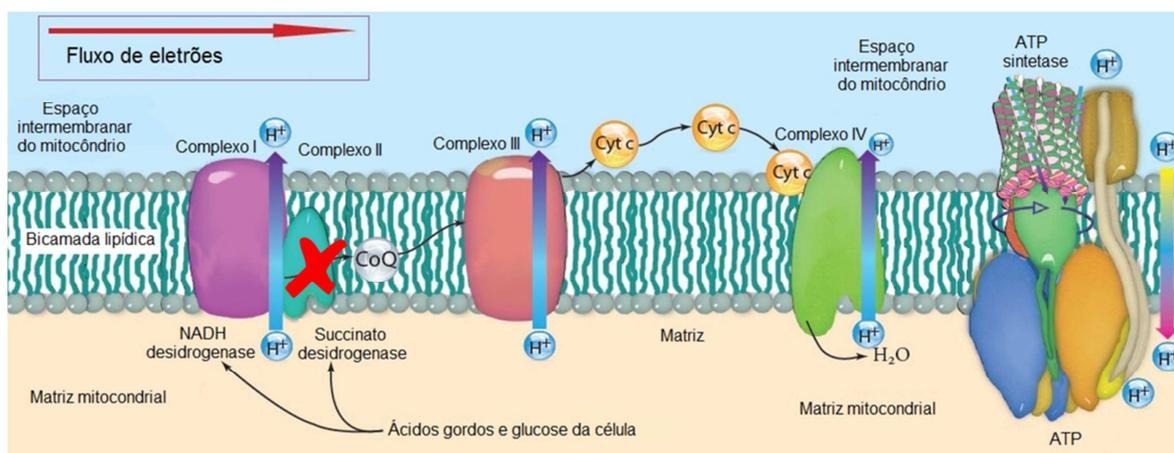


Fig. 1.4. Representação esquemática da ação da atrazina ao nível da cadeia transportadora de elétrons do mitocôndrio. (Adaptado de Menezes, 2014)

Os efeitos adversos da atrazina e dos seus metabolitos para a saúde em mamíferos ainda não estão bem esclarecidos. Estudos com ratos Sprague-Dawley, mostraram que a exposição dietética a estes compostos levou a uma maior incidência de tumores mamários precoces, estando estes associados à indução da senescência prematura reprodutiva, criando assim um ambiente conducente ao crescimento do tumor (Hanioka, 1998; Adesiyani, 2011).

1.1.2. Ácido acético

O ácido acético (CH_3COOH) (fig. 1.5), também designado por ácido etanóico (IUPAC), é um ácido monocarboxílico alifático, com massa molar de 60,04 g/mol, densidade 1,049 g/cm³ no estado líquido e 1,266 g/cm³ no estado sólido, ponto de fusão de 16,5 °C, ponto de ebulição de 118 °C, e pK a de 4,75 a 25 °C, miscível em água em todas as proporções e viscosidade de 1,22 mPa/s a 25 °C. Apresenta uma DL₅₀ de 3310 mg/kg em rato, quando administrado oralmente (Goldberg, 2002).

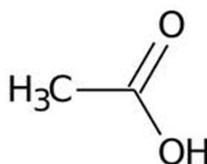


Fig. 1.5. Representação estrutural do ácido acético. (Adaptado de Goldberg, 2002)

É considerado um ácido fraco, que inibe o crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae*. No meio ambiente, as leveduras *S. cerevisiae* coabitam com bactérias acéticas que utilizam o etanol proveniente da fermentação alcoólica, efetuada pela levedura, para a produção de ácido acético. Para neutralizar os efeitos dos ácidos fracos como o ácido acético, as leveduras desenvolvem respostas ao

stress, que atuam de forma a impedir a acumulação de níveis elevados destes ácidos no interior celular, potencialmente tóxicos (Giannattasio, 2005).

Neste contexto, tem sido descrito que o ácido acético (20-80 mM) comporta-se como indutor de morte em células de *S. cerevisiae* W303 em fase exponencial do crescimento, exibindo características de processo ativo de morte tais como condensação da cromatina ao longo do invólucro nuclear, exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana do plasma, e ocorrência do fenótipo TUNEL positivo (do inglês, *TdT mediated dUTP nick end labeling*, um método para detetar apoptose). Outras publicações associam uma via metabólica mitocondrial à morte celular induzida pelo ácido acético em células de *S. cerevisiae* W303 crescidas até à fase estacionária. Nas condições acima descritas observou-se, em células apoptóticas, a libertação de citocromo c mitocondrial para o citoplasma e geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Giannattasio, 2005). Apesar de alguns marcadores de apoptose poderem ser detetados na presença de ácido acético na concentração de 120 mM, alguns autores sugerem que a morte celular por necrose é predominante em células expostas durante 200 min, a níveis de ácido acético superiores a 80 mM. Esta hipótese fundamenta-se em:

1. A mortalidade até 120 mM (ou mais) não é significativamente inibida pela cicloheximida (um inibidor da síntese proteica em eucariontes);
2. A percentagem de células com marcadores apoptóticos, induzida pelo aumento das concentrações do ácido, aumenta com tratamentos até 80 mM de ácido e, em seguida, diminui;
3. A percentagem de células com alterações ultra-estruturais típicas de necrose é mais elevada e muito extensa em amostras tratadas com 120-160 mM de ácido acético.

O fenótipo apoptótico ou necrótico foi relatado em *S. cerevisiae* quando expostas durante 200 min a níveis baixos ou elevados de H₂O₂, respetivamente (Madeo, 1999; Ludovico, 2001).

Posto isto, é possível utilizar o ácido acético como controlo positivo de apoptose (níveis de ácido acético \leq 80 mM) e de necrose (níveis de ácido acético $>$ 80 mM).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo Homem não é recente, tendo sido encontradas evidências de produção de bebidas fermentadas na China em 7000 a.C., e de vinho no Irão e Egipto em 6000 a.C. e 3000 a.C., respetivamente

(Legras, 2007). Hoje em dia, esta levedura continua a ser muito utilizada no fabrico de vários produtos alimentares, entre eles, os iogurtes, o pão, os bolos, o vinho, a cerveja, entre outros, devido essencialmente à sua capacidade para fermentar glúcidos. Desta forma, a *S. cerevisiae* tem sido utilizada para fermentar glúcidos do arroz, trigo, cevada e milho para produzir bebidas alcoólicas e na indústria de panificação para expandir/aumentar a massa (Eun-Young, 2010; Ibáñez, 2014).

Além da sua importante utilização na indústria alimentar, esta levedura tem outras aplicações. Devido a ser um organismo eucarionte bastante simples, a *S. cerevisiae* tem sido utilizada como modelo celular em diversos estudos, nomeadamente na descoberta e caracterização de vias metabólicas (Costa, 2001). Estudos realizados *in vivo* para avaliar o stress induzido por diversos compostos químicos em organismos eucariontes, apresentam muitas dificuldades a nível técnico, económico e ético. Assim, a levedura *S. cerevisiae* tem-se mostrado como boa opção para estes estudos, devido não só a ser um organismo eucarionte unicelular, mas também por ser um organismo reconhecido como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e conseqüentemente, não patogénico, de manipulação e conservação segura. Esta levedura é também muito utilizada pelo fácil cultivo em meios simples, fácil estabelecimento das condições ótimas de crescimento, taxa de replicação elevada e genoma totalmente sequenciado. (Murphy, 1999; Costa, 2001). Como organismo aeróbio facultativo, utiliza em anaerobiose, hexoses, como por exemplo a glucose para, via fermentação alcoólica, obter energia que assegura a sua sobrevivência ou, em presença de dioxigénio (O₂), metaboliza oxidativamente álcoois ou outros substratos orgânicos, típicos da respiração aeróbia, possuindo por esse motivo, sistemas de defesa antioxidantes como os estudados neste trabalho (Costa, 2001).

Além destas vantagens, as células de *S. cerevisiae* possuem diversas semelhanças com as células de mamífero nas suas macromoléculas e organelos, sendo que diversas proteínas destas leveduras têm sido funcionalmente capazes de substituir proteínas homólogas humanas (Costa, 2001).

Assim, a levedura *S. cerevisiae* é um modelo relevante que tem contribuído para o entendimento de mecanismos bioquímicos e moleculares de diversos problemas desafiadores da ciência atual, entre os quais, aqueles que se encontram ligados ao stress oxidativo (Costa, 2001). A levedura *S. cerevisiae* é classificada taxonomicamente como:

Quadro 1.1. Classificação taxonómica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Classificação Taxonómica	
Domínio:	<i>Eucariota</i>
Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Ascomycota</i>
Classe:	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem:	<i>Saccharomycetales</i>
Família:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Sub-família:	<i>Saccharomycetoideae</i>
Género:	<i>Saccharomyces</i>
Espécie:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Neste trabalho foram estudadas duas estirpes de leveduras. A *S. cerevisiae* UE-ME₃ isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo, Portugal, depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora. Esta levedura possui propriedades fisiológicas particulares e únicas que lhe facilitam a sobrevivência em ambientes extremos onde ocorrem níveis elevados de glúcidos (140-160 g/L), teor alcoólico elevado (superior a 15% (v/v)), pH ácido (3,0-3,5) e baixo teor em nitrogénio, lípidos e vitaminas, condições características dos mostos. A *S. cerevisiae* UE-ME₃ tem sido utilizada como modelo celular em diversos estudos de stress oxidativo (Ferreira, 2008).

Por outro lado, a *S. cerevisiae* W303 (não modificada) é uma levedura comercial pertencente à coleção EUROSCARF (*EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional Analysis*). Esta possui um genótipo *MAT leu2-3,112, his3-11,15 trp1-1, can1-100, ade2-1, ura3-1* (Osório, 2004; Albuquerque, 2007). Esta levedura W303 tem sido muito utilizada em laboratórios de pesquisa bioquímica/biomédica de todo o mundo, para a qual o genoma se encontra totalmente sequenciado (Giannatasio, 2005; Kim, 2009; Ralser, 2012).

1.3. As espécies reativas de oxigénio e o stress oxidativo

O átomo de oxigénio (O) surgiu no nosso planeta em quantidade significativa na atmosfera há mais de $2,45 \times 10^9$ anos com o aparecimento de organismos capazes de realizar a fotossíntese como as cianobactérias, sendo assim possível produzir oxigénio a partir de luz solar e de substâncias presentes na atmosfera, como moléculas de água (H₂O), dióxido de carbono (CO₂) e o dióxido de enxofre (SO₂). A par da produção de oxigénio, estes seres vivos produzem também compostos

carbonados reduzidos que são utilizados pelos organismos quimiotróficos para produção da energia necessária à vida. A chegada dos seres fotossintéticos terá sido um acontecimento central no desenvolvimento da vida na Terra, pois antes disso a atmosfera era em grande parte anaeróbia. Além de ser um elemento maioritário na atmosfera (cerca de 21 %), o oxigénio é também muito importante para os seres vivos, principalmente na sua forma diatómica (O₂).

O átomo de oxigénio é considerado um di-radical, uma vez que apresenta um par de eletrões desemparelhados com o mesmo estado de spin em orbitais π^* . Ocasionalmente, sob condições biológicas normais, o oxigénio é capaz de remover eletrões a outras moléculas através de reações não enzimáticas conduzindo à formação de espécies químicas fortemente reativas. A barreira cinética associada à molécula de dioxigénio devido à existência de dois eletrões com o mesmo estado de spin que conduz muitas vezes à formação de moléculas radicalares prejudiciais para as células, dota o oxigénio de uma estabilidade reacional que impede reações explosivas quando em contacto com oxidantes atmosféricos, contribuindo para a existência da vida tal como a conhecemos. É esta restrição cinética que torna o oxigénio o aceitador final de eletrões ideal nos sistemas biológicos. Devido a isso, os seres vivos desenvolveram sistemas enzimáticos com locais de ligação que conseguem conter o oxigénio permitindo o contacto com substratos oxidáveis por períodos de tempo mais longos do que aqueles que ocorreriam com uma simples colisão, sendo capaz de ultrapassar a barreira cinética provocando a reação desta molécula. Ao mesmo tempo, estes enzimas são capazes de capturar a energia resultante da oxidação em compostos de elevada energia como o ATP, a “moeda” energética essencial à vida (McCord, 2000).

Como referido anteriormente, o oxigénio não consegue receber um par de eletrões com spins opostos, tem que retirar um eletrão de cada vez. Isto leva à quebra de pares de eletrões, resultando na formação de espécies reativas. O produto da redução do dioxigénio por adição de um eletrão é o radical anião superóxido (O₂^{•-}). Por outro lado, se a transferência envolver dois eletrões ocorre a formação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), que apesar de ser uma espécie reativa de oxigénio não é um radical, apesar de ter capacidade para aceitar mais dois eletrões, o que o torna um oxidante citotóxico. Alguns quelantes de ferro (II) ou cobre (I) são capazes de transferir um terceiro eletrão para o peróxido de hidrogénio conduzindo a quebra da ligação O-O. Um dos fragmentos é reduzido a água, enquanto que o outro constitui o radical hidroxilo (HO[•]), conhecido como um dos oxidantes mais potentes. Esta molécula é capaz de iniciar a peroxidação lipídica, causar a quebra das cadeias de DNA, sendo virtualmente capaz de oxidar indiscriminadamente qualquer molécula orgânica. A

interação entre as moléculas anteriormente faladas e outras moléculas conduzem à formação de outras espécies reativas de oxigénio como os radicais peróxido (ROO[•]), alcóxido (RO[•]), e óxido nítrico (NO[•]), que por sua vez conduzem à formação de peroxinitrito (ONOO[•]), entre outros (McCord, 2000; Singh, 2004).

As moléculas anteriormente referidas, radicalares e não-radicalares, têm todas em comum a molécula de oxigénio, sendo denominadas espécies reativas de oxigénio (ROS). Apesar das espécies reativas de oxigénio apresentarem uma elevada reatividade para com outras moléculas, podendo provocar danos nos organismos, em determinadas condições e em determinados níveis, estas moléculas atuam como reguladores metabólicos, desempenhando muitas vezes papéis centrais no metabolismo celular, sendo que muitos mecanismos envolvendo radicais livres são específicos de determinados sistemas ou tecidos, como por exemplo na defesa e regulação de processos de comunicação celular (McCord, 2000).

As ROS são muitas vezes formadas no decorrer de reações do metabolismo basal sendo que as três principais ROS formadas a nível fisiológico são O₂^{•-}, o H₂O₂ e o HO[•]. A grande fonte de O₂^{•-} é a cadeia respiratória, ao nível dos locais de fosforilação do ADP/ATP. Em geral, os eletrões são transferidos ao longo da cadeia transportadora de eletrões até ao dioxigénio, reduzindo-o a H₂O, porém aproximadamente 1-3 % dos eletrões são desviados da cadeia, conduzindo a uma deficiente redução do oxigénio, formando-se O₂^{•-}. Outra fonte endógena de ROS é o enzima NAD(P)H oxidase. O H₂O₂ é também produzido por outros enzimas, como xantina oxidase, aminoácido oxidase, peroxissomas e enzimas do citocromo P450, através do consumo da molécula de dioxigénio, em reações metabólicas envolvendo estes enzimas. Devido à elevada semelhança estrutural com a molécula de água, o peróxido de hidrogénio difunde facilmente através dos diferentes compartimentos celulares, podendo, na presença de iões metálicos como o Fe²⁺ ou o Cu²⁺, originar o radical HO[•], através de uma sucessão de reações, como as reações de Haber-Weiss ou reações de Fenton. Devido à sua elevada reatividade, o radical hidroxilo pode depois dar origem a uma vasta gama de outros radicais devido ao seu contacto com os constituintes celulares, como os radicais anteriormente referidos, peróxido e alcóxido, entre outros (Birben, 2012).

Existem também fontes de ROS (fig. 1.6) de origem exterior aos organismos, com as quais contactamos diariamente. Um dos exemplos é o fumo de tabaco que contém vários compostos oxidantes e radicais livres como o O₂^{•-}, e NO[•]. A inalação do fumo de tabaco ativa mecanismos endógenos conduzindo, por exemplo, à acumulação de neutrófilos e macrófagos, e conseqüentemente, ao aumento de moléculas oxidantes. O ozono tornou possível a colonização dos continentes terrestres ao

proteger a superfície dos raios ultravioleta (UV), porém esta molécula pode levar também à produção de ROS, uma vez que causa peroxidação lipídica, e outros danos celulares em determinados níveis de exposição. Outra das fontes exógenas de ROS é a radiação ionizante, que na presença de O₂ converte diversos radicais, como o HO[•] e O₂^{•-} e radicais orgânicos em peróxido de hidrogénio e lipoperóxidos. Estes lipoperóxidos na presença de iões metálicos propagam a formação de ROS por reações do tipo Fenton, conduzindo a estados de stress oxidativo. Os fotões ultravioleta A (UVA) são capazes de desencadear reações de oxidação, pela excitação de moléculas fotossensíveis como as porfirinas, podendo conduzir à formação de radicais livres. Também os iões metálicos são encontrados fora dos organismos, podendo considerar-se fontes externas de ROS bem como internas, devido à sua capacidade para gerar espécies radicalares por reações de Fenton, entre outras anteriormente referidas (Birben, 2012).

Todas estas fontes de ROS e outras como a alimentação deficiente, o stress, a poluição, o contacto com compostos químicos como os fitofármacos, entre outras (fig. 1.6), podem conduzir à propagação das ROS e dos danos oxidativos, atingindo estados em que o ambiente celular, em situações normais de ambiente redutor, passa a oxidante. Este estado denomina-se stress oxidativo (Schrader, 2006; Birben, 2012).

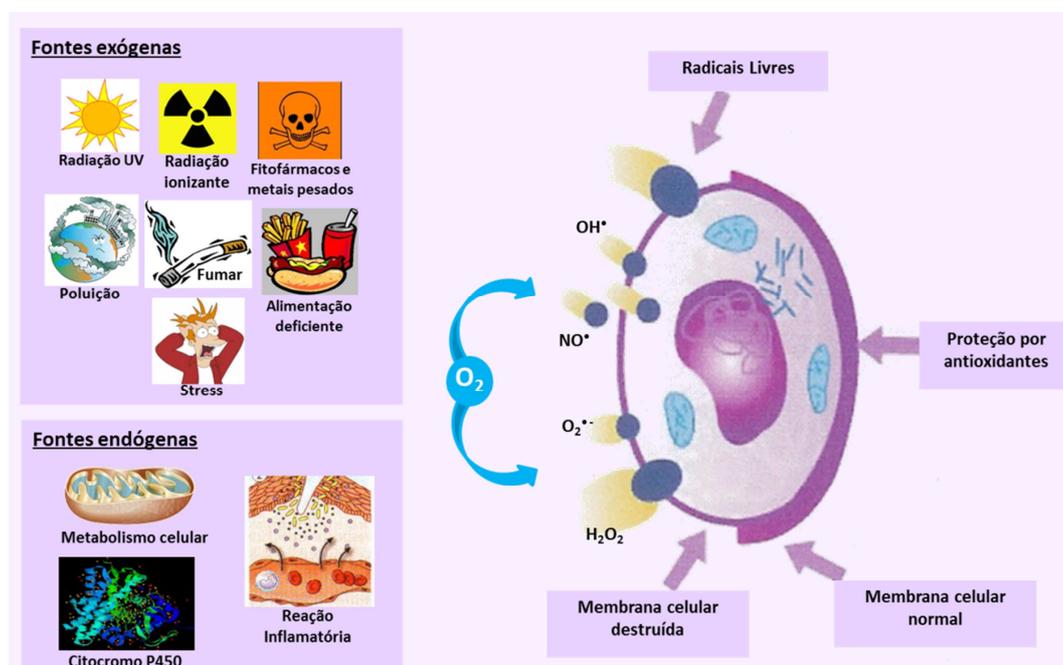


Fig. 1.6. Fatores exógenos e endógenos que levam à produção de ROS e respetivas respostas celulares. (Adaptado de Schrader, 2006; Birben, 2012)

Para combater os estados de stress oxidativo, os organismos desenvolveram vários mecanismos de defesa. A eficácia destes mecanismos de defesa varia de

acordo com diferentes alterações celulares e ambientais como a presença de determinados compostos como a ATZ e o CH₃COOH utilizados neste estudo. A capacidade de combate celular ao stress oxidativo pode ser avaliada através de diversos ensaios laboratoriais, como por exemplo o método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP).

O DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) consiste num radical livre estável, que possui um eletrão de valência desemparelhado situado num átomo de nitrogénio (Sharma, 2009). Este ensaio desenvolvido por Blois (1958), mede a capacidade de uma substância para neutralizar os radicais DPPH[•], tal como podemos observar na figura 1.7 (Molyneux, 2004):

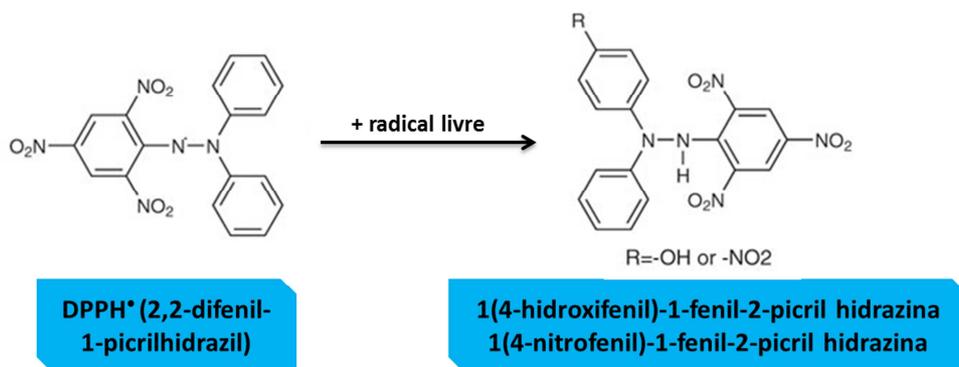
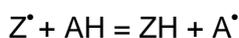


Fig. 1.7. Reação do DPPH. (Adaptado de Kedare, 2011)

O DPPH[•] tem a particularidade de constituir um dos poucos radicais nitrogenados orgânicos estáveis que pode ser comercializado, eliminando, como tal, a necessidade de ser gerado antes de um ensaio de atividade antioxidante, sendo, por isso, considerado um método preciso, fácil e bastante económico, válido para avaliar a capacidade de eliminação de radicais (Kedare, 2011; Clarke, 2013). Como já foi referido, o DPPH é caracterizado como um radical livre estável devido à deslocalização do eletrão livre em relação à molécula, o que faz com que a molécula não dimerize como acontece com outros radicais. Esta deslocalização também origina a cor violeta escuro, com um comprimento de onda de absorção em solução metanólica de aproximadamente 520 nm. Ao misturar o radical DPPH com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogénio, ocorre a neutralização do radical, que pode ser observada pela perda da coloração violeta. A eficiência antioxidante é medida à temperatura ambiente, de modo a que o risco de degradação térmica das moléculas testadas seja eliminado (Kedare, 2011).

Na reação:



o radical DPPH é representado por Z[•] e a molécula doadora por AH. Z[•], ao entrar em contacto com AH vai ser reduzido, ao mesmo tempo que a outra substância é oxidada. Assim, ZH é a forma reduzida e A[•] é o radical livre gerado. Este radical irá então passar por outras reações que controlam a estequiometria geral. A reação acima representada tem como objetivo reproduzir laboratorialmente as reações que ocorrem num sistema oxidante, tais como a auto-oxidação de lípidos ou de outra substância insaturada. A molécula de DPPH (Z[•]) representa os radicais livres formados na célula cuja atividade deve ser suprimida pela substância AH.

É um método rápido, simples, barato e muito utilizado para medir a capacidade de compostos para atuar como sequestradores de radicais livres, e para avaliar a atividade antioxidante dos alimentos. Também pode ser usado para quantificar os antioxidantes em sistemas biológicos complexos, para amostras sólidas ou líquidas. Como descrito na literatura, este ensaio tem sido utilizado com sucesso na deteção de propriedades antioxidantes de grãos e farelo de trigo, de vegetais, de óleos de sementes comestíveis solubilizados em diversos solventes, como o etanol, metanol, misturas álcool-água ou acetona água e benzeno, farinhas e conjugados do ácido linoleico. É um método conveniente para determinar antioxidantes, como os grupos aromáticos da cisteína, glutathione, ascorbato, α -tocoferol e ácidos polihidroxílicos do azeite, frutos, sumos e vinhos (Kedare, 2011).

Como referido anteriormente, outro método vulgarmente utilizado para medir a capacidade antioxidante total envolve a determinação da capacidade antioxidante para reduzir do ferro (FRAP), um método colorimétrico simples e fiável, proposto por Benzie e Strain, 1996. Este método fundamenta-se na capacidade que os compostos antioxidantes possuem para reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺. A pH ácido, o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺, é reduzido a um complexo ferroso de TPTZ, [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺, formando-se um cromóforo de cor azul intensa, com máximo de absorção a 593 nm. As condições em que o ensaio ocorre favorecem a redução do complexo férrico, e por conseguinte o desenvolvimento da cor, desde que esteja presente uma substância oxidante (Benzie, 1996). Então, no ensaio do FRAP é usado um excesso de Fe (III), para que seja medida a capacidade da amostra para reduzir o Fe (III) a Fe (II), ou seja, quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, tal como podemos observar na figura 1.8 (Firuzi, 2005; Amamcharla, 2014):

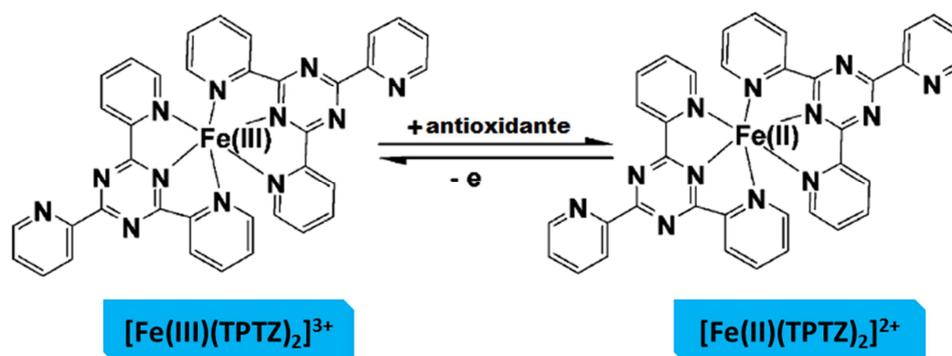


Fig. 1.8. Reação do FRAP. (Adaptado de Benzie, 1996)

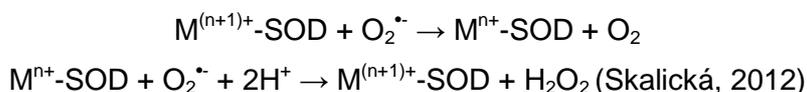
1.4. Combate ao stress oxidativo

As células possuem defesas não-enzimáticas e predominantemente enzimáticas que protegem os constituintes celulares de danos oxidativos desencadeados pelas espécies reativas de oxigénio estabilizando o ambiente redox celular (Jamieson, 1998). A maior parte das defesas enzimáticas possuem um metal de transição no seu centro de reação, com eletrões distribuídos por diferentes camadas de valência que podem ser mobilizados nos processos de desintoxicação.

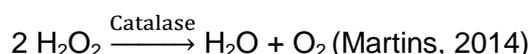
Como já foi referido anteriormente, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é uma das ROS produzidas em maior quantidade na célula, sendo precursora de outras entidades químicas, como o radical hidroxilo, fortemente deletérias para as biomoléculas. O enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de desprotonação do radical anião superóxido a peróxido de hidrogénio participando na sua desintoxicação (Birben, 2012). Existem diferentes isoenzimas distribuídas por diferentes compartimentos celulares que podem ser agrupados por diferentes subclasses, de acordo com o metal presente no seu centro ativo. As leveduras, tal como outros eucariontes possuem duas isoformas intracelulares, uma localizada no mitocôndrio (SOD_{Mn} , codificado pelo gene SOD2) que possui no seu centro ativo um átomo de manganês e outra localizada no citoplasma ($\text{SOD}_{\text{Cu-Zn}}$, codificado pelo gene SOD1) (Ferreira, 1997; Liu, 2010; Soprana, 2011). A isoforma codificada pelo SOD1, designação que adotaremos neste texto, parece ser o principal enzima envolvido na remoção do radical anião superóxido do citoplasma e, possivelmente, também no peroxissoma, enquanto que o enzima codificado pelo SOD2 tem como função proteger o mitocôndrio do radical superóxido gerado pela respiração (Gardner, 2002). A bibliografia revela ainda que SOD1 pode desempenhar um papel tampão relevante dos níveis intracelulares de cobre, função que parece não estar relacionada com o seu papel protetor contra o stress oxidativo (Jamieson, 1998). Assim, os iões metálicos que integram o centro ativo dos enzimas

são os responsáveis pela reação de dismutação, ou seja, uma reação em que um elemento, neste caso o ião metálico da proteína, é alternadamente oxidado e reduzido.

A reação catalisada pelo enzima SOD pode ser representada de acordo com as equações:

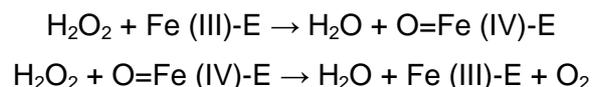


onde M representa o ião ou iões metálicos do centro ativo do enzima. Apesar da reação de dismutação ser espontânea, é muito lenta. Este facto coloca o referido enzima na frente de resposta à propagação de espécies oxidativas. Todavia o peróxido de hidrogénio, produto da reação descrita anteriormente, não é inócuo para a célula, devido à sua reatividade e semelhança estrutural com a molécula da água. Ao difundir-se com facilidade entre compartimentos celulares, origina outro tipo de ROS ainda mais reativas para as biomoléculas. Assim, a célula desenvolveu mecanismos capazes de eliminar o peróxido de hidrogénio formado endogenamente. Enzimas capazes de o fazer são por exemplo o catalase (CAT) também designado por hidropoxidases. Este é um enzima, intracelular da maior parte dos organismos vivos, protege as células dos efeitos tóxicos do H₂O₂ e catalisa a desprotonação deste em dióxigénio e água, sem formação de radicais livres:



Como se trata de hemoproteínas, os enzimas catalase possuem um átomo de ferro no seu centro ativo, capaz de converter o H₂O₂ em água e dióxigénio (Venkateshwaran, 1999). Em geral, o átomo de ferro do centro ativo deste grupo de enzimas encontra-se no estado de ião férrico (Fe(III)), e adjacente a dois resíduos de aminoácidos (aa), um de histidina e outro de aspargina (Zhao, 2006). Estes dois resíduos de aa ao entrarem em contacto com a molécula de H₂O₂ provocam uma transferência protónica entre os dois átomos de oxigénio da molécula conduzindo a uma distribuição desigual da carga, o que leva a uma distensão da ligação O-O e conseqüente quebra da mesma. Trata-se de uma quebra heterolítica da ligação covalente, que conduz à formação de uma molécula de H₂O livre, permanecendo o oxigénio remanescente do H₂O₂ ligado ao átomo de ferro do enzima que, devido a isso, é então oxidado a ião ferroso O=(Fe(IV)) (ferro no estado de oxidação +4 com um átomo de oxigénio ligado). Ao contrário do ião férrico, que possui um carácter mais redutor, o ião ferroso O=(Fe(IV)) é um poderoso oxidante que reage facilmente com outras moléculas de H₂O₂ de forma a remover-lhe um átomo de oxigénio reduzindo-se

a Fe(III) com consequente produção de O₂ e H₂O, como se pode observar nas reações:



onde Fe-E representa o átomo de ferro do grupo hemo ligado ao enzima (Maté, 1999; Chelikani 2004). Tal como o enzima SOD, este catalisa uma reação de dismutação, em que o substrato atua tanto como redutor e como oxidante.

Neste trabalho estudaram-se os isoenzimas catalase A e T. O enzima catalase A (CTA1) encontra-se localizado nos peroxissomas e parece estar envolvido na desintoxicação do peróxido de hidrogénio gerado pela β -oxidação dos ácidos gordos. O enzima catalase T (CTT1) localizado no citoplasma celular, parece estar envolvido na proteção contra vários agentes de stress, como o caso das ROS (Zandycke, 2002; Martins, 2014). Alguns autores revelaram que a sobreexpressão do isoenzima CTT1 pode estar relacionada com a diminuição da concentração intracelular de H₂O₂, inibição da síntese de DNA e da proliferação celular e indução de apoptose (Brown, 1999).

Outro enzima capaz de catalisar a reação de redução, não só de H₂O₂, mas também de lipoperóxidos é o enzima glutathione peroxidase (GPx), uma selenoproteína do ciclo de oxidação do glutathione (Birben, 2012). Esta atividade enzimática reconhece o glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cisteinilglycine) como co-substrato doador de equivalentes redutores (Mannarino, 2008; Guedes, 2009; Bhandary, 2013). O átomo de selénio da cisteína encontra-se, no estado de repouso, sob a forma de selenol. Neste estado, o metal estabelece uma ligação com um átomo de hidrogénio localizado perpendicularmente ao resíduo de aminoácido, ligação essa que envolve essencialmente eletrões π . Estas características levam a que o selénio perca facilmente o protão, originando o anião selenito (Ez-Se⁻) com carácter nucleófilo muito forte que pode ser facilmente oxidado. Na presença de peróxidos, o anião selenito realiza um ataque nucleófilo a um dos átomos de oxigénio, formando o derivado ácido selénico com libertação de água ou álcool caso estejam envolvidos lipoperóxidos (Brigelius-Flohé, 1989; Júnior, 2001). O enzima GPx possui um local de ligação ao GSH, adjacente à selenocisteína. Devido à instabilidade do ácido selénico este reage com o GSH libertando uma molécula de água, ao mesmo tempo que se reduz e a molécula de GSH se oxida, instante em que o selénio se liga ao GSH. A par do local de ligação do GSH referido anteriormente existe um segundo local de ligação da mesma molécula. A segunda molécula de GSH ao ligar-se a esse local do centro ativo, liberta um protão, originando o anião GS⁻ que reage com o grupo sulfureto da primeira

molécula de GSH e leva à formação de uma ligação dissulfureto com rutura da ligação ao selénio e libertação de dissulfureto de glutationo (GSSG), ficando o átomo de selénio e, conseqüentemente, o enzima livre para realizar outro ciclo catalítico (Júnior, 2001).

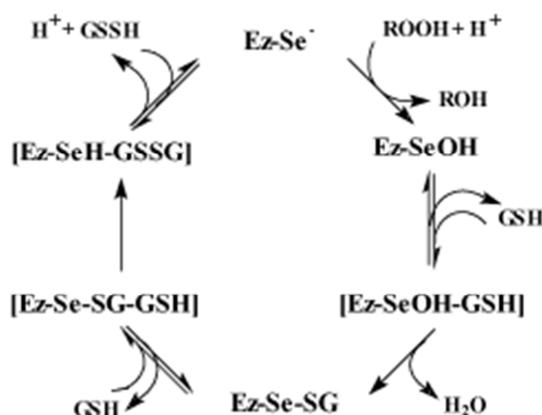


Fig. 1.9. Mecanismo catalítico do enzima GPx. (Adaptado de Júnior, 2011)

A oxidação do GSH, faz com que o enzima GPx participe ativamente na eliminação das ROS. O GSH é o principal tampão tiol redox da célula, sendo sintetizado no citosol a partir de diversos aminoácidos, tais como L-glutamato, L-cisteína e glicina (Birben, 2012). O GSH participa em inúmeras reações de desintoxicação, formando dissulfureto de glutatióno (GSSG) de forma a reduzir os peróxidos a compostos inócuos para a célula (Penha-Silva, 2005; Burton, 2011). Um importante marcador do crescimento celular é a soma das duas formas de glutatióno (GSH+GSSG), uma vez que o tripéptido glutatióno é fundamental para o funcionamento celular normal, sendo que em casos de proliferação celular há um aumento destes tióis (Zhu, 2013). O tripéptido glutatióno é utilizado pelas células em vários processos, tais como o combate ao stress oxidativo, desintoxicação de substâncias tóxicas e vias de sinalização. Apesar de participar em todos estes processos, o glutatióno é ainda um indicador do estado redox celular, que pode ser detetado pela razão GSH/GSSG (Bhandary, 2013). Quando se determinam valores elevados da razão GSH/GSSG, a quantidade de GSH intracelular é superior à de GSSG, logo ambiente celular é maioritariamente redutor, sendo este o seu ambiente saudável. Nos casos em que a razão GSH/GSSG é baixa, significa que ocorreu uma transição redutor-oxidante do ambiente celular, encontrando-se esta em stress oxidativo (Chen, 2012; DePonte, 2012). O papel relevante do glutatióno no metabolismo celular, no combate direto ou acoplado a reações enzimáticas, contra o stress oxidativo ou em reações de conjugação para excreção de xenobióticos, impõe

manutenção de níveis intracelulares elevados do tripéptido. O enzima glutationo redutase (GR) é o responsável pela reposição dos níveis de glutationo na célula a partir do GSSG (Lushchak, 2011). Este enzima é uma flavoproteína, responsável pela redução do dissulfureto de glutationo gerado no combate às ROS (Schaedle, 1977; Zhu, 2013). Possui um núcleo flavínico acoplado a cistinas e resíduos de histidina, que asseguram o fluxo de eletrões pelo seu centro ativo. O enzima GR possui ainda locais de ligação ao NADPH e GSSG geometricamente opostos. O FAD, ao ser reduzido a FADH₂ por equivalentes redutores sob a forma de NADPH, adquire um poder redutor capaz de quebrar a ligação dissulfureto entre as cistinas do centro ativo do enzima (Beutler, 1967; Meister, 1988; Gill, 2013). Os eletrões da ligação dissulfureto vão posteriormente ser utilizados na redução do resíduo de histidina que desencadeia um ataque nucleófilo à cistina do GSSG mais próxima, utilizando o poder redutor recém-adquirido para romper a ligação dissulfureto do GSSG localizado entre dois resíduos de cisteína da molécula. Esta reação gera dois intermediários: GS-Cys e GS⁻. O resíduo histidina do enzima transfere então um protão para o anião GS⁻ levando à formação de GSH. De seguida, rompe-se a ligação débil entre o FAD e a cistina e restabelece-se a ligação dissulfureto entre as cistinas do enzima devido a um ataque nucleófilo entre cistinas com libertação de um segundo anião GS⁻ que ao receber um protão irá formar uma segunda molécula de GSH (Kretzschmar, 1996).

A capacidade redutora do enzima GR é assegurada pela manutenção de níveis elevados de NADPH na célula. O enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), regulador-chave da via das pentoses de fosfato, catalisa a conversão de glucose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconato com a redução do NADP⁺ a NADPH (Danesi, 2006; Hecker, 2013; Nantakomol, 2013). Este enzima possui um papel relevante no combate ao stress oxidativo. Ao manter os níveis de NADPH na célula, o enzima GR vai conseguir manter os níveis de GSH celulares, e por conseguinte, proteger a célula dos efeitos oxidativos das ROS. Este enzima desempenha outras funções importantes na célula, tais como a disponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH para biossíntese lipídica, bem como de precursores da síntese de nucleótidos, uma vez que um dos produtos da via das pentoses de fosfato é a ribose-5-fosfato (Danesi, 2006; Méndez, 2011).

Através da figura 1.10 ilustra a interação metabólica dos enzimas até aqui referidos.

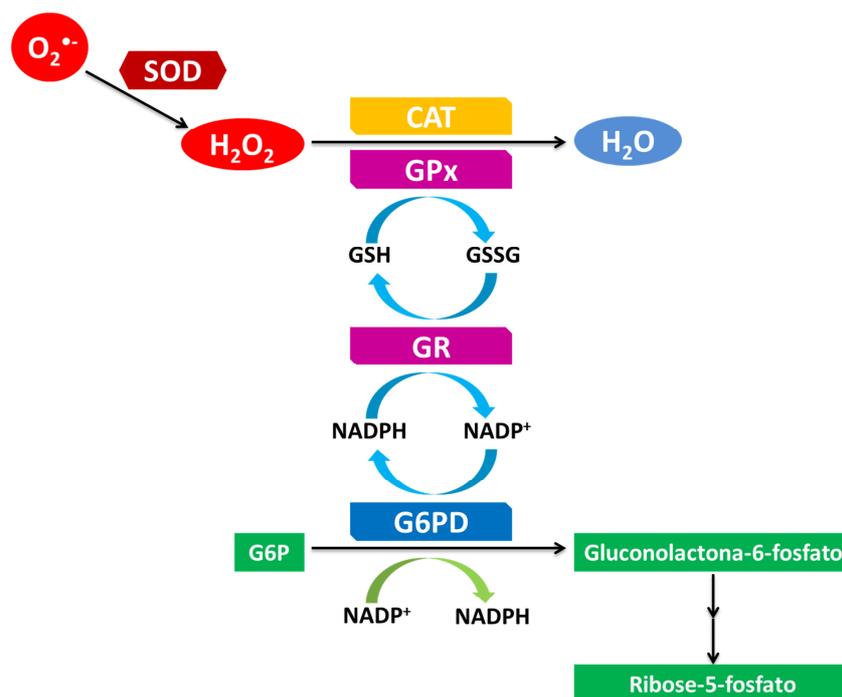


Fig. 1.10. Interação metabólica entre os enzimas SOD e CAT e o ciclo do glutatônio (Adaptado de Danesi, 2006; DePonte, 2012).

A par dos enzimas catalase e glutatônio peroxidase, existem outros com capacidade para reduzir o peróxido de hidrogénio a água e outros compostos inócuos para a célula. O enzima ascorbato peroxidase (APx) é um desses exemplos. Trata-se de outra hemoproteína pelo que também aqui o átomo de ferro é um elemento central na reação catalítica (Morita, 2011). Este enzima utiliza o ascorbato, uma molécula antioxidante por excelência como cofator na reação enzimática (Caverzan, 2014). Tal como podemos observar pelo diagrama da figura 1.11, os eletrões do ascorbato podem ser transferidos para o enzima, e deste para o H_2O_2 , levando à formação de água e monodesidroascorbato (MDHA). O enzima APx faz parte de um ciclo, denominado ciclo do ascorbato que inicia com a conversão do H_2O_2 a água e oxigénio, por ação do APx. As moléculas de monodesidroascorbato formadas pela redução do H_2O_2 a H_2O possuem a capacidade de reagir entre si dando origem a uma molécula de ascorbato e outra de desidroascorbato (DHA). Esta última molécula pode depois ser reduzida a ascorbato pelo enzima desidroascorbato redutase (DHAR), um enzima que utiliza como cofator o GSH que é oxidado a GSSG de forma a reduzir o DHA e repor os níveis de ascorbato da célula, tornando-o disponível para ser novamente utilizado, por exemplo no combate ao stress oxidativo (Shikanai, 1998; Shigeoka, 2002). O monodesidroascorbato pode ser também convertido diretamente em ascorbato pela reação catalisada pelo monodesidroascorbato redutase (MDHAR) que utiliza os

equivalentes redutores do NADPH gerados pela via das pentoses fosfato para repor os níveis de ascorbato (Shigeoka, 2002) (fig. 1.11). Este ciclo torna possível a reutilização do ascorbato, conferindo-lhe uma maior capacidade de redução de ROS do que aquela que a molécula teria se atuasse isoladamente. O ascorbato por si só é um poderoso antioxidante, porém, acoplado ao enzima vê a sua capacidade de combate ao stress oxidativo potenciada.

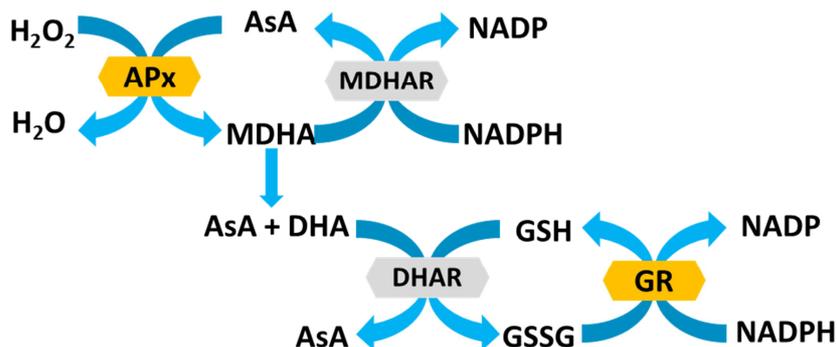


Fig. 1.11. Interação ciclo do ascorbato - ciclo do glutatióno. (Adaptado de Shigeoka, 2002)

Os processos de oxidação desencadeados pelas ROS e que conduzem a situações de stress oxidativo conduzem inevitavelmente a danos nos constituintes celulares. Mesmo nos casos em que as defesas celulares conseguem conter a proliferação das ROS, existem danos que fazem com que seja necessário repor as moléculas afetadas. O processo de reposição requer energia, necessária para a biossíntese e transporte de biomoléculas para os locais necessários, entre outros processos. Um dos enzimas responsáveis pela disponibilização de energia para os bioprocessos anteriormente descritos é o fosfatase alcalina (ALP), responsável pela rutura de ligações monofosfoéster com libertação de fosfato inorgânico (Rodrigues, 2006; Vlahovic, 2009). O rompimento destas ligações de potencial químico elevado libertam enorme quantidade de energia que pode ser aproveitada em processos anabólicos como a síntese proteica, lipídica e de ácidos nucleicos (Akcaakaya, 2007; Banik, 2009). Este enzima participa por exemplo nos processos finais de digestão, bem como na excreção, reabsorção de água, e em mecanismos de transporte ativo através de membranas (Souvannavong, 1995). Denomina-se fosfatase alcalina devido ao seu pH ótimo ser em condições de pH alcalino (entre 7,5 e 11) (Rodrigues, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que a regulação génica da síntese deste enzima dá-se de forma diferencial por fatores do ambiente celular como a carência energética. Foi também demonstrado que em situações de replicação celular, os níveis deste enzima encontram-se fortemente aumentados, associando-o a processos

de proliferação celular (Liu, 2013). Os fenómenos atrás descritos suportam então a evidência de que se trata de um enzima essencial no combate ao stress oxidativo, disponibilizando a energia necessária à reposição das moléculas danificadas pelas ROS, bem como, em casos mais severos de danos celulares, no auxílio ao processo de apoptose. A última constatação prende-se com o facto de que é necessária enorme quantidade de energia para a biossíntese de corpos apoptóticos, bem como na biossíntese *de novo* de enzimas e outras moléculas essenciais à apoptose (Souvannavong, 1995).

1.5. Danos celulares

Por vezes, as defesas antioxidantes não são eficientes e/ou não atuam a tempo de evitar alterações celulares permitindo que as espécies reativas de oxigénio interajam com os constituintes celulares, alterando-os. Assim, os danos celulares devido às ROS manifestam-se maioritariamente sobre alvos moleculares como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, pelo facto de estas serem as biomoléculas mais abundantes nas células. As alterações na estrutura destas biomoléculas irão provocar alterações no normal funcionamento da célula, podendo mesmo comprometer a sua sobrevivência.

O efeito das ROS ao nível dos lípidos de membrana é altamente prejudicial tanto para as células como para os organismos que estas constituem (Badmus, 2011). Tomando como exemplo o radical hidroxilo, uma ROS com elevada capacidade de oxidação lipídica, ao contactar com grupos metilo alilícos dos resíduos acilo insaturados de membrana, gera principalmente liporradicais (L^{*}), radicais alcóxilo (LO^{*}) e radicais peróxilo (LOO^{*}), levando à destruição da sua estrutura, falha dos mecanismos de troca de metabolitos e, numa condição extrema, à morte celular (Halliwell, 1993; Lima, 2001; Badmus, 2011). A peroxidação lipídica (LPO) devido à acumulação de ROS constitui um evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula (Halliwell, 1993; Lima, 2001). Como a membrana celular é maioritariamente constituída por lípidos, alterações no ambiente lipídico conduzem a alterações funcionais como a permeabilidade que conduz a alterações do fluxo iónico e de outras substâncias, desregulando a capacidade seletiva de entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula, podendo levar, em casos extremos à rutura da estrutura membranar e, conseqüente, rebentamento dos organelos subcelulares, ou da própria célula (Lima, 2001; Repetto, 2012).

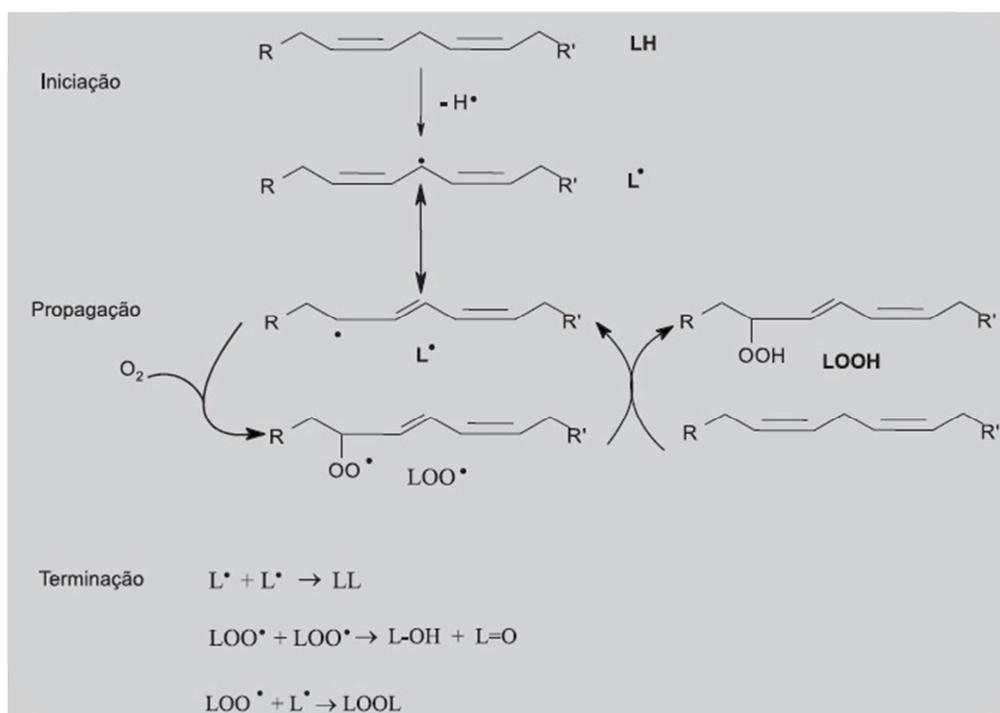
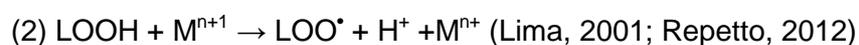
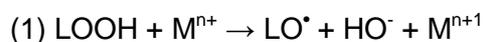


Fig. 1.12 Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.

(Adaptado de Lima, 2001)

A lipoperoxidação inicia quando um resíduo acilo sofre um ataque por uma espécie reativa como o radical hidroxilo, e perde um átomo de hidrogénio anteriormente ligado a um grupo metileno (CH₂), formando assim um radical de carbono (C•). Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular formando um dieno conjugado, ou seja, duas ligações duplas intercaladas por uma ligação simples (Lima, 2001). Este processo denomina-se iniciação da peroxidação lipídica e precede as fases de propagação e terminação (fig. 1.12). A propagação da LPO ocorre quando, na presença de O₂ o radical C• dá origem a um radical peróxido (COO•). Este derivado tem capacidade para remover um átomo de hidrogénio alílico de outro resíduo acilo, formando um lipoperóxido (LOOH) e gerando outro radical de carbono que alimenta a propagação em cadeia da reação, disseminando os danos pela vizinhança (Lima, 2001; Noori, 2012). No caso de a reação ocorrer entre o radical peróxido e uma dupla ligação na mesma cadeia de resíduo acilo, serão formados peróxidos cíclicos. As reações atrás referidas podem ser catalisadas por iões de metais de transição, como Feⁿ⁺ e Cuⁿ⁺, conduzindo à formação de radicais lipídicos alcóxido, peróxido e hidroxilo a partir dos lipoperóxidos, conforme demonstrado nas reações 1 e 2, onde M representa o metal de transição e n o seu estado de oxidação:



Tal como referido, o processo de LPO culmina com a fase de terminação, na qual ocorre a aniquilação dos radicais formados obtendo-se como produtos da reação moléculas não radicalares (Gardner, 1989; Lima, 2001). Nesta etapa podem ocorrer clivagens da cadeia carbonada com formação de aldeídos, entre os quais o malonodialdeído (MDA) que irá ser estimado neste trabalho, bem como outros derivados hidroxi-, ceto-, cetohidroxi- e epoxi-hidroxi-acilos, resultantes da formação de ligações covalentes com resíduos de aminoácidos adjacentes ou rearranjos conformacionais (Lima, 2001; Birben, 2012).

Outros alvos macromoleculares das ROS são as proteínas. Estas biomoléculas desempenham papéis diversos na célula, atuando por exemplo como componentes estruturais ou, no caso dos enzimas, como catalisadores biológicos, permitindo a ocorrência de reações muitas vezes termodinamicamente desfavoráveis e a existência de vida tal como a conhecemos. A importância das proteínas nos organismos leva a que alterações nas suas estruturas, como as resultantes dos ataques por ROS perturbem, não só a organização celular, como também o seu metabolismo podendo conduzir a danos, muitas vezes graves e irreversíveis que culminam em processos de morte celular por apoptose ou em casos extremos por necrose (Donne, 2003; Liebert, 2010; Noori, 2012). Interações ROS-proteínas levam à ocorrência de oxidações designadas por carboxilação que se caracterizam pela remoção de prótons aos átomos de carbono dos resíduos de aminoácidos das proteínas, resultando na formação de um radical C[•]. Os resíduos de aa mais suscetíveis à carboxilação são cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, cujos derivados radicalares são capazes de participar em reações cruzadas com outros resíduos da molécula, conduzindo à alteração estrutural da proteína e, conseqüente, diminuição ou perda de funcionalidade que conduzem a perturbações das vias metabólicas, desregulação dos processos de transporte membranar e de outros eventos celulares mediados por proteínas que podem estar associados a patologias como a doença de Parkinson e de Alzheimer (Donne, 2003; Liebert, 2010; Birben, 2012). Os processos de oxidação e formação de radicais livres provocados por ROS não ficam confinados à molécula inicial. No caso das proteínas, tal como referido para os lípidos, também ocorrem casos de clivagem, libertando-se produtos como aldeídos que irão propagar os danos a outras moléculas. Podem também ocorrer casos de ligações cruzadas com ácidos nucleicos e lípidos, estendendo os danos a esses grupos macromoleculares (Barreiros, 2006; Birben, 2012).

Nos últimos anos observou-se que os danos no DNA e mutações ocorriam mesmo na ausência de exposição a cancerígenos genotóxicos. Os agentes que levam a esses danos incluem produtos normais do metabolismo celular, como as ROS,

produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrogénios, espécies reativas de nitrogénio, alguns intermediários de vias metabólicas e fontes exógenas inevitáveis, tais como as radiações UV, radiação ionizante, radioisótopos ou até substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes da dieta e da atmosfera (Letavayová, 2006; Birben, 2012; Kang, 2012). Foi de extrema relevância o desenvolvimento de métodos analíticos satisfatoriamente sensíveis para a deteção de danos basais no DNA, para que se pudesse avaliar de que forma esses danos contribuíam para a cancerigénese. Diversos estudos têm revelado que grande parte dos danos endógenos no DNA correspondem à oxidação das bases. A identificação de potenciais oxidantes responsáveis pela oxidação das bases do DNA constitui tema de estudo (Birben, 2012; Kang, 2012). No entanto, sabe-se que interações ROS-DNA, levam à sua oxidação. Os processos oxidativos, atuam de diversas formas, conduzindo à degradação das bases azotadas, quebra das ligações de hidrogénio entre nucleótidos das cadeias antiparalelas do DNA, alterações nas ligações entre bases púricas e pirimídicas e a desoxirribose (Loureiro, 2002). Estes e outros danos conduzem a mutações, deleções e/ou translocações de genes. Por exemplo, o radical HO[•] é bastante reativo, podendo reagir com as bases do DNA, removendo-lhe átomos de hidrogénio e, deste modo, originar mutações no genoma. É provável que o HO[•] desempenhe um papel importante na oxidação endógena do DNA. O H₂O₂ ao difundir-se até ao núcleo da célula, reage com iões metálicos, gerando agentes oxidantes que ao ocorrer em meio adjacente à molécula de ácido nucleico pode levar à sua oxidação. Outros oxidantes capazes de interatuar com o DNA são os peroxinitritos (ONOO⁻). Estes têm capacidade de se difundir intracelularmente, sendo capturados por algumas células via canais aniónicos. Um conjunto de mecanismos bastante complexos levam à formação de espécies reativas de nitrogénio e oxigénio a partir do peroxinitrito, que aparentam ser responsáveis por danos oxidativos. Uma observação importante é a de que o peroxinitrito é bastante reativo com a 8-oxodesoxiguanosina (pelo menos 1000 vezes mais em relação à reatividade com 2'-desoxiguanosina) (Letavayová, 2006). Estados patológicos de infeção crónica e de inflamação são importantes fatores de risco para diversas neoplasias humanas, estabelecendo diversos autores uma ligação entre inflamação e indução de mutações com a capacidade dos peroxinitritos para oxidar o DNA. Os processos atrás referidos conduzem a alterações não só do código genético mas também do fluxo da informação genética. Fontes bibliográficas referem que algumas regiões promotoras de genes, possuem sequências nucleotídicas para ligação a fatores de transcrição ricas em guaninas e citosinas, nucleótidos muito suscetíveis à oxidação. Este facto leva a que, o local de ligação do fator de transcrição se altere impossibilitando a transcrição, ou tornando-a deficiente e,

consequentemente, provocando uma alteração do normal fluxo da informação genética. Estes processos oxidativos produzem 8-hidroxi-guanosina (8-OH-G), um biomarcador muito utilizado na detecção de processos cancerígenos que, a par da doença de Alzheimer e Parkinson, constituem a consequência mais visível dos efeitos do stress oxidativo sobre as biomoléculas, com destaque para o DNA (Hemnani, 1998; Birben, 2012).

2. Problema e Objetivos

2.1. Problema

O crescimento exponencial da população humana tornou necessário aumentar a produção e a preservação das culturas agrícolas. Nesse contexto, a indústria química desenvolveu compostos fitofarmacêuticos aplicáveis no controlo de infestantes e na prevenção de pragas por insetos que permitiram otimizar os processos, de produção agrícola. Entre os produtos fitofarmacêuticos, destacam-se os herbicidas, como por exemplo, a atrazina que atua ao nível do cloroplasto, como inibidor da cadeia transportadora de eletrões, bloqueando a fotossíntese. A atrazina é um poluente orgânico persistente, devido à sua fraca degradação química e biológica, entrando facilmente em contacto com os seres vivos, atingindo o Homem em níveis de concentração muito superiores aos que foram aplicados. Devido à sua persistência ambiental e à sua elevada toxicidade, a atrazina foi proibida em diversos países da União Europeia e nos Estados Unidos da América. Contudo, devido à elevada globalização e fluxo de produtos agrícolas, a sua disseminação pelo globo continua a ser bastante facilitada, continuando a ocorrer o contacto entre a atrazina e os seres vivos. Embora os eucariontes heterotróficos não possuam cloroplastos na sua constituição, a cadeia respiratória localizada na membrana interna mitocondrial pode ser um alvo bloqueável pela atrazina nos locais de fosforilação do ADP a ATP, levando assim à formação de ROS, como o $O_2^{\cdot-}$, despoletando eventuais pulsos de stress oxidativo, ou stress oxidativo crónico, com disfunção de vias de sinalização, ocorrência de danos celulares e, conseqüente, morte celular. Em algumas situações, os sistemas não enzimáticos e enzimáticos de defesa antioxidante, como por exemplo, catalases, glutathione peroxidases e o tripéptido glutathione, ou sistemas de reparação de danos celulares, conseguem garantir o retorno parcial ou total das células afetadas ao seu funcionamento normal. Em certos casos, esses mecanismos não são suficientemente eficazes para prevenir danos irreparáveis, ocorrendo morte celular. Alguns estudos sugerem que a atrazina pode comportar-se como indutora de apoptose em determinados níveis de exposição, pelo que o recurso ao ácido acético, um indutor de morte celular (apoptose/necrose) em leveduras constitui um agente químico controlo, adequado para a caracterização dos efeitos da atrazina em *Saccharomyces cerevisiae*, um eucarionte GRAS aeróbio facultativo, com sistemas de defesa antioxidantes e energéticos homólogos aos humanos. Assim a escolha das estirpes UE-ME₃, nativa e W303, comercial EUROSCARF constituem modelos adequados para testar os efeitos da atrazina na resposta antioxidante e energética de eucariontes.

2.2. Objetivos gerais

O objetivo geral deste estudo foi testar a H₀: “As estirpes *S. cerevisiae* UE-ME₃, nativa de mostos alentejanos e *S. cerevisiae* W303, uma levedura EUROSCARF, comercial, exibem perfil de crescimento e capacidade de resposta antioxidante semelhantes, características que não são perturbadas pela exposição à atrazina.”

2.3. Objetivos específicos

Conhecer e compreender:

- A curva de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 na presença e ausência de atrazina e ácido acético;
- o protocolo experimental para garantir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* na ausência e na presença dos agentes de stress;
- a resposta antioxidante da *S. cerevisiae* à atrazina e ao ácido acético;
- alterações ao nível do metabolismo energético da *S. cerevisiae* quando expostas à atrazina e ao ácido acético.

Dar valor:

- Aos cuidados de assepsia necessários para a preparação dos meios de cultura para os ensaios de exposição das leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 à atrazina e ao ácido acético;
- à fase de crescimento em que a cultura é exposta tanto à atrazina como ao ácido acético;
- ao cuidado no manuseamento e na calibração de equipamentos e materiais utilizados;
- à qualidade das curvas de calibração;
- à qualidade das curvas de reação para as diferentes atividades enzimáticas quando na presença e na ausência de atrazina e de ácido acético;
- às alterações observadas, em termos de conteúdo e atividade enzimática de células crescidas na presença de atrazina e de ácido acético relativamente aos controlos;
- aos modelos de análise estatística utilizados para interpretar/validar eventuais alterações.

Aplicar:

- A outros eucariontes;
- extrapolar os conhecimentos adquiridos a outras triazinas;

- contribuir para redefinir os níveis de circulação ambiental/segurança para o contacto com atrazina;
- interpretar os mecanismos de toxicidade da atrazina e contribuir para implementar mecanismos de alerta toxicológico;
- apoiar a implementação de legislação referente à sua aplicação agrícola e na criação de normas que regulem a importação de produtos alimentares de países externos à UE.

3. Metodologia

3.1. Estratégia

Para atingir os objetivos propostos para este trabalho obedeceu-se ao seguinte plano:

Local de realização: Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

Apoio financeiro: Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (FCT/ICAAM), Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

Duração: 1 ano letivo.

Modelo Biológico:

Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃, estirpe isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo e depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora e *Saccharomyces cerevisiae* W303, uma levedura EUROSCARF, comercial.

Agentes de stress: Atrazina e ácido acético.

Ensaio: Leveduras inoculadas em meio YPD (controlo) ou YPD com atrazina (50µM) ou ácido acético (50 mM e 500 mM) (teste) cresceram a 28 °C durante 200 min.

Resultados obtidos ao longo da cultura:

- Acompanhamento da cultura pela turbidez a 640nm e cfu.

Resultados obtidos no final da cultura:

- Determinação do peso seco.

Frações sub-celulares selecionadas:

- Sobrenadante pós-12000 g;
- Sedimento pós-12000 g.

Parâmetros analisados nas frações sub-celulares selecionadas:

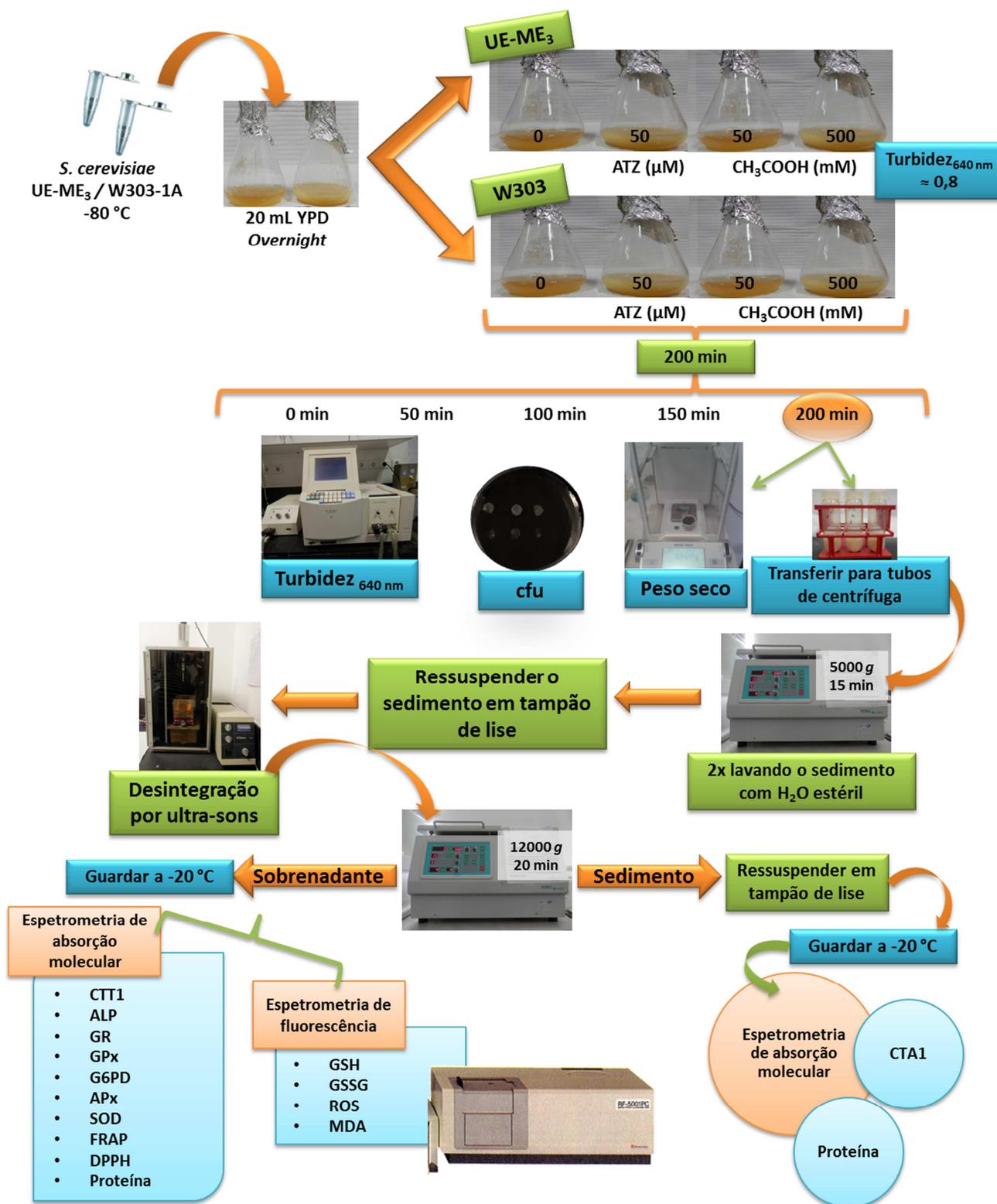
- Conteúdo em proteínas do sobrenadante e sedimento pós-12000 g;
- Malonodialdeído (MDA) do sobrenadante pós-12000 g;
- Espécies reativas de oxigénio (ROS) do sobrenadante pós-12000 g;
- Glutationo (GSH) do sobrenadante pós-12000 g;
- Dissulfureto de glutatióno (GSSG) do sobrenadante pós-12000 g;
- Fosfatase Alcalina (ALP);
- Glutationo redutase (GR);
- Glutationo peroxidase (GPx);
- Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD);
- Catalase citoplasmática (CTT1);
- Catalase peroxissomal (CTA 1);
- Ascorbato Peroxidase (APx)
- Superóxido Dismutase (SOD);
- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
- Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP).

Análise estatística dos resultados: Análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan.

Técnicas utilizadas:

- Cultura de microrganismos;
- Desintegração celular, por homogeneizador de sonda de ultrassons;
- Fracionamento celular, por centrifugação diferencial;
- Espectrometria de absorção molecular (conteúdo em proteínas, FRAP e DPPH e atividades enzimáticas CTT1, CTA1, GR, GPx e G6PD, ALP, SOD e APx);
- Espectrometria de fluorescência (conteúdo em GSH, GSSG, ROS e MDA);
- Ferramentas informáticas - folha de cálculo Excel e *software* para análise estatística SPSS, versão 22, adquirida pela Universidade de Évora.

3.2. Diagrama do Trabalho



3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Material biológico e obtenção das culturas de células

Neste estudo, foram utilizadas duas estirpes de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a UE-ME₃, isolada em mostos de vinhos regionais do Alentejo, Portugal da coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora e a estirpe W303, pertencente à coleção EUROSCARF, muito utilizada em laboratórios de pesquisa bioquímica/biomédica de todo o mundo. Estas leveduras encontram-se guardadas no nosso laboratório a -80 °C.

S. cerevisiae UE-ME₃ e W303 conservadas a -80 °C, foram colocadas a crescer *overnight* em meio líquido YPD, composto por extrato de levedura (1%), peptona (2%) e glucose (2%), de forma a garantir uma população celular elevada. Transferiu-se uma alíquota deste meio para novos meios YPD (controlo e tratamentos) e incubou-se em banho com agitação à temperatura de 28 °C, até a cultura atingir a fase exponencial do crescimento (turbidez_{640nm} ≈ 0,8), instante em que se adicionou o respetivo agente de stress atrazina (50 µM), ácido acético (50 mM) ou ácido acético (500 mM). As culturas (controlos e tratamentos) foram mantidas em agitação constante à temperatura de 28 °C durante 200 min, sendo o crescimento acompanhado pela leitura de turbidez_{640nm} e pela determinação de unidades formadoras de colónias (cfu) a cada 50 min de ensaio.

No final do ensaio determinou-se o peso seco, um importante indicador da biomassa produzida durante a cultura, para os ensaios controlo e tratamentos com os agentes de stress atrazina e ácido acético. As amostras recolhidas de cada cultura foram colocadas a secar em estufa a 80 °C até atingirem peso constante.

3.3.2. Fracionamento celular

Aos 200 min de ensaio, recolheu-se e centrifugou-se o conteúdo dos erlenmeyers a 5000 g, 4 °C, durante 15 min. Após esta primeira centrifugação desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento por duas vezes com H₂O bidestilada repetindo o passo de centrifugação. De seguida procedeu-se a nova centrifugação nas condições acima descritas, desprezando-se o sobrenadante, e ressuspendendo-se o sedimento em tampão de lise (tampão fosfato 10 mM, pH 7,0). Posteriormente, procedeu-se à lise da suspensão celular por ultra-sons em três ciclos de 5 min cada a 4 °C. Transferiu-se o homogeneizado obtido para tubos de centrífuga, e centrifugou-se a 5000 g, 4 °C, durante 15 min. Após este passo de centrifugação, recolheu-se o sobrenadante, que foi então centrifugado a 12000 g, 4 °C, durante 20 min. Recolheu-se o sobrenadante (pós 12000 g) e distribuiu-se por microtubos em alíquotas de 300 µL. O sedimento (pós 12000 g) foi ressuspendido em tampão de lise,

distribuído por microtubos em alíquotas de 100 µL. As alíquotas foram preservadas a -20 °C, para determinação posterior de conteúdos e atividades enzimáticas.

3.3.3. Determinação de conteúdos das frações celulares

3.3.3.1. Proteínas

A quantificação do teor proteico das amostras foi efetuada pelo método de Lowry (1951). Neste método, a proteína é tratada com sulfato de cobre, na presença de tartarato de sódio e potássio, seguido da adição de reagente de Folin-Ciocalteu. A ligação peptídica (-CO-NH-) reage com o sulfato de cobre em meio alcalino, obtendo-se um complexo de cor azul. Os resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano da proteína causam uma redução do molibdato, tungstato e ácido fosfórico (componentes do reagente de Folin-Ciocalteu), com o objetivo de se obter um composto de cor azul, melhorando, assim, a sensibilidade do método. Este cromóforo pode ser doseado por espectrometria de absorção molecular ao comprimento de onda máximo de 750 nm (Walther, 2003).

Assim, a quantificação da proteína, iniciou com a preparação do reagente de Lowry, diluindo 1 mL de sulfato de cobre (1 %) e 1 mL de tartarato de sódio e potássio (2 %) com carbonato de sódio (2 %) até ao volume de 100 mL. Posto isto, diluiu-se a solução comercial de reagente de Folin-Ciocalteu em água destilada, na proporção de 1:1. De seguida, preparou-se uma curva de calibração, em que se usou uma solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para a quantificação do teor proteico, diluíram-se alíquotas de sobrenadante e sedimento pós 12000 g, oriundas das culturas celulares obtidas nas condições de ensaio acima descritas, em NaOH (0,5 M). Seguidamente, fez-se reagir esta mistura com 1,25 mL de reagente de Lowry, agitou-se no vórtex, e aguardou-se 10 min em repouso. De seguida adicionou-se 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, agitou-se no vórtex e aguardou-se 30 min em repouso. Terminado o tempo de repouso, leu-se a absorvência a 720 nm. A concentração de proteína foi determinada por interpolação na curva de calibração obtida com os padrões de BSA, realizada nas mesmas condições de ensaio (fig. 1A).

3.3.3.2. Malondialdeído (MDA)

O MDA é o aldeído mais abundante que resulta da peroxidação lipídica, que ocorre quando as espécies reativas de oxigénio atacam lípidos poli-insaturados (Zhou, 2014). Este pode também formar-se como produto secundário da biossíntese de prostaglandinas (Skalická, 2012). Então, como o MDA é um produto da peroxidação lipídica, pode ser utilizado como um indicador da ação de radicais livres no organismo (Ferreira, 1997). A quantificação de MDA em sistemas biológicos é feita com extrema

facilidade, sendo um parâmetro bastante importante para avaliar o estado de stress oxidativo na célula (Sim, 2003, Skalická, 2012). Yagi introduziu o método (1976), que consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e quantificação do produto resultante por espectrometria de fluorescência.

Preparou-se uma mistura de reação constituída por amostras do sobrenadante pós 12000 g, duodecilssulfato de sódio (SDS) (8,1%) e ácido tiobarbitúrico (TBA) em tampão acetato (10%), pH 3,5. Incubou-se, com agitação a 95 °C, durante 60 min. Após arrefecimento em gelo adicionou-se 2,5 mL de n-butanol e agitou-se. A mistura reacional ficou em repouso durante aproximadamente 1 h, para separação de fases de forma a permitir a recolha da fase orgânica, na qual foi lida a potência de fluorescência a $\lambda_{\text{excitação}}$ 515 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 553 nm com uma abertura de fenda de 10/5. O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

A concentração de MDA foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida através de padrões de MDA com concentração diferente, submetidos a condições iguais às amostras (fig. A2).

3.3.3.3. Espécies reativas de oxigénio (ROS)

As ROS formam-se nos organismos vivos por diferentes vias, nomeadamente a via oxidativa da respiração celular e processos enzimáticos e não enzimáticos de intoxicação/desintoxicação celular (Halliwell, 1989). Quando são produzidas em baixa quantidade e em intervalos de tempo controlado, as ROS desempenham inúmeras funções benéficas para os seres vivos. Estas espécies auxiliam a manutenção do ambiente redox celular, são mediadoras de processos como a fagocitose, apoptose, reações de desintoxicação, entre outros. Estão também envolvidas em vias de sinalização para manter a homeostase celular do organismo. Regulam muitos processos metabólicos e celulares, incluindo a proliferação, migração, expressão de genes, imunidade e cicatrização (Noori, 2012). No entanto, a célula possui sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que tem como objetivo, impedir a formação em excesso ou promover a eliminação de ROS deletérios para outras biomoléculas. Contudo, quando a formação de ROS excede a capacidade antioxidante celular, devido ao aumento da sua produção e/ou à diminuição das defesas antioxidantes, a célula entra em stress oxidativo que em situação crónica pode levar à morte celular (McCord, 2000; Sen, 2000). Pelo facto de as ROS poderem causar danos celulares irreversíveis, o seu doseamento é essencial, devido ao facto de serem marcadores do estado oxidativo da célula.

Determinou-se o conteúdo em ROS pelo método descrito por LeBel (1990). Neste método, a diclorofluoresceína (DCFH) reage com estas espécies químicas, produzindo um complexo que emite fluorescência. Então, para quantificar as ROS presentes na amostra, começou-se por preparar uma mistura reacional contendo DCFH (1 M) em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 e Tris-HCl (40 mM) pH 7,4, na proporção 1:40. Esta mistura de reação foi incubada durante um período de tempo de 5 min em banho com agitação a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota de amostra do sobrenadante pós 12000 g à mistura de DCFH preparada. Agitou-se a mistura e incubou-se durante 10 min em banho com agitação a 37 °C. De seguida, leu-se a potência de fluorescência desta mistura reacional, a $\lambda_{\text{excitação}}$ 485 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 520 nm com uma abertura de fenda 3/3. O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

A concentração de ROS foi determinada por interpolação em curva de calibração, obtida para padrões de concentração variável de H₂O₂, submetidas às mesmas condições que as amostras (fig. A3).

3.3.3.4. Glutationo e dissulfureto de glutationo (GSH e GSSG)

O tripéptido glutationo (GSH) está envolvido em quase todos os processos celulares, atuando como protetor contra as ROS (Teng, 2011). O GSH representa um sistema de defesa primário contra o peróxido de hidrogénio e outros peróxidos da célula. Este tripéptido atua, também, como cofator de vários enzimas no combate ao stress oxidativo, que o vão oxidar a dissulfureto de glutationo (GSSG). É também importante referir que o tripéptido glutationo é um dos responsáveis pela estabilização do saudável ambiente redutor celular (Meister, 1988).

O método para quantificação do GSH e GSSG foi descrito por Hissin em 1976. Para quantificar o conteúdo em GSH, foram utilizadas amostras de sobrenadante pós 12000 g, diluídas em tampão fosfato de sódio (0,1 M), EDTA (0,005 M), pH 8,0 e solução incompleta de *o*-fetaldeído (OPT) sem β -mercaptoetanol. Agitou-se esta mistura no vórtex, e de seguida colocou-se no banho com agitação à temperatura ambiente durante 15 min. Posto isto, transferiu-se a mistura para uma célula de fluorímetro de quartzo, lendo-se a potência de fluorescência nas seguintes condições: $\lambda_{\text{excitação}}$ de 350 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ de 420 nm, com uma abertura de fenda de 3/3. O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A concentração de GSH na amostra foi determinada por interpolação na curva

de calibração obtida com padrões de GSH submetidos a condições de ensaio equivalentes às descritas (fig A4).

Na quantificação do GSSG, foram utilizadas amostras de sobrenadante pós 12000 g, diluídas em solução de *N*-etilmaleimida (NEM) (0,04 M) um sequestrador do GSH, de forma a eliminar a contaminação pelo tripéptido endógeno. Esta mistura reacional foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente, garantindo, deste modo, que o GSH se encontrava totalmente complexado ao NEM. No final da incubação, alíquotas da mistura foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais se adicionou uma solução de OPT comercial e NaOH (0,1 M). Esta mistura foi agitada e, ficou a incubar durante 15 min à temperatura ambiente. Posto isto, leu-se a potência de fluorescência em condições idênticas às condições referidas para a quantificação de GSH. O controlo negativo do ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A concentração de GSSG foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida através de diferentes padrões de GSSG, submetidos às mesmas condições de ensaio (fig. A5).

3.3.3.5. Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*})

De acordo com Brand-Williams, 1995, o ensaio DPPH mede a capacidade de uma substância para neutralizar os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*}). Esta espécie química constitui um dos poucos radicais azotados orgânicos estáveis, que pode ser comercializado como tal, eliminando a necessidade de ser produzido antes de um ensaio de atividade antioxidante. Em solução metanólica, o DPPH^{*} apresenta coloração arroxeadada, que exibe um máximo de absorvência entre 515 e 520 nm. Ao colocar compostos antioxidantes na amostra, estes vão neutralizar o radical doando um átomo de hidrogénio e convertendo-o num derivado incolor. A perda de cor pode ser determinada por espetrometria de absorção molecular e correlacionada com a capacidade anti-radicalar da amostra testada (Brand-Williams, 1995; Huang, 2005; Andrade, 2011).

Para quantificar o conteúdo em DPPH^{*}, foram usadas alíquotas de sobrenadante pós 12000 g, diluídas numa solução metanólica de DPPH (0,03 g/L). A absorvência foi lida a 515 nm à temperatura ambiente ao fim de 180 s. O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A concentração de DPPH foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com diferentes padrões de ácido gálico, submetidos às mesmas condições de ensaio (fig. A6).

3.3.3.6. Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP)

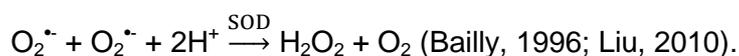
O método para avaliar o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) foi descrito por Benzie e Strain (1996), e baseia-se na redução, em meio ácido, de um complexo férrico de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) ([Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺) a um complexo ferroso de TPTZ ([Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺) com uma forte coloração azul escura. Quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, podendo ser monitorizado através da leitura da absorvência a um comprimento de onda de 593 nm (Huang, 2005; Martins, 2013).

Para avaliar o FRAP, foram usadas alíquotas de sobrenadante pós 12000 g, diluídas no reagente FRAP, sendo este reagente composto por tampão acetato de sódio (300 mM) pH 3,6, uma solução de cloreto de ferro (20 mM) e TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM). O produto da reação foi determinado pela leitura de absorvência a 593 nm à temperatura de 37 °C ao fim de 180 s. O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura reação, substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A concentração de FRAP foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida através de diferentes padrões de Trolox, submetidos às mesmas condições de ensaio (fig. A7).

3.3.4. Determinação de atividades enzimáticas das frações celulares

3.3.4.1. Superóxido dismutase (SOD)

O enzima superóxido dismutase é geralmente considerado um enzima chave na regulação da concentração intracelular do radical anião superóxido. Este enzima catalisa a redução de radicais anião superóxido (O₂^{•-}) formando peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e dioxigénio (O₂), de acordo com a seguinte reação:



Para quantificação do enzima recorreu-se ao método descrito por Azevedo (2000), onde se segue a taxa de inibição da redução do citocromo c gerado pelo enzima xantina oxidase (Soprana, 2011).

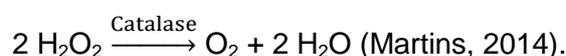
O enzima SOD foi quantificado numa mistura de reação contendo tampão fosfato (50 mM) pH 7,8, xantina (3 mM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM), cloreto de nitrotetrazólio (azul) (NBT) (0,75 mM), albumina de soro bovino (BSA) 15 % e uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (59,29 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 102,69 mg/L na estirpe W303). A reação foi iniciada com a adição do enzima xantina oxidase (0,80 U/mL), sendo esta seguida pela leitura da absorvência a 560 nm, à temperatura de 25 °C, durante 600 s.

A atividade enzimática foi determinada a partir do coeficiente angular das curvas de reação ($0,9850822 < r < 0,9977374$, fig. A8). O controlo negativo deste ensaio foi realizado contra um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (50 mM) pH 7,8.

3.3.4.2. Catalase A e T (CTA1 e CTT1)

O peróxido de hidrogénio é um mensageiro inorgânico produzido pelas células durante a respiração aeróbia. Em baixa concentração, o H₂O₂ desencadeia respostas adaptativas que aumentam a resistência da célula a oxidantes, aumentando, deste modo, a expressão de enzimas antioxidantes e proteínas relacionadas com o stress. Quando em elevadas concentrações, o H₂O₂ torna-se tóxico, provocando a morte celular programada e a produção de HO[•]. Posto isto, os níveis de H₂O₂ celular são fortemente regulados pelos enzimas metabolizadores de H₂O₂, como por exemplo os enzimas catalase (Martins, 2014).

Os enzimas catalase encontram-se vastamente distribuídos na natureza, em microrganismos aeróbios, em plantas e células animais, pois possuem a função de proteger a célula dos danos causados pelos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio. Os enzimas catalase estão assim envolvidos na desprotonação do peróxido de hidrogénio em água e dióxigénio sem consumo adicional de substratos doadores de eletrões, de acordo com a seguinte reação:



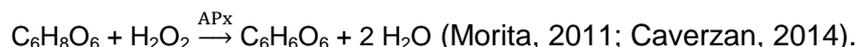
Os enzimas catalase podem ser encontrados sob duas formas, a catalase A (CTA1), presente no sedimento pós 12000 g, e a catalase T (CTT1) presente no sobrenadante pós 12000 g.

Para quantificar estes enzimas recorreu-se ao método descrito por Todovora (2009), preparando-se uma mistura de reação contendo tampão fosfato (50 mM) pH 7,0, que garantia as condições ótimas de funcionamento do enzima e H₂O₂ (30 mM). Iniciou-se a reação adicionando uma alíquota de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g (73,35 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 91,62 mg/mL na estirpe W303 no caso da CTA1, e 15,55 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 17,91 mg/mL na estirpe W303 no caso da CTT1). Esta reação foi seguida através da leitura de absorvência a 240 nm à temperatura de 25 °C durante um intervalo de tempo de 120 s. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9791752 < r < 0,9990561$, fig. A9 e A10) e o coeficiente de absorvidade molar do H₂O₂ (0,0435 mM⁻¹.cm⁻¹). O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura contra um

branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

3.3.4.3. Ascorbato peroxidase (APx)

O enzima ascorbato peroxidase (APx) é uma hemoproteína que reduz o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a água, utilizando o ácido ascórbico (ASA) como substrato. O ácido ascórbico doa eletrões ao peróxido de hidrogénio, produzindo desidroascorbato e água, de acordo com a equação:



Para a quantificação deste enzima recorreu-se ao método descrito por Janda (1999), onde se segue a decomposição do ácido ascórbico pelo APx por espetrometria de absorção molecular.

Este enzima foi quantificado numa mistura de reação constituída por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0, de forma a garantir as condições ótimas do enzima em estudo, ácido ascórbico (1 mM), H₂O₂ (10 mM) e EDTA (0,1 mM), iniciando-se a reação pela adição de uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (39,53 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 76,25 mg/mL na estirpe W303). Esta mistura de reação foi deixada a estabilizar por 3 min, após os quais se seguiu a reação através da leitura de absorvência a 290 nm à temperatura de 37 °C, durante um intervalo de tempo de 300 s. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9523917 < r < 0,994887$, fig. A11) e o coeficiente de absorvidade molar do ácido ascórbico ($2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O controlo negativo do ensaio foi realizado através da leitura contra um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

3.3.4.4. Glutationo peroxidase (GPx)

O enzima glutatióno peroxidase é responsável por catalisar a redução de peróxido de hidrogénio e lipoperóxidos originados pelo ataque das ROS, com formação de dissulfureto de glutatióno (GSSG) e água, de acordo com a seguinte reação:



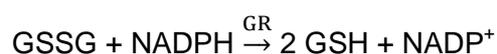
O método de quantificação do enzima GPx foi descrito por Mills (1957) e Inoue (1999). Preparou-se uma mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, garantindo assim o ambiente adequado ao estudo do enzima, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL), NADPH (1,6 mM) e uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (19,76 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 34,23 mg/L na estirpe W303). Deixou-se

estabilizar a mistura de reação a 37 °C, no compartimento do espectrómetro de absorção molecular. Iniciou-se a reação com a adição de ter-butil hidroperóxido (t-BHP) (1 mM) e leu-se a absorvência a 340 nm, a 37 °C durante 600 s.

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9148503 < r < 0,9986371$, fig. A12) e o coeficiente de absorvência molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura contra um branco com a mesma composição da mistura de reação, exceto a amostra.

3.3.4.5. Glutationo redutase (GR)

O enzima glutationo redutase é o enzima responsável pela regeneração do dissulfureto de glutationo (GSSG) em glutationo (GSH), indispensável para o funcionamento do enzima GPx. Este enzima possui um núcleo flavínico no seu centro ativo que irá ser reduzido na presença de NADPH, adquirindo o poder redutor capaz de romper as ligações dissulfureto do GSSG, permitindo a reposição dos níveis de GSH, de acordo com a seguinte reação (Massey, 1965):

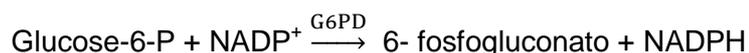


Para a determinação da atividade enzimática GR recorreu-se ao método descrito por Goldberg (1987). Determinou-se a atividade enzimática numa mistura de reação contendo tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, EDTA (15 mM), GSSG (63,5 mM) e uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (59,29 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 102,69 mg/L na estirpe W303). Incubou-se esta mistura a 37 °C durante 300-600 s. De seguida, adicionou-se NADPH (9,6 mM), e leu-se a absorvência a 340 nm, à temperatura de 37 °C, durante 300 s.

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9214526 < r < 0,9949206$, fig. A13) e o coeficiente de absorvência molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O controlo negativo do ensaio foi realizado através da leitura contra um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

3.3.4.6. Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

O enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é o enzima regulador da via das pentoses fosfato. Este catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, com conseqüente redução do NADP⁺ a NADPH, de acordo com a equação:



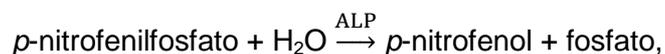
Este enzima é o responsável pela reposição dos níveis de NADPH necessários ao combate antioxidante, anabolismo lipídico entre outros. É também, indiretamente responsável, pela síntese de precursores dos ácidos nucleicos, adquirindo desta forma um papel chave não só no suporte ao combate ao stress oxidativo, mas também na reposição de constituintes celulares danificados, quer devido ao ataque de ROS como a outros processos (Danesi, 2006).

A quantificação deste enzima foi realizada de acordo como o método descrito por Postma (1989) e Bergmeyer (1983). Quantificou-se este enzima através de uma mistura de reação contendo tampão fosfato (1 M) pH 8,0, NADP⁺ dissódico (0,04 M), cloreto de magnésio hexahidratado (0,5 M), glucose-6-fosfato (0,1 M), e uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (19,76 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 34,23 mg/L na estirpe W303). A reação foi seguida através da leitura de absorvência a 340 nm, à temperatura de 37 °C durante um intervalo de tempo de 600 s.

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,909634 < r < 0,999736$, fig. A14) e o coeficiente de absorvidade molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O controlo negativo do ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

3.3.4.7. Fosfatase alcalina (ALP)

O enzima fosfatase alcalina está presente em praticamente todos os organismos vivos, sendo este capaz de hidrolisar uma grande variedade de ésteres e ácidos de pentóxido de fósforo, libertando fosfato. Este processo de hidrólise é denominado por desfosforilação, caracterizando-se pela remoção de grupos de fosfato de diversas moléculas (Rodrigues, 2006). Como o próprio nome indica, este enzima tem o seu ótimo de atividade em pH alcalino, mais precisamente entre 7,5 e 11,0. O enzima ALP catalisa a reação:



onde o substrato *p*-nitrofenilfosfato perde o grupo fosfato, transformando-se em *p*-nitrofenol.

Este enzima foi quantificado numa mistura de reação constituída por tampão Tris-HCl (0,5 M) pH 8,5, de forma a garantir as condições ótimas do enzima em análise, *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) (6 mM) e água, iniciando-se a reação pela adição de uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (39,53 mg/L na estirpe UE-ME₃ e 68,46 mg/L na estirpe W303). A reação foi seguida através da leitura de

absorvência a 450 nm à temperatura de 37 °C durante um intervalo de tempo de 300 s.

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9140957 < r < 0,9987112$, fig. A15) e o coeficiente de absorvidade molar do p-nitrofenol ($18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O controlo negativo deste ensaio foi realizado através da leitura de um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

3.4. Equipamento

- Autoclave da marca Selecta, modelo microclave;
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200;
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205;
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R;
- Espectrómetro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC;
- Espectrómetro de absorção molecular de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant;
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1;
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450;
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34;
- Potenciômetro da marca Hanna, modelo pH 20;
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K;
- Vórtex da marca Heidolph, modelo Reax 2000.

3.5. Reagentes

- 1-Butanol, 99,5 %, Panreac, Barcelona;
- 2, 4,6 -Tris (2-piridil)-s-triazina, 99 %, Sigma, St. Louis;
- 2,2 - difenil-1-picril-hidrazil, Sigma, St. Louis;
- 2',7' - diclorofluoresceína, Sigma, St. Louis;
- Acetato de sódio trihidratado, 99, 0-101,0%, Panreac, Barcelona;
- Ácido acético glacial, Panreac, Barcelona;
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37,0 %, Merck, Darmstadt;
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St.Louis;
- Ácido gálico, pró-análise, Sigma, St Louis;
- Ácido L(+)-ascórbico, Prolabo, Leuven;
- Ácido tiobarbitúrico, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Agar bacteriológico, Himedia, Mumbai;
- Albumina do soro bovino, Sigma, St. Louis;
- Ascorbato, pró-análise, 99%, Fluka, St. Louis
- Atrazina, Pestanal, Riedel de Haën, Seelze;

- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt;
- Cloreto de Ferro (III) hexahidratado, pró-análise, Merck, Darmstadt;
- Cloreto de magnésio hexa-hidratado, 99 %, Sigma, St. Louis;
- Cloreto de nitrotetrazolio (azul), sigma-aldrich, Suíça;
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Dissulfureto de glutationo, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis;
- Duodecilssulfato de sódio, Sigma, St. Louis;
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8 %, Merck, Darmstadt;
- Extrato de levedura, 99,0 %, Sigma, St. Louis;
- Fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina oxidado (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- Fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- Glucose, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- Glucose-6 Fosfato, Sigma-Aldrich, St. Louis;
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis;
- Glutationo, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis;
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt;
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Metanol, Sigma-Aldrich, St.Louis;
- N-etilmaleimida, Sigma, St. Louis;
- o-fetaldeído, Sigma, St. Louis;
- Peptona, 99,0 %, Sigma, St. Louis;
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30,0 %, Sigma, St. Louis;
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis;
- Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5-102,9 %, Panreac, Barcelona;
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- ter-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis;
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- Trolox metil éter, 98%, Sigma, St. Louis;
- Xantina oxidase, Sigma, St. Louis;
- Xantina, 99%, Sigma, St. Louis.

4. Resultados e Discussão

O uso abusivo de herbicidas como a atrazina, de fraca mobilidade no solo e difícil degradação química e biológica, por isso considerados como POPs e potenciais indutores de stress oxidativo, despoletou na comunidade científica um interesse elevado em esclarecer eventuais mecanismos de toxicidade destes fitofármacos em células eucarióticas. Deste modo, o principal alvo deste estudo foi testar que o perfil de crescimento e a capacidade de resposta antioxidante das leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 não diferem entre si e não são perturbados pela exposição à referida triazina.

As figuras 4.1 A e 4.1 B representam curvas de crescimento das estirpes UE-ME₃ e W303, expressas pela turbidez, na ausência de qualquer agente de stress, o controlo, e na presença de atrazina (50 µM) ou de ácido acético (50, 500 mM). Os resultados mostraram que o crescimento da levedura UE-ME₃, exposta à atrazina, assumiu um perfil idêntico ao obtido com células crescidas na presença de ácido acético (500 mM), para o período de tempo entre 0 e 100 min, onde ocorreu uma atenuação do crescimento relativamente ao controlo e às células expostas ao ácido acético (50 mM) (fig. 4.1 A). Assim, a presença de atrazina ou de ácido acético (500 mM) conduzem a uma fase de latência mais ampla do que a detetada no controlo ou na presença de ácido acético (50 mM). No entanto, a tolerância inicial da estirpe nativa à atrazina mostrou-se inferior à detetada para o ácido acético em nível de exposição de ordem de grandeza mil vezes superior. Todavia, nos últimos 100 min da cultura observou-se um crescimento mais acentuado da estirpe UE-ME₃ exposta à atrazina comparativamente com o controlo e as expostas ao ácido acético (fig. 4.1 A). No que diz respeito à estirpe W303, pode-se observar perfis de crescimento semelhantes aos detetados na estirpe nativa UE-ME₃. Assim, a figura 1B revela um perfil de crescimento desta estirpe de levedura exposta à atrazina (50 µM) um pouco mais atenuado do que aquele que foi observado para a outra estirpe de levedura com uma fase de latência estendida até aos 50 min, instante em que assume um declive acentuado até aos 180 min, a partir do qual os valores de células expostas à triazina se tornam significativamente idênticos aos da curva controlo. O atraso inicial detetado nas curvas de crescimento da atrazina pode indiciar o despoletar de mecanismos adaptativos quer em células UE-ME₃ quer em células W303 sobreviventes, facto que lhes permitiu um crescimento mais favorável na fase final da cultura. No instante 200 min, essas condições parecem ter sido atingidas em ambas as estirpes de levedura. Relativamente à exposição ao ácido acético o crescimento na presença deste agente de stress (50, 500 mM) foi significativamente atenuado, em particular nas células

crescidas na presença de ácido acético (500 mM). No que diz respeito à estirpe W303, observou-se ainda uma sobreposição do perfil de crescimento das leveduras expostas à atrazina (50 μ M) com as expostas ao ácido acético (50 mM), até aos 120 min, instante em que a inflexão prematura da curva de crescimento na presença de ácido acético (50 mM) se afastou do perfil da curva obtida na presença de atrazina (fig. 4.1 B). No entanto, a sensibilidade à triazina manifestada pela estirpe comercial na presença deste herbicida parece ser semelhante à detetada na estirpe nativa, em particular para os primeiros instantes da cultura, para a qual a triazina num nível de exposição mil vezes inferior ao nível mais baixo de ácido acético indicia manifestações de toxicidade. A extensão da fase log da curva de crescimento da estirpe UE-ME₃ exposta à atrazina após o instante 100 min sugere que o mecanismo adaptativo à triazina poderá envolver alterações do metabolismo energético condicionantes de respostas antioxidantes diferenciadas em cada uma das estirpes analisadas.

As figuras 4.1 C e 4.1 D exibem as curvas de sobrevivência obtidas para as duas estirpes em estudo na presença ou ausência dos mesmos agentes de stress. Interessantemente, os resultados revelaram um perfil de sobrevivência distinto para cada estirpe estudada na ausência de atrazina ou ácido acético. Contudo detetou-se um decréscimo acentuado da sobrevivência celular em qualquer das situações de exposição para ambas as estirpes de leveduras. Curiosamente, leveduras expostas à atrazina (50 μ M) exibiram um perfil de sobrevivência sobreponível com o detetado com ambas as estirpes expostas ao ácido acético (50 mM), muito diferente do obtido quando expostas a ácido acético (500 mM). Este tipo de resposta permite inferir um nível elevado de toxicidade manifestado pela atrazina em unicelulares eucariontes, uma vez que o nível de exposição à triazina era três ordens de grandeza inferior ao de ácido acético. A referida sobreposição das curvas de sobrevivência sugere indução de morte celular por mecanismo distinto do observado para o nível de exposição (500 mM) descrito na literatura como maioritariamente necrótico.

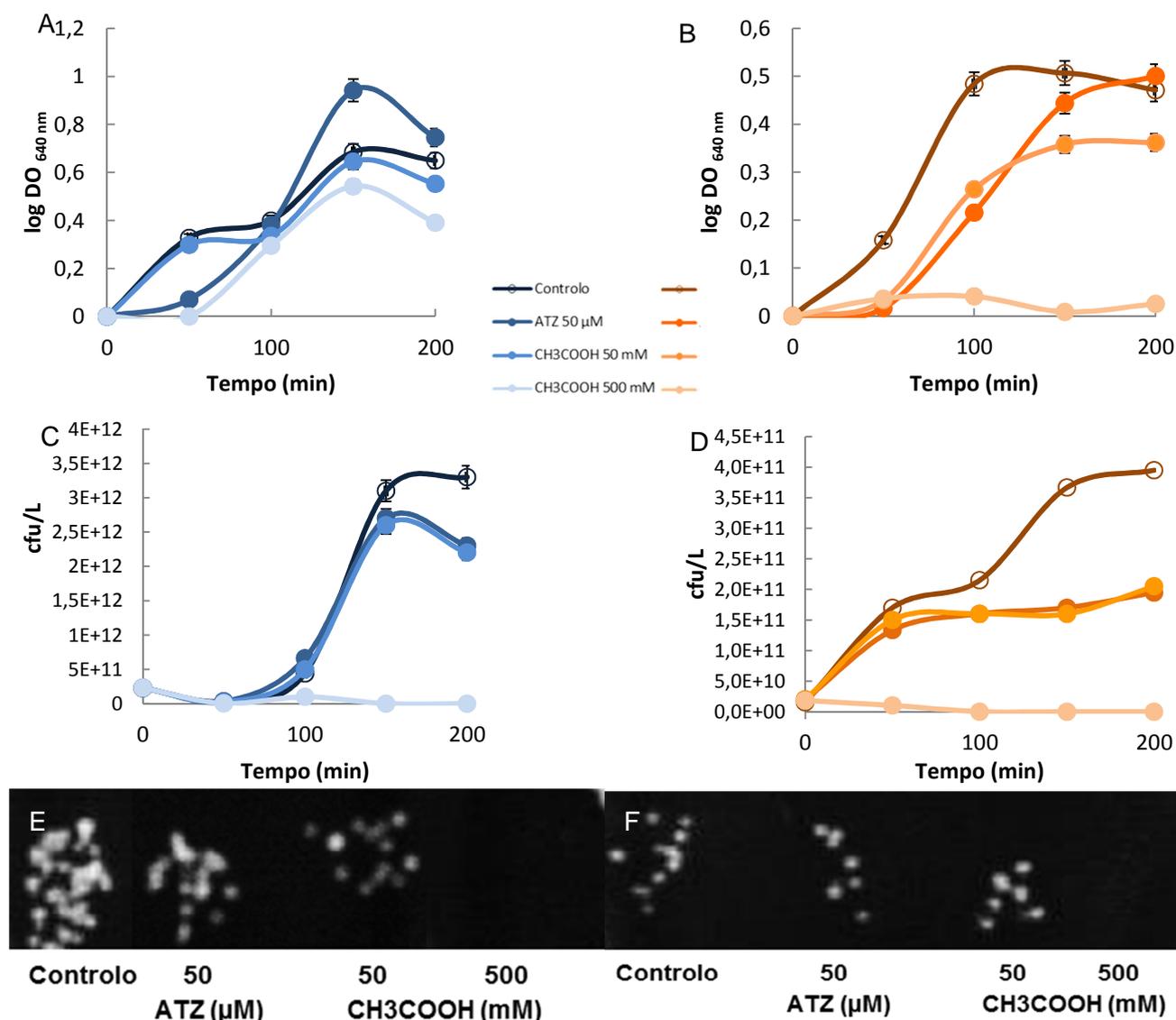


Fig. 4.1. Curvas de crescimento e de sobrevivência celular de *S. cerevisiae* UE-ME₃ - azul (A, C, E) e W303 - laranja (B, D, F) expostas a atrazina (50 μM) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética ± EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

Este tipo de resposta pode ser destacado pelas cfu determinadas aos 200 min de cultura. Assim, a fig. 4.2 A mostra-nos um decréscimo significativo acentuado para ambas as estirpes crescidas na presença de qualquer dos agentes de stress testados. A referida figura mostra ainda que o número de células viáveis nesse tempo de cultura foi superior em qualquer dos ensaios com a levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃. Pela figura 4.2 A podemos ainda detetar uma queda mais acentuada da viabilidade celular em *S. cerevisiae* W303 (50,7 e 48,7 pontos percentuais) nas culturas expostas à atrazina (50 μM) e ácido acético (50 mM), uma vez que para a *S. cerevisiae* UE-ME₃ apenas se detetou uma queda de 30,3 e 33,3 pontos percentuais nas mesmas

condições de ensaio. Contudo, para a exposição ao ácido acético (500 mM) não se detetaram células viáveis no final da cultura. Mais uma vez, detetou-se uma resposta sobreponível nas duas estirpes de leveduras entre a atrazina (50 μ M) e o ácido acético (50 mM). O marcador de disponibilidade energética, ALP, assume um perfil ligado ao crescimento celular e de resposta ao ácido acético sobreponível com o detetado pelas cfu (fig. 4.2 B). Assim, a referida figura mostra uma atividade ALP na estirpe W303 inferior em 40,6 pontos percentuais à detetada na estirpe UE-ME₃. Por outro lado, a exposição ao ácido acético (50, 500 mM) induziu um perfil de resposta desta atividade catalítica semelhante nas duas estirpes (20,9 e 93,8 pontos percentuais para a estirpe W303 e 25,7 e 95 pontos percentuais para a estirpe UE-ME₃). Todavia, só se obteve um decréscimo significativo da atividade ALP para a atrazina (50 μ M) para a estirpe W303, uma vez que ainda que detetada essa tendência na estirpe UE-ME₃ não revelou significado estatístico. Esta resposta pode ter contribuído em termos energéticos para a melhor sobrevivência da estirpe nativa após os 100 min.

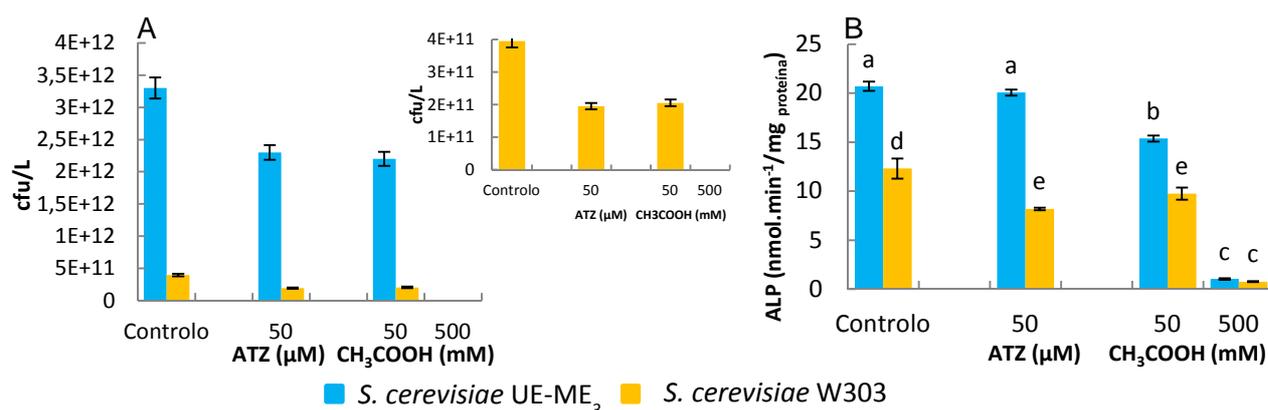


Fig. 4.2. Representação gráfica das cfu ao fim dos 200 min (A) e atividade enzimática ALP (B) estimada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303, crescidas em meio YPD e expostas a atrazina (50 μ M) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética \pm EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

A figura 4.3 representa a quantidade intracelular do tripéptido glutationo, bem como do seu derivado oxidado dissulfureto de glutationo. Assim, a figura 4.3 A revela que a soma dos níveis do tripéptido e do seu derivado que se passa a designar por conteúdo em tióis totais não proteicos, é superior em *S. cerevisiae* W303 crescidas na ausência de qualquer dos agentes de stress. A presença da atrazina não afetou significativamente este conteúdo na estirpe UE-ME₃, embora se tenha detetado um aumento significativo do conteúdo em tióis totais nas células W303 expostas à atrazina (50 μ M). Quando se avaliou a exposição ao ácido acético detetou-se um aumento dos

níveis de tióis totais não-proteicos em *S. cerevisiae* UE-ME₃, mas em células W303 observou-se uma resposta diferente, ocorrendo uma queda significativa desses valores para níveis significativamente muito baixos. Assim, a resposta em termos de níveis de glutatióno à atrazina e ao ácido acético foi diferente em cada uma das estirpes analisadas, podendo em parte justificar a quebra acentuada da viabilidade celular detetada em *S. cerevisiae* W303 expostas ao ácido acético e de algum modo compreender-se a melhor sobrevivência à atrazina e ao ácido acético manifestada pela estirpe UE-ME₃. Pode-se analisar com maior detalhe as flutuações dos níveis intracelulares do tripéptido interpretando as figuras 4.3 B e 4.3 C, onde podemos observar que os níveis de glutatióno e de dissulfureto de glutatióno eram superiores em células W303, facto que numa primeira aproximação nos faria suspeitar de uma melhor capacidade antioxidante mediada pelo glutatióno em células W303. No primeiro caso (fig. 4.3 B), a presença de atrazina no meio de cultura induziu um aumento do conteúdo em GSH nas estirpes seleccionadas para estudo, apesar de não terem ocorrido variações significativas do conteúdo tiólico não-proteico em células UE-ME₃. Esta resposta particular pode dever-se em parte ao decréscimo significativo do conteúdo em dissulfureto de glutatióno observado nesse tipo de células quando expostas à atrazina e ao aumento desse conteúdo em células W303. Deste modo, podemos afirmar que a queda observada nos níveis de dissulfureto de glutatióno em *S. cerevisiae* UE-ME₃ permite inferir uma melhor capacidade antioxidante mediada pelo glutatióno nessa levedura, que contrariamente ao expectável se mostrou menos eficaz em células W303. Este facto poderá justificar, em parte a melhor sobrevivência da estirpe UE-ME₃ à triazina. Contudo, células UE-ME₃ crescidas na presença de ácido acético (50 mM) exibiam níveis significativamente mais elevados de glutatióno e dissulfureto de glutatióno (fig. 4.3 B e 4.3 C), enquanto que células W303 não viram afetados significativamente os níveis de GSH em qualquer condição de exposição ao ácido acético, embora diferentes do controlo e idêntico ao observado com células UE-ME₃ crescidas na presença do nível mais elevado de ácido acético. Curiosamente, os níveis de dissulfureto de glutatióno diminuíram significativamente para o nível de exposição de ácido acético (500 mM) em células W303. Esta variação aparentemente benéfica para essa estirpe poderá dever-se apenas à quantidade muito baixa de células viáveis presentes no meio de cultura, não refletindo uma verdadeira resposta antioxidante. Deste modo, pode-se afirmar que o conteúdo intracelular em tióis não-proteicos em cada estirpe de levedura era distinto, assim como a resposta à atrazina e ao ácido acético, justificando em parte o que já foi especulado nas figuras 4.1 e 4.2.

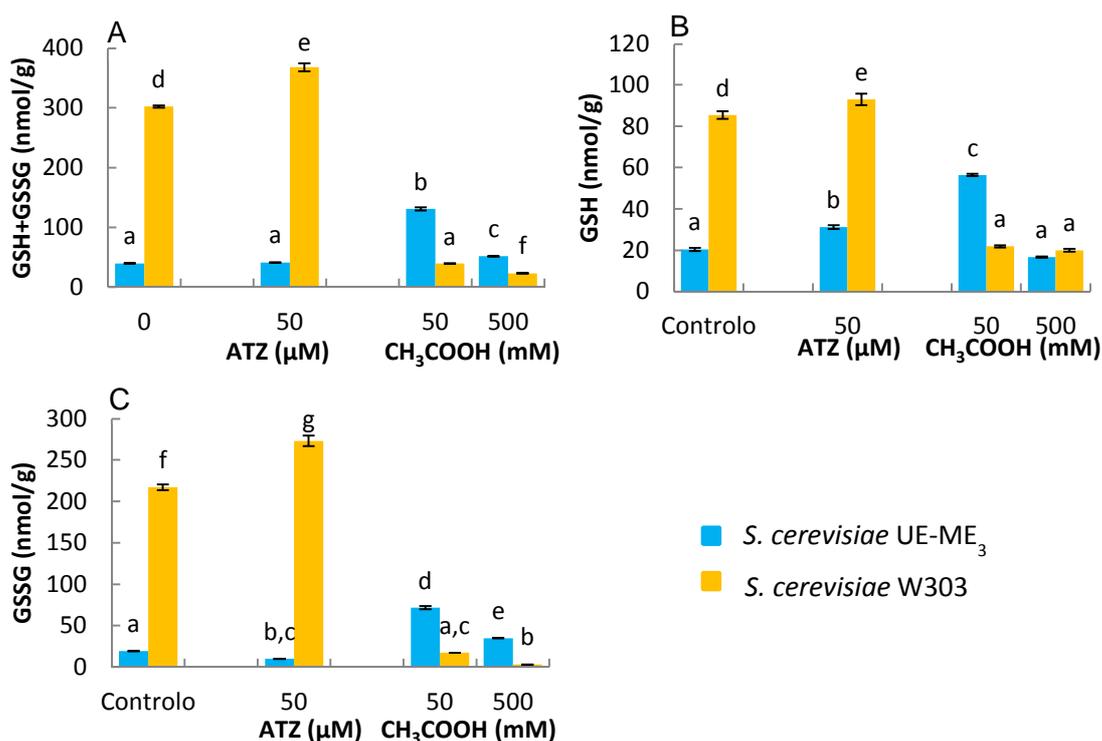


Fig. 4.3. Conteúdo em tióis totais não-proteicos (A), GSH (B) e GSSG (C) determinados por espectrometria de fluorescência, no sobrenadante pós-12000 *g* de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 expostas a atrazina (50 μM) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética ± EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

No seguimento do trabalho procurou-se comparar a capacidade antioxidante mediada pelo par redox GSH/GSSG com a capacidade antioxidante mediada pelo ferro (FRAP) e a capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH do sobrenadante pós-12000 *g*. Assim, a figura 4.4 A mostra-nos que a estabilização do ambiente redutor celular medido pela razão GSH/GSSG na estirpe UE-ME₃ era superior ao detetado na estirpe W303, quando crescidas na ausência de agentes de stress. Todavia, após exposição à atrazina detetou-se um aumento significativo desse parâmetro em células UE-ME₃, efeito que não seguiu o mesmo perfil em células W303, pelo que apesar dos níveis de tióis não proteicos basal serem inferiores em *S. cerevisiae* UE-ME₃, o sistema responde mais adequadamente à estabilização do ambiente celular na presença do herbicida. Esta resposta confirma o que já vimos a especular ao longo deste texto, relativo à manifestação de uma maior resposta antioxidante por células UE-ME₃, à atrazina. Analisando atentamente os efeitos do ácido acético, detetamos um comportamento inverso ao observado para a triazina, isto é, a manutenção do estado redox pelo par GSH/GSSG diminuiu significativamente para qualquer nível de exposição ao ácido acético (50, 500 mM) na estirpe UE-ME₃, perfil contrário ao detetado em *S. cerevisiae* W303, onde se registou um aumento significativo para qualquer nível de exposição. A partir das figuras 4.4 B e 4.4 C,

observamos que a capacidade de resposta antioxidante mediada pelo ferro, bem como a capacidade para sequestrar radicais livres era significativamente superior em células W303 não expostas aos agentes químicos. A mesma diferença foi observada quando células das duas estirpes foram expostas à atrazina (50 μ M), parecendo que apenas em células W303 a capacidade antioxidante mediada por ferro aumentou significativamente. Tendo em conta os resultados obtidos é-se tentado admitir que a capacidade antioxidante mediada pelo ferro não foi relevante na resposta à atrazina na estirpe nativa. No que diz respeito ao efeito produzido pelo ácido acético observou-se um aumento da capacidade antioxidante mediada pelo ferro para os dois níveis de exposição selecionados em *S. cerevisiae* UE-ME₃, resposta inversa detetada em células W303. Um perfil idêntico foi observado em células W303 em termos de capacidade para sequestrar radicais livres (DPPH). Contudo, apenas foi registado um decréscimo acentuado desta propriedade em células UE-ME₃ crescidas na presença de ácido acético 500 mM, não se observando alterações significativas para o nível mais baixo de ácido acético nesta população de células. De novo, a estirpe UE-ME₃ com menor capacidade de resposta antioxidante aparente, mediada pelo ferro ou estimada pelo DPPH exibiu uma melhor sobrevivência ao ácido acético.

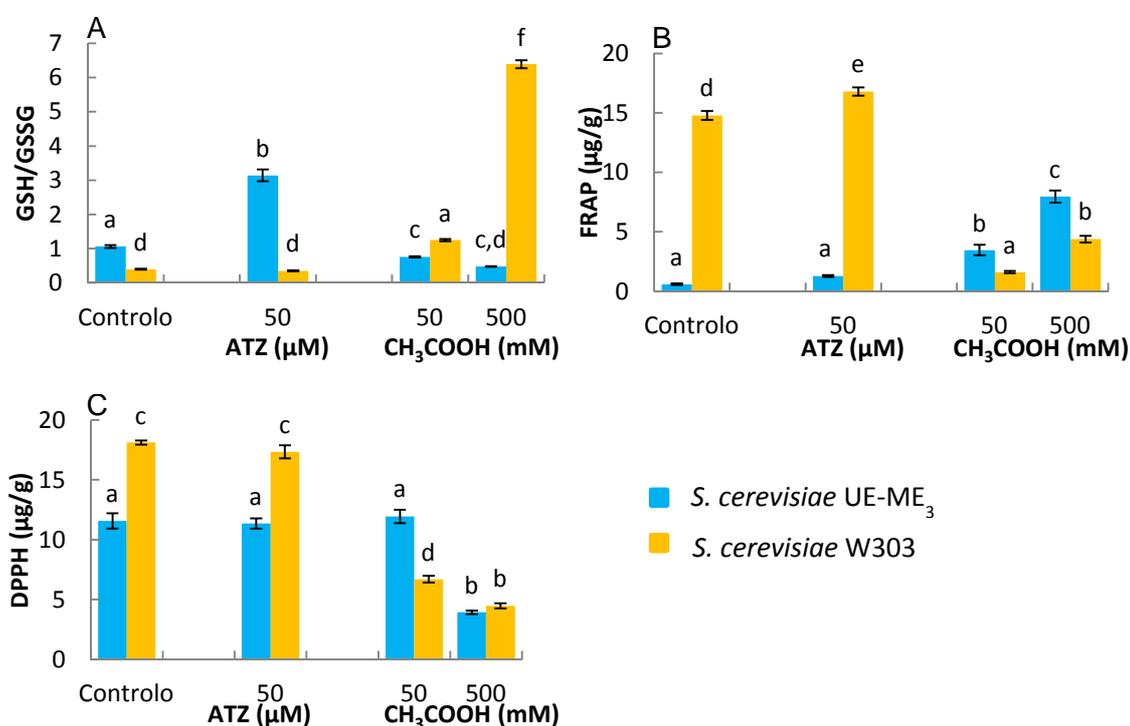


Fig. 4.4. Razão GSH/GSSG (A) e conteúdo em FRAP (B) e DPPH (C) determinados por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303, crescidas em meio YPD e expostas a atrazina (50 μ M) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética \pm EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

A figura 4.5 representa o conteúdo em espécies reativas de oxigénio, estimado pelos níveis de peróxido de hidrogénio intracelulares, bem como o índice de danos celulares estimados pelo produto da peroxidação lipídica, o malonodialdeído detetado nas duas estirpes de *S. cerevisiae* em estudo. A figura 4.5 A revela que os níveis de ROS na estirpe W303 eram muito superiores aos da estirpe UE-ME₃ não expostas a qualquer dos agentes de stress analisados, facto que pode estar correlacionado com a elevada capacidade antioxidante detetada na estirpe comercial pelos métodos FRAP e DPPH, uma vez que o poder antioxidante dependente do par redox GSH/GSSG não parece ter sido eficaz em células W303. A exposição à atrazina (50 µM) induziu na estirpe UE-ME₃ um aumento significativo do conteúdo em ROS comparativamente com o das células controlo, provavelmente uma resposta idêntica à detetada para a exposição das mesmas células ao ácido acético (50 mM). Contudo, os níveis de ROS não sofreram alteração em células W303 expostas à atrazina permanecendo elevados como nas células controlo. No entanto, em presença de ácido acético, as *S. cerevisiae* W303 exibiram conteúdos em ROS significativamente comparáveis com aqueles que foram detetados nas células controlo da estirpe UE-ME₃. Quando se observou a figura 4.5 B detetaram-se níveis de MDA muito superiores em células da estirpe W303, compatíveis com os níveis de ROS detetados e com a baixa capacidade antioxidante exibida pelo par redox GSH/GSSG. Esta condição celular leva a supor que a estirpe comercial era mais débil do que a estirpe nativa, exibindo níveis de danos celulares superiores em células não expostas aos agentes químicos. Quando se procurou compreender o efeito do ácido acético no meio de cultura, a figura 4.5 B mostrou um aumento dos níveis de MDA em *S. cerevisiae* UE-ME₃ expostas ao ácido acético (50, 500 mM) e um decréscimo dos níveis de MDA em células da estirpe W303 expostas ao ácido acético (50 mM), resposta que parece positivamente correlacionável ($r = 0,719$ $p < 0,05$) com os níveis de ROS detetados anteriormente, bem como com a capacidade antioxidante detetada pelo par redox GSH/GSSG, pelo FRAP e pelo DPPH. Surpreendentemente, os níveis de MDA revelaram-se muito elevados nas células UE-ME₃, quase triplicando os níveis detetados na situação controlo, resposta que pode explicar a baixa sobrevivência desta levedura para estes níveis de concentração, muito provavelmente, porque estaremos a detetar derivados de materiais celulares fortemente atacados pela peroxidação lipídica.

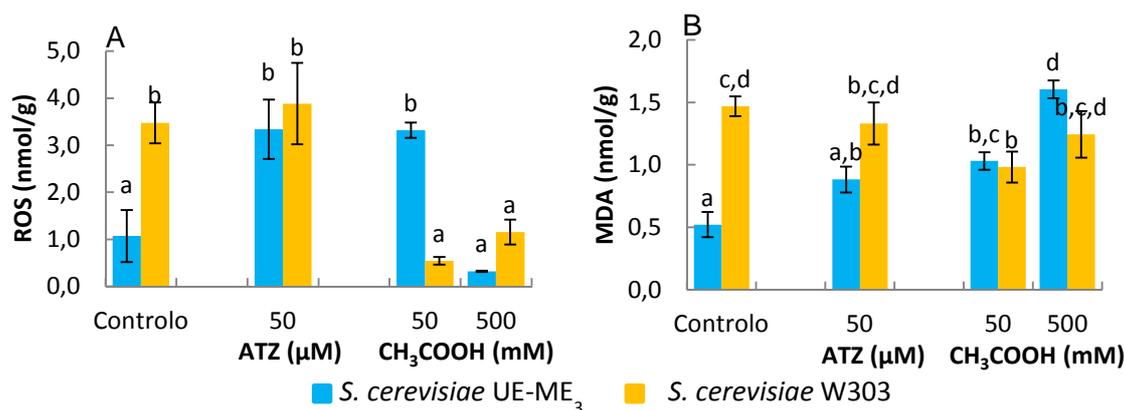


Fig. 4.5. Conteúdo em ROS (A) e MDA (B) determinados por espetrometria de fluorescência, no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 expostas a atrazina (50 μM) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética ± EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

Avaliada a capacidade antioxidante total, não enzimática, os marcadores de stress oxidativo e de danos celulares, procurou-se compreender em parte a origem das espécies reativas e estimar a capacidade da resposta antioxidante enzimática expressa no sobrenadante pós 12000 g das duas populações de células testadas. Assim, a figura 4.6 A revelou um nível mais elevado da atividade SOD1 (Cu-Zn), em células UE-ME₃ ($p < 0,05$). A exposição à atrazina (50 μM) provocou um decréscimo desta atividade catalítica em ambas as estirpes estudadas, resposta que parece estar correlacionada com o aumento de ROS previamente discutido ($r = -0,511$, $p < 0,05$ para *S. cerevisiae* UE-ME₃). A exposição ao ácido acético também provocou um decréscimo significativo desta atividade catalítica em qualquer tipo de células estudadas. Convém no entanto destacar que o valor mais baixo em UE-ME₃ foi registado para o nível de exposição de ácido acético (50 mM). Prosseguindo o nosso estudo, observamos nas figuras 4.6 B e 4.6 C que as atividades enzimáticas ascorbato peroxidase e glutatióno peroxidase eram mais elevadas (7-10 x) em células UE-ME₃ ($p < 0,01$). A exposição à atrazina causou uma queda significativa (≈ 37 pontos percentuais) destas atividades catalíticas em células UE-ME₃. O mesmo perfil de resposta foi apenas detetado na atividade GPx nas células W303. De qualquer modo a queda da atividade catalítica glutatióno peroxidase e ascorbato peroxidase referidas podem estar correlacionadas com a perda da viabilidade celular já discutida anteriormente, detetada na exposição de *S. cerevisiae* à triazina (fig. 4.1 C e 4.1 D). A exposição ao ácido acético provocou também um decréscimo significativo das atividades ascorbato peroxidase e glutatióno peroxidase (80 e 30, 86 e 66 pontos percentuais, respetivamente) em células da estirpe UE-ME₃, podendo de novo ser correlacionados com a perda de viabilidade descrita anteriormente. No entanto, a

atividade APx aumentou em células W303 expostas ao ácido acético (50 mM) e não foi afetada na presença de ácido acético (500 mM). Embora em termos absolutos os níveis de atividade sejam muito baixos, esta flutuação foi um pouco inesperada. No que diz respeito à atividade GPx, a figura 4.6 C revelou um aumento dessa atividade catalítica no mesmo tipo de células. As respostas observadas parecem apontar mais uma vez para uma menor importância da atividade antioxidante mediada pelo ciclo do glutatono na resposta à atrazina pelas células comerciais. Como o ciclo do glutatono é modulado por dois enzimas (GPx e GR) e o funcionamento do próprio ciclo depende dos equivalentes redutores sob a forma de NADPH gerados maioritariamente pelo G6PD, um enzima chave da via das pentoses de fosfato, prosseguimos este estudo avaliando os níveis basais destes enzimas que assistem à transferência de equivalentes redutores na resposta antioxidante mediada pelo tripéptido glutatono. Assim, surpreendentemente as atividades enzimáticas G6PD e GR apresentavam valores significativamente mais elevados na estirpe W303 ($p < 0,01$). Contudo, a exposição à atrazina (50 μ M) provocou um aumento significativo da atividade G6PD e um decréscimo significativo da atividade GR em ambas as estirpes (fig. 4.6 D e 4.6 E). Embora a renovação de equivalentes redutores pelo G6PD seja ampliada, não se observou um perfil idêntico de utilização desses equivalentes redutores na resposta antioxidante do ciclo do glutatono. Um eventual bloqueio desta transferência de potencial redutor e a diminuição das atividades peroxidase podem mais uma vez ter contribuído para a diminuição da viabilidade celular detetada aos 200 min de cultura em células crescidas na presença de atrazina. Quando se avaliou o efeito do ácido acético detetou-se de novo um aumento da atividade G6PD em células UE-ME₃ expostas a ácido acético (50 mM), idêntico ao que aconteceu com a atrazina (50 μ M). No entanto, para o ácido acético não foram detetadas alterações significativas desta atividade catalítica entre tratamentos na estirpe W303. A atividade glutatono redutase não sofreu alterações significativas em células UE-ME₃ expostas ao ácido acético (50 mM), mas diminuiu significativamente para o outro nível de exposição (fig. 4.6 E).

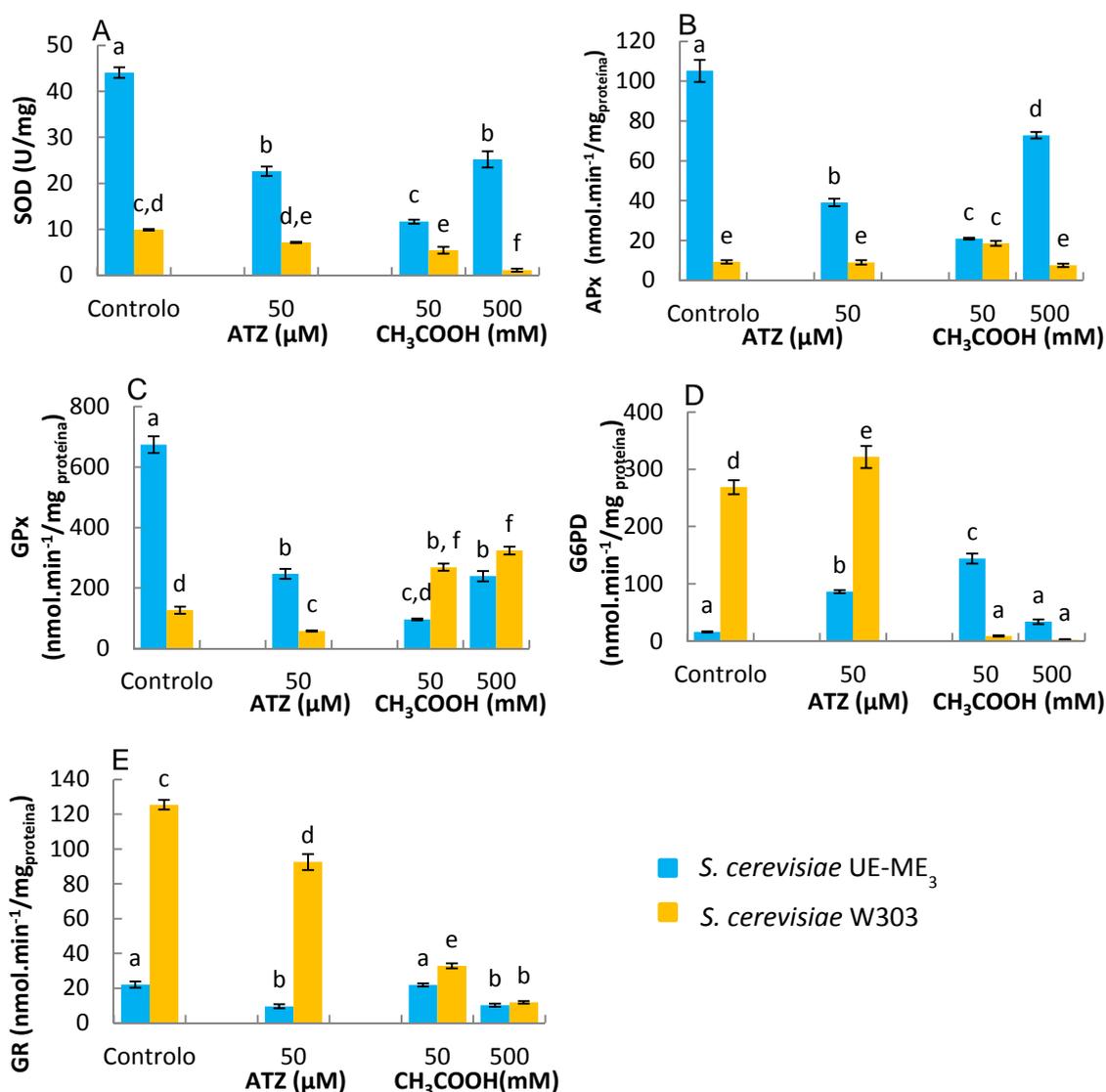


Fig. 4.6. Atividades dos enzimas SOD (A), APx (B), GPx (C), G6PD (D) e GR (E) estimadas por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303, crescidas em meio YPD e expostas a atrazina (50 μM) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética ± EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, p < 0,01).

Por fim, tentou-se avaliar a capacidade antioxidante mediada por hemoenzimas catalase citoplasmáticas (CTT1) e peroxissomais (CTA1). A figura 7A revelou que estas duas atividades catalíticas expressavam-se em níveis mais elevados em *S. cerevisiae* UE-ME₃. Contudo, a exposição à atrazina não perturbou a atividade CTT1 em qualquer das estirpes estudadas mas provocou um decréscimo significativo das atividades CTA1 em ambas as estirpes. Estes resultados levaram a supor uma maior importância do ciclo do glutathione na resposta antioxidante à atrazina em células da estirpe nativa. As figuras 4.7 A e 4.7 B mostram ainda a resposta ao ácido acético por estas atividades catalíticas nas estirpes testadas. Assim, ocorreu um aumento

significativo da atividade CTT1 de células UE-ME₃ e W303 crescidas na presença de ácido acético (50 mM) que não foi perturbada ou diminuiu em células W303 e UE-ME₃ crescidas na presença de ácido acético (500 mM), respetivamente. Relativamente à atividade CTA1 a presença de ácido acético (50, 500 mM) provocou uma queda significativa em células UE-ME₃ crescidas em ácido acético (50 mM) de 61 pontos percentuais e a anulação dessa atividade para a exposição a ácido acético (500 mM) em qualquer das estirpes. Estranhamente, a atividade CTA1 duplicou em células W303 expostas a ácido acético (50 mM), resposta para a qual não se tem uma interpretação razoável. O decréscimo acentuado da atividade CTA1 maioritariamente peroxissomal pode refletir um abrandamento energético da β -oxidação de resíduos acilo que ocorre preferencialmente no peroxissoma de *S. cerevisiae*, já referido no início deste capítulo.

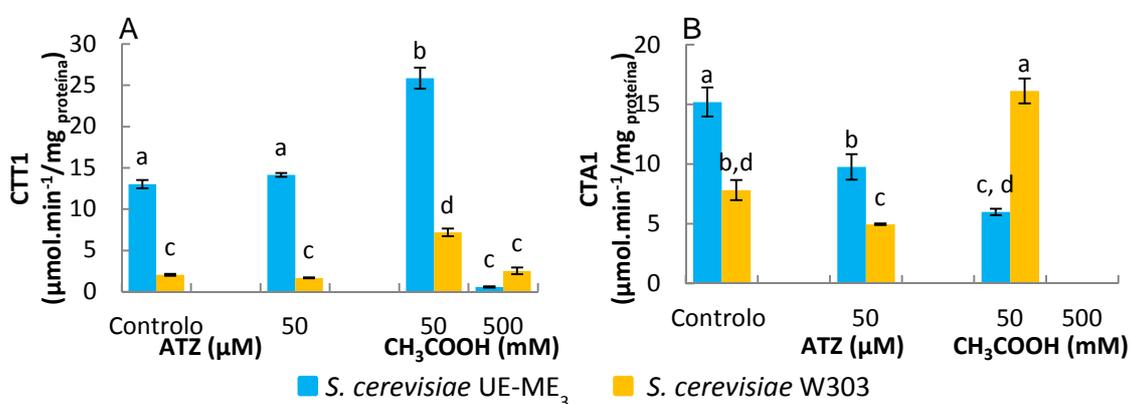


Fig. 4.7. Atividades dos enzimas CTT1 (A) e CTA1 (B) estimadas por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303, crescidas em meio YPD e expostas a atrazina (50 μM) e ácido acético (50, 500 mM). (Cada ponto representa a média aritmética ± EPM, pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes, $p < 0,01$).

Os resultados obtidos revelam que a atrazina é tóxica para as duas estirpes atrasando o seu crescimento e diminuindo a sobrevivência celular ao fim de 200 min de exposição. Os marcadores não enzimáticos e enzimáticos de morte celular estão presentes em ambas as estirpes ao fim de 200 min de exposição seguindo em muitas situações um perfil idêntico ao detetado em células expostas a ácido acético (50 mM) descrito na literatura como um indutor de apoptose, mas as diferenças apresentadas neste estudo preliminar levam a inferir que a atrazina causa morte celular, eventualmente por processo ativo mas distinto do descrito para o ácido acético.

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem tirar as conclusões:

1. A tolerância de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e W303 à atrazina (50 µM) nos instantes iniciais do crescimento foi inferior à detetada para o ácido acético (1000 x inferior).

2. A presença de atrazina (50 µM) ou de ácido acético (500 mM) ampliaram a fase de latência relativamente à curva controlo das duas estirpes estudadas.

3. O crescimento das estirpes UE-ME₃ e W303 expostas à atrazina (50 µM) foi mais acentuado do que na ausência da triazina ou em presença de ácido acético no final da cultura.

4. O atraso inicial detetado nas curvas de crescimento da atrazina pode indiciar o despoletar de mecanismos adaptativos nas células sobreviventes, permitindo-lhes um crescimento mais favorável na fase final da cultura.

5. A exposição ao ácido acético (50, 500 mM) atenuou significativamente o crescimento das duas estirpes de *S. cerevisiae*, embora na ausência dos agentes de stress cada estirpe tenha exibido um perfil de sobrevivência distinto.

6. As células expostas à atrazina (50 µM) exibiram um perfil de sobrevivência e de viabilidade celular sobreponível com o detetado em ambas as estirpes ao ácido acético (50 mM), distinto do detetado para o nível de concentração de 500 mM.

7. O marcador de disponibilidade energética, ALP, assumiu um perfil de resposta ao ácido acético, idêntico ao da viabilidade celular detetado pelas cfu. Assim, a atividade ALP da estirpe W303 mostrou-se significativamente inferior à detetada na estirpe UE-ME₃. Por outro lado, a exposição ao ácido acético (50, 500 mM) induziu uma resposta semelhante desta atividade catalítica nas duas estirpes de *S. cerevisiae*.

8. As respostas descritas nos parágrafos anteriores permitem inferir que a atrazina é muito tóxica para *S. cerevisiae*, um organismo unicelular eucarionte, exercendo efeitos idênticos aos do ácido acético num nível de concentração mil vezes inferior. A sobreposição das curvas de sobrevivência ao ácido acético (50 mM) e atrazina (50 µM) sugerem indução de morte celular por mecanismo distinto do observado para o ácido acético (500 mM), descrito na literatura como maioritariamente necrótico.

9. A presença da atrazina (50 µM) não afetou significativamente o conteúdo em tióis totais não proteicos da estirpe UE-ME₃, embora tenha provocado um aumento significativo deste conteúdo em células W303.

10. A exposição ao ácido acético elevou significativamente o conteúdo em tióis totais não proteicos da estirpe UE-ME₃, mas diminuiu este conteúdo em células W303.

11. A presença de atrazina no meio de cultura induziu um aumento do conteúdo em GSH nas duas estirpes selecionadas para estudo, bem como um decréscimo significativo dos níveis de GSSG em leveduras da estirpe UE-ME₃, facto que parece justificar, em parte, uma melhor sobrevivência da estirpe UE-ME₃ à triazina.

12. A capacidade antioxidante mediada pelo par redox GSH/GSSG na estirpe UE-ME₃ foi superior ao detetado na estirpe W303, quando crescidas na ausência de agentes de stress.

13. A exposição à atrazina induziu um aumento significativo da razão GSH/GSSG em células UE-ME₃, resposta que não seguiu o mesmo perfil em células W303, pelo que apesar dos níveis de tióis não proteicos basal ser inferior em *S. cerevisiae* UE-ME₃, este sistema respondeu mais adequadamente à estabilização do ambiente celular na presença do herbicida.

14. A exposição ao ácido acético (50, 500 mM), induziu um comportamento inverso ao observado para a triazina, diminuindo a capacidade antioxidante mediada pelo par redox GSH/GSSG na estirpe UE-ME₃, resposta oposta à detetada na estirpe W303.

15. A capacidade antioxidante mediada pelo ferro, bem como a capacidade para sequestrar radicais livres, medida pelo DPPH mostrou-se significativamente superior em células W303 não expostas a agentes químicos.

16. A capacidade antioxidante mediada pelo ferro não foi relevante na resposta à atrazina pela estirpe nativa, uma vez que apenas aumentou significativamente em células W303 expostas à atrazina (50 µM).

17. O ácido acético induziu um aumento da capacidade antioxidante mediada pelo ferro para os dois níveis de exposição selecionados na estirpe UE-ME₃, resposta oposta à detetada em células W303.

18. Foi detetado um decréscimo da capacidade para sequestrar radicais livres (DPPH) em células UE-ME₃ crescidas na presença de ácido acético 500 mM, não ocorrendo alterações significativas para o nível mais baixo de ácido acético.

19. Apesar de células UE-ME₃ exibirem menor capacidade de resposta antioxidante mediada pelo ferro ou estimada pelo DPPH possuem sobrevivência mais extensa ao ácido acético.

20. Os níveis de ROS na estirpe W303 eram muito superiores aos da estirpe UE-ME₃ controlo, facto que pode estar correlacionado com a elevada capacidade antioxidante detetada na estirpe comercial pelos métodos FRAP e DPPH, uma vez

que o poder antioxidante dependente do par redox GSH/GSSG não parece ter sido eficaz em células W303.

21. O conteúdo em ROS de células UE-ME₃ expostas à atrazina (50 µM) e ao ácido acético (50 mM) aumentou significativamente, contrariamente ao detetado em células W303 que permaneceram elevados como nos ensaios controlo.

22. Os níveis de MDA eram mais elevados em células da estirpe W303, situação compatível com os níveis elevados de ROS detetados e com a baixa capacidade antioxidante exibida pelo par redox GSH/GSSG.

23. Os níveis de MDA em *S. cerevisiae* UE-ME₃ não foram afetados pela atrazina mas aumentaram em células expostas ao ácido acético (50, 500 mM), tendo diminuído em células da estirpe W303 crescidas em presença de ácido acético (50 mM).

24. A atividade SOD1, mais elevada em células UE-ME₃ diminuiu nas duas estirpes estudadas expostas à atrazina (50 µM) ou ao ácido acético (50, 500 mM), resposta que parece estar correlacionada com o aumento de ROS previamente discutido.

25. A exposição à atrazina e ao ácido acético provocou uma queda significativa das atividades enzimáticas APx e GPx em células UE-ME₃ onde eram mais elevadas nos ensaios controlo. O mesmo perfil de resposta foi apenas detetado na atividade GPx em células W303 expostas á atrazina, resposta que pode justificar a perda da viabilidade celular em presença da triazina.

26. As atividades enzimáticas G6PD e GR eram mais elevadas na estirpe W303. Contudo, a exposição à atrazina (50 µM) provocou um aumento significativo da atividade G6PD e um decréscimo significativo da atividade GR em ambas as estirpes. Embora a renovação de equivalentes redutores pelo G6PD seja ampliada, não se observou um perfil idêntico de mobilização desses equivalentes redutores na resposta antioxidante pelo ciclo do glutationo. Um eventual bloqueio desta transferência de potencial redutor e a diminuição das atividades peroxidase podem mais uma vez ter contribuído para a diminuição da viabilidade celular detetada aos 200 min de culturas de células crescidas na presença de atrazina.

27. O ácido acético causou um aumento da atividade G6PD em células UE-ME₃ expostas a ácido acético (50 mM), idêntico ao detetado com atrazina (50 µM). No entanto, para o ácido acético não foram detetadas alterações significativas desta atividade catalítica entre tratamentos na estirpe W303.

28. A atividade GR não sofreu alterações significativas em células UE-ME₃ expostas ao ácido acético (50 mM), mas diminuiu significativamente para o outro nível de exposição.

29. As atividades CTA1 e CTT1 que se expressavam em níveis mais elevados em *S. cerevisiae* UE-ME₃, diminuíram na presença de atrazina (CTA1) ou não foram perturbadas pela exposição à triazina (CTT1) em qualquer das estirpes testadas. Estes resultados confirmam uma maior importância do ciclo do glutatono na resposta antioxidante à atrazina em células da estirpe nativa.

30. A atividade CTT1 de células UE-ME₃ e W303 crescidas na presença de ácido acético (50 mM) sofreu um aumento significativo que não foi perturbado ou diminuiu em células W303 e UE-ME₃ crescidas na presença de ácido acético (500 mM), respetivamente.

31. O crescimento na presença de ácido acético (50 mM) provocou uma queda significativa da atividade CTA1 de células UE-ME₃ crescidas em ácido acético, bem como a anulação desta atividade para o nível de exposição mais elevado (500 mM) em qualquer das estirpes. O decréscimo acentuado da atividade CTA1 maioritariamente peroxissomal pode refletir um abrandamento energético da β -oxidação de resíduos acilo que ocorre preferencialmente no peroxissoma de *S. cerevisiae*.

32. Os resultados obtidos revelaram que a atrazina foi tóxica para as duas estirpes atrasando o seu crescimento e diminuindo a sobrevivência celular ao fim de 200 min de exposição. Os marcadores não enzimáticos e enzimáticos de morte celular estão presentes em ambas as estirpes ao fim de 200 min de exposição seguindo em muitas situações um perfil idêntico ao detetado em células expostas a ácido acético 50 mM descrito na literatura como um indutor de apoptose, mas as diferenças apresentadas neste estudo preliminar levam a inferir que a atrazina causou morte celular, eventualmente por processo ativo, mas distinto do descrito para o ácido acético.

6. Referências Bibliográficas

- Adesiyan AC, Oyejola TO, Abarikwu SO, Oyeyemi MO, Farombi EO (2011) Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in a atrazine-model of experimental toxicity, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 201-207.
- Akcakaya H, Aroymak A, Gokce S (2007) A quantitative colorimetric method of measuring alkaline phosphatase activity in eukaryotic cell membranes, *Cell Biology International*, 31, 186-190.
- Albuquerque PM, Witt MA, Stambuk BU, Nascimento MG (2007) Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent, *Process Biochemistry*, 42, 141-147.
- Amamcharla JK, Metzger LE (2014) Modification of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay to determine the susceptibility of raw milk to oxidation, *International Dairy Journal*, 34, 177-179.
- Andrade TJS, Araújo BQ, Citó AMGL, Silva J, Saffi J, Richter MF, Ferraz ABF (2011) Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL), *Food Chemistry*, 126, 1044-1048.
- Armas ED, Monteiro RTR, Antunes PM (2007) Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes, *Química Nova*, 30, 1119 – 1127.
- Arora A, Sairam RK, Srivasta GC (2002) Oxidative stress and antioxidant system in plants, *Current Science*, 82, 1227-1238.
- Astiz M, Arnal N, Alaniz MJT, Marra CA (2011) Occupational exposure characterization in professional sprayers: Clinical utility of oxidative stress biomarkers, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 249-258.
- Ávila LG, Leite SB, Dick DP, Pohlmann A (2009) Formulações de atrazina em xerogéis: síntese e caracterização, *Química Nova*, 32 (7), 1727-1733.
- Badmus JÁ, Adedosu TO, Fatoki JO, Adegbite VA, Saramoye AO, Odunola AO (2011) Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68 (1), 23-29.
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging, *Physiologia Plantarum*, 97, 104-110.
- Banik RM, Pandey SK (2009) Selection of metal salts for alkaline phosphatase production using response surface methodology, *Food Research International*, 42, 471-475.
- Barreiros ALBS, David JM, Davis JP (2006) Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Química Nova*, 29 (1), 113-123.

- Baxter L, Brain R, Prosser R, Solomon K, Hanson M (2013) Sensitivity of a green alga to atrazine is not enhanced by previous acute exposure, *Environmental Pollution*, 181, 325-328.
- Belleville E, Dufva M, Aamand J, Bruun L, Clausen L, Christensen CBV (2004) Quantitative microarray pesticide analysis, *Journal of Immunological Methods*, 286, 219-229.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bergmeyer H, Grabl M (1983) Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- Beutler E (1967) Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: In vivo and in vitro studies, *Journal of Clinical Investigation*, 48, 1957-1966.
- Bhandary B, Marahatta A, Kim H-R, Chae H-J (2013) An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 434-456.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidante Defense, *WAO Journal*, 9-19.
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Braconi D, Possenti S, Laschi M, Geminiani M, Lusini P, Bernardini G, Santucci A (2008) Oxidative Damage Mediated by Herbicides on Yeast Cells, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56, 3836-3845.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Raducal Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 28, 25-30.
- Brigelius-Flohé R, Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (1989) In The Selenoprotein Glutathione Peroxidase. Glutathione-Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Wiley, New York.
- Brown MR, Miller FJ, Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL (1999) Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells, *Journal of American Heart Association*, 85, 524-533.
- Burton GJ, Jauniaux MD (2011) Oxidative Stress, *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25, 287-299.
- Caverzan A, Bonifacio A, Carvalho FEL, Andrade CMB, Passaia G, Schunemann M, Maraschin FS, Martins MO, Teixeira FK, Rauber R, Margis R, Silveira JAG, Margis-Pinheiro M (2014) The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice, *Plant Science*, 214, 74-87.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 192-208.

- Chen H, Chen J, Guo Y, Wen Y, Liu J, Liu W (2012) Evaluation of the Role of the Glutathione Redox Cycle in Cu(II) Toxicity to Green Algae by a Chiral Perturbation Approach, *Aquatic Toxicology*, 1-37.
- Clarke G, Ting KN, Wiart C, Fry J (2013) High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest, *Antioxidants*, 2, 1-10.
- Costa V, Moradas-Ferreira P (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217-246.
- Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 468–477.
- Danesi EDG, Miguel ASM, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Jr. AP (2006) Effect of carbon: nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Engineering*, 75, 96-103.
- DePonte M (2012) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3217–3266.
- Donne ID, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzano A (2003) Protein carbonylation in human diseases, *Molecular Medicine*, 19 (4), 169-176.
- El-Bestawy E, Sabir J, Mansy AH, Zabermawi N (2013) Isolation, identification and acclimatization os Atrazin-resistant soil bacteria, *Annals of Agricultural Science*, 58 (2), 119-130.
- Eun-Young J, Hyun-Sun L, Un JC, Song HB, Ki HK, Hyung JS (2010) Acute and subacute toxicity of yeast hydrolysate from *Saccharomyces cerevisiae*, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1677-1681.
- Fang R, Chen G, Yi L, Shao Y, Zhang L, Cai Q, Xiao J (2014) Determination of eight triazine herbicide residues in cereal and vegetable by micellar electrokinetic capillary chromatography with on-line sweeping, *Food Chemistry*, 145, 41-48.
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, *Rev Ass Med Brasil*, 43(1), 61-68.
- Ferreira R, Alves-Pereira I, Magriço S, Ferraz-Franco C (s/d) Comportamento celular e resposta antioxidante diferenciados de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Saccharomyces chevalieri* ao metavanadato de amónio, *Revista de Ciências Agrárias*, 455-464.
- Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L (2005) Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 174-184.
- Gardner HW (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids, *Free Radical Biol. Med.*, 7, 65-86

- Gardner R, Salvador A, Moradas-Ferreira P (2002) Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation, *Free Radical Biology & Medicine*, 32 (12), 1351-1357.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Corte-Real M, Passarella S, Marra E (2005) Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death, *Gene*, 354, 93-98.
- Giddings JM, Anderson TA, Hall Jr LW, Hosman AJ, Kendall RJ, Richards RP (2005) Atrazine in North American surface waters: a probabilistic aquatic ecological risk assessment, Pensacola, FL: SETAC Press. 108-112.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations, *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
- Goldberg D, Spooner R (1987) Glutathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed, Bergmayer, VCH, New York.
- Goldberg RN, Kishore N, Lennen RM (2002) Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers, *Journal of Physical Chemistry*, 31 (2), 231 – 370.
- Guedes RP, Bosco LD, Araújo ASR, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA (2009) Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord, *Brain Research Bulletin*, 80, 422-427.
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-725 .
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Rad Bio Med*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hanioka N, Jinno H, Kitazawa K, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M, Ogawa K (1998) In vitro biotransformation of atrazine by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes, *Chemico-Biological Interactions*, 116, 181-198.
- He H, Yu J, Chen G, Li W, He J, Li H (2012) Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 91-96.
- Hecker PA, Lionetti V, Ribeiro RF, Jr, Rastogi S, Brown BH, O'Connell KA, Cox JW, Shekar KC, Gamble DM, Sabbah HN, Leopold JA, Grupte SA, Recchia FA, Stanley WC (2013) Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Increases Redox Stress and Moderately Accelerates the Development of Heart Failure, *Circ Heart Fail.*, 6, 118-126.
- Hemnani T, Parihar MS (1998) Reactive oxygen species and oxidative DNA damage, *Indian Journal Physiology and Pharmacology*, 42 (4), 440-452.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Ibáñez C, Pérez-Torrado R, Chiva R, Guillamón JM, Barrio E, Querol A (2014) Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from

- fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies, *International Journal of Food Microbiology*, 171, 129-135.
- Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A (1999) Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 17, 27002–27009.
 - Jamieson DJ (1998) Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 14, 1511-1527.
 - Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants, *Planta*, 208, 175-180.
 - Javaroni ACR, Landgraf DM, Rezende OOM (1999) Comportamento dos Herbicidas Atrazina e Alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar, *Química Nova*, 22.
 - Jin Y, Wang L, Chen G, Lin X, Miao W, Fu Z (2014) Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 782-790.
 - Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP, Kubota LT (2001) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, *Química Nova*, 24 (1), 112-119.
 - Kang MA, So E-Y, Simins AL, Spitz DR, Ochi T (2012) DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway, *Cell Death and Disease*, 3, 249-256.
 - Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal Food Science Technology*, 48 (4), 412-422.
 - Kim SH, Kim JK (2009) YCF and YAP gene expressions in yeast cells after irradiation combined with mercury treatment, *Iran. J. Radiat. Res.*, 6 (4), 161-166.
 - Kretzschmar M (1996) Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Experimental Toxicological Pathology*, 48, 439-446.
 - Lange S, Schmitt J, Schmid RD (2001) High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Journal of Immunological Methods*, 255, 103-114.
 - LeBel PC, Ischiropoulos H, Bondys CS (1990) Evaluation of the Probe 2,7 Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res.*, 5, 227-231.
 - Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history, *Molecular Ecology*, 16, 2091-2102.
 - Letavayová L, Marková, Hermanská, Vlcková V, Vlasaková D, Chovanec M, Brozmanová J (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-

homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair*, 5, 602-610.

- Liebert MA (2010) Antioxidants & Redox Signaling 12 (3).
- Lima ES, Abdalla DSP (2001) Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37, 293-303.
- Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Jones CS, Rasmussen S (2013) Functional characterization and transcript analysis of an alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*, *Fungal Genetics and Biology*, 54, 52–59.
- Liu X, Zhang X, Zhang Z (2010) Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 584 1245-1250.
- Loureiro APM, Mascio PD, Medeiros MHG (2002) Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagenese e carcinogenese, *Química Nova*, 25, 777-793.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193, 265-75.
- Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leão C, Côrte-Real M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid, *Microbiology*, 147, 2409-2415.
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Madeo F, Frohlich E, Frohlich KU (1997) A Yeast Mutant Showing Diagnostic Markers of Early and Late Apoptosis, *Journal of Cell Biology*, 139 (3), 729-734.
- Mannarino SC, Amorim MA, Pereira MD, Moradas-Ferreira P, Panek AD, Costa V, Eleutherio ECA (2008) Gluthathione is necessary to ensure benefits of calorie restriction during ageing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, 700-705.
- Martins AC, Bukman L, Vargas AMM, Barizão EO, Moraes JCG, Visentainer JV, Almeida VC (2013) The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology, *Food Chemistry*, 138, 574-580.
- Martins D, English AM (2014) Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast, *Redox Biology*, 2, 308-313.
- Massey V, Williams CH, Jr (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase, *Journal of Biological Chemistry*, 240, 4470-4480.
- Maté MJ, Zamocky M, Nykyri LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Kooler F, Fita I (1999) Structure of Catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal Molecular Biology*, 268, 135-149.

- McCarthy ID, Fuiman LA (2008) Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion, *Aquatic Toxicology*, 88, 220-229.
- McCord JM (2000) - The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am J Med.*, 108, 652-659.
- Meister A (1988) Glutathione Metabolism and It's Selective Modification, *Journal Biol. Chem.*, 33, 17205-17208.
- Mendas G, Vuletic M, Galic N, Drevenkar V (2012) Urinary metabolites as biomarkers of human exposure to atrazine: Atrazine mercapture in agricultural workers, *Toxicology Letters*, 210, 174-181.
- Méndez D, Linares M, Diez A, Puyet A, Bautista JM (2011) Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A- deficiency, *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 1305–1313.
- Menezes MJ, Riley LG, Christodoulou J (2014) Mitochondrial respiratory chain disorders in childhood: Insights into diagnosis and management in the new era of genomic medicine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1368-1379.
- Mills GC (1957) *Journal of Biological Chemistry*, 229, 189.
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.
- Morita S, Nakatani S, Koshiba T, Ogihara Y, Tanaka K (2011) Differential Expression of Two Cytosolic Ascorbate Peroxidases and Two Superoxide Dismutase Genes in Response to Abiotic Stress in Rice, *Rice Science*, 18 (3), 157-166.
- Murphy A, Kavanagh K (1999) Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen Implication for biotechnology, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 551-557.
- Nantakomol D, Paul R, Palasuwan A, Day NPJ, White NJ, Imwong M (2013) Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Malaria Journal*, 12 (289), 1-8.
- Noori S (2012) Na Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System, *Open Access Scientific Reports*, 1 (8), 1-9.
- Peixoto MFSP, Lavorenti A, Regitano JB, Tornisielo VL (2000) Degradação e formação de resíduos ligados de ¹⁴C-atrazina em Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico, *Scientia Agricola*, 57 (1).
- Osorio H, Moradas-Ferreira P, Gunther MAS, Sillero A (2004) In *Saccharomyces cerevisiae*, the effect of H₂O₂ on ATP, but not on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, depends on the glucose concentration. *Arch. Microbiol.* 181, 231-236.
- Penha-Silva N, Cunha GN, Ferreira FA, Coelho DP (2005) Determinação da faixa de referência de glutatono peroxidase no soro de bovinos sadios, *Bioscience Journal*, 21 (2), 89-93.

- Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP (1989) Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 468–477.
- Radosevich M, Traina SJ, Hao YL, Tuovinen OH (1995) Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1), 297-302.
- Ralser M, Kuhl H, Ralser M, Werber M, Lehrach H, Breitenbach M, Timmermann B (2012) The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt, *Open Biology*, 2, 1-9.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012) Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, *INTECH*, 1-28.
- Rodrigues MCA, Guimarães LHS, Liberato JL, Polizeli MLTM, Santos WF (2006) Acid and alkaline phosphatase activities of a fraction isolated from *Parawixia bistriata* spider venom, *Toxicon*, 47, 854-858.
- Ross MK, Filipov NM (2006) Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis, *Analytical Biochemistry*, 351, 161-173.
- Schaedle M, Bassham JA (1977) Chloroplast Glutathione Reductase, *Plant Physiology*, 59, 1011-1012.
- Schrader M, Dariush FH (2006) Peroxisomes and oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1755-1766.
- Sen CK (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regulation*, 36, 1-30.
- Sharma OP, Bhat TK (2009) DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1305-1319.
- Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa KI, Yokota A, Shigeoka S (1998) Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts, *FEBS Letters*, 428, 47-51.
- Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DEL (2003) Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 785, 337-344.
- Singh RP, Sharad S, Kapur S (2004) Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants, *JACM*, 5 (3), 218-225.
- Skalická ZF, Zolzer F, Beránek L, Racek J (2012) Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 111–114.

- Soprana HZ, Souza LC, Debbas V, Laurindo FRM (2011) Cellular prion protein (PrP^C) and superoxide dismutase (SOD) in vascular cell under oxidative stress, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 229-236.
- Takahashi S, Murata N (2005) Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage, *Biochimica e Biophysica Acta*, 1708, 352-361.
- Teng Y, Liu R, Li C, Zhang H (2011) Effect of 4-aminoantipyrine on oxidative stress induced by glutathione depletion in single human erythrocytes using a microfluidic device together with fluorescence imaging, *Journal of Hazardous Materials*, 192, 1766-1771.
- Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash MH, Agrawal R, Basappa SC, Joseph R (1999) Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*, 34, 187-191.
- Vlahović M, Lazarević J, Perić-Mataruga V, Ilijin L, Mrdaković M (2009) – Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 1148-1155.
- Vonberg D, Vanderborght J, Cremer N, Putz T, Herbst M, Vereecken H (2014) - 20 Years of long-term atrazine monitoring in shallow aquifer in western Germany, *Water research*, 50, 294 – 306.
- Walther, U., Czermak, A., Muckter, H., Walther, S., Fichtl, B. (2003) - Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines, *Arch. Toxicol.*, 77:131-137.
- Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochemistry Medical*, 15, 212-216.
- Zandycke SMV, Sohler PJ, Smart KA (2002) The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 365-373.
- Zhao X, Zhang Y, Strong R, Grotta JC, Aronowski J (2006) 15d-Prostaglandin J2 activates peroxisome proliferator-activated receptor- α , promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26, 811-820.
- Zhou F, Xiao M, Su G, Cui C, Sun W (2014) Gelation of salted myofibrillar protein under malondialdehyde-induced oxidative stress, *Food Hydrocolloids*, 40, 153-162.
- Zhu S, Zhao X, Zhang W, Liu Z, Qi W, Anjum S, Xu G (2013) Fluorescence detection of glutathione reductase activity based on deoxyribonucleic acid-templated silver nanoclusters, *Analytica Chimica Acta*, 786, 111-115.

ANEXOS

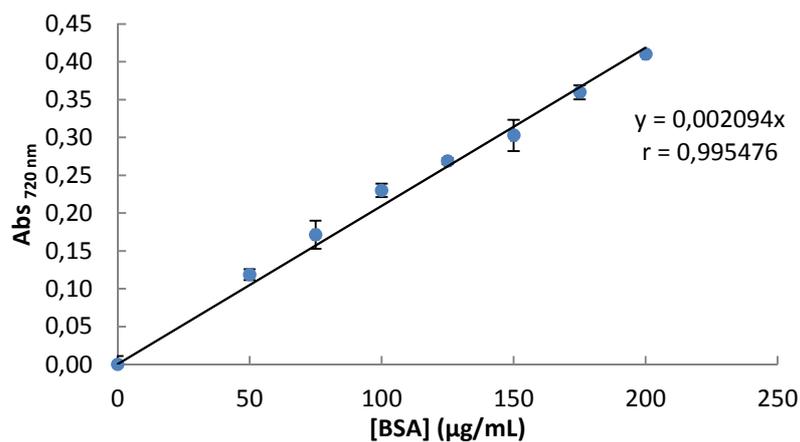


Figura A1. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

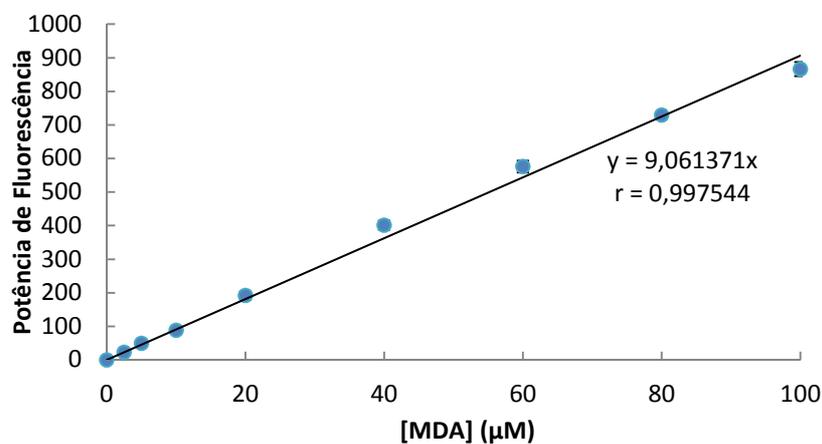


Figura A2. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura de soluções padrão de MDA (0-100 µM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

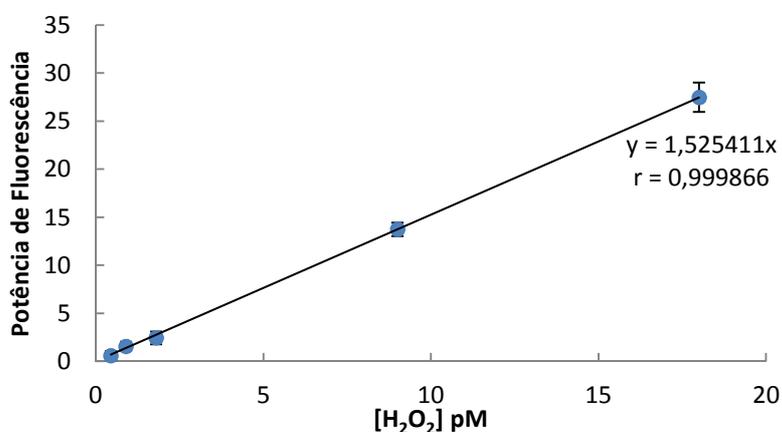


Figura A3. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura de soluções padrão de H₂O₂ (0,45-18 µM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

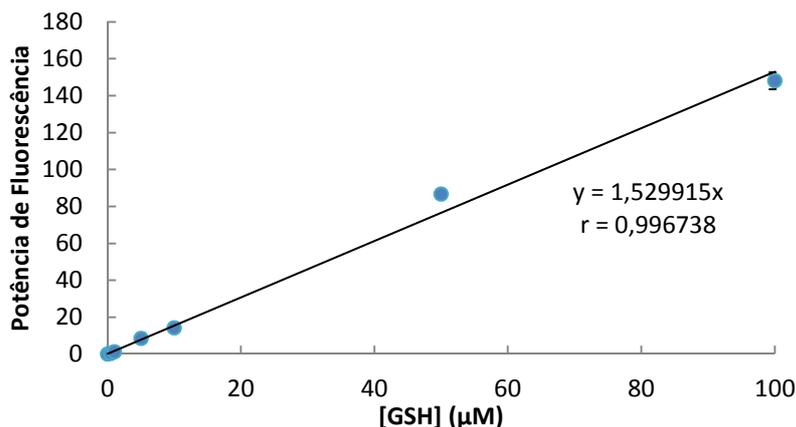


Figura A4. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura de soluções padrão de GSH (0-100 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

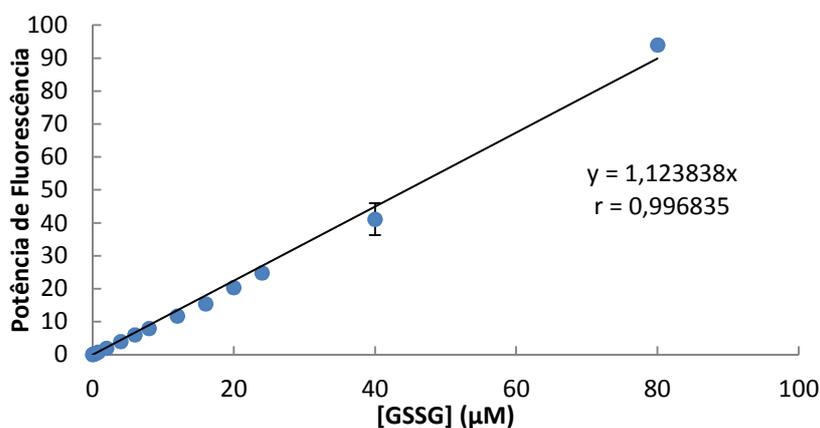


Figura A5. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura de soluções padrão de GSSG (0-80 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

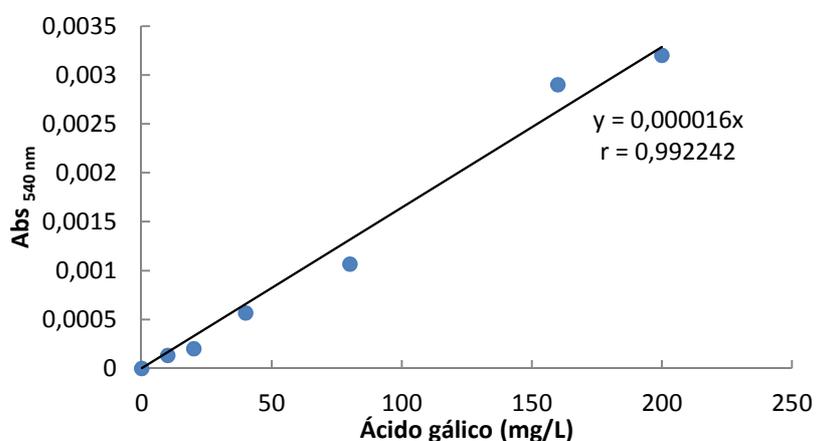


Figura A6. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de DPPH, construída a partir da leitura de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

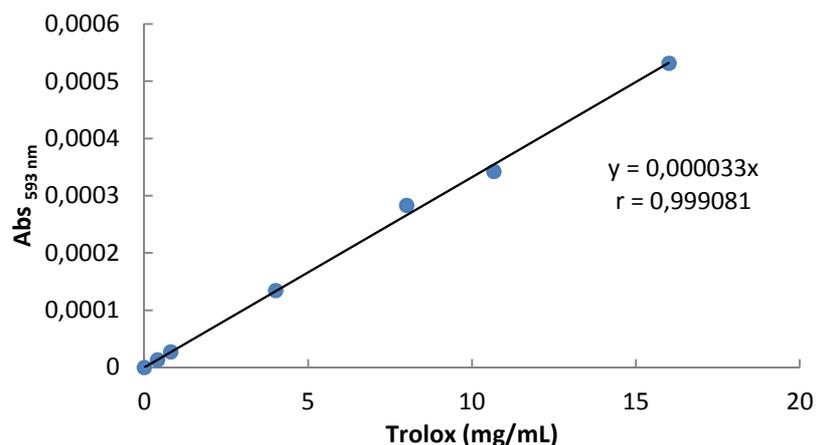


Figura A7. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de FRAP, construída a partir da leitura de soluções padrão de trolox (0-18 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

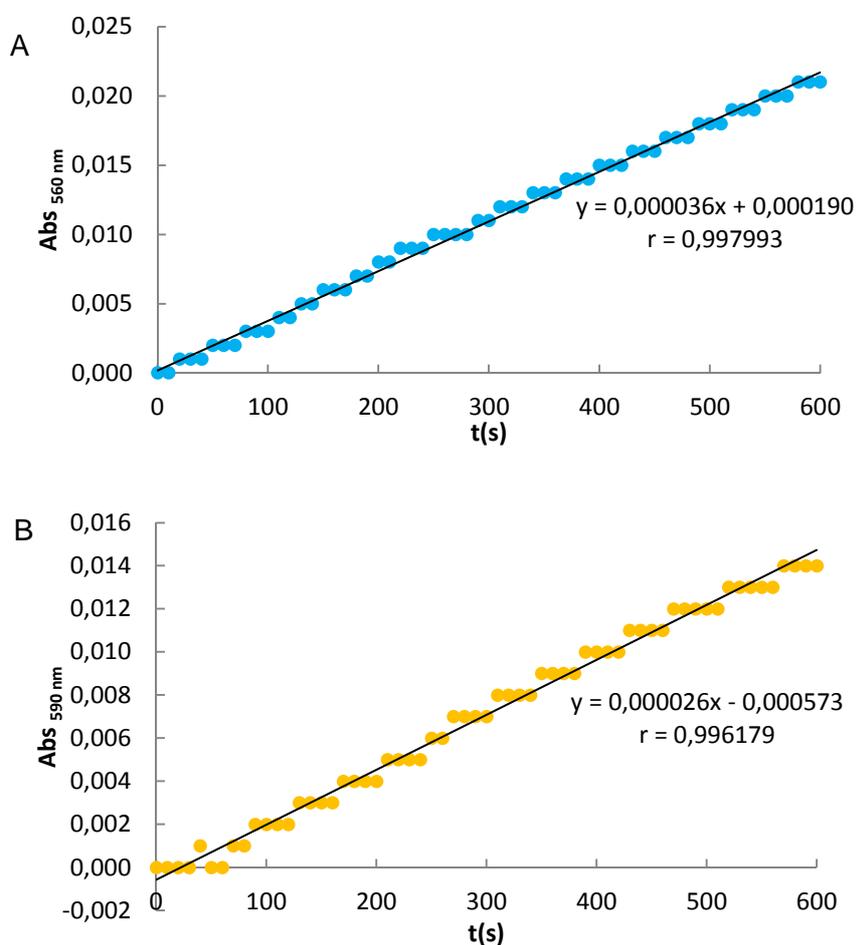


Figura A8. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática SOD de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência de indutor de stress (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 μ M) (B).

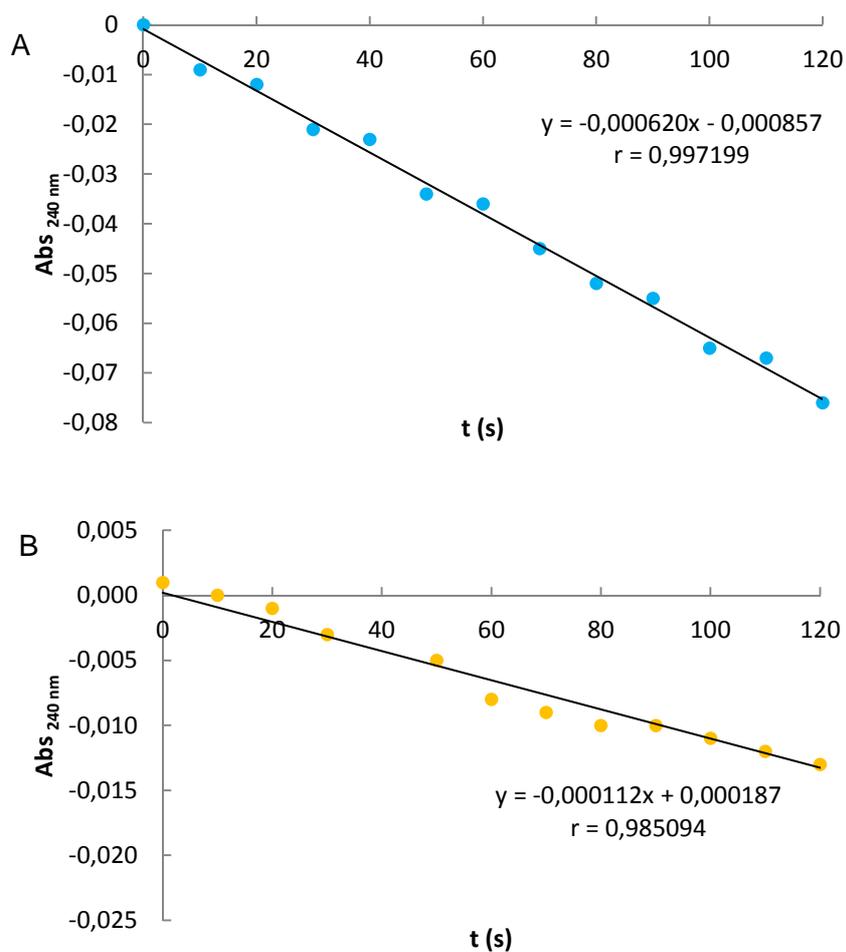
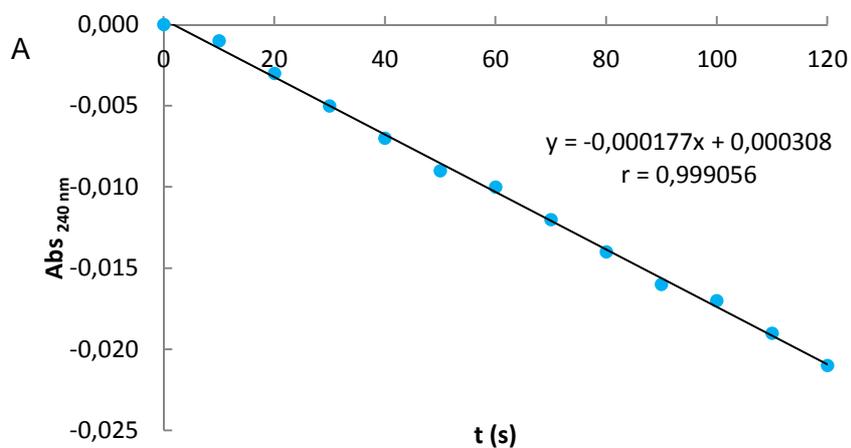


Figura A19. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTA1 de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (50 mM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 μM) (B).



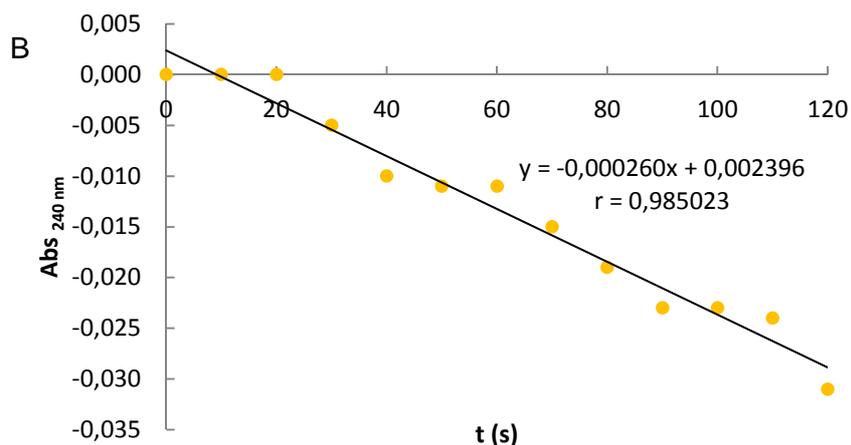


Figura A10. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTT1 de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 µM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (50 mM) (B).

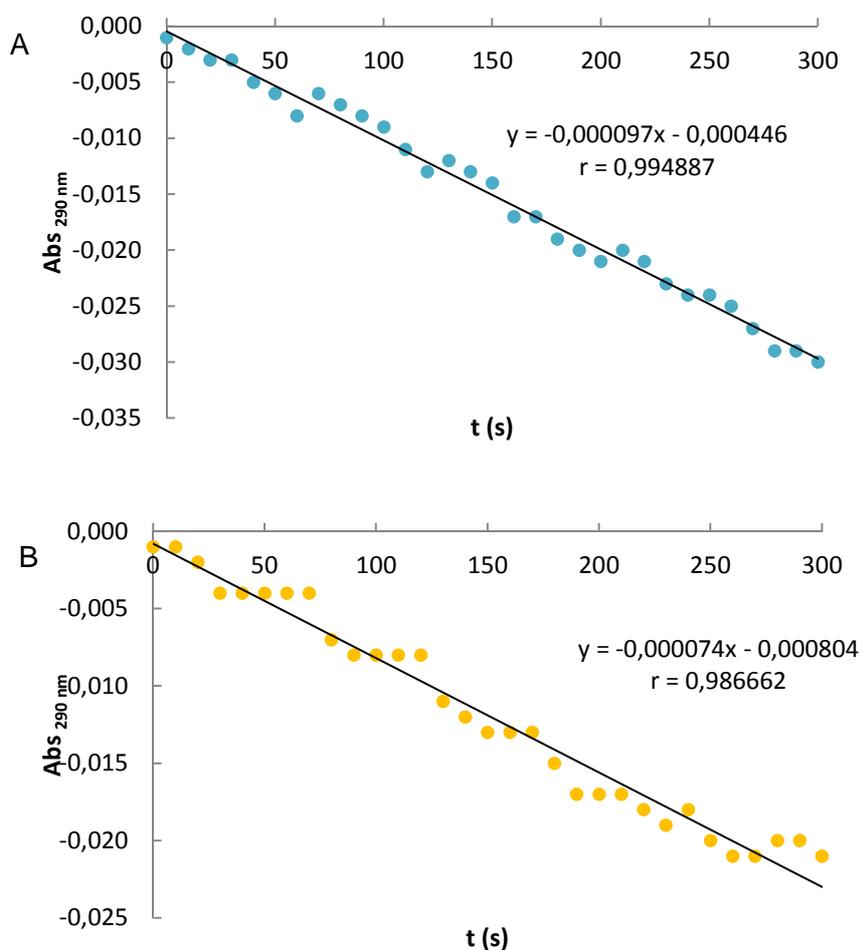


Figura A11. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática APx de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (500 mM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 µM) (B).

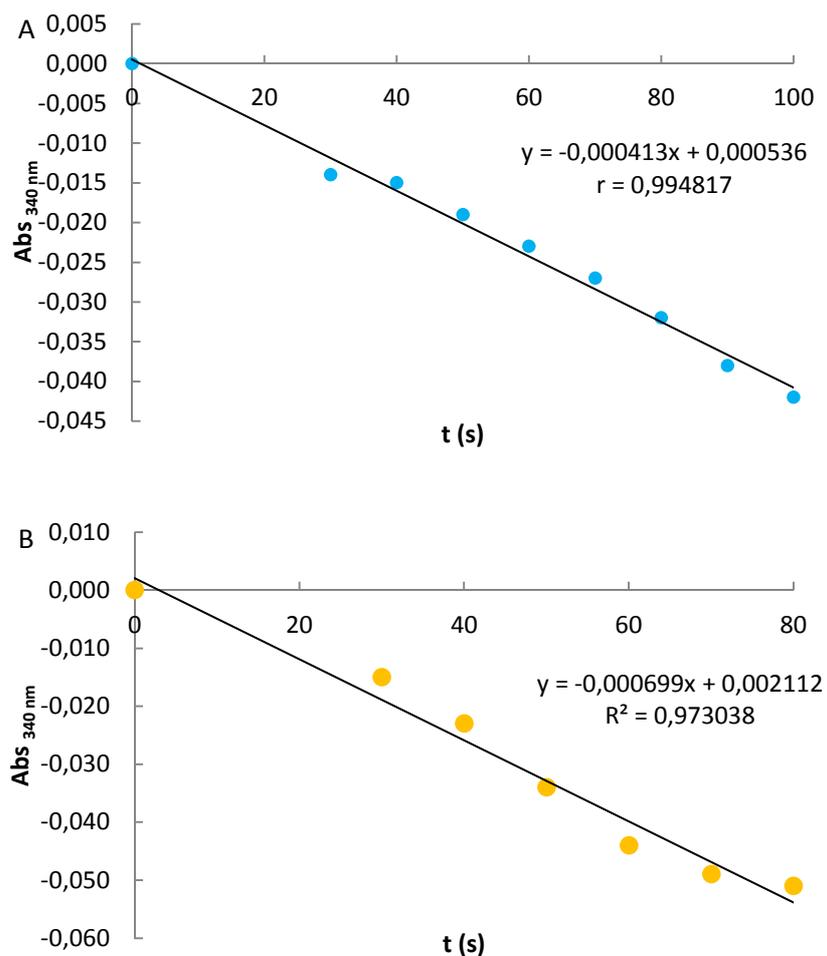
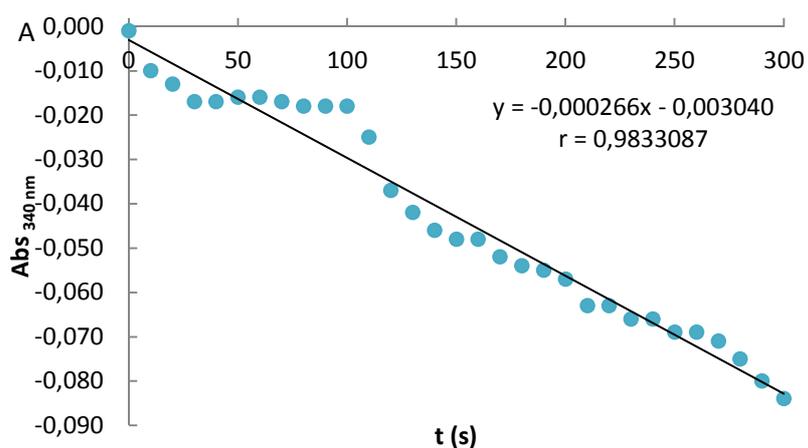


Figura A12. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GPx de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (50 mM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 μM) (B).



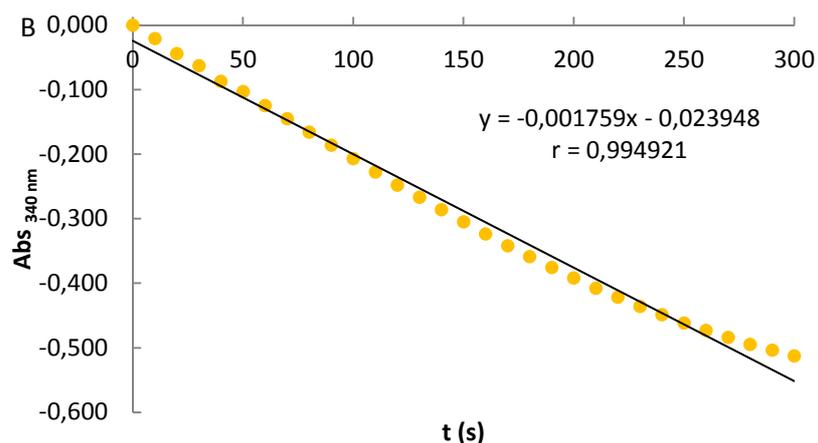


Figura A13. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (50 mM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na ausência de indutor de stress (B).

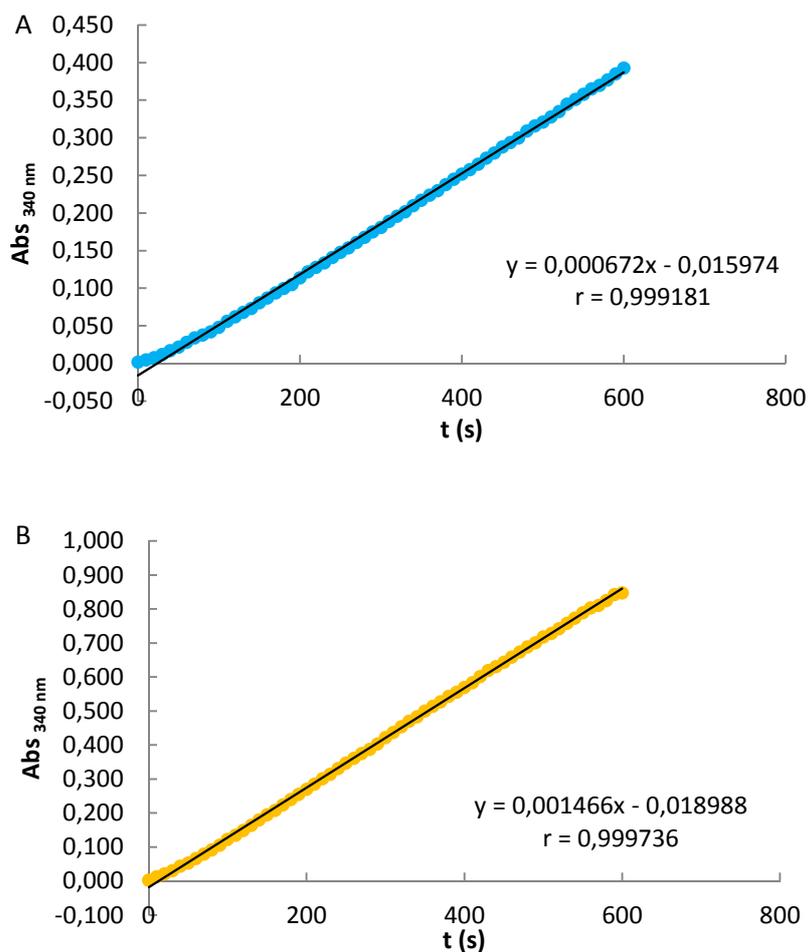


Figura A14. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de ácido acético (50 mM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na ausência de indutor de stress (B).

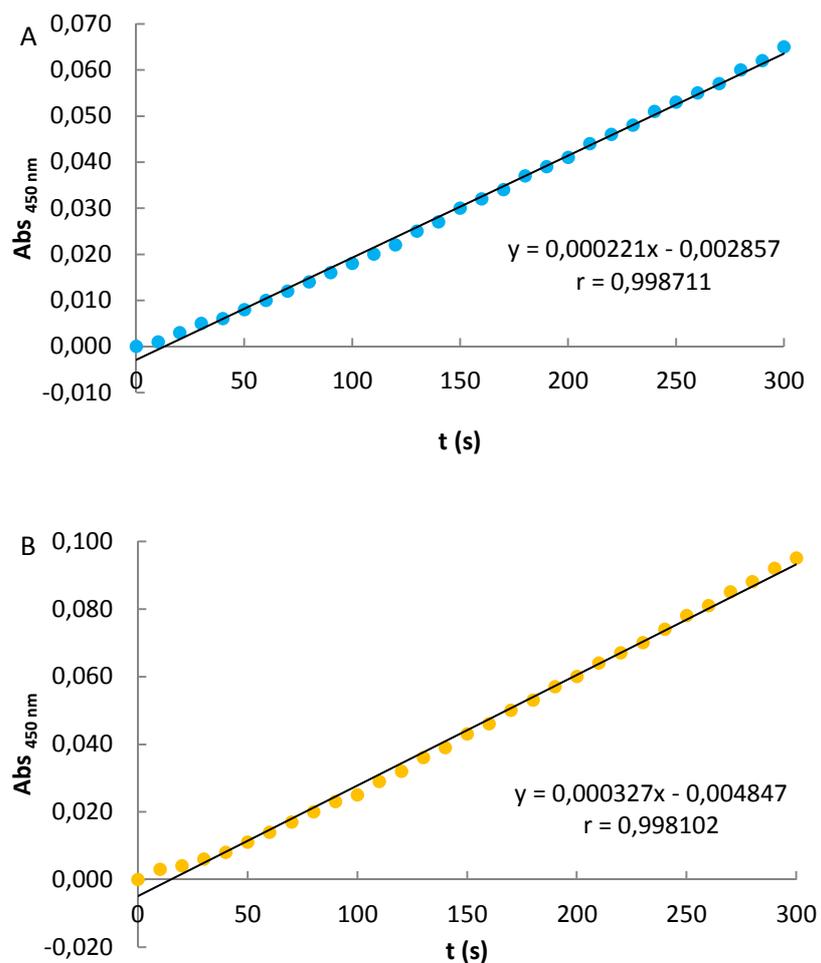


Figura A15. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 μM) (A), e de células *S. cerevisiae* W303 crescidas em meio YPD na presença de atrazina (50 μM) (B).

Quadro 1. Resultados da análise de variância (modelo – “ANOVA I”)

Conc. ou ativ. enzimática	Origem de variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99 %)
Proteína sobrenadante	Entre grupos	2,517	7	0,360	3875,197	0
	No interior dos grupos	0,003	32			
	Total	2,520	39			
Proteína sedimento	Entre grupos	1,489	7	0,213	15081,455	0
	No interior dos grupos	0	32			
	Total	1,490	39			
Proteína	Entre grupos	6,480	7	0,926	3058,321	0
	No interior dos grupos	0,010	32			
	Total	6,490	39			
DPPH	Entre grupos	1013,450	7	144,779	176,761	0
	No interior dos grupos	26,210	32	0,819		
	Total	1039,660	39			
FRAP	Entre grupos	1382,349	7	197,478	388,711	0
	No interior dos grupos	16,257	32	0,508		
	Total	1398,606	39			
APx	Entre grupos	44706,113	7	6386,588	518,810	0
	No interior dos grupos	393,923	32	12,310		
	Total	45100,035	39			
CTA1	Entre grupos	1300,888	7	185,841	93,383	0
	No interior dos grupos	63,683	32	1,990		
	Total	1364,571	39			
CTT1	Entre grupos	2712,378	7	387,483	276,954	0
	No interior dos grupos	44,771	32	1,399		
	Total	2757,149	39			
G6PD	Entre grupos	540976,217	7	77282,317	187,142	0
	No interior dos grupos	13214,715	32	412,960		
	Total	554190,931	39			
SOD	Entre grupos	6921,698	7	988,814	258,912	0
	No interior dos grupos	122,212	32	3,819		
	Total	7043,909	39			
ALP	Entre grupos	2054,675	7	293,525	292,341	0
	No interior dos grupos	32,130	32	1,004		
	Total	2086,805	39			
GPx	Entre grupos	1308697,619	7	186956,803	170,645	0
	No interior dos grupos	35058,946	32	1095,592		
	Total	1343756,564	39			
GR	Entre grupos	66750,292	7	9535,756	403,970	0
	No interior dos grupos	755,363	32	23,605		
	Total	67505,655	39			
MDA	Entre grupos	4,268	7	0,610	10,628	0
	No interior dos grupos	1,836	32	0,057		
	Total	6,104	39			
ROS	Entre grupos	78,204	7	11,172	16,488	0
	No interior dos grupos	21,683	32	,678		
	Total	99,887	39			
GSH	Entre grupos	33936,691	7	4848,099	578,008	0
	No interior dos grupos	268,403	32	8,388		
	Total	34205,094	39			
GSSG	Entre grupos	381648,901	7	54521,272	2241,746	0
	No interior dos grupos	778,269	32	24,321		
	Total	382427,170	39			
GSH+GSSG	Entre grupos	638664,518	7	91237,788	4347,105	0
	No interior dos grupos	671,621	32	20,988		
	Total	639336,139	39			
GSH/GSSG	Entre grupos	153,015	7	21,859	788,317	0
	No interior dos grupos	0,887	32	0,028		
	Total	153,902	39			
Peso seco	Entre grupos	53196,922	7	7599,560	53,584	0
	No interior dos grupos	4538,400	32	141,825		
	Total	57735,322	39			