

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Efeitos sobre o metabolismo glicídico e marcadores de stress
em *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao
S-etil-N,N-dipropiltiocarbamato, atrazina e prolina**

Gonçalo Nuno Carrasco Sebastião

Orientador(es) | Rui Ferreira
I Alves-Pereira

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Efeitos sobre o metabolismo glicídico e marcadores de stress
em *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao
S-etil-N,N-dipropiltiocarbamato, atrazina e prolina**

Gonçalo Nuno Carrasco Sebastião

Orientador(es) | Rui Ferreira
I Alves-Pereira

Évora 2025



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora) (Arguente)
Rui Ferreira (Universidade de Évora) (Orientador)

Índice

Índice	i
Índice de figuras	ii
Índice de Quadros.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Agradecimentos	v
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Metabolismo da glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.2. Stress oxidativo	7
2.Problema e Objetivos	8
3.Metodologia.....	10
Parâmetros analisados	10
3.1. Diagrama do trabalho	12
3.2. Equipamento utilizado	13
3.3. Reagentes	13
3.4. Procedimento Experimental.....	15
3.4.1. Cultura de microrganismos	15
3.4.2. Peso seco	16
3.4.3. Fracionamento celular	16
3.4.4. Proteínas	16
3.4.5. Fosfatase alcalina (ALP).....	17
3.4.6. Glutationo (GSH) e dissulfureto de glutatióno (GSSG)	17
3.4.7. Espécies reativas de oxigénio (ROS).....	18
3.4.8. Catalase A e T.....	18
3.4.9. Glutationo redutase	19
3.4.10. Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	19
3.4.11. Piruvato cinase.....	20
3.4.12. Citrato sintase	20
3.4.13. Succinato desidrogenase	21
3.4.14. NADH (ubiquinona) desidrogenase I.....	21
3.4.15. Piruvato descarboxilase	22
4.Resultados e discussão	22

4.1. Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e na disponibilidade de fosfato inorgânico, tióis não proteicos e espécies reativas de oxigênio.	23
4.2. Efeito da composição do meio de cultura em marcadores de stress e de reposta antioxidante de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	24
4.3. Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e na disponibilidade de fosfato inorgânico, tióis totais não proteicos e espécies reativas de oxigênio.	26
4.4. Efeito da composição do meio de cultura no metabolismo energético de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	28
5. Conclusões.	31
Referências bibliográficas.	34
ANEXOS.	39

Índice de figuras

Figura 1.1. Estrutura química do S-etil-N, N-dipropiltiocarbamato	2
Figura 1.2. Estrutura química da Atrazina	2
Figura 1.3. Estrutura química da Prolina	3
Figura 1.4. Curva de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figura 1.5. Metabolismo da glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
Figura 3.1. Diagrama do trabalho	12
Figura 4.1. Efeito da composição do meio de cultura no peso seco (A), conteúdo proteico total (B), atividade enzimática ALP (C) e conteúdo em tióis totais não proteicos (D) do sobrenadante TP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	23
Figura 4.2. Efeito da composição do meio de cultura no conteúdo em GSH (A), GSSG (B), razão GSH/GSSG (C) e conteúdo em ROS (D) do sobrenadante TP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	25
Figura 4.3. Efeito da composição do meio de cultura nas atividades enzimáticas GR (A), G6PD (B), CTT (C) e CTA (D) do sobrenadante TP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	27
Figura 4.4. Efeito da composição do meio de cultura nas atividades enzimáticas PK (A), PDC (B), razão CS (C), SDH (D) e NDEI (E) do sobrenadante TP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	30

Índice de Quadros

Quadro A1. Resultados da análise de variância (modelo – “ANOVA I”)	39
--	----

Efeitos sobre o metabolismo glicídico e marcadores de stress em *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao S-etil-N,N-dipropiltiocarbamato, atrazina e prolina

Resumo

A exposição múltipla de modelos biológicos a xenobióticos, são aproximações mais apropriadas para caraterizar os seus mecanismos de interação. Este estudo procurou avaliar como a exposição individual ou combinada de *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura Crabtree positiva, ao S-Etil-N,N-dipropiltiocarbamato (EPTC), atrazina (ATZ) e prolina (Pro) afeta o seu metabolismo glicídico e o índice de stress oxidativo. A exposição combinada dos agentes de stress ATZ e EPTC, despoletou em *S. cerevisiae* respostas distintas da exposição individual a cada um deles. O decréscimo da razão glutatono/dissulfureto de glutatono, o aumento do conteúdo em espécies reativas de oxigénio, a indução das atividades enzimáticas piruvato cinase e piruvato descarboxilase, bem como, a inibição da atividade NADH desidrogenase I, resultante da exposição combinada ATZ+EPTC indiciam uma regressão da evolução do metabolismo fermentativo aeróbio para respiratório-fermentativo de *S. cerevisiae* UE-ME₃ (efeito de Crabtree). A Pro exerceu um efeito modulador positivo nesta resposta.

Palavras-chave: Levedura, glicose, espécies reativas, tiocarbamatos, triazinas

Effects on glucose metabolism and stress markers in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to *S*-ethyl-*N,N*-dipropylthiocarbamate, atrazine, and proline

Abstract

Multiple exposures of biological models to xenobiotics provide the most effective means of characterizing their interaction mechanisms. This study aimed to evaluate how *Saccharomyces cerevisiae*, a Crabtree-positive yeast, responds to individual and combined exposure to *S*-Ethyl-*N,N*-dipropylthiocarbamate (EPTC), atrazine (ATZ), and proline, with a focus on glucose metabolism and oxidative stress. Combined exposure to ATZ and EPTC triggered distinct responses in *S. cerevisiae* compared to individual treatments. Notably, the combined exposure (ATZ+EPTC) led to a decreased glutathione/glutathione disulfide ratio, increased reactive oxygen species production, induction of pyruvate kinase and pyruvate decarboxylase activities, and inhibition of NADH dehydrogenase I. These changes suggest a regression of the shift from aerobic fermentative metabolism towards a respiratory-fermentative state (Crabtree effect). Proline modulated this response, exerting a protective or stabilizing effect.

Keywords: Yeast, glucose, reactive species, thiocarbamates, triazines

Agradecimentos

Depois de terminado este trabalho, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que foram um grande apoio e que me ajudaram na sua elaboração. Quero agradecer e expressar o devido reconhecimento:

Aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Alves-Pereira, por toda a dedicação, ajuda e conhecimentos transmitidos que foram fundamentais para esta investigação.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade de Évora pela possibilidade de utilização das instalações e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Ao MED - Mediterranean, Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE - Global Change and Sustainability Institute, Departamento de Química e Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), pelo apoio a nível financeiro que proporcionou a realização deste trabalho.

Ao meu pai, à minha mãe, à minha irmã, e toda a família, pela compreensão e o apoio incondicional que foram essenciais no meu percurso académico.

À minha namorada por todo o amor e dedicação ao longo deste percurso.

A todos os que contribuíram de alguma forma para este trabalho, o meu agradecimento.

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

•O ₂ ⁻	Radical anião superóxido
ACC	Acetil-CoA carboxilase (EC 3.1.3.44)
ACE	Acetil colinesterase (EC 3.1.1.7)
ADP	Adenosina difosfato
ALP	Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês, Adenosine triphosphate)
ATZ	Atrazina
Cfu	Unidades formadoras de colónias (do inglês, colony forming unit)
CS	Citrato sintase (EC 2.3.3.1)
CTA	Catalase A (EC 1.11.1.6)
CTT	Catalase T (EC 1.11.1.6)
EPTC	<i>S</i> -Etil- <i>N,N</i> -dipropiltiocarbamato
FAD ⁺	Dinucleótido de flavina e adenina (oxidado)
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina (reduzido)
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GPx	Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.8.1.7)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros (do inglês, Generally Recognized As Safe)
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutatono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HK	Hexocinase (EC 2.7.1.1)
MDA	Malonodialdeído
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
NDHI	NADH (ubiquinona) desidrogenase I (EC 1.6.5.3)
OD	Turbidez (do inglês, optical density)
•OH	Radical hidroxilo
PDC	Piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1)
PDH	Piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1)

Pi	Fosfato inorganico
PK	Piruvato cinase (EC 2.7.1.40)
Pro	Prolina
ROS	Especies reativas de oxigenio (do inglês, reactive oxygen species)
SDH	Succinato desidrogenase (EC 1.3.5.1)
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (do inglês, tricarboxylic acid cycle)

1. Introdução

Os crescentes desafios ambientais agravados pelo rápido crescimento da população humana tem levado entidades governamentais em associação com o tecido industrial de diversos países a procurarem soluções que equilibrem a prosperidade económica com a sustentabilidade ambiental. A agricultura atual manifesta forte dependência da aplicação de herbicidas e de outros produtos fitofarmacêuticos para assegurar níveis de elevada produtividade. Contudo, muitos desses compostos são prejudiciais ao ambiente e aos seres vivos não direcionados (Rashid et al., 2010; Khan et al., 2023). A proposta de solução para minimizar o elevado impacto ambiental associado ao uso em larga escala de herbicidas, bem como à consequente pressão sobre recursos naturais, integra-se nos objetivos da economia circular que procura a minimização, reutilização alternativa, reciclagem e recuperação de materiais considerados resíduos (Otero et al., 2023). Embora seja possível obter níveis elevados de produtividade com níveis baixos de fertilização e de aplicação de produtos fitofarmacêuticos, numa abordagem de economia circular, a reciclagem destes não está isenta de riscos podendo o ciclo tornar-se “tóxico” devido às substâncias recicladas serem potencialmente prejudiciais à saúde, uma vez que não são conhecidas as interações que diversos produtos fitofarmacêuticos podem estabelecer entre si (Marcuță et al., 2021). Embora existam diversos estudos que procuram avaliar como o modo de utilização de agentes fitofarmacêuticos pode afetar diversos nichos ecológicos, em geral, a maior parte desses trabalhos científicos dirigem-se apenas a um composto isolado, abordagem que se afasta da realidade ambiental, uma vez que no terreno ocorrem interações múltiplas entre os diversos produtos fitofarmacêuticos aplicados numa dada cultura (Barbieri et al., 2022). Pelo exposto, urge realizar estudos que avaliem a interação múltipla de produtos fitofarmacêuticos ao nível do crescimento e metabolismo celular eucarionte. Esse tipo de abordagem condicionou o delineamento experimental deste trabalho científico onde se avaliaram interações duplas ou triplas entre o *S*-etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato (EPTC) e a atrazina (ATZ) e/ou a prolina (Pro) no metabolismo energético do unicelular eucarionte *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, uma levedura nativa de mostos do Alentejo, utilizada como modelo biológico.

O *S*-etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato (EPTC) C₉H₁₉NOS (figura 1.1) é um tiocarbamato com propriedades herbicidas, utilizado maioritariamente no controlo de infestantes em diversas culturas agrícolas, é também aplicado em calçadas de residências

e locais públicos. Tal como outros tiocarbamatos o EPTC tem como mecanismo de ação a inibição de enzimas, como o acetil-CoA carboxilase (ACC, EC 3.1.3.44) responsável por catalisar o primeiro passo na síntese dos ácidos gordos, levando a défice na produção de lípidos, debilitando a membrana celular, bem como, o acetil colinesterase (ACE, EC 3.1.1.7) enzima essencial regulador da transmissão do impulso nervoso, podendo este composto ser potencialmente considerado uma neurotoxina. Na união europeia encontra-se não aprovado para utilização de acordo com o Regulamento (CE) N.º 1107/2009 relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado (EPA, 2008).

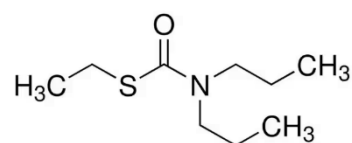


Figura 1.1. Estrutura química do *S*-etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato

A atrazina (ATZ) $C_8H_{14}ClN_5$ (figura 1.2) é outro produto fitofarmacêutico, utilizado como herbicida seletivo de pré e pós emergência em diversas culturas. Pertence à família das triazinas, partilhando o seu mecanismo de ação como inibidor da cadeia de transporte de eletrões do cloroplasto com indução indireta da produção de ROS. A atrazina, é solúvel em água e exibe elevada persistência no solo. Diversos estudos confirmaram efeitos adversos para outros organismos como a desregulação endócrina (Solomon et al., 2008). A ATZ apresenta um valor de DL_{50} entre 1700 e 4000 mg/kg em roedores, embora os ruminantes sejam mais sensíveis, com valores de 250 mg/kg (World Health Organization, 1990).

Embora, desde 2004 existam fortes restrições e proibições à sua aplicação em culturas agrícolas nos estados-membros da União Europeia, a sua utilização ocorre com elevada frequência em países fornecedores de alimentos para a união europeia. Por outro lado, o passivo acumulado de ATZ em solos europeus, devido a anos consecutivos de aplicação agronómica permanece elevado (Regulation, 2009).

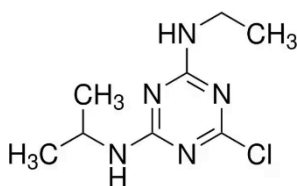


Figura 1.2. Estrutura química da atrazina

A prolina (Pro) (figura 1.3) é muitas vezes descrita como um aminoácido apesar de não conter grupo amina primário. Por esse motivo é corretamente classificada como iminoácido. A Pro está envolvida na síntese de proteínas, participa em mecanismos de osmorregulação e constitui fonte de nitrogénio. Apresenta também um importante papel protetor contra agentes de stress em microrganismos doando átomos de hidrogénio às ROS, tais como o radical hidroxilo, convertendo-as em moléculas menos prejudiciais. A síntese citoplasmática de prolina a partir do glutamato em *Saccharomyces cerevisiae* é catalisada por 3 enzimas, Pro1p (γ -glutamil cinase) (EC 2.7.2.11), Pro2p (γ -glutamil fosfato redutase) (EC 1.2.1.38) e Pro3p (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) redutase) (EC 1.2.1.88) (Mukai et al., 2019).

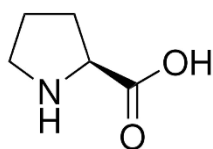


Figura 1.3. Estrutura química da prolina

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para testar efeitos biológicos de diferentes produtos fitofarmacêuticos é legitimada por possuir um conjunto de características ímpares tais como: *i*) genoma simples e bem caracterizado, pois foi o primeiro microrganismo eucarionte a ter o seu genoma totalmente sequenciado; *ii*) grau elevado de semelhança com organismos mais complexos, pois possui características estruturais comuns às de células de eucariontes mais complexas como acontece com o ser humano; *iii*) elevada taxa de crescimento e curto tempo de geração, permitindo rápido trabalho laboratorial; *iv*) fácil cultivo, pois leveduras tem requisitos de crescimento muito baixos permitindo o uso de meios simples. A sua utilização é igualmente legitimada por ser um organismo GRAS (Generally Recognized As Safe) utilizado há milhares de anos na alimentação humana. É também especialmente útil para estudos de mecanismos de cancerigénese, visto que estas células podem alternar o seu metabolismo de fermentativo para respiratório, de forma dependente da fonte de carbono. Como anaeróbio facultativo utiliza a glicose como fonte de carbono preferencial para assegurar a fermentação alcoólica mesmo na presença de oxigénio. Em condições de baixo nível de glicose altera o seu metabolismo para respiratório utilizando o etanol produzido pela fermentação via ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Sherman, 2002; Leister et al., 2007; Malina et al., 2021). A este fenómeno dá-se o nome de efeito de Crabtree,

descoberto por Herbert Grace Crabtree em 1929 ao realizar estudos em células tumorais (Crabtree, 1929).

A *S. cerevisiae*, em meio de cultura que utiliza glicose como fonte de carbono, passa por quatro diferentes fases de crescimento: lag, log, pós-diáuxica e estacionária (figura 1.4). A fase lag corresponde ao período no qual a célula se adapta ao novo meio com crescimento e taxa respiratória lentos, sendo seguida pela fase log onde a levedura cresce exponencialmente, utilizando o metabolismo fermentativo, o que leva à acumulação de etanol. Após esgotarem a fonte de carbono fermentável ocorre o chamado desvio diáuxico onde as células passam a utilizar a via respiratória para sintetizar o ATP, bloqueando a expressão dos enzimas fermentativos. Quando os nutrientes se esgotam começa a fase estacionária no qual as células terminam a divisão celular e atenuam o seu metabolismo. Quando todos os nutrientes se esgotam e/ou a concentração de compostos tóxicos aumentam drasticamente, as células morrem (Werner-Washburne et al., 1996; Salari & Salari, 2017).

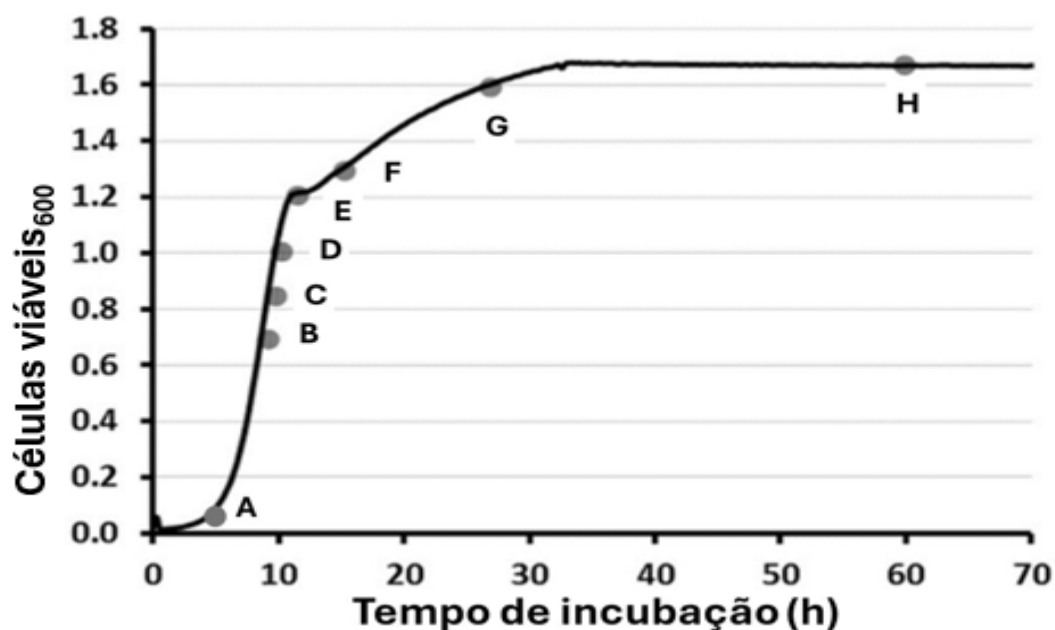


Figura 1.4. Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* onde estão assinaladas as diferentes fases do crescimento de A a H (A fase lag; B, C e D fase log; E desvio diáuxico; F fase pós-diáuxica; G início de fase estacionária; H fase estacionária). (adaptado de (Rezaei et al., 2014))

1.1. Metabolismo da glicose em *Saccharomyces cerevisiae*

O primeiro passo da via glicolítica (Figura 1.5) é catalisado pelo enzima hexocinase, ATP D-hexose-6-fosfotransferase (HK, EC 2.7.1.1) onde ocorre transferência de um grupo fosfato do ATP para a glicose (hexose) e esta é convertida em glicose-6-fosfato que segue pela via glicolítica até ser convertida em fosfoenolpiruvato e este posteriormente transformado em piruvato ou deriva para a via das pentoses fosfato, onde é metabolizada pela glicose-6-fosfato desidrogenase com formação de nucleótidos e NADPH (Cárdenas et al., 1998).

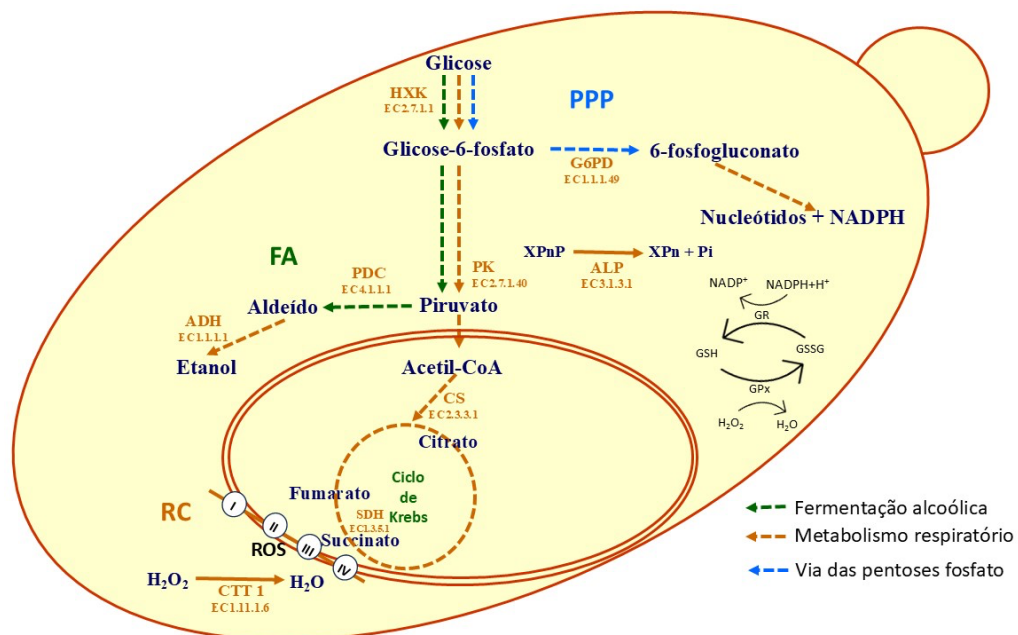


Figura 1.5. Metabolismo da glicose em *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Nelson & Cox (2017) e Dong et al., (2017)).

O fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato em conjunto com a fosforilação do ADP em ATP, sendo este processo catalisado pelo enzima piruvato cinase (PK, EC 2.7.1.40) seguindo a reação: Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP, um processo essencial para o consumo da glicose em organismos respiratórios facultativos. O ATP produzido nesta reação permite o crescimento da célula na ausência de oxigênio (Israelsen & Vander Heiden, 2015).

O piruvato é posteriormente convertido em acetil-CoA por descarboxilação oxidativa, processo catalisado pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH, EC1.2.4.1) ligando assim a glicólise ao ciclo do citrato, também conhecido como ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou ciclo de Krebs (Alabduladhem & Bordoni, 2024). O primeiro passo do ciclo de Krebs corresponde à condensação do acetil-CoA e do oxaloacetato em Acetil-CoA (2 carbonos) + oxaloacetato (4 carbonos) → citrato (6 carbonos). Esta reação é catalisada pelo enzima citrato sintase (CS, E.C 2.3.3.1), uma transferase mitocondrial utilizada normalmente como marcador de funcionalidade mitocondrial (Patel et al., 2014). Outro enzima essencial ao ciclo do citrato e com papel acoplado à cadeia de transporte de elétrons é o succinato desidrogenase (SDH, EC 1.3.5.1), também designado por complexo II que está localizado na membrana mitocondrial e atua catalisando a oxidação do succinato em fumarato, enquanto ocorre a redução do coenzima FAD^+ a FADH_2 que irá doar diretamente elétrons à cadeia respiratória. Posteriormente ocorrerá a hidratação do fumarato formando-se malato, reação catalisada pelo enzima fumarase (EC 4.2.1.2) que será depois oxidado, regenerando assim o oxaloacetato com repetição do ciclo. Por cada volta do ciclo do citrato, uma molécula de acetil-CoA é consumida, com libertação de duas moléculas de CO_2 , uma molécula de GTP, três moléculas de NADH e uma molécula de FADH_2 (Alabduladhem & Bordoni, 2024).

A cadeia respiratória da *S.cerevisiae* tem ausência de complexo I, mas apresenta na sua membrana mitocondrial interna 3 NADH desidrogenases. O NADH gerado na matriz mitocondrial é assim oxidado pelo NADH ubiquinona oxidoredutases (Herrero et al., 2008).

O piruvato pode também seguir a via fermentativa (aeróbia/anaeróbia), um percurso que embora produza menos ATP do que a via respiratória permite que a levedura gere ATP enquanto regenera NAD^+ . Para tal o enzima piruvato descarboxilase (PDC, EC 4.1.1.1) é essencial, visto ser responsável por catalisar o primeiro passo da fermentação alcoólica que envolve a descarboxilação do piruvato a acetaldeído e liberta uma molécula de CO_2 . O acetaldeído é depois reduzido originando etanol através do enzima álcool desidrogenase. Durante o segundo passo reacional, o NADH é oxidado a NAD^+ , necessário à produção de ATP. (Barnett, 2003; Stacpoole & McCall, 2023).

Um percurso metabólico alternativo à glicólise é a via das pentoses fosfato que consiste em duas fases: oxidativa e não oxidativa que tem como objetivo a produção de NADPH e ribose-5-fosfato que podem ser utilizados na biossíntese de materiais lipídicos,

esteroides e nucleótidos, ou na resposta antioxidante. O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) desempenha um papel chave nesta via sendo responsável por catalisar o seu primeiro passo. Após a formação de glicose-6-fosfato ocorre a desidrogenação deste substrato com formação de 6-fosfogluconato, reação controlada maioritariamente pelos níveis de NADP^+ intracelulares (Stincone et al., 2015).

1.2. Stress oxidativo

O stress oxidativo é definido na literatura como uma condição na qual a capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS) por parte da célula é inferior à sua formação, o que leva a uma situação de desequilíbrio no estado de oxidação-redução da célula que despoleta a ocorrência de danos oxidativos. Esta situação deve-se ao facto de o dioxigénio (O_2) ser um oxidante, por possuir dois eletrões desemparelhados na última camada de valência e o ambiente intracelular ser predominantemente redutor, facto que facilita a formação endógena de ROS como o peróxido de hidrogénio H_2O_2 , o radical anião superóxido O_2^- e o radical hidroxilo OH^\bullet . A sua existência no interior celular permitiu o desenvolvimento de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, ao longo da evolução filogenética. (Herrero et al., 2008; Sies, 2020).

A prevenção da acumulação de ROS e a manifestação dos seus efeitos adversos dotou as células de dois mecanismos de defesa: o primeiro passa por evitar a sua formação o segundo envolve métodos enzimáticos e não enzimáticos que permitem reparar e remover produtos da oxidação dos materiais celulares. Um dos meios enzimáticos de proteção contra ROS são os enzimas catalase (EC 1.11.1.6) que em *S. cerevisiae* se dividem em catalase A peroxissomal e catalase T citoplasmática que atuam na conversão do peróxido de hidrogénio H_2O_2 em água H_2O e dioxigénio O_2 (Baker et al., 2023; Sepasi Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018).

O tripéptido glutationo (GSH) ou mais concretamente γ -glutamyl-L-cistenylic acid desenvolve um papel relevante nas defesas antioxidantes uma vez que atua na captura de ROS utilizando o seu grupo sulfidrílo para se transformar em dissulfureto de glutationo (GSSG), reação que pode ocorrer apenas por equilíbrio químico, mas que é maioritariamente catalisada pelo enzima glutationo peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), convertendo assim o peróxido de hidrogénio ou os lipoperóxidos em H_2O ou no álcool correspondente, respetivamente. Os níveis de GSH são posteriormente repostos pelo enzima glutationo redutase (GR, EC 1.8.1.7) que utiliza o NADPH gerado pelo G6PD na via das pentoses fosfato, formando assim um ciclo de oxidação-redução para estabilizar

os níveis de glutathione/dissulfureto de Glutathione (ZITKA et al., 2012; Vašková et al., 2023).

Um importante marcador de stress oxidativo é o malonodialdeído (MDA) o principal produto da peroxidação de lípidos, utilizado para quantificar níveis de stress oxidativo. Sendo um produto direto da peroxidação de lípidos os seus níveis refletem diretamente os danos oxidativos causados à membrana celular. Na sua formação os radicais livres removem um átomo de hidrogénio de um resíduo acilo, criando um radical lipídico que reage com o dioxigénio para formar um radical lipídico peroxidado, começando assim uma reação em cadeia que termina com a formação de produtos estáveis, como o malonodialdeído, que ao reagir são maioritariamente tóxicos (Del Rio et al., 2005).

O termo fosfatase alcalina (ALP) designa uma família de isoenzimas assim nomeada devido à sua ação de remover grupos fosfato de moléculas orgânicas em condições alcalinas, permitindo assim a difusão da molécula pela célula e disponibilizando fosfato inorgânico. Está ainda associado a processos de diferenciação, proliferação e defesa celular, bem como, à apoptose (Sharma et al., 2014; P. Nalini et al., 2015).

2.Problema e Objetivos

A realização de estudos que envolvam a exposição múltipla de modelos biológicos a produtos fitofarmacêuticos de circulação ambiental, correspondem a aproximações mais adequadas para identificar e caraterizar mecanismos de interação entre xenobióticos e as células eucariontes, do que a avaliação individual de cada composto. A *Saccharomyces cerevisiae*, por ser um eucarionte unicelular com o genoma totalmente sequenciado e que exhibe elevada homologia sequencial com o dos mamíferos constitui também um bom modelo de estudo por ser seguro e de fácil replicação.

O metabolismo energético de leveduras Crabtree mostra-se também como uma boa ferramenta no diagnóstico de mecanismos de toxicidade exercido por xenobióticos em células eucariontes. Como os produtos fitofarmacêuticos *S*-etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato (EPTC), a atrazina (ATZ) e o iminoácido prolina são de ampla circulação ambiental, torna-se de elevado interesse esclarecer o seu mecanismo de interação com o metabolismo respiratório e de resposta ao stress de *S. cerevisiae*, pelo que o objetivo geral deste estudo será testar a H_0 : “A exposição individual ou combinada de *Saccharomyces cerevisiae* ao *S*-Etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato, atrazina e prolina não afeta o seu metabolismo glicídico, índice de stress oxidativo e de danos celulares”.

Para este efeito serão cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- i. Avaliação do crescimento celular da levedura vínica nativa do Alentejo, *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, em meio rico (YPD); meio rico e prolina (YPD – Pro); meio rico e tiocarbamato (YPD-EPTC); meio rico e triazina (YPD-ATZ), meio rico com mistura de tiocarbamato e triazina (YPD – EPTC+ATZ) e meio rico com mistura de tiocarbamato, triazina e prolina (YPD–EPTC+ATZ+Pro) por conteúdo em proteínas, peso seco, e atividade enzimática fosfatase alcalina (ALP);
- ii. Obtenção do sobrenadante e sedimento pós-12000 g, após lise celular em banho de ultrassons, seguida de centrifugação diferencial;
- iii. Avaliação do metabolismo glicolítico da levedura vínica do Alentejo *S. cerevisiae* UE-ME₃, em meio rico (YPD); meio rico e prolina (YPD–Pro); meio rico e tiocarbamato (YPD-EPTC); meio rico e triazina (YPD-ATZ), meio rico com mistura de tiocarbamato e triazina (YPD– EPTC+ATZ) e meio rico com mistura de tiocarbamato, triazina e prolina (YPD– EPTC+ATZ+Pro), em termos de marcadores do metabolismo fermentativo e respiratório-fermentativo da glicose, nomeadamente atividades enzimáticas, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), piruvato cinase (PYC), piruvato descarboxilase (PDC), citrato sintase (CS), entre outros, por espectrometria de absorção molecular.
- iv. Avaliação de marcadores de stress oxidativo e de morte celular da levedura vínica do Alentejo *S. cerevisiae* UE-ME₃, em meio rico (YPD); meio rico e prolina (YPD–Pro); meio rico e tiocarbamato (YPD-EPTC); meio rico e triazina (YPD-ATZ), meio rico com mistura de tiocarbamato e triazina (YPD – EPTC + ATZ) e meio rico com mistura de tiocarbamato, triazina e prolina (YPD–EPTC+ATZ+Pro), em termos de conteúdo em glutatono, espécies reativas de oxigénio (ROS) e malonodialdeído (MDA) entre outros, por espectrometria de fluorescência.

3. Metodologia

A conclusão dos objetivos traçados para este estudo obedeceu à seguinte estratégia:

Local de realização: a componente experimental foi executada nos Laboratórios da Escola de Ciências e Tecnologia (ECT) - Departamento de Química e Bioquímica e do Laboratório Associado MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development - Évora & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute.

Período de realização: 1 ano letivo;

Modelo biológico: *Saccharomyces cerevisiae* estirpe UE-ME₃

Fornecedor: coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora

Agentes de stress:

- *S*-etil-*N,N*-dipropiltiocarbamato (EPTC);
- Atrazina (ATZ) e
- Prolina (Pro)

Frações celulares: Sobrenadante e sedimento pós-12000 g;

Ensaio: exposição da levedura *S. cerevisiae* às condições de crescimento:

- I meio rico (YPD);
- II YPD com prolina (YPD–Pro);
- III YPD com tiocarbamato (YPD-EPTC);
- IV YPD com triazina (YPD-ATZ),
- V YPD com tiocarbamato/triazina (YPD – EPTC + ATZ);
- VI - YPD com tiocarbamato/triazina/prolina (YPD–EPTC+ATZ+Pro),

Parâmetros analisados:

- Peso seco
- Turbidez

Conteúdos em

- Proteínas
- Espécies reativas de oxigénio (ROS)
- Glutationo (GSH)

- Dissulfureto de glutationo (GSSG)

Atividades enzimáticas

- Fosfatase alcalina (ALP)
- Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)
- Piruvato cinase (PK)
- Citrato sintase (CS)
- Succinato desidrogenase (SDH)
- NADH (ubiquinona) desidrogenase I (NDHI)
- Piruvato descarboxilase (PDC)
- Catalases A e T
- Glutationo redutase (GR)

Técnicas utilizadas

Obtenção de culturas de microrganismos em suspensão; fracionamento celular por centrifugação diferencial; desintegração celular por ultrassons; determinação de atividades enzimáticas por espectrometria de absorção molecular e de conteúdos celulares por espectrometria de fluorescência.

Análise estatística

Os parâmetros determinados em 5 experiências independentes com *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em 6 diferentes condições de cultura foram submetidos a Análise de variância simples, ANOVA I (Quadro A1) e teste de significância de Duncan, com recurso ao programa SPSS para Windows, versão 29 (2023), licenciado para a Universidade de Évora.

Suporte financeiro

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) como parte do projeto UIDB/05183/2020.

3.1. Diagrama do trabalho

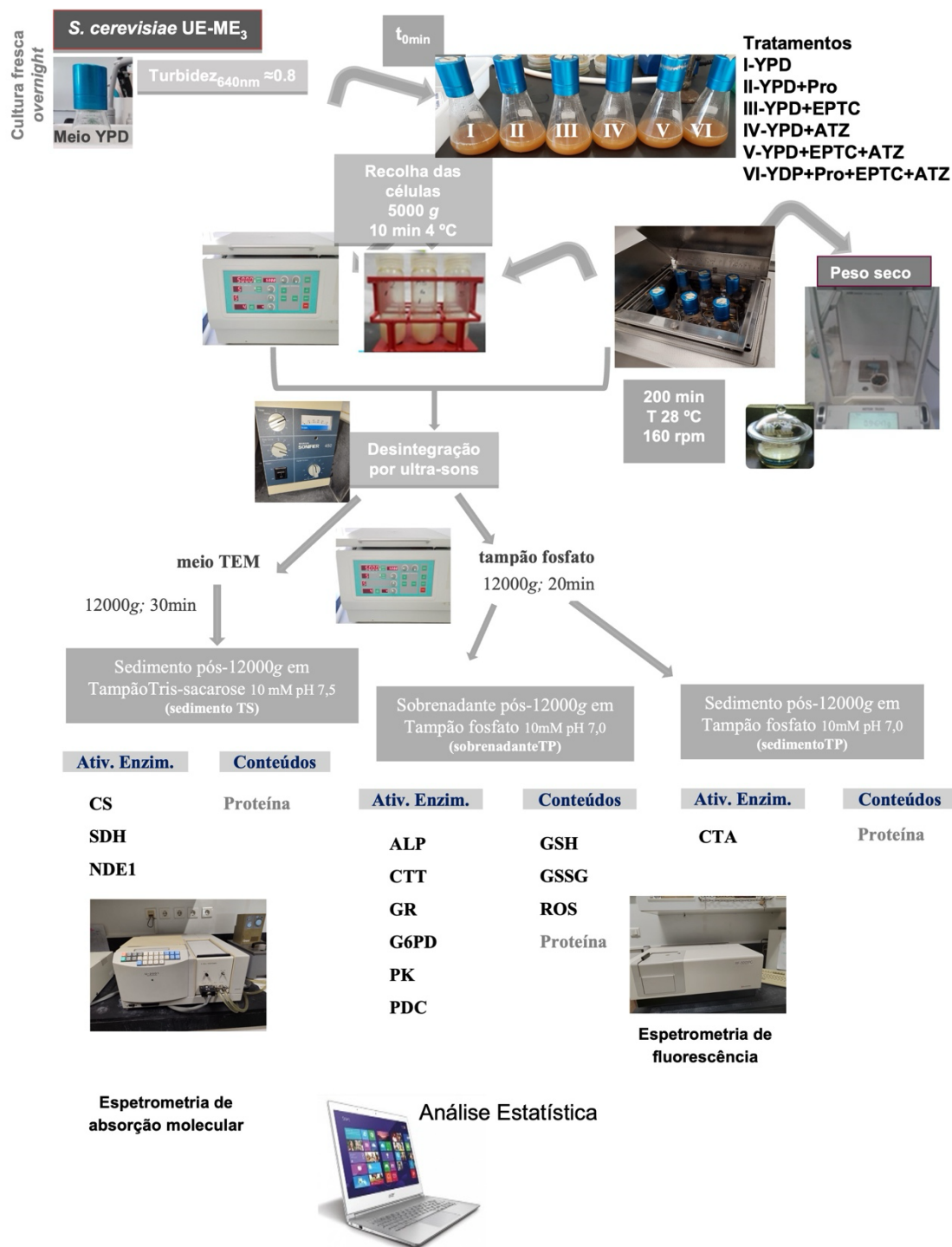


Figura 3.1. Diagrama do trabalho

3.2. Equipamento utilizado

Banho termostatzado com agitação, marca Memmert, modelo WB7.

Balança analítica, marca Mettler, modelo AE 200.

Incubador, marca Memmert, modelo BE500.

Centrífuga, marca Hermle, modelo Z323 K.

Espectrómetro de absorção molecular de feixe duplo, marca Hitachi, modelo U2001, com banho com circulação de água marca Grant.

Espectrómetro de fluorescência de feixe simples, marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC.

Balança micro-analítica, marca Mettler Toledo, modelo AX 205 Delta Range.

Vórtex, marca Witeg Wisd, modelo VM-10.

Placas de aquecimento com agitação magnética, marca VWR, modelo VMS-A.

Potenciômetro marca Hanna Instruments, modelo pH 20

Estufa marca WTC binder, modelo E28

3.3. Reagentes

1,1,3,3-tetrametoxipropano, pró-análise, Sigma, St. Louis

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, pró-análise, Sigma, St. Louis

Acetil-CoA, pró-análise, Sigma, St. Louis

Ácido acético (10%), MERCK, Darmstadt

Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, MERCK, Darmstadt

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (sal dissódico), pa, Sigma, St. Louis

Ácido gálico, pró-análise, MERCK, Darmstadt

Ácido linoleico, pró-análise, Sigma, St. Louis

Ácido málico, pró-análise, Sigma, St. Louis

Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt

Adenosina difosfato (ADP), pró-análise, Sigma, St. Louis

Adenosina trifosfato (ATP), pró-análise, Sigma, St. Louis

Albumina de soro bovino (BSA), pró-análise, Sigma, St. Louis

Álcool desidrogenase (ADH), pró-análise, Sigma, St. Louis

Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt

Cianeto de potássio, pró-análise, Sigma, St. Louis

Citocromo c, Sigma, St. Louis

Cloreto de magnésio, 99%, pró-análise, Sigma, St. Louis

Cloreto de magnésio hexahidratado, 99%, Sigma, St. Louis
 Cloreto de potássio, pró-análise, Sigma, St. Louis
 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, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
 Extrato de levedura, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Fosfoenolpiruvato, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Frutose 1,6-difosfato, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Glicerol, pró-análise, MERCK, Darmstadt
 Glicilglicina, 98,0%, MERCK, Darmstadt
 Glicose 6-fosfato-desidrogenase, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Glicose, 99,5 %, Sigma, St. Louis
 Glutationo redutase, 99,9 %, Sigma, St. Louis
 Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
 Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
 Hidrogenofosfato de dipotássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
 Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
 Lactato desidrogenase, 95%, Sigma, St. Louis
 n-butanol, 99%, Sigma, St. Louis
 N-etilmaleimida, 97,0%, Sigma, St. Louis
 Nicotinamida adenina dinucleotído, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
 Nicotinamida adenina dinucleotído, pró-análise, 97,0 %, Sigma, St. Louis
 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
 o-fetaldeído, 99%, Sigma, St. Louis
 Oxaloacetato, 97,0 %, Sigma, St. Louis
 Peptona, impureza $\leq 15\%$, Sigma, St. Louis
 Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30%, Sigma, St. Louis
 Piruvato, 99%, Sigma, St. Louis
 p-nitrofenilfosfato, $> 97\%$, Sigma, St. Louis
 Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteu, pró-análise, Sigma, St. Louis
 Succinato, 98 %, pró-análise, Sigma, St. Louis

Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5 %, MERCK, Darmstadt
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, pa, 99,9%, MERCK, Darmstadt
t-butilhidroperóxido, pró-análise, Sigma, St. Louis
Tris-(hidroximetil)-aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
Tween 20, pro-análise, MERCK, Darmstadt
Xantina oxidase, pró-análise, Sigma, St. Louis
Xantina, pró-análise, Sigma, St. Louis

3.4. Procedimento Experimental

3.4.1. Cultura de microrganismos

O modelo biológico utilizado neste estudo foi a estirpe UE-ME₃ de *Saccharomyces cerevisiae* um eucarionte unicelular isolado a partir de mostos de vinhos do Alentejo, depositada no laboratório de Enologia da Universidade de Évora. Colónias isoladas destas leveduras preservadas a -80°C, em meio de cultura com glicerol, no bloco de laboratórios da fase III, Departamento de Química e Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, foram utilizadas para obter cultura fresca. Iniciou-se o ensaio inoculando amostra de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio rico (YPD) com 1/3 de líquido para 2/3 de ar, constituído por extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) dissolvidos em água ultrapura, ambos esterilizados, ao qual foi adicionado glicose (20 g/L) esterilizada por filtração. As leveduras cresceram overnight até se atingir a turbidez_{640nm} \approx 0,8. Aliquotas da cultura fresca foram inoculadas em novo meio rico (YPD) e deixadas crescer a 28 °C, até atingir a fase exponencial média para serem utilizadas posteriormente para iniciar o ensaio de exposição de acordo com o delineamento experimental: *i*) meio rico (YPD); *ii*) meio rico e prolina (100 mg/100mL) (YPD – Pro); *iii*) meio rico e *S*-etil-*N*, *N*-dipropiltiocarbamato (5 mg/100 mL) (YPD-EPTC); *iv*) meio rico e atrazina (5 mg/100 mL) (YPD-ATZ), *v*) meio rico com *S*-etil-*N*, *N*-dipropiltiocarbamato (5 mg/100 mL) e atrazina (5 mg/100 mL) (YPD – EPTC+ATZ) e *vi*) meio rico com *S*-etil-*N*, *N*-dipropiltiocarbamato (5 mg/100 mL), atrazina (5 mg/100 mL) e prolina (100 mg/100mL) (YPD–EPTC+ATZ+Pro). As culturas foram deixadas crescer a 28°C, com agitação orbital a 150 rpm, durante 200 min, tempo necessário para se manifestar o desvio diáuxico.

3.4.2. Peso seco

O peso seco das culturas, um marcador de biomassa, foi determinado por recolha e pesagem de amostras das culturas controlo e de exposição ($0,1\text{cm}^3$) que foram deixadas secar em estufa a 80°C até atingir peso constante.

3.4.3. Fracionamento celular

Após 200 minutos de ensaio, as células presentes no meio de cultura foram sedimentadas por centrifugação diferencial (5000 g, 10 min, 4°C) e recolhidas após lavagem (3x) com água destilada estéril. Em seguida, o sedimento foi ressuscitado em 10 mL de tampão fosfato (10 mM), pH 7,0 e homogeneizado em banho de ultrassons (pulso de 0,1 kHz de 10 em 10 s, durante 3x5 min) para lise celular. O lisado celular foi centrifugado (5000g, 10 min, 4°C). O sobrenadante, então, obtido, foi centrifugado (12000 g, 15 min, 4°C) e guardado em microtubos a -20°C para posterior determinação de conteúdos e de atividades enzimáticas (sobrenadante TP). O sedimento remanescente foi ressuscitado em 3,0 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 (sedimento TP) (Lake, B., 1987; Sugimoto et al., 1990).

Para obtenção da fração rica em mitocôndrios, as células sedimentadas foram ressuscitadas em 10 mL de tampão TEM (0,05 M) pH 7,5 e homogeneizadas em banho de ultrassons (pulso de 0,1 kHz de 10 em 10 s, durante 3x5 min) para lise celular. O lisado obtido foi centrifugado (5000 g, 10 min, 4°C). O sedimento foi ressuscitado em 10 mL de tampão Tris-sacarose (0,01M) pH 7,5 e guardado em microtubos a -20°C para posterior utilização (sedimento TS) (Tzagoloff, 1971).

3.4.4. Proteínas

O conteúdo em proteína total das frações celulares previamente preparadas foi determinado de acordo como o procedimento descrito por (Lowry (1951) que se baseia na reação entre a ligação peptídica (-CO-NH-) e sulfato de cobre em meio alcalino que gera um complexo de cor azul, bem como, na reação entre os aminoácidos triptofano e tirosina presentes nas proteínas com o reagente de Folin-Ciocalteu, catalisada pelo Cu^{2+} , a pH alcalino que origina um complexo de heteromolibdênio de cor azul que potencia a sensibilidade do método. Os cromóforos gerados podem ser quantificados por espectrometria de absorção molecular lendo a absorvência das soluções a 720 nm.

Fez-se reagir 1 mL de reagente de Lowry, constituído por carbonato de sódio a 2 % (p/v), sulfato de cobre 0,1 % (p/v) e tartarato de sódio e potássio 0,2 % (p/v) preparado extemporaneamente com a 0,025 mL de soluções BSA (25-200 $\mu\text{g/mL}$) (curva de

calibração), ou a 0,04 mL de amostra diluída em 0,2 mL de NaOH (0,5 M). Após agitação no vórtex adicionou-se 0,1 mL de reagente de Folin, seguindo-se segunda agitação e repouso por 30 min. Leu-se a absorvência a 720 nm e determinou-se a concentração de proteína por interpolação gráfica na curva de calibração.

3.4.5. Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina designa uma família de isoenzimas que desempenham papel relevante em diferentes processos biológicos como a apoptose, a proliferação e a diferenciação celular, sendo diversas vezes tomado como marcador enzimático de proliferação celular.

A atividade enzimática fosfatase alcalina (ALP) foi determinada incubando sobrenadante TP de cada amostra, na diluição adequada, numa mistura reacional constituída por tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5 e pNPP (1,2 mM). Seguiu-se a formação de p-nitrofenol, um produto da hidrólise de ligações fosfoéster do substrato p-nitrofenilfosfato (pNPP), registando o aumento da absorvência a 405 nm durante 120 s. Foi igualmente preparada uma solução branco onde o volume da amostra foi substituído por igual volume de tampão (Bretaudiere, 1984).

Calculou-se a atividade ALP a partir do coeficiente angular das curvas de reação ($0,993519 < r < 0,923664$) e utilizando o coeficiente de absorvidade molar $16,03 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do pNPP.

3.4.6. Glutationo (GSH) e dissulfureto de glutathione (GSSG)

O tripéptido glutathione, γ -glutamyl-L-cysteinylglycine (GSH) é uma molécula de baixo peso molecular que exerce, entre outros, papel protetor contra o stress oxidativo, devido ao facto de possuir o aminoácido cisteína com um grupo tiol que é facilmente oxidado a dissulfureto de glutathione (GSSG), uma reação com elevado nível de reversibilidade. Tal facto, leva a que o glutathione se encontre maioritariamente na sua forma reduzida e como tal, a relação GSH/GSSG ($\cong 1,2$ em leveduras) possa ser utilizada com frequência para avaliar o estado de oxidação celular.

A determinação do conteúdo em glutathione (GSH) envolveu a preparação de misturas de reação constituídas por amostras de sobrenadante TP, diluídas em tampão fosfato de sódio (0,1 M) a pH 8,0 com EDTA (0,005 M) e OPT (comercial). A mistura foi agitada em vórtex e deixada reagir em banho com agitação à temperatura ambiente durante 15 minutos. Preparou-se em simultâneo soluções branco, onde a amostra foi substituída por tampão fosfato. A fluorescência foi lida no espectrómetro de fluorescência

ao comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão de 420 nm. O teor de GSH em grama de peso seco foi obtido por interpolação de uma curva de calibração com padrões de GSH (0-100 μ M) (Hissin & Hilf, 1976), (Carru et al., 2003).

A quantificação do dissulfureto de glutationo (GSSG) envolveu a adição de *N*-etilmaleimida (NEM) a amostras do sobrenadante TP, idênticas às utilizadas na quantificação do GSH, de modo que a NEM forme um complexo com o GSH removendo-o da leitura do GSSG. Esta mistura foi deixada à temperatura ambiente durante 30 min. Após esse período foi adicionado OPT em NaOH (0,1 M) e colocado em banho com agitação durante 15 min. A leitura seguiu as mesmas condições utilizadas para o GSH (Carru et al., 2003).

O teor em GSSG, por grama de peso seco, no sobrenadante TP, foi obtido por interpolação gráfica em curva de calibração previamente construída com padrões de GSSG (0-80 μ M)

3.4.7. Espécies reativas de oxigénio (ROS)

A acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) no meio celular, pode ocorrer quando a célula é exposta a agentes de stress, provocando alterações deletérias no metabolismo quando o seu teor se sobrepõe aos níveis basais da célula produzindo danos em diversos componentes da célula que até pode conduzir à morte celular.

O conteúdo em ROS de cada amostra foi determinado seguindo o método de Lebel 1992 (LeBel et al., 1992), um método fluorimétrico no qual se utiliza o diclorofluoresceína (DCFH) que facilmente se oxida dando origem a DCF, na presença de peróxido de hidrogénio, um composto com elevada fluorescência. Para tal foi diluída a amostra em DCFH (1 M) preparado em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 e Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 com uma proporção 1:40. Uma solução branco foi igualmente preparada substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 10 min sendo a sua fluorescência lida ao comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão a 520 nm. A concentração de ROS foi calculada por interpolação gráfica na curva de calibração obtida para padrões de concentração diferente de H₂O₂ (0-400 μ M).

3.4.8. Catalase A e T

A expressão dos enzimas catalase, pertencentes à classe das oxido-redutases, pode ser determinada no citoplasma (CTT) e no peroxissoma (CTA) de *S. cerevisiae*. A

decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e dioxigénio (O_2) constitui a principal função que lhes é atribuída.

Determinou-se a referida atividade enzimática seguindo o procedimento descrito por (Beers & Sizer, 1952), no qual se acompanhou a degradação do peróxido de hidrogénio lendo a variação de absorvência a 240 nm, a 25 °C, ao longo de 90 s contra uma solução branco na qual a amostra foi substituída por igual volume de por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. Incubou-se alíquotas do sobrenadante TP (CTT) ou do sedimento TP (CTA) com concentração adequada de proteínas num meio de reação composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H_2O_2 (30 mM). Calculou-se as atividades CTT e CTA a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reação ($0,971295 < r < 0,796143$) (cTT), ($0,981213 < r < 0,723309$) (CTA) e utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o H_2O_2 de $0,0435 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4.9. Glutationo redutase

O enzima glutatióno redutase (GR) é responsável por catalisar a regeneração do dissulfureto de glutatióno (GSSG) em glutatióno (GSH), um dos passos do ciclo de oxidação – redução do glutatióno. A referida atividade enzimática decorreu como descrito por Goldberg e Spooner (1987). Preparou-se uma mistura de reação constituída por sobrenadante TP de cada amostra, tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, EDTA (15 mM), e GSSG (63,5 mM). A reação foi despoletada pela adição de NADPH (0,17 mM). Leu-se a absorvência contra um branco, onde a amostra foi substituída por igual volume de tampão fosfato (0,12 M) pH 7,0, a 340nm durante 120s a 37°C. Calculou-se a atividade enzimática utilizando o valor do coeficiente angular das retas obtidas ($0,975238 < r < 0,744718$), e o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4.10. Glicose-6-fosfato desidrogenase

O enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato uma das principais fontes de NADPH intracelular, onde a glicose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogluconolactona e NADPH.

O procedimento descrito por (Bergmeyer, 1983) e (Postma et al., 1989) foi utilizado na determinação da atividade enzimática. Preparou-se um meio de reação constituído por sobrenadante TP, tampão tris-HCl (1M) pH 8,0; NADP^+ (0.04 M) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 M). Deixou-se a mistura de reação estabilizar a 37°C durante 1 min. Em seguida iniciou-se a reação com a adição de glicose-6-fosfato (0,1 M). Leu-se a

variação de absorvência a 340 nm, durante 120 s contra um branco no qual se substituiu a amostra por um igual volume de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,0.

A atividade enzimática G6PD foi calculada utilizando o valor do coeficiente angular das curvas de reação ($0,928583 < r < 0,837129$) e utilizando o valor do coeficiente de absortividade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADPH.

3.4.11. Piruvato cinase

O enzima piruvato cinase (PK) desempenha um papel relevante como catalisador da reação de conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato essencial para o consumo da glicose em leveduras.

A determinação desta atividade enzimática seguiu procedimentos descritos em Maitra & Lobo (1971) e (Bergmeyer (1983), onde se utilizou o lactato desidrogenase (LDH) como enzima auxiliar de forma a assegurar a formação de lactato, após a formação do piruvato com consumo de NADH. Preparou-se um meio de reação constituído por tampão tris-HCl (100 mM) pH 8, fosfoenolpiruvato (1 mM), ADP (1 mM), frutose 1,6-difosfato (1mM), NADH (0,03 mM), lactato desidrogenase (0,3 U) e sobrenadante TP de cada amostra, na diluição adequada. Foi igualmente preparada uma solução branco substituindo a amostra na mesma mistura de reação por igual volume de água.

Para calcular o valor da atividade enzimática utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,961539 < r < 0,792707$), com base no decréscimo da absorvência registado a 340 nm, durante 90 s, a 37°C, e o valor do coeficiente de absortividade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADH.

3.4.12. Citrato sintase

Um dos passos reguladores do ciclo do citrato envolve o enzima citrato sintase (CS) que catalisa a reação da formação do citrato, por condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato. Esta atividade enzimática foi determinada utilizando um meio de reação constituído por Tris-HCl (100 mM) pH 8,0 contendo, acetil-CoA (0,1 mM), oxaloacetato (0,2 mM), ácido 5,5'-ditiodi-2-nitrobenzoico (reagente de Ellman) (0,25 mM) e amostra rica em mitocondrios (sedimento TS) (Kim et al., 1986). Foi também preparada uma solução branco utilizando a mesma mistura reacional, mas onde a amostra foi substituída por igual volume de tampão.

No cálculo da atividade enzimática citrato sintase (CS) utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,973558 < r < 0,764091$), geradas a partir da leitura da

absorvência a 412 nm durante 300 s, a 25°C e o valor do coeficiente de absortividade molar de 14,14 mM⁻¹cm⁻¹ para o 2-nitro-5-tiobenzoato.

3.4.13. Succinato desidrogenase

O enzima succinato desidrogenase (SDH), outro regulador do ciclo do citrato, catalisa a reação de oxidação do succinato em fumarato com redução do coenzima FAD⁺ a FADH₂, equivalentes redutores que são transferidos diretamente para o complexo II da cadeia respiratória. A referida atividade catalítica foi medida de forma indireta, lendo a sua capacidade para reduzir o citocromo c, por espectrometria de absorção molecular (Chapman et al., 1992).

Preparou-se uma mistura de reação constituída por tampão fosfato (50 mM) pH 7,4; citocromo c (100 mM); cianeto de potássio (1 mM), succinato (2,5 mM) e sedimento TS na diluição adequada. Preparou-se de igual modo, uma solução branco utilizando uma mistura de reação onde a amostra foi substituída por igual volume de tampão fosfato. No cálculo da atividade SDH recorreu-se ao coeficiente angular das curvas de reação ($0,992932 < r < 0,982720$), construídas a partir da variação da absorvência a 550 nm, 25°C, durante 300s e utilizou-se o valor do coeficiente de absortividade molar de 19 mM⁻¹cm⁻¹ (Walzel et al., 2002).

3.4.14. NADH (ubiquinona) desidrogenase I

Embora a cadeia respiratória de *S.cerevisiae* não disponha de complexo I, como descrito para outros eucariontes, possui 3 NADH desidrogenases localizadas na membrana interna mitocondrial. Assim, neste microrganismo, os equivalentes redutores sob a forma de NADH formados no citoplasma são oxidados pelo enzima NADH ubiquinona oxidorreductase também denominado NADH desidrogenase externa (NDE1).

Na determinação da referida atividade enzimática fez-se reagir tampão fosfato (0,5 M) pH 7,6; KCN (100 µM); citocromo c (22,5 µM); e sedimento TS na diluição adequada e NADH (0,5 mM), a 30°C, durante 180 s, como descrito por Tzagoloff, (1971) e Ludovico et al. (2002). Preparou-se igualmente uma solução branco utilizando a mesma mistura na qual a amostra foi substituída por um volume igual de tampão fosfato. O valor da atividade NDE1 foi calculado com recurso ao coeficiente angular das curvas de reação ($0,997881 < r < 0,994936$), construídas a partir da leitura de absorvência a 550 nm e utilizando também o valor do coeficiente de absortividade molar de 21 mM⁻¹ cm⁻¹ para o citocromo c.

3.4.15. Piruvato descarboxilase

O enzima piruvato descarboxilase (PDC) catalisa o passo iniciador da via fermentativa promovendo a descarboxilação do piruvato a acetaldeído. Por esse motivo é muitas vezes utilizado como um bom marcador da atividade fermentativa em *S. cerevisiae*. A determinação desta atividade enzimática obedeceu ao protocolo delineado por Bergmeyer (1983) no qual foi elaborado um meio de reação constituído por tampão MES (50 mM) pH 6, piruvato (30 mM), NADH (10mg/mL) e o enzima auxiliar ADH (10 U/mL). Iniciou-se a reação com a adição do sobrenadante TP de cada amostra. Preparou-se uma solução branco utilizando a mesma mistura reacional onde a amostra foi substituída por igual volume de tampão MES.

No cálculo da atividade enzimática utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,902485 < r < 0,819746$) delineadas a partir da leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, a 30°C, durante 600 s e com o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o NADH.

4. Resultados e discussão

A *S. cerevisiae* é classificada como levedura Crabtree positiva, ou seja, onde ocorrem alterações do metabolismo celular maioritariamente moduladas pelo teor de glicose. Entre as alterações metabólicas que podem ser detetadas temos a ocorrência de défice respiratório associado à competição entre a glicólise e a fosforilação oxidativa para o ADP e o Pi. Quando a fonte de carbono é preferencialmente a glicose a levedura assume metabolismo fermentativo independentemente de crescer na ausência ou presença de O₂, com repressão do metabolismo respiratório. Esta opção mantém-se ao longo do crescimento celular até que o teor intracelular de glicose diminua e aumente o de etanol. Como referido anteriormente na secção 1, nessa fase do crescimento, designada por desvio diáuxico, ocorre indução da expressão de enzimas respiratórios e silenciamento parcial das vias fermentativas passando a levedura a crescer em condições respiratório-fermentativas. A fermentação aeróbia determinada em leveduras Crabtree positivas é em muitos aspetos um fenómeno idêntico ao descrito por Meyerhof e Warburg no início do século XX em células cancerígenas e conhecido por efeito Warburg (Warburg, 1956).

Ao longo deste estudo procurou-se avaliar alterações metabólicas no crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em diferentes meios de cultura que incluem o controlo (meio YPD) e outros 5 tratamentos onde o meio de cultura continha EPTC ou ATZ ou Pro ou combinações dos três agentes de stress. Em qualquer dos ensaios procurou-se avaliar se

a presença isolada ou combinada dos agentes de stress revertia ou potenciava o desvio diáuxico.

4.1. Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e na disponibilidade de fosfato inorgânico, tióis não proteicos e espécies reativas de oxigénio.

A figura 4.1A representa o peso seco determinado no final da cultura em cada um dos tratamentos. Os resultados representados nessa figura mostram que não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre células controlo e qualquer dos tratamentos. Apenas células expostas individualmente ao EPTC ou à ATZ exibiram peso seco diferente das crescidas com a adição de prolina à mistura EPTC + ATZ.

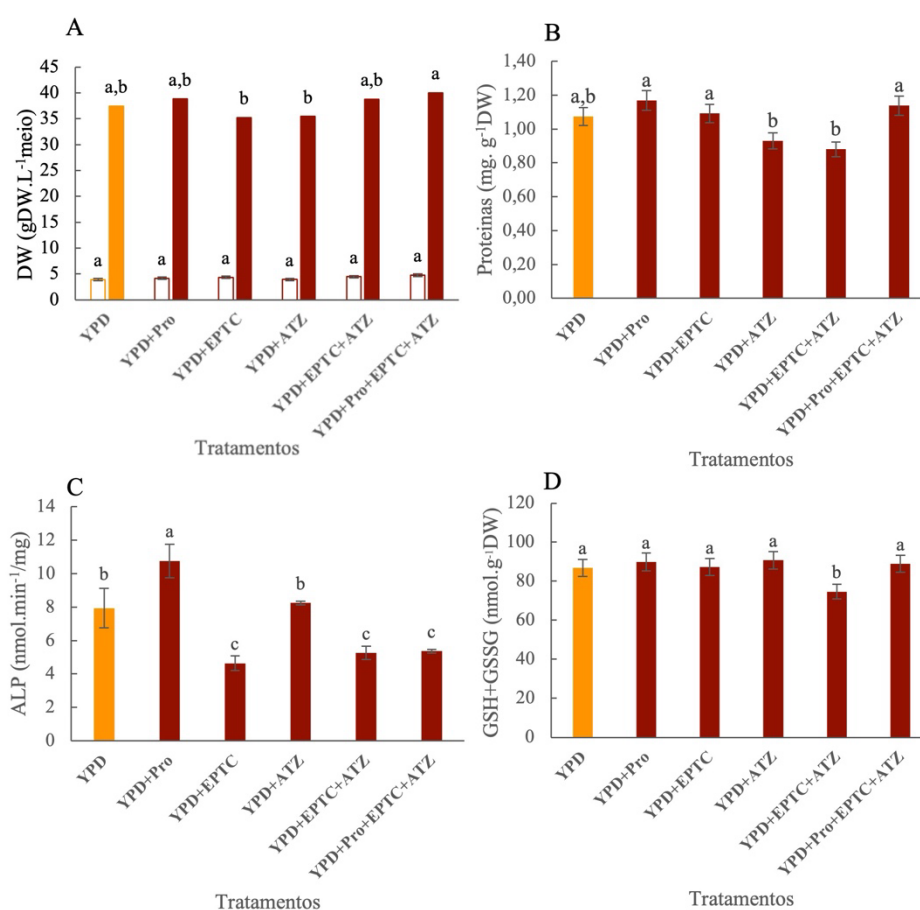


Figura 4.1. Efeito da composição do meio de cultura no peso seco no início da cultura (colunas abertas) e no final da cultura (colunas a cheio) (A), conteúdo proteico total (B), atividade enzimática ALP (C) e conteúdo em tióis totais não proteicos (D) do sobrenadante TP de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O conteúdo proteico total entre células controlo e de qualquer dos tratamentos também não apresentou diferenças com significado estatístico (figura 4.1B) embora, nesse parâmetro tenham sido detetadas diferenças ($p < 0,05$) entre células crescidas apenas na presença de ATZ ou de EPTC+ATZ relativamente a qualquer dos restantes tratamentos. A adição de Pro ao meio com EPT+ATZ parece ter revertido o efeito inibitório do crescimento detetado quando a ATZ está presente.

A atividade enzimática ALP variou entre 4 e 10 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg}$) resultados inferiores, mas da mesma ordem de grandeza dos publicados por (Bang & Chung, 2010) (figura 4.1C). A referida atividade catalítica não foi afetada pela ATZ no meio de cultura. Todavia quando este possui EPTC ou EPTC combinado apenas com ATZ ou com ATZ e Pro, a referida atividade catalítica diminuiu para aproximadamente metade do valor controlo. Como em qualquer destes 3 casos o valor da atividade ALP é estatisticamente idêntico ($\cong 4,5 \text{ nmol min}^{-1} / \text{mg}$) não se pode admitir qualquer efeito sinérgico quer pela ATZ quer pela Pro. O efeito positivo na disponibilização de P_i quando apenas a Pro está no meio de cultura não foi observado na presença de EPTC.

O conteúdo em tióis totais não proteicos (figura 4.1D) ($75\text{-}85 \text{ nmol}^{-1} \text{g DW}$), valores superiores aos determinados por Elskens et al. (1991). Este parâmetro não sofreu alterações significativas em qualquer dos tratamentos, com exceção das leveduras que cresceram na presença de EPTC+ATZ, onde ocorreu um decréscimo com significado estatístico. Outro aspeto a considerar foi a prolina ter anulado esse efeito estabilizando o conteúdo em tióis totais em valores próximos do controlo.

4.2. Efeito da composição do meio de cultura em marcadores de stress e de reposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃.

O conteúdo em glutationato citoplasmático (sobrenadante TP) (figura 4.2A) variou entre 30 e 43 $\text{nmol g}^{-1} \text{DW}$ valores superiores aos descritos por Elskens et al. (1991). A referida figura revela que ocorreu uma diminuição deste conteúdo em qualquer dos ensaios de exposição, tendo significado estatístico em células expostas apenas à ATZ ou expostas a combinação EPTC+ATZ com ou sem Pro. Estes resultados indiciam que o consumo do tripéptido parece estar associado a resposta antioxidante, maioritariamente condicionada pela presença de ATZ na cultura.

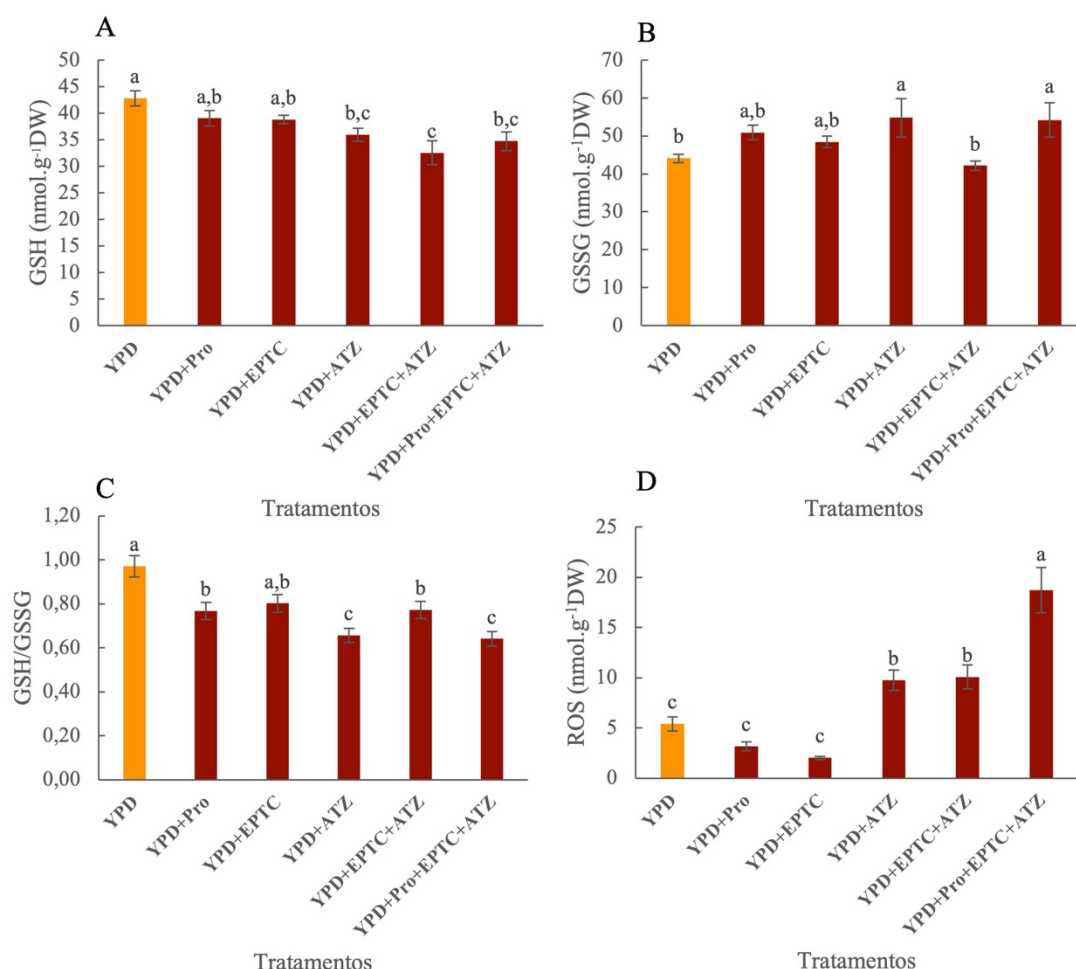


Figura 4.2. Efeito da composição do meio de cultura no conteúdo em GSH (A), GSSG (B), razão GSH/GSSG (C) e conteúdo em ROS (D) do sobrenadante TP de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A partir da figura 4.2B podemos observar que a maior parte dos tratamentos não afetaram o conteúdo em dissulfureto de glutathione (GSSG), com exceção do que foi observado em células expostas a ATZ ou ATZ combinada com EPTC+Pro, resultados que nestes dois casos, sugerem aumento da resposta antioxidante mediada pelo glutathione com acumulação de GSSG. O conteúdo em GSSG distribuiu-se entre 40-55 nmol g⁻¹ DW, valores superiores aos descritos por (Elskens et al., 1991).

A razão GSH/GSSG (figura 4.2C) variou entre 0,6-1,1, valores superiores aos determinados em *S. cerevisiae* por (Kiriya et al., 2013) (0,14-0,35). A referida razão diminuiu com significado estatístico em qualquer dos tratamentos, comparativamente com o controlo, atingindo os valores mais baixos em células expostas à ATZ ou ATZ+EPTC+Pro. O decréscimo observado em quase todos os tratamentos indiciam

condições de stress oxidativo apesar de o conteúdo em tióis totais permanecer praticamente inalterado (figura 4.1D).

O conteúdo em ROS, expresso em teor de peróxido de hidrogénio intracelular (figura 4.2D) confirma as condições de stress oxidativo indiciadas pela quebra de poder redutor observada pela razão GSH/GSSG discutida no paragrafo anterior, tendo esse efeito significado estatístico em todos os ensaios de exposição que incluíam a ATZ como agentes de stress.

4.3. Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular *S. cerevisiae* UE-ME₃ e na disponibilidade de fosfato inorgânico, tióis totais não proteicos e espécies reativas de oxigénio.

O decréscimo do teor de GSH e da razão GSH/GSSG seguida pelo aumento da concentração de ROS descritos na seção anterior poderá estar relacionada com a perda de atividade GR, ou seja, com a sua capacidade para regenerar o GSH. A atividade GR (figura 4.3A) foi afetada negativamente em quase todos os tratamentos com exceção da determinada em células expostas a Pro que aumentou ou ATZ que permaneceu idêntica ao controlo. Esta alteração parece justificar em parte o decréscimo da razão GSH/GSSG e o aumento do conteúdo em ROS descritos na secção anterior. Todavia a referida alteração de atividade enzimática não parece estar relacionada com a atividade G6PD geradora de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do enzima GR. A atividade glutationo redutase variou entre 20 e 80 (nmol.min⁻¹/mg), valores dentro do intervalo de variação descrito por (Bayliak et al., 2006). A figura 4.3B revela que a maior parte dos tratamentos não afetou a atividade catalítica G6PD. Foi exceção células expostas à combinação EPTC+ATZ que corresponde ao valor mais elevado que foi determinado, alteração para a qual não encontramos justificação plausível, a menos que a via das pentose-fosfato estivesse a ser mobilizada para gerar intermediários da via glicolítica. A atividade G6PD variou entre (6 e 12 nmol.min⁻¹/mg), intervalo próximo ainda que inferior dos determinados por (Bayliak et al., 2006) (47,2 nmol.min⁻¹/mg).

A atividade catalase presente no sobrenadante TP (CTT) variou entre 0,5 e 2,5 (μmol.min⁻¹/mg), intervalo de valores idêntico ao descrito por (Bayliak et al., 2006)(figura 4.3C). A referida atividade enzimática foi afetada negativamente ($p<0.05$) em qualquer dos tratamentos, atingindo o valor mais baixo no tratamento de exposição à

EPTC+ATZ+Pro, sendo assim comprometido o consumo, por esta via, do excesso de peróxido de hidrogénio intracelular. Assumindo que um aumento desta atividade permite induzir processo de indução de morte celular por apoptose, uma resposta inversa, como a que foi observada, aponta para um aumento da atividade proliferativa.

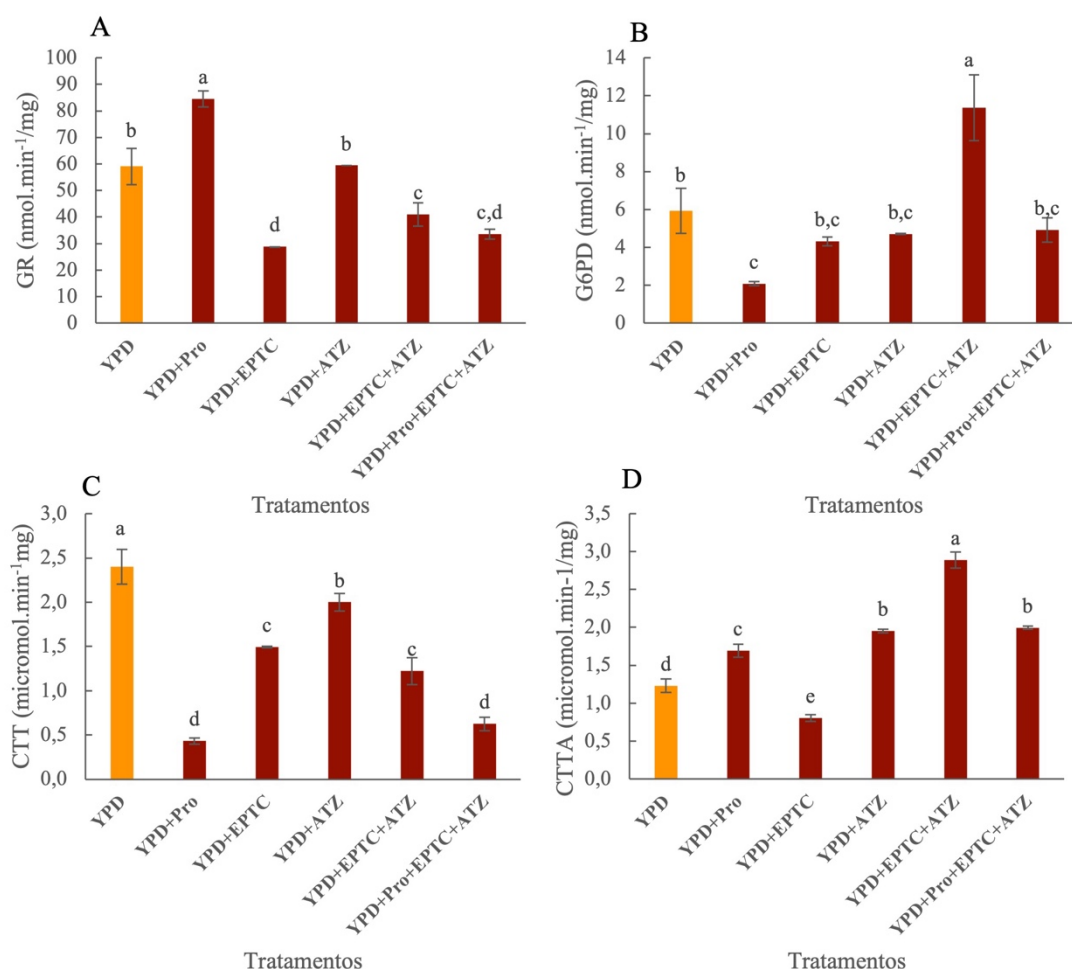


Figura 4.3. Efeito da composição do meio de cultura nas atividades enzimáticas GR (A), G6PD (B), CTT (C) e CTA (D) do sobrenadante TP de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A atividade catalase peroxissomal (CTA) (figura 4.3D) apresentou nível superior ao controlo em quase todos os tratamentos, com exceção da que foi determinada em células expostas apenas ao EPTC, ensaio no qual foi observado o valor mais baixo. Esta atividade enzimática variou entre 0,7 e 2,7 ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg}$) intervalo de variação dentro da ordem de grandeza dos valores publicados por Bayliak et al. (2006). Este tipo de resposta sugere um speed up da beta-oxidação dos ácidos gordos no peroxissoma, o

compartimento por excelência onde essa via se expressa preferencialmente em *S. cerevisiae*, pelo que se pode assumir elevada mobilização do metabolismo lipídico indispensável ao crescimento celular.

4.4. Efeito da composição do meio de cultura no metabolismo energético de *S. cerevisiae* UE-ME₃.

O intermediário metabólico piruvato integra uma encruzilhada metabólica que envolve alguns passos essenciais do metabolismo energético celular. Assim, a sua disponibilização ao nível do citoplasma envolve a participação do enzima piruvato cinase (PK) um regulador-chave da glicólise. A continuidade do seu percurso metabólico pode então dar-se via fermentação alcoólica envolvendo a participação do enzima piruvato descarboxilase (PDC), outro modulador chave da concentração de estado estacionário do piruvato citoplasmático. Para além deste percurso no citoplasma o piruvato pode ser transferido para o mitocôndrio onde é convertido em acetil-CoA após descarboxilação oxidativa a acetil-CoA pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH). Alternativamente o piruvato pode ser carboxilado pelo enzima piruvato carboxilase e convertido em oxaloacetato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). O oxaloacetato por condensação com o acetil-CoA no mitocôndrio pode então ser convertido em citrato pelo enzima citrato sintase, um dos regulares do ciclo TCA. O NADH libertado ao longo do ciclo será então oxidado pelo enzima NDE1 presente na membrana interna mitocondrial. Alternativamente o succinato doa eletrões ao coenzima FAD^+ convertendo-o em $FADH_2$ através do enzima succinato desidrogenase, ou complexo II da cadeia respiratória, que transfere esses eletrões ao coenzima Q. Deste modo quer o coenzima NADH quer o $FADH_2$ gerados ao nível do ciclo TCA contribuem para a produção de ATP pela via respiratória.

A figura 4.4A mostra que a exposição isolada de *S. cerevisiae* à Pro e ao EPTC não provocou alterações com significado estatístico da atividade enzimática PK ($p < 0,05$). Contudo a exposição isolada à ATZ; ou combinada desta com o EPTC ou desta combinada com a Pro provocaram a duplicação da atividade PK, contribuindo para um aumento da disponibilidade do piruvato no citoplasma. A atividade piruvato cinase variou entre 1,5 e 5 $nmolmin^{-1}/mg$, valores inferiores aos descritos por Polakis & Bartley (1965). A partir da figura 4.4B pode observar-se que a maior parte dos tratamentos não provocaram alteração da atividade de PDC. Exceção foram os tratamentos isolados com EPTC ou com

EPTC+ATZ, que neste caso levou a uma duplicação da referida atividade catalítica. A atividade piruvato descarboxilase assumiu valores entre (4 e 8 nmolmin⁻¹/mg) inferiores aos descritos por (Flikweert et al., 1996). Os resultados discutidos nas figuras 4.4A e 4.4B apontam para uma reversão do metabolismo energético para a via fermentativa. Todavia o aumento de piruvato em células expostas à ATZ ou à combinação ATZ+EPTC+Pro poderá ter seguido destino metabólico distinto.

Alternativamente o piruvato poderá ter sido mobilizado para o mitocôndrio via piruvato desidrogenase (PDH) ou piruvato carboxilase (PC), seguido por conversão em citrato via CS. No entanto, esta opção alternativa não foi confirmada em células expostas apenas à ATZ ou combinada com EPTC e Pro uma vez que a figura 4.4C mostra que não houve alterações significativas dos valores da atividade CS entre células controle e quase todos os tratamentos que variou entre 4 e 14 nmol.min⁻¹/mg, valores inferiores aos descritos em (Castro et al., 1976). Apenas ocorreu um aumento significativo em células expostas de forma combinada ao EPTC e ATZ. Este mecanismo poderá levar a supor uma estimulação do metabolismo respiratório associado à evolução normal para fase diáuxica. No entanto, tal desvio não parece ter ocorrido de forma concertada na maior parte dos tratamentos, uma vez que a atividade NDE1 apenas aumentou nas leveduras sujeitas ao tratamento isolado com EPTC ou ATZ, de forma não correlacionada com a CS. Convém também referir que no tratamento combinado EPTC+ATZ observou-se um decréscimo significativo desta atividade da cadeia respiratória, sugerindo que a transferência de elétrons do NADH para o O₂ poderá ter sido bloqueada pela exposição simultânea a estes dois produtos fitofarmacêuticos e mostra-se estar correlacionada com a reativação do metabolismo fermentativo. Esta resposta parece ser igualmente suportada pelos resultados da figura 4.4D, tendo em consideração que a atividade SDH associada à transferência de elétrons do succinato para o FADH₂, e deste para o coenzima Q, seguida pela transferência dos elétrons para o O₂, não apresentava diferenças significativas relativamente ao controle na maior parte dos tratamentos. Apenas ocorreu um aumento com significado estatístico em células expostas à ATZ. A atividade succinato desidrogenase variou entre 30 e 50 nmolmin⁻¹/mg, valores inferiores aos determinados (Lushchak et al., 2005).

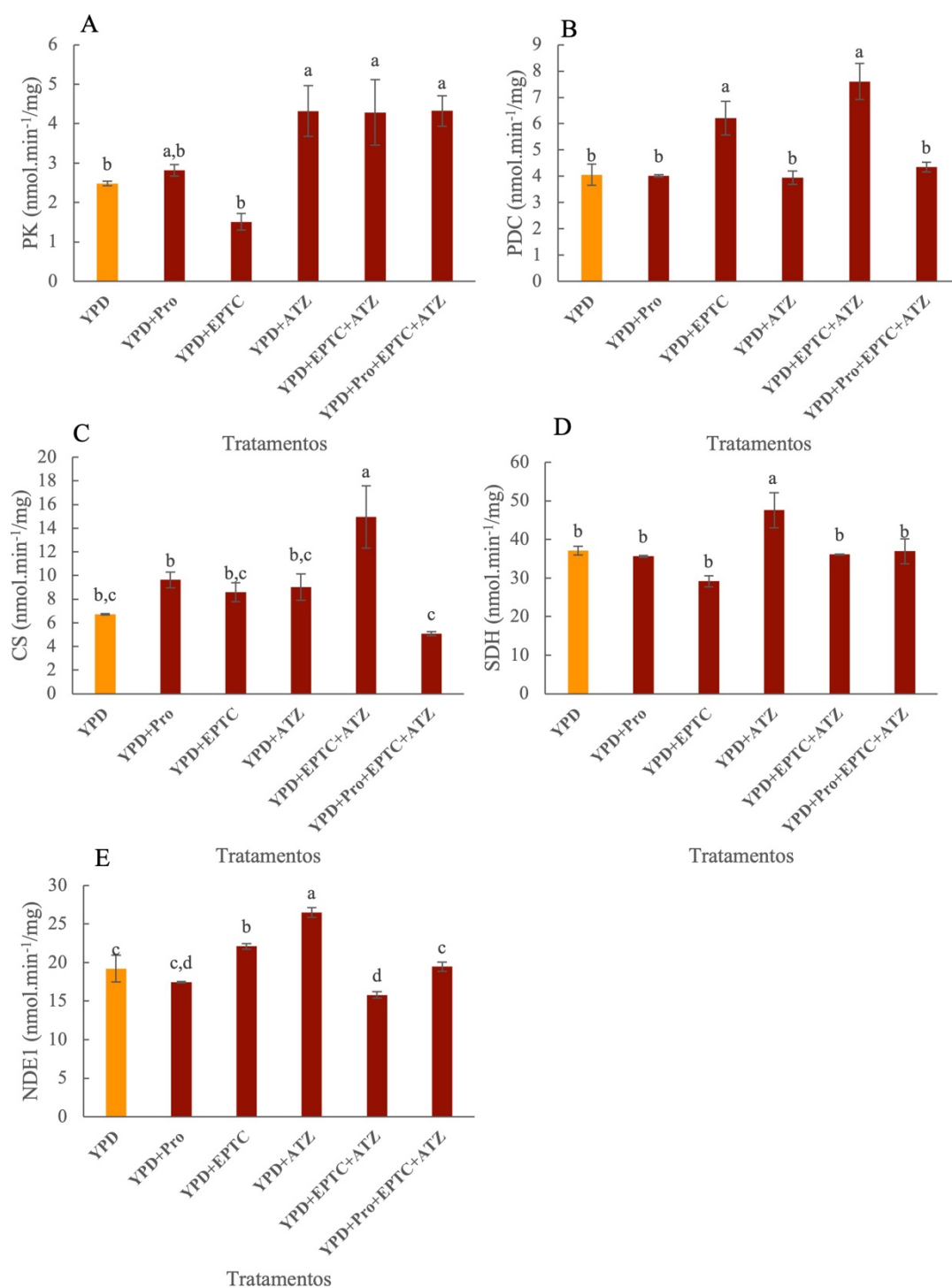


Figura 4.4. Efeito da composição do meio de cultura nas atividades enzimáticas PK (A), PDC (B), CS (C), SDH (D) e NDEI (E) do sobrenadante TP de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A evolução das condições intracelulares de stress oxidativo, traduzido pelo decréscimo da razão GSH/GSSG detetado maioritariamente em células expostas a ATZ ou à combinação EPTC+ATZ indiciam que o desvio diáuxico poderá ter sido potenciado por estas condições culturais, podendo a Pro ter exercido um efeito modulador nesta resposta. Contudo o decréscimo menos acentuado da razão GSH/GSSG e o aumento mais atenuado do conteúdo em ROS pela ATZ combinada com o EPTC sugere que poderá ter havido um atraso na evolução do metabolismo fermentativo para respiratório-fermentativo quando as *S.cerevisiae* foram expostas à combinação EPTC+ATZ. Estes resultados confirmam que os efeitos metabólicos exercidos pela exposição combinada dos agentes de stress são diferentes da exposição individual de cada um deles. O risco da exposição combinada do EPTC e ATZ será maior do que em qualquer um dos outros casos uma vez que aponta para uma indução do efeito de Crabtree.

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a H_0 proposta na secção problemas e objetivos foi negada, uma vez que o índice de stress oxidativo e de danos celulares, bem como o metabolismo energético de *S. cerevisiae* UE-ME₃ foram afetados significativamente pelos tratamentos realizados com os dois agentes fitofarmacêuticos ATZ, EPTC e prolina. Assim as principais conclusões deste estudo são:

A exposição isolada ao EPTC ou combinada com a ATZ ou ATZ Pro diminuiu a atividade enzimática ALP para aproximadamente metade do valor controlo. Como em qualquer das três situações aqui referidas o valor da atividade ALP é idêntico não se pode admitir qualquer efeito sinérgico quer pela ATZ quer pela Pro. A prolina não foi capaz de contrariar o efeito positivo na disponibilização de P_i quando o meio de cultura continha EPTC.

A prolina anulou o decréscimo do conteúdo em tióis totais não proteicos citoplasmáticos de *S. cerevisiae* expostas em simultâneo a EPTC + ATZ, repondo esse teor para níveis próximos dos determinados no grupo controlo.

A exposição isolada *S. cerevisiae* UE-ME₃ à ATZ ou combinada apenas com EPTC ou EPTC+Pro levou a um decréscimo do conteúdo em glutatono citoplasmático, facto que permite especular que o consumo do tripéptido pode estar associado ao despoletar de uma resposta antioxidante à ATZ.

Células expostas a ATZ ou ATZ combinada com EPTC + Pro apresentavam teor citoplasmático em GSSG superior ao das células controlo, facto que corrobora o

despoletar de um aumento da resposta antioxidante mediada pelo glutathione especulado no ponto anterior.

A razão GSH/GSSG diminuiu com significado estatístico em todos os tratamentos, comparativamente com o controlo, tendo sido detetados os valores mais baixos em células crescidas na presença de ATZ ou de ATZ+ EPTC+Pro. Estes resultados indiciam que o despoletar da resposta antioxidante mediada pelo glutathione não foi suficiente para prevenir a evolução para condições de stress oxidativo.

O conteúdo em ROS, expresso em teor de peróxido de hidrogénio intracelular confirma as condições de stress oxidativo indicadas pela quebra de poder redutor intracelular, observado pela queda da razão GSH/GSSG referida no ponto anterior, sendo esse efeito observado em todos os ensaios em que *S. cerevisiae* UE-ME₃ foram expostas à ATZ combinada ou não com o EPTC ou EPTC+Pro.

O decréscimo do teor de GSH e da razão GSH/GSSG seguida pelo aumento da concentração de ROS poderá estar relacionada com a perda de capacidade do enzima GR para regenerar o GSH, uma vez que a atividade GR diminuiu em quase todos os tratamentos com exceção dos ensaios de exposição à Pro que aumentou ou ATZ que não variou.

A alteração de atividade GR não parece estar relacionada com a atividade G6PD, a principal fonte de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do enzima GR, uma vez que a maior parte dos tratamentos não afetou a atividade catalítica G6PD.

A atividade catalase (CTT) diminuiu em qualquer dos tratamentos, atingindo o nível mais baixo nos tratamentos com Pro ou EPTC+ATZ+Pro, parecendo ter sido comprometida a eliminação do excesso de peróxido de hidrogénio citoplasmático, por esta via, resposta que aponta para um aumento da atividade proliferativa.

A atividade catalase peroxissomal (CTA) aumentou em quase todos os tratamentos, com exceção das células expostas isoladamente ao EPTC, ensaio no qual se determinou o valor mais baixo. O aumento da atividade CTA aponta para um aumento da taxa de beta-oxidação no peroxissoma, o compartimento onde esta via se expressa preferencialmente em *S. cerevisiae* pelo que somos levados a assumir elevada mobilização energética.

A exposição isolada de *S. cerevisiae* UE-ME₃ à ATZ, combinada com o EPTC ou combinada ainda com a Pro provocaram a duplicação da atividade PK, contribuindo para um aumento da disponibilidade do piruvato citoplasmático.

A exposição isolada ao EPTC ou EPTC+ATZ provocou um aumento da atividade enzimática PDC que no último caso levou à duplicação do valor controle.

O aumento das atividades PK reguladora da via glicolítica e PDC reguladora da fermentação alcoólica no tratamento EPTC+ATZ apontam para uma regressão do metabolismo energético para fermentativo aeróbio, com atraso na evolução metabólica para o expectável desvio diáuxico.

O decréscimo da razão GSH/GSSG, o aumento do conteúdo em ROS, a indução das atividades enzimáticas PK e PDC, bem como, a inibição da atividade NDEI, devido à exposição combinada ATZ+EPTC indiciam que poderá ter havido um atraso na evolução do metabolismo fermentativo aeróbio para respiratório-fermentativo quando *S. cerevisiae* UE-ME₃ foram expostas em simultâneo a estes dois agentes fitofarmacêuticos, uma vez que o aumento de stress oxidativo não foi acompanhado por indução do metabolismo respiratório. A presença de Pro no meio de cultura poderá ter exercido um efeito modulador positivo na resposta.

A exposição combinada dos agentes de stress ATZ e EPTC, despoletaram em *S. cerevisiae* respostas distintas da exposição individual a cada um deles.

O risco associado à exposição combinada EPTC+ATZ poderá ser maior do que a exposição individual, uma vez que aponta para uma indução do efeito de Crabtree.

Referências bibliográficas

- Alabduladhem, T. O., & Bordoni, B. (2024). *Physiology, Krebs Cycle*.
- Baker, A., Lin, C.-C., Lett, C., Karpinska, B., Wright, M. H., & Foyer, C. H. (2023). Catalase: A critical node in the regulation of cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*, 199, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.009>
- Bang, W.-S., & Chung, H.-J. (2010). Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *New Biotechnology*, 27(4), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.03.001>
- Barbieri, G. F., Young, B. G., Dayan, F. E., Streibig, J. C., Takano, H. K., Merotto, A., & Avila, L. A. (2022). Herbicide mixtures: interactions and modeling. *Advances in Weed Science*, 40(spe1). <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2022;40:seventy-five011>
- Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast*, 20(6), 509–543. <https://doi.org/10.1002/yea.986>
- Bayliak, M., Semchyshyn, H., & Lushchak, V. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific. *Biochemistry (Moscow)*, 71(9), 1013–1020. <https://doi.org/10.1134/S0006297906090100>
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–140. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50881-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50881-x)
- Bergmeyer. (1983). Bergmeyer, Grassl. Methods of enzymatic analyses. *Starch - Stärke*, 106–107. <https://doi.org/10.1002/star.19850370313>
- Bretaudiere, J.T.S. (1984) No Title. In: Verlag Chemie F, editor. Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol II., 3rd. ed. Florida
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., & Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1401(3), 242–264. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(97\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(97)00150-X)
- Carru, C., Zinellu, A., Sotgia, S., Marongiu, G., Farina, M. G., Usai, M. F., Pes, G. M., Tadolini, B., & Deiana, L. (2003). Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1017(1–2), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.020>
- Chapman, K. B., Solomon, S. D., & Boeke, J. D. (1992). SDH1, the gene encoding the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 118(1), 131–136. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90260-V](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90260-V)
- de Castro, I. N., de Saavedra, J. M. A., Machado, A., & Mayor, F. (1976). Regulation of the level of yeasts citrate synthase by oxygen availability. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 12(3), 161–169. <https://doi.org/10.1007/BF01741714>

- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Designed Research; C, J. N. M. (2021). *Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112836118/-/DCSupplemental>
- Dong, X., Liu, T., & Xiong, Y. (2017). A novel approach to regulate cell membrane permeability for ATP and NADH formation in *Saccharomyces cerevisiae* induced by air cold plasma. *Plasma Science and Technology*, 19(2), 024001. <https://doi.org/10.1088/2058-6272/19/2/024001>
- Elskens, M. T., Jaspers, C. J., & Penninckx, M. J. (1991). Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 137(3), 637–644. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-637>
- Epa, U. (2008). *Health Effects Support Document for S-Ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC)*. www.epa.gov/safewater/ccl/pdf/EPTC.pdf
- Flikweert, M. T., Van Der Zanden, L., Janssen, W. M., Steensma, H. Y., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast (Chichester, England)*, 12(3), 247–257. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960315\)12:3%3C247::AID-YEA911%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3%3C247::AID-YEA911%3E3.0.CO;2-I)
- Goldberg and Spooner. Methods of enzymatic analysis, In: VCH NY, editor. 3rd ed. 1987.p. 258–260
- Herbert Grace Crabtree, B. (1929). *LXI. Observations On The Carbohydrate Metabolism Of Tumours*.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), 1217–1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Israelsen, W. J., & Vander Heiden, M. G. (2015). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>
- Khan, B. A., Nadeem, M. A., Nawaz, H., Amin, M. M., Abbasi, G. H., Nadeem, M., Ali, M., Ameen, M., Javaid, M. M., Maqbool, R., Ikram, M., & Ayub, M. A. (2023). *Pesticides: Impacts on Agriculture Productivity, Environment, and Management Strategies* (pp. 109–134). https://doi.org/10.1007/978-3-031-22269-6_5
- Kim, K.-S., Rosenkrantz, M. S., & Guarente, L. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* Contains Two Functional Citrate Synthase Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 6(6), 1936–1942. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.6.1936-1942.1986>

- Kiriyama, K., Hara, K. Y., & Kondo, A. (2013). Oxidized glutathione fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* engineered for glutathione metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7399–7404. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5074-8>
- Lake, B. (1987) Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. Press I, editor. Oxford, 183–215 p.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
- Leister, D., Herrmann, J. M., Altmann, K., Dürr, M., & Westermann, B. (2007.). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism to Study Mitochondrial Biology General Considerations and Basic Procedures. In *From: Methods in Molecular Biology* (Vol. 372). Mitochondria: Practical Protocols. <http://www.yeastgenome.org/>.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A., & Côrte-Real, M. (2002). Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(8), 2598–2606. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-12-0161>
- Lushchak, V., Semchyshyn, H., Mandryk, S., & Lushchak, O. (2005). Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.010>
- Maitra, P. K., & Lobo, Z. (1971). A Kinetic Study of Glycolytic Enzyme Synthesis in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 246(2), 475–488. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62514-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62514-1)
- Marcuță, A., Tindeche, C., Tudor, V., Carbarău, C., Smedescu, D., & Marcuță, L. (n.d.). Application of the Principles of the Circular Economy in Conventional Agriculture. Case Study-pesticide Waste Recycling. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 21, 2021.
- Mukai, Y., Kamei, Y., Liu, X., Jiang, S., Sugimoto, Y., Mat Nanyan, N. S. binti, Watanabe, D., & Takagi, H. (2019). Proline metabolism regulates replicative lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 6(10), 482–490. <https://doi.org/10.15698/mic2019.10.694>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08289-8>
- Otero, P., Echave, J., Chamorro, F., Soria-Lopez, A., Cassani, L., Simal-Gandara, J., Prieto, M. A., & Fraga-Corral, M. (2023). Challenges in the Application of Circular

- Economy Models to Agricultural By-Products: Pesticides in Spain as a Case Study. *Foods*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/foods12163054>
- P. Nalini, P. Ellaiah, T. Prabhakar, & G. Girijasankar. (2015). Microbial alkaline phosphatases in bioprocessing. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 384–396.
- Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W., & Jordan, F. (2014). The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 16615–16623. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.563148>
- Polakis, E., & Bartley, W. (1965). Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochemical Journal*, 97(1), 284–297. <https://doi.org/10.1042/bj0970284>
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 468–477. <https://doi.org/10.1128/aem.55.2.468-477.1989>
- Rashid, B., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2010). Herbicides and pesticides as potential pollutants: A global problem. In *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 427–447). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7_19
- Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. OJ L 309, 24.11.2009, p. 1–50.
- Rezaei, M. N., Dornez, E., Jacobs, P., Parsi, A., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. (2014). Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation. *Food Microbiology*, 39, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.013>
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>
- Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Sherman, F. (2002). [i] Getting Started with Yeast. http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/Index.html
- Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
- Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., & Van Der Kraak, G. J. (2008). Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic

- Reptiles: A Critical Review. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(9), 721–772. <https://doi.org/10.1080/10408440802116496>
- Stacpoole, P. W., & McCall, C. E. (2023). The pyruvate dehydrogenase complex: Life's essential, vulnerable and druggable energy homeostat. *Mitochondrion*, 70, 59–102. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.02.007>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Sugimoto, Y., Ohta, Y., Morikawa, T., Yamashita, T., Yoshida, M., & Tamaoki, B.-I. (1990). In vitro metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*). *Journal of Steroid Biochemistry*, 35(2), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(90\)90284-Y](https://doi.org/10.1016/0022-4731(90)90284-Y)
- Tzagoloff, A. (1971). Assembly of the Mitochondrial Membrane System. *Journal of Biological Chemistry*, 246(9), 3050–3056. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62289-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62289-6)
- Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L., & Perjési, P. (2023). Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*, 28(3), 1447. <https://doi.org/10.3390/molecules28031447>
- Walzel, B., Speer, O., Boehm, E., Kristiansen, S., Chan, S., Clarke, K., Magyar, J. P., Richter, E. A., & Wallimann, T. (2002). New creatine transporter assay and identification of distinct creatine transporter isoforms in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(2), E390–E401. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00428.2001>
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123:309–14.
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E., & Peck, V. M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 19(6), 1159–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02461.x>
- World Health Organization. (1990). *Health and Safety Guide No. 47, Atrazine: health and safety guide*.
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>

ANEXOS

Quadro A1. Resultados da análise de variância (modelo – “ANOVA I”)

Parâmetro	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
Proteínas	Entre grupos	0,067	5,00	0,01	3,57	0,10
	No interior dos grupos	0,000	0,00			
	Total	0,067	5,00			
DW	Entre grupos	57,129	5,00	11,43	2,40	0,10
	No interior dos grupos	57,060	12,00	4,76		
	Total	114,189	17,00			
ALP	Entre grupos	82,965	5,00	16,59	12,05	0,00
	No interior dos grupos	16,530	12,00	1,38		
	Total	99,495	17,00			
DW	Entre grupos	57,129	5,00	11,43	2,40	0,10
	No interior dos grupos	57,060	12,00	4,76		
	Total	114,189	17,00			
GSH	Entre grupos	678,011	5,00	135,60	3,00	0,03
	No interior dos grupos	1084,736	24,00	45,20		
	Total	1762,747	29,00			
GSSG	Entre grupos	333,659	5,00	66,73	6,12	0,00
	No interior dos grupos	261,891	24,00	10,91		
	Total	595,550	29,00			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,071	5,00	0,01	6,89	0,01
	No interior dos grupos	0,000	0,00			
	Total	0,071	5,00			

Parâmetro	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
GSH+GSSG	Entre grupos	175,646	5,00	35,13	7,54	0,01
	No interior dos grupos	0,000	0,00			
	Total	175,646	5,00			
ROS	Entre grupos	941,823	5,00	188,36	27,41	0,00
	No interior dos grupos	164,956	24,00	6,87		
	Total	1106,778	29,00			
CTTsob	Entre grupos	8,792	5,00	1,76	44,12	0,00
	No interior dos grupos	0,478	12,00	0,04		
	Total	9,271	17,00			
CTTsed	Entre grupos	7,689	5,00	1,54	108,24	0,00
	No interior dos grupos	0,170	12,00	0,01		
	Total	7,860	17,00			
GR	Entre grupos	6460,845	5,00	1292,17	32,85	0,00
	No interior dos grupos	471,970	12,00	39,33		
	Total	6932,815	17,00			
G6PD	Entre grupos	146,132	5,00	29,23	12,00	0,00
	No interior dos grupos	29,231	12,00	2,44		
	Total	175,363	17,00			
PK	Entre grupos	21,484	5,00	4,30	6,45	0,00
	No interior dos grupos	7,991	12,00	0,67		
	Total	29,475	17,00			
CS	Entre grupos	169,361	5,00	33,87	7,32	0,00
	No interior dos grupos	55,565	12,00	4,63		
	Total	224,926	17,00			
SDH	Entre grupos	526,877	5,00	105,38	5,99	0,01

Parâmetro	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
	No interior dos grupos	210,985	12,00	17,58		
	Total	737,862	17,00			
NDE1	Entre grupos	214,699	5,00	42,94	20,84	0,00
	No interior dos grupos	24,731	12,00	2,06		
	Total	239,431	17,00			
PDC	Entre grupos	37,419	5,00	7,48	8,34	0,00
	No interior dos grupos	12,565	14,00	0,90		
	Total	49,984	19,00			