



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Diurão: resposta por sistemas
antioxidantes e energéticos de
*Saccharomyces cerevisiae***

Hugo Miguel Pio Tenda

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2013

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Diurão: resposta por sistemas
antioxidantes e energéticos de
*Saccharomyces cerevisiae***

Hugo Miguel Pio Tenda

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2013

Índice

Índice	I
Índice de Figuras	III
Índice de Quadros	IV
Agradecimentos	V
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	VI
Resumo	IX
Diuron: antioxidant and energetic systems response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	XI
Abstract	XI
1. Fundamento Teórico	1
1.1. Produtos fitofarmacêuticos.....	1
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em estudos de stress	8
1.3. Stress oxidativo e resposta antioxidante	11
2. Problema e Objetivos	23
2.1. Problema	23
2.2. Objetivo geral	24
2.3. Objetivos específicos.....	24
3. Metodologia	27
3.1. Estratégia	27
3.2. Diagrama do trabalho	30
3.3. Procedimento experimental	32
3.3.1. Cultura celular	32
3.3.2. Fracionamento celular e preparação de amostras.....	32
3.3.3. Quantificação de GSH e GSSG	33
3.3.4. Quantificação de ROS	34
3.3.5. Quantificação de MDA	34
3.3.6. Quantificação de Proteína	35
3.3.7. Determinação da atividade glutatióno redutase.....	36
3.3.8. Determinação da atividade glutatióno peroxidase	37
3.3.9. Determinação da atividade catalase	37
3.3.10. Determinação da atividade glucose-6-P desidrogenase	38
3.3.11. Determinação da atividade ascorbato peroxidase.....	39
3.3.12. Determinação da atividade fosfatase alcalina.....	39
3.3.13. Determinação da atividade γ -glutamil transferase	40
3.3.14. Obtenção do extrato enriquecido em lípidos e ergosterol	41
3.3.14.1. Ergosterol	41
3.3.14.2. Triacilgliceróis.....	42
3.3.14.3. Fosfolípidos	43
3.4. Equipamento	44
3.5. Reagentes.....	44
4. Resultados/discussão dos resultados	47
4.1. Resposta ao diurão por marcadores de crescimento e sobrevivência celular:.....	47

4.2.	Resposta ao diurão por sistemas antioxidantes e de excreção:	52
4.3.	Resposta ao diurão por marcadores lipídicos:	61
5.	Conclusões	65
	Referências Bibliográficas	67
	ANEXO	77

Índice de Figuras

Figura 1.1. Evolução da prática agrícola nas últimas décadas.....	2
Figura 1.2. Representação estrutural do diurão.....	3
Figura 1.3. Modo de ação do Diurão sobre as plantas.....	4
Figura 1.4. Mecanismo de ação do diurão na cadeia transportadora de eletrões mitocondrial.....	7
Figura 1.5. Cadeia transportadora de eletrões do retículo endoplasmático.....	8
Figura 1.6. Perfil de Crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 1.7. Fontes de ROS.....	13
Figura 1.8. Interação ascorbato-ciclo do glutatióno.....	18
Figura 1.9. Reação catalisada pelo enzima GPx.....	19
Figura 1.10. Reação catalisada pelo enzima GR.....	20
Figura 1.11 Reação catalisada pelo enzima glucose-6-P desidrogenase.....	20
Figura 1.12 Transporte transmembranar do glutatióno auxiliado pelo enzima γ -GT.....	21
Figura 4.1. Representação gráfica do peso seco de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	48
Figura 4.2. Representação gráfica do conteúdo em lípidos totais de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	48
Figura 4.3. Representação gráfica do conteúdo em proteína total de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	49
Figura 4.4. Representação gráfica do conteúdo em glutatióno total (A) e GSH+GSSG do sobrenadante (B) e sedimento (C) pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	50
Figura 4.5. Representação gráfica da atividade enzimática ALP no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	50
Figura 4.6. Representação gráfica de cfu de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	51
Figura 4.7. Representação gráfica do teor em GSH (A) e GSSG (B) do sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	52
Figura 4.8. Representação gráfica da razão GSH/GSSG do sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	53
Figura 4.9. Representação gráfica do teor em ROS do sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	53
Figura 4.10. Representação gráfica do teor em GSH do sedimento pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	54
Figura 4.11. Representação gráfica do teor em GSSG do sedimento pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	54
Figura 4.12. Representação gráfica da razão GSH/GSSG (A) e do teor em ROS (B) do sedimento pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	55
Figura 4.13. Representação gráfica do teor em MDA de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	56
Figura 4.14. Representação gráfica da atividade enzimática GR no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	57
Figura 4.15. Representação gráfica da atividade enzimática GPx no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	58
Figura 4.16. Representação gráfica da atividade enzimática G6PD d no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	58
Figura 4.17. Representação gráfica das atividades enzimáticas CAT T (A) e CAT A (B) no sobrenadante e sedimento pós-12000 g, respetivamente, de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	59
Figura 4.18. Representação gráfica da atividade enzimática APX d no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	60
Figura 4.19. Representação gráfica da atividade enzimática γ -GT no sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	60
Figura 4.20. Representação gráfica do teor em Fosfolípidos de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	61

Figura 4.21. Representação gráfica do teor em Triacilgliceróis de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	62
Figura 4.22. Representação gráfica do teor em Ergosterol de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	63
Figura A1. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH.	79
Figura A2. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG.	79
Figura A3. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS.....	79
Figura A4. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA.	80
Figura A5. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas.....	80
Figura A6. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEPD ₇₅ (B).	81
Figura A7. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GPx de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEP ₀ (B).	81
Figura A8. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CAT T de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEP ₇₅ (B).	82
Figura A9. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CAT A de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YED ₀ (B).	83
Figura A10. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YED ₇₅ (B).	83
Figura A11. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática APX de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEPD ₇₅ (B).	84
Figura A12. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEP ₀ (B).	85
Figura A13. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática γ -GT de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD ₀ (A) e YEP ₇₅ (B).	85
Figura A14. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Ergosterol.....	86
Figura A15. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Triacilglicerol.....	86
Figura A16. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Fosfolípidos.....	86

Índice de Quadros

Quadro 4.1. Representação da proporção relativa dos componentes maioritários do extrato lipídico.....	63
Quadro A1. Resultados da análise de variância (modelo – “ANOVA I”).....	87

Agradecimentos

Chegado ao fim de mais uma etapa da minha vida, é indispensável agradecer a todos os que me ajudaram a ultrapassá-la, dando-me forças para continuar a caminhar sempre em frente em direção à finalização deste objetivo. Agradeço aos meus orientadores de estágio Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Ferreira pela disponibilidade prestada e pelo conhecimento transmitido no decorrer destes últimos anos e em particular neste projeto, e que me permitiu crescer tanto a nível intelectual como prático.

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

Agradeço à Rita Nunes pela paciência inesgotável que tem para comigo e que ajudou a que esta etapa académica fosse finalizada com sucesso, ajudando não só na pesquisa e finalização de inúmeros trabalhos como a nível pessoal, com todo o apoio e dedicação demonstrados, que fizeram com que estes últimos 2 anos de muito trabalho fossem mais fáceis de ultrapassar e que no fim, olhando para trás, me aperceba que valeram a pena.

Chega agora a vez de agradecer à minha família, nomeadamente os meus pais Manuel Tenda e Maria do Céu Pio aos quais devo, mais uma vez, a possibilidade de continuação dos meus estudos. Agradeço-lhes também todo o apoio prestado desde sempre. Agradeço também ao meu irmão Filipe Tenda e aos meus avós Cristóvão, Natividade e Clara por todo o apoio prestado e que em conjunto com os meus pais formam a equipa que me apoia desde sempre, dando toda a ajuda possível.

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

$\cdot\text{O}_2^-$	Radical anião superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigénio singuleto
3,4-DCA	3,4-dicloroanilina
ADP	Difosfato de adenosina
ALP	Fosfatase alcalina (E.C. 3.1.3.1)
APx	Ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11)
AsA	Ascorbato
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina do soro bovino
CAT A	Catalase A (EC 1.11.1.6)
CAT T	Catalase T (EC 1.11.1.6)
cfu	Unidades formadoras de colónias, do inglês colony forming units
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
Cys	Aminoácido cisteína
DCFH	Diclorofluoresceína
DHA	Desidroascorbato
DHAR	Desidroascorbato redutase (E.C. 1.8.5.1)
Diurão	<i>N</i> -(3,4-diclorofenil)- <i>N,N</i> -dimetil-ureia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAD^+	Dinucleótido de flavina e adenina (forma oxidada)
FADH_2	Dinucleótido de flavina e adenina (forma reduzida)
Fe	Ferro
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GPx	Glutationo peroxidase dependente do selénio (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.6.4.2)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>Generally Regarded As Safe</i> (FDA, USA)
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutatióno
H^+	Protão

H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HO [•]	Radical hidroxilo
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry
LOO [•]	Radical Lipoperoxilo
LOOH	Lipoperoxido
MDA	Malonodialdeído
MDHA	Monodesidroascorbato
MDHAR	Monodesidroascorbato redutase (E.C. 1.6.5.4)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mn	Manganês
N	Azoto
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
O ₂	dioxigénio
O ₃	Ozono
OPT	o-fetaldeído
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> - Nitrofenilfosfato
POP	Poluentes orgânicos persistentes
Q _A	Quinona A
Q _B	Quinona B
RO [•]	Radical alcóxido
ROO [•]	Radical peróxido
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SDS	Duodecilsulfato de sódio
SH	Sulfidrilo
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BHP	t-butil hidroperóxido

TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UE	União Europeia
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinol
UV	Ultravioleta
YED	Extrato de levedura com glucose, do inglês Yeast Extract Dextrose
YEP	Extrato de levedura com peptona, do inglês Yeast Extract Peptone
YEPD	Extrato de levedura com peptona e glucose, do inglês Yeast Extract Peptone Dextrose
γ -GT	γ -glutamilttransferase (EC 2.3.2.2)

Resumo

O esclarecimento dos mecanismos de ação do diurão em eucariotas constitui uma prioridade em toxicologia ambiental, por esta fenilureia ser um poluente orgânico persistente. Deste modo, o alvo principal deste estudo foi avaliar como a carência em nutrientes e a exposição ao diurão influenciam o crescimento, resposta energética e antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃. O diurão (75 μM) mostrou-se tóxico para *S. cerevisiae* UE-ME₃, pelo decréscimo da biomassa produzida por leveduras crescidas em meios com glucose como fonte de carbono, em 200 min de ensaio, embora na fase final da exposição se observe uma resposta proliferativa à fenilureia, com o aumento da sobrevivência celular e das atividades fosfatase alcalina, glutathione redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase, catalase T e A e ascorbato peroxidase, bem como do conteúdo em fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol de leveduras em fase fermentativa, onde a resposta antioxidante parece ser um contribuinte vital.

Diuron: antioxidant and energetic systems response of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The finding of toxic mechanisms of diuron in eukaryotes is a priority in environmental toxicology, because this phenylurea is a persistent organic pollutant. Thus, the aim of this study was to evaluate how nutrients starvation and diuron exposure influence growth, energy and antioxidant response of *S. cerevisiae* UE-ME₃. The results show that diuron (75 mM) was toxic to *S. cerevisiae* UE-ME₃, decreasing biomass production by yeast grown using glucose as carbon source, during 200 min of assay, although in the final phase of diuron exposure it was observed a proliferative response to phenylurea, with an increased of cell survival and alkaline phosphatase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, catalase T and A, and ascorbate peroxidase enzyme activities, as well as in phospholipids, triacylglycerols, and ergosterol contents of fermentative yeasts, whose antioxidant response appears to be critical.

1. Fundamento Teórico

1.1. Produtos fitofarmacêuticos

Ao longo da história, muitos foram os períodos em que alterações sociais definiram novas fronteiras que contribuíram para esboçar a sociedade atual. Esses períodos conturbados da história mundial conferiram a muitos países condições favoráveis para a expansão populacional que gerou novas necessidades em alimentos e em outros recursos essenciais. As necessidades alimentares até à II Guerra mundial eram parcialmente supridas por uma agricultura sustentável, de rotação entre várias espécies vegetais num determinado local, praticada por grupos de pessoas, muitas vezes pertencentes à mesma família, que constituíam um “agroecossistema” que permitia a manutenção dos níveis de nutrientes do solo e favorecia o controlo natural de pragas (Altieri, 1998). Porém, nos últimos 50 a 60 anos ocorreu nos países desenvolvidos uma revolução da agricultura que procurou dar resposta à enorme necessidade alimentar derivada pela explosão demográfica mundial. Desde então, passou a dar-se maior atenção e incentivo às monoculturas, que consistem em culturas, muitas vezes de centenas de hectares onde é cultivada uma única variedade vegetal. Para além disso, as plantas cultivadas passaram a ser escolhidas de acordo com características que favorecem uma maior fonte de receitas monetárias, tais como, o tamanho dos frutos, sabor, ou outra característica procurada no mercado. Porém, na grande maioria dos casos, as espécies com essas características apresentam elevada vulnerabilidade a predadores naturais, doenças e, para além disso, necessitam de uma ampla variedade e grande quantidade de nutrientes que o solo não consegue fornecer, nem as plantas têm a capacidade de sintetizar, o que leva a condições de esgotamento dos solos, como o esgotamento de recursos em azoto (N), levando à destruição da fauna microbiana do solo, muitas vezes essencial à vida das plantas, ao mesmo tempo que estimula a propagação de pragas (Altieri, 1998; Parfitt, 2010).



Figura 1.1. Evolução da prática agrícola nas últimas décadas (adaptado de (Altieri, 1998).

A vulnerabilidade das monoculturas levou a que os agricultores se vissem obrigados a recorrer às “maravilhas” da química, passando a depender dos fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos, entre os quais se destacam os herbicidas como produtos muito utilizados. Todavia, a vida não é estática e imutável. Tal fato levou a que os seres vivos alvo dos herbicidas adquirissem, via seleção natural, mecanismos de desintoxicação que lhe conferiram novas capacidades para constituírem uma ameaça às culturas objeto da proteção. Esta “evolução” das ameaças às culturas tem determinado o recurso a novos produtos fitofarmacêuticos logo que o agricultor observa que o herbicida ou o regulador de pragas aplicado deixa de proteger uma determinada cultura. As empresas envolvidas no desenvolvimento desses materiais tiram partido da enorme evolução da síntese química do pós-guerra que tem permitido a criação de inúmeros princípios ativos e de inúmeras conjugações desses princípios ativos com diversos adjuvantes, criando uma grande diversidade de formulações, que tornam o mercado dos produtos fitofarmacêuticos extremamente dinâmico e gerador de receitas milionárias (Altieri, 1998; Braconi, 2008).

As tentativas de preservar as plantações têm levado ao abuso da aplicação de herbicidas e de outros produtos fitofarmacêuticos. Ao serem utilizados em excesso e/ou de forma contínua, estes compostos atingem os solos onde são facilmente lixiviados pela água da chuva e da rega, atingindo cursos de água superficiais, bem como aquíferos que facilitam a sua disseminação ambiental, absorção e acumulação progressiva pelos vários níveis tróficos de diversas cadeias alimentares. Este fato permite a exposição dos seres humanos a níveis de xenobióticos muito superiores aos aplicados nas culturas e potencialmente mais perigosos. Para além disso, devido à globalização, mesmo os países com normas bem definidas quanto

ao uso de determinados compostos, estão a eles expostos devido à importação de produtos provenientes de países onde o seu uso não está sujeito a legislação proibitiva, ou então essa legislação permite uma utilização mais ampla do que a europeia (Altieri, 1998; Braconi, 2008).

A classe de herbicidas denominada fenilureia é composta por inúmeros compostos utilizados para controlar infestantes, tanto em culturas agrícolas como em pavimentos urbanos, tintas, entre outros. As moléculas que integram este grupo, como o linurão, isoproturão e o composto utilizado neste estudo, o diurão, possuem em comum os grupos fenilo e ureia, que lhes confere propriedades semelhantes e que são responsáveis pela sua atividade herbicida. Estas moléculas diferem entre si na potência da sua ação e na facilidade de acesso ao alvo, que depende dos seus grupos substituintes que variam nas diferentes fenilureias (Mattina, 1991; Giacomazzi, 2004; Sørensen, 2008; Can, 2013)

O diurão, ou *N*-(3,4-diclorofenil)-*N*, *N*-dimetil-ureia, nome IUPAC, é utilizado como princípio ativo de diversos herbicidas e por isso encerra um enorme potencial de estudo, de forma a perceber o seu impacto quando aplicado em culturas agrícolas. É uma molécula pertencente à família das fenilamidas e à subclasse das fenilureias (Giacomazzi, 2004; Sørensen, 2008).

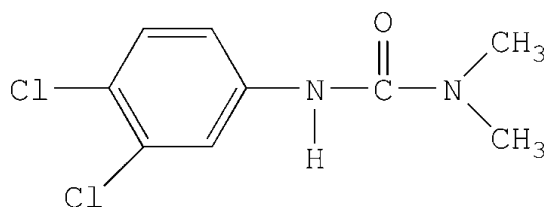


Figura 1.2. Representação estrutural do diurão (*N*'-(3,4-diclorofenil)-*N*,*N*-dimetil-ureia) (adaptado de Merck, 1996).

A sua utilidade enquanto agente herbicida advém da capacidade que possui de bloquear a transferência de eletrões ao nível da cadeia de transporte de eletrões do fotossistema II dos organismos fotossintéticos. Esta molécula é capaz de se ligar à quinona B (Q_B), na proteína D_1 pertencente ao complexo do fotossistema II dos cloroplastos, presentes nas membranas dos tilacóides, impedindo a transferência de eletrões entre a quinona A (Q_A) e a Q_B , bloqueando desta forma o fluxo de eletrões. Ao impedir a transferência eletrónica, impede a conversão de energia radiante em energia química sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP) e equivalentes redutores como o NADPH, bem como a fixação do dióxido de carbono (CO_2), conduzindo à morte celular e conseqüentemente à morte dos organismos nos quais o diurão é aplicado (Giacomazzi, 2004; Moncada, 2004; Sørensen, 2008; Romero, 2010).

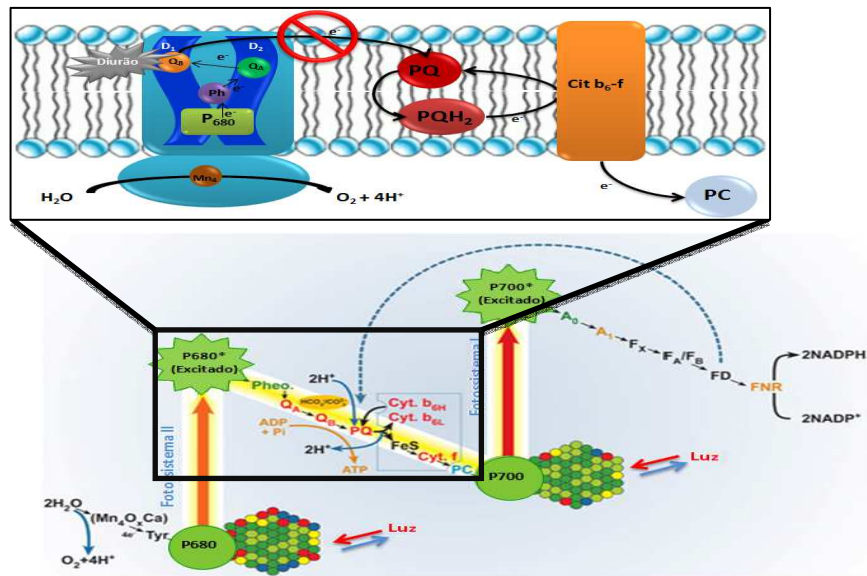


Figura 1.3. Modo de ação do diurão sobre as plantas (adaptado de Quintas, 2008 e Najafpour, 2012).

Para além da falência dos organismos por carência de energia e fonte de carbono, o diurão é ainda responsável por diversos danos celulares, tais como impedir a célula de reoxidar a Q_A , levando à formação de clorofila num estado tripleto, que ao interagir com o dióxigénio (O_2) conduz à formação da molécula de oxigénio singuleto (1O_2). Esta última molécula é capaz de remover prótons a lípidos insaturados levando à formação de radicais lipídicos que iniciam assim a peroxidação lipídica conduzindo a graves danos celulares tais como a rutura de membranas, levando à morte celular (Giacomazzi, 2004; Moncada, 2004; Romero, 2010).

As capacidades desta molécula para a exterminação de seres fotossintéticos levou a que fosse amplamente utilizada no controlo de uma enorme variedade de infestantes, tanto de folha anual, como perene e também de gramíneas e musgos. Devido à vasta gama de infestantes afetada pelo diurão, o uso deste estende-se a plantações, tais como a de cana-de-açúcar, algodão e frutícolas, entre outras. Além disso, o diurão também é utilizado na eliminação de infestantes em pavimentos urbanos, estradas e caminhos de ferro. Apesar da utilização do diurão estar restringida na União Europeia (UE) por ser considerado uma substância perigosa prioritária, continua a ser utilizado em estradas e tintas antivegetativas, dentro de parâmetros controlados. Esses parâmetros são regulados por diretivas da UE que estabelecem como valor seguro, uma média anual de $0,2 \mu\text{g/L}$ e como valor máximo aceitável $1,8 \mu\text{g/L}$ (Giacomazzi, 2004; Sørensen, 2008).

Os valores atrás referidos podem por vezes ser ultrapassados em aplicações acidentais que conduzam à libertação de diurão em excesso para o ambiente. Como se trata de um

composto cuja degradação é difícil, e cuja persistência em determinados meios é elevada, existe a possibilidade dos níveis de diurão atingirem valores superiores a 1,8 µg/L, como em águas Japonesas onde foram encontrados níveis de diurão de 3,05 µg/L. Por outro lado, esta fenilureia também se vai acumulando ao longo dos diferentes níveis tróficos das cadeias alimentares, uma vez que a maioria dos organismos não possui a capacidade de degradar o diurão. É devido a este fato que muitos estudos toxicológicos envolvendo o diurão e os seus efeitos envolvem a administração de níveis de exposição deste fitofármaco cerca de mil vezes superior àquelas que podem ser encontradas na natureza, numa tentativa de simular os efeitos da sua acumulação pelos organismos, onde pode atingir valores muito superiores aos aplicados na natureza. Podem ser utilizados como exemplos os estudos realizados com leveduras, onde *Saccharomyces cerevisiae* contataram com o diurão numa concentração de 200 mg/L, ou outro onde se determinou um valor de EC₅₀ para 30 min de exposição ao diurão de 11,6 mg/L do fitofármaco (Conner, 1983; Giacomazzi, 2004; Estève, 2009; Balakrishnan, 2012). Como o diurão possui elevada afinidade para a matéria orgânica, a elevada propensão para a lixiviação deve-se muitas vezes à sua fraca afinidade por solos pobres em matéria orgânica. Outra característica que facilita a ampla migração desta molécula, é o seu longo tempo de meia vida de hidrólise, que permite o seu transporte por longos períodos de tempo, para locais distantes daquele onde a fenilureia foi aplicada. Para além disso, a sua degradação por elementos físicos como a radiação UV, ou pela ação de microrganismos, leva à formação de derivados do diurão, como a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) que muitas vezes possuem toxicidade e persistência ambiental superior ao diurão, induzindo eles próprios elevado impacte ambiental desta molécula (Giacomazzi, 2004; Sørensen, 2008).

O diurão é também uma molécula de baixa volatilidade, que persiste entre um mês e um ano no solo, fato que também o torna um alvo forte dos processos de lixiviação, e contribui para a elevada distribuição e contaminação das áreas circundantes aos locais de aplicação desta fenilureia. Além disso, existe forte probabilidade de ao atingir cursos de água e contaminar aquíferos subterrâneos, ser absorvido por uma vasta variedade de plantas e animais que o bioacumulam e expõem a espécie humana, no topo de uma cadeia alimentar, a níveis extremamente elevados e prejudiciais para a saúde (Giacomazzi, 2004; Moncada, 2004; Sørensen, 2008).

No ser humano, é absorvido pelo trato gastrointestinal e pelo sistema respiratório, sendo metabolizado, em poucas horas, através de reações de hidroxilação e *N*-desalquilação, com posterior excreção pela urina. Noutros animais, onde foi possível realizar estudos de exposição ao fitofármaco, foi possível observar que os efeitos do diurão passam pela perda de

peso (transmitida à descendência no caso dos ratos), anomalias no sangue, fígado e baço. Em quantidades elevadas esta fenilureia possui ainda, em algumas espécies, efeitos teratogênicos que conduzem a atrasos na formação óssea e a malformações como costelas onduladas (Giacomazzi, 2004).

Quanto às propriedades físico-químicas, o diurão apresenta-se, na sua forma pura, como um sólido cristalino incolor, não iônico e com moderada solubilidade em água (42 mg.L⁻¹ a 20 °C) e massa molar de 231,1 g/mol. Esta molécula é sólida à temperatura ambiente, possuindo um ponto de fusão entre 158 e 159 °C e uma pressão de vapor de 0,009 mPa a 25 °C. O seu valor da constante de Henri é 0,000051 Pa.m³.mol⁻¹, tornando-o num agente com muito baixa volatilidade, tanto em água como no solo, o que torna insignificante a sua dispersão aérea do local de aplicação para outros locais. Como referido anteriormente, possui um longo tempo de hidrólise, podendo-se considerar que apresenta hidrólise praticamente nula a pH neutro, característica que aumenta em soluções fortemente ácidas ou alcalinas, com formação de derivados como a 3,4-DCA. Possui um coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) baixo ou moderado ($K_{ow}= 2,6$) e constante de partição solo-fração orgânica de 485, o que justifica a sua elevada afinidade para solos com elevado teor orgânico (Giacomazzi, 2004; Romero, 2010).

É certo que os animais, bactérias e outros organismos não possuem fotossistemas, porém, mesmo nesses seres o diurão provoca danos, que em certos casos pode originar graves problemas e até mesmo a morte. Admite-se que nesses casos o diurão atua ao nível das cadeias transportadoras de eletrões presentes nas células desses organismos, como a cadeia respiratória. O diurão ao desregular o normal fluxo de eletrões ao nível dos locais de fosforilação do ADP a ATP conduz à deficiente redução do dioxigénio a água e à libertação do radical anião superóxido como subproduto. Um dos modelos propostos para a formação desta espécie radicalar refere o papel da ubiquinona no transporte de eletrões até ao dioxigénio. A UQ, é uma molécula da famílias das quinonas referidas anteriormente nas plantas que ao aceitar eletrões reduz-se a ubiquinol, molécula capaz de transferir eletrões ao citocromo c e assim garantir o fluxo de eletrões ao longo da membrana. Tal como o diurão interfere com as quinonas das plantas, também poderá interferir com a UQ, levando à formação de um radical ubiquinol que culminará na incompleta redução do O₂ e formação do [•]O₂⁻ (Quintas, 2008; Bleier, 2013).

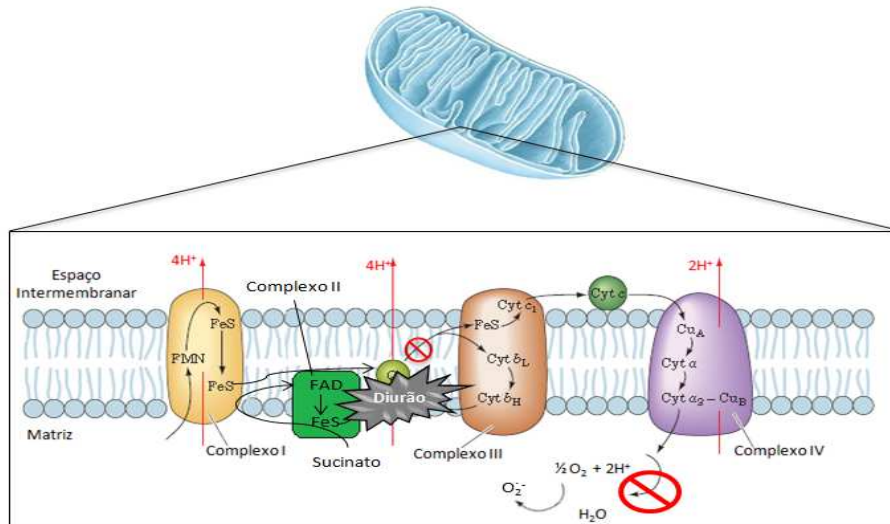


Figura 1.4. Mecanismo de ação do diurão na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (adaptado de Voet, 2008).

Desta forma, a fenilureia em estudo pode ser um potencial gerador de ROS, capaz de provocar danos celulares, muitas vezes irremediáveis e que conduzem à morte celular.

As membranas celulares constituem sensores extremamente sensíveis às alterações intra e extracelulares, adaptando a sua estrutura e fluidez de acordo com essas mesmas alterações. Estas estruturas são constituídas maioritariamente por fosfolípidos que para além de constituírem a estrutura base das membranas, têm muitas outras funções como a de atuarem como mensageiros celulares, despoletando uma série de cascatas metabólicas que auxiliam na alteração do metabolismo celular para fazer face às constantes alterações do meio (Vance, 1990; Quintas, 2008).

É no retículo endoplasmático, mais propriamente na membrana desta estrutura que ocorre parte do anabolismo lipídico e de esteróis, uma vez que é nesse local que se encontram os enzimas responsáveis por alguns passos essenciais da modificação de resíduos acilo e também da biossíntese de triacilgliceróis, fosfolípidos e esteróis de membrana, para serem utilizados quando necessários, tanto na disponibilização de energia, como na integração de outras vias metabólicas (Vance, 1990; Quintas, 2008).

Os triacilgliceróis e o ergosterol quando em excesso no citoplasma celular, podem ser armazenados em complexos macromoleculares denominados *lipid droplets*, constituídos por um núcleo hidrófobo de ésteres de ergosterol, delimitado por uma monocamada de fosfolípidos. Inicialmente admitia-se que estas estruturas serviam apenas como depósitos lipídicos, uma vez que permaneciam como reservas lipídicas até serem mobilizadas para disponibilização energética ou biossíntese de fosfolípidos de membrana. Contudo mostram-se

cada vez mais como essenciais na manutenção da homeostase lipídica celular. Existem porém indícios de que estas estruturas também armazenam temporariamente proteínas e são o local de formação de determinados mensageiros celulares como alguns diacilgliceróis e o ácido fosfatídico, gerados pelo catabolismo dos triacilgliceróis estando envolvidos em inúmeros processos de sinalização celular (Kurat, 2006; Fujimoto, 2008).

Desta forma, alterações no funcionamento do retículo endoplasmático, como as que podem ser provocadas pelo diurão, conduzem à desregulação do metabolismo lipídico e esteroídico e causar danos celulares. À semelhança do que foi descrito para a membrana interna mitocondrial, a membrana do retículo endoplasmático possui uma cadeia transportadora de elétrons que culmina na ativação de insaturases, responsáveis pela adição de ligações duplas em resíduos acilo, estruturas onde o diurão pode atuar, promovendo alterações deletérias no metabolismo energético e estrutural da célula. (Vance, 1990; Quintas, 2008; Martin, 2007).

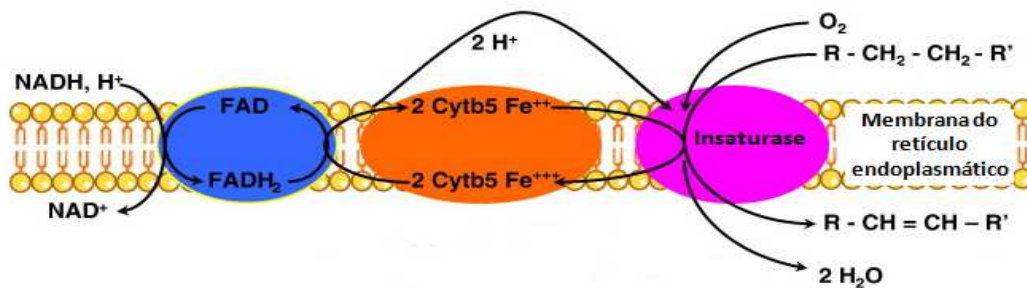


Figura 1.5. Cadeia transportadora de elétrons do retículo endoplasmático (adaptado de Martin, 2007)

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* em estudos de stress

Os estudos sobre stress oxidativo visam a descoberta e/ou elucidação dos diversos mecanismos inerentes ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente desequilíbrio do ambiente celular. Todas essas alterações conduzem a reprogramação fisiológica e estão por detrás de inúmeras patologias como o cancro que muitas vezes conduzem à morte do organismo.

Apesar destes estudos visarem a obtenção de conhecimento para aplicação de novas terapias e/ou alterações comportamentais e ambientais nos organismos superiores como o ser humano, não é viável nem eticamente aceitável que os estudos sejam desenvolvidos com estes seres, pelo menos em fases iniciais dos mesmos estudos. Surge assim a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo unicelular que, devido ao fato de ser uma célula

eucariota possui um elevado grau de homologia com as células dos organismos superiores o que torna os resultados obtidos neste modelo biológico fiavelmente extrapoláveis para outros organismos como o ser humano (correlação de cerca de 70 % em relação ao Homem) (Maris, 2001; Danesi, 2006; Marcolin, 2008).

Este organismo, foi amplamente estudado nas últimas décadas, tendo sido elucidados diversos aspetos do seu metabolismo e fisiologia, sendo que o seu genoma se encontra completamente sequenciado. Todas as descobertas relativas a esta levedura demonstraram que se trata de um organismo de segura manipulação (GRAS), ou seja, sem riscos para o utilizador. Este aspeto é reforçado com o fato deste organismo estar fortemente associado ao ser humano há milhares de anos, constituindo o fermento biológico utilizado na fermentação de bebidas alcoólicas e no fabrico de alimentos como o pão, elementos pertencentes à dieta humana desde há 6000 anos. Além da sua segurança, a *S. cerevisiae* apresenta ainda inúmeras características que a tornam uma ótima opção como modelo biológico em inúmeros estudos entre os quais a sua elevada taxa de replicação e fácil estabelecimento das condições ótimas de crescimento, que permite a obtenção de uma elevada quantidade de material de estudo em pouco tempo. Trata-se de um organismo aeróbio facultativo que utiliza tanto a via anaeróbia, na qual realiza fermentação alcoólica de hexoses como a glucose para obtenção de energia, como, quando na presença de dioxigénio, um metabolismo oxidativo de álcoois ou outros substratos orgânicos, característico da respiração aeróbia (Maris, 2001; Danesi, 2006; Marcolin, 2008; Ortuño, 2012).

Estas células possuem um perfil de crescimento semelhante ao das bactérias, mas com algumas variações. Quando transferidas para um novo meio de cultura descontínuo permanecem numa fase letárgica de adaptação (fase lag) depois da qual iniciam um processo de replicação a uma taxa elevada (fase exponencial) com a formação de uma nova geração a cada 90 min, obtendo a energia através da fermentação alcoólica da fonte de carbono do meio, preferencialmente glucose. Mesmo em condições aeróbias, quando na presença de níveis de glucose entre 0.5 e 1 g.L⁻¹, este organismo desenvolve um metabolismo respiratório-fermentativo. Quando os níveis de glucose atingem valores inferiores a 0,2 %, dá-se uma depressão catabólica (transição diáuxica) na qual o crescimento da cultura fica estagnado, enquanto as células ativam mecanismos necessários para a alteração do metabolismo para a via aeróbia. Após esta fase de transição metabólica, as leveduras retomam a replicação celular mas numa taxa mais lenta que a anterior (fase pós diáuxica). Nesta fase, as células utilizam a glucose remanescente, o etanol e o glicerol formados no período fermentativo para obtenção de energia sendo que são necessárias 3 a 4 h para a formação de nova geração. Quando as

fontes de carbono se esgotam, a cultura celular cessa a divisão acelerada e adapta-se às condições de carência nutritiva, entrando numa fase estacionária, na qual o número de células formadas e o número de células que morrem é semelhante, o que faz com que a população se mantenha constante, até que os produtos do metabolismo celular se comecem a acumular no meio de cultura e o número de células que morrem se torne superior ao número de células formadas e a cultura entra numa fase de declínio (Maris, 2001; Danesi, 2006; Marcolin, 2008; Ochoa-Estopier, 2011). Nesse caso de ausência de glucose, são ativados mecanismos energéticos aeróbios, como referido anteriormente, que passam por exemplo pelo aumento da função mitocondrial, mais propriamente uma ativação da cadeia respiratória que induz um aumento dos erros inerentes a este processo e devido ao aumento da produção de ROS. Estes processos tornam as células de *S. cerevisiae* mais suscetíveis aos danos oxidativos, alterando não só as moléculas presentes na célula no momento da ação das ROS mas provocando também alterações ao nível do metabolismo do DNA, mais propriamente da tradução e transcrição, conduzindo a alterações que passam pela modificação do ciclo celular que conduz a uma diminuição ou até mesmo paragem da replicação celular com alteração do metabolismo no sentido de aumentar a longevidade da célula. Este e outros processos de ausência de fonte nutritiva atuam então como agentes indutores de stress (Gimeno, 1992; Lin, 2004).

Outra fonte nutritiva cuja privação funciona como indutora de stress é a peptona, fonte de azoto por excelência de *S. cerevisiae* que pode desencadear muitas alterações celulares. O azoto é um elemento essencial para o metabolismo celular, constituindo grande parte das moléculas base dos principais grupos de biomoléculas da célula, como os aminoácidos das proteínas e as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos e deste modo é um elemento químico fundamental para a existência da vida tal como a conhecemos. Em casos de ausência de fonte de azoto, como no caso da peptona, as alterações celulares ocorrem maioritariamente ao nível da transcrição, induzindo ou reprimindo a cópia de determinados genes para mRNA, de forma a adaptar o metabolismo celular às novas condições. Tal como referido para a falta de glucose, também a carência de azoto conduz a alterações do ciclo celular, existindo estudos que demonstram que na ausência de fontes de azoto ocorre a indução de meiose e esporulação com o objetivo de tentar proteger as células da falta de azoto e/ou glucose, ao mesmo tempo que tentam disseminar esses esporos por uma área mais vasta de forma a encontrar melhores condições de crescimento (Cunningham, 1991; Park, 1996).



Figura 1.6. Perfil de crescimento de *S. cerevisiae* (adaptado de Marcolin, 2008)

Devido ao fato de se tratar de um organismo aeróbio facultativo a *S. cerevisiae* possui sistemas de defesa antioxidantes de forma a conseguirem minimizar os efeitos negativos que advêm do contato com o dióxigênio. Diversos estudos demonstraram que estas leveduras possuem diversos enzimas antioxidantes e envolvidos no metabolismo energético celular com um elevado grau de semelhança com os homólogos humanos como os isoenzimas CAT A e CAT T ou o enzima SOD_{CuZn} . Esta semelhança nos sistemas antioxidantes permite uma elevada fiabilidade na extrapolação dos resultados obtidos para os humanos, constituindo outro ponto vantajoso para a utilização deste modelo biológico em detrimento de seres mais complexos, permitindo o avanço de diversos estudos sem a interferência dos problemas éticos e legais da experimentação animal. Todos estes fatores levam a uma elevada utilização destes organismos em estudos de stress oxidativo quer seja para observação das alterações celulares em diferentes concentrações de O_2 , quer em estudos relacionados com o impacte de diversos xenobióticos como o herbicida em foco neste trabalho e a carência nutritiva (Braconi, 2008; Marcolin, 2008, Rowe, 2008; Carmona, 2012; Fujiwara, 2013).

1.3. Stress oxidativo e resposta antioxidante

O oxigénio é um elemento químico essencial para a vida, nomeadamente na sua forma diatómica. A molécula de dióxigênio surgiu no planeta que habitamos em quantidades significativas devido a alguns organismos fotossintéticos anóxicos ancestrais das cianobactérias terem adquirido mecanismos capazes de libertar o dióxigênio a partir da molécula de água. O grande passo evolutivo deu-se quando esses organismos desenvolveram

estruturas capazes de armazenar um potencial oxidante que fosse capaz de oxidar a molécula de água. Essas estruturas que denominamos por clorofila, são constituídas pelo núcleo protoporfirínico IX, complexado com o metal de transição manganês (Mn) como acontece no fotossistema II das plantas (Blankenship, 1998; Blankenship, 2001).

A oxidação da água a dioxigénio possui um potencial de redução médio (E_m') de +0,82 V. Os fotossistemas, nomeadamente o fotossistema II das plantas têm a capacidade para armazenar a energia proveniente dos fotões da energia radiante no átomo de Mn que adquire um potencial de oxidação superior a 1 V, suficiente para oxidar a água a O_2 (Blankenship, 1998; Blankenship, 2001).

O aumento de dioxigénio na atmosfera desencadeou um vasto número de mudanças, que alteraram a vida no planeta terra, levando à formação da camada de ozono (O_3) que permitiu aos organismos colonizar todo o planeta e a alterações que permitiram a evolução de organismos simples para organismos mais complexos. Porém, apesar da molécula de dioxigénio ser estável, devido à particularidade de possuir dois eletrões desemparelhados com o mesmo estado de *spin* em orbitais π^* e contrariar o princípio de exclusão de Pauli, o seu aumento trouxe inúmeros riscos para os seres vivos (Halliwell, 1984; Turrens, 2003). Mesmo tratando-se de uma molécula estável, o dioxigénio pode dar origem a inúmeras espécies químicas (ROS) capazes de causar danos nos organismos vivos. Existem fatores físicos, como a radiação, ou químicos como os produtos fitofarmacêuticos e iões metálicos que ao interatuar com a molécula de dioxigénio, despoletam a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). As ROS, são estruturas químicas instáveis que possuem na sua composição átomos de oxigénio capazes de reagir com constituintes celulares, oxidando-os, alterando a sua estrutura e inviabilizando o seu papel biológico. As ROS compreendem espécies radicalares, como o $\cdot O_2^-$, que apesar de por si não constituir um perigo direto, leva à formação de outras ROS mais reativas como o radical hidroxilo ($HO\cdot$), alcóxido ($RO\cdot$) e peróxido ($ROO\cdot$). Compreendem ainda espécies não radicalares como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Alguma destas estruturas, como o H_2O_2 difundem-se facilmente pelos diferentes compartimentos celulares, devido à sua semelhança estrutural com a molécula de água, podendo no decorrer do processo gerar espécies químicas ainda mais deletérias para a célula (Halliwell, 1984; Barreiros, 2006; Vasconcelos, 2007; Rowe, 2008; Franco, 2009; Fransen, 2012).

A formação de ROS não depende apenas da ação de agentes externos sobre os organismos vivos, pois também ocorrem como subprodutos do metabolismo celular. Uma das fontes endógenas de ROS é, como referido anteriormente, a cadeia de transporte de eletrões do mitocôndrio, onde uma redução deficiente do O_2 a H_2O leva à formação do $\cdot O_2^-$. Outras

fontes endógenas de ROS são os peroxissomas ou o retículo endoplasmático. Por outro lado, a formação endógena de ROS pode acontecer de forma independente do metabolismo celular. Em muitos desses casos, a sua formação decorre em presença de metais de transição como o Fe, via reações de Fenton (Turrens, 2003; Barreiros, 2006; Buonocore, 2010).

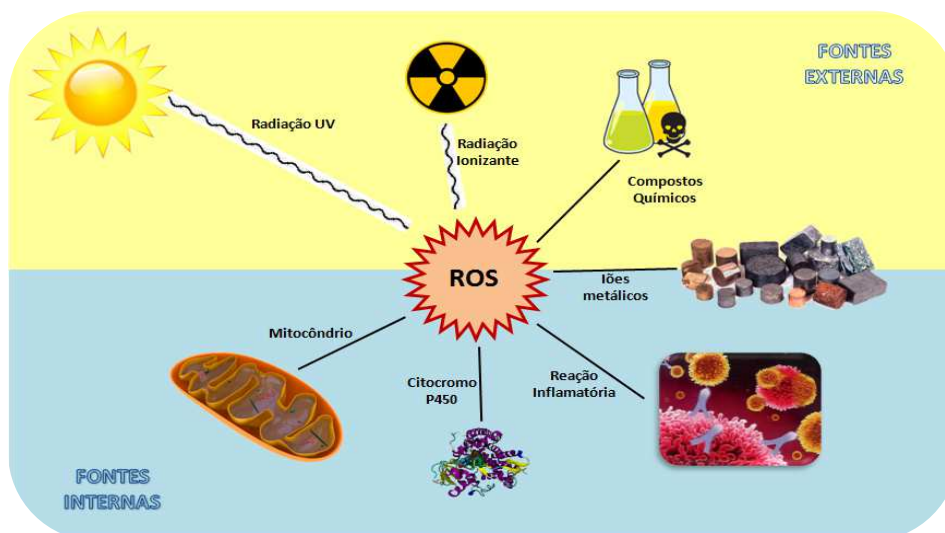


Figura 1.7. Fontes de ROS (adaptado de Buonocore, 2010).

Os danos celulares das ROS manifestam-se maioritariamente sobre alvos moleculares como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos. No caso dos ácidos nucleicos como o DNA, algumas ROS como o HO[•] são capazes de remover prótons à desoxirribose, levando à quebra da estrutura do ácido nucleico e à formação de moléculas como a 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina ou 8-ciclo-2'-desoxiguanosina. No caso das bases azotadas, o radical hidroxilo, atua como agente eletrófilo, insaturando-as com formação de novos radicais livres. Estas modificações originam mutações que interferem com o fluxo normal da informação génica (Barreiros, 2006; Rowe, 2008).

No caso das proteínas, as alterações provocadas pelas ROS podem ocorrer devido à remoção de prótons, como referido atrás para os ácidos nucleicos, mas também por adição de moléculas radicalares. As ROS atacam maioritariamente as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos constituintes das proteínas, sendo os mais vulneráveis a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, que se oxidam ao reagir com as ROS e dão origem a novos radicais que participam na formação de ligações cruzadas que modificam a estrutura e função proteica. No decorrer deste processo podem também ocorrer clivagens de cadeias dos resíduos afetados, com formação de aldeídos e cetonas que por sua vez podem ainda propagar os danos às moléculas adjacentes. Este tipo de modificações levam à desregulação dos processos de transporte membranar e de outros eventos celulares mediados por proteínas,

podendo em certos casos levar à morte celular devido a falência completa do controlo do metabolismo se os danos incidirem sobre enzimas ou inviabilizarem a ativação de mecanismos de defesa e controlo do ciclo celular que impossibilitem a indução da apoptose. Nesse caso a morte por necrose será predominante, estendendo-se os danos às células vizinhas com aumento do raio de propagação. Este tipo de lesões encontra-se muitas vezes associado a patologias como a falência renal e/ou pulmonar crónica e o síndrome de Alzheimer (Donne, 2003; Barreiros, 2006; Acquaviva, 2009)

Relativamente aos lípidos, os danos despoletados pelas ROS também podem conduzir a danos extensos e graves. Um dos casos mais documentados é o ataque por parte do radical hidroxilo. Esta ROS fortemente tóxica tem a capacidade de reagir com grupos metilo alílicos dos resíduos acilo, removendo-lhes um protão com a formação de um radical lipídico e uma molécula de água, o iniciador da peroxidação lipídica. Este grupo radicalar, na presença da molécula de O₂ vai conduzir à formação de um radical lipoperoxilo (LOO[•]), ao longo da denominada fase de propagação da peroxidação lipídica. Esse radical peroxilo de reatividade considerável, é capaz de reagir com moléculas vizinhas, removendo-lhes um protão e levar à formação de um lipoperóxido (LOOH) e de um novo radical lipídico enquanto decorre a denominada fase de terminação da peroxidação lipídica. Os lipoperóxidos podem ainda sofrer outros passos reacionais, conduzindo à formação de aldeídos como o malonodialdeído (MDA) e de outras moléculas, algumas delas com propriedades genotóxicas, capazes de reagir com os ácidos nucleicos e aminoácidos e de propagar os danos inicialmente lipídicos a outras classes de moléculas. Os danos lipídicos constituem, tal como os de outras biomoléculas, um grande risco para a sobrevivência celular. Estas biomoléculas desempenham papéis de grande importância na constituição da membrana celular, pelo que a peroxidação lipídica, que possui um potencial elevado para se propagar em cadeia a partir de uma molécula às seguintes, pode levar à rutura da estrutura celular causando a morte da célula e espalhando o seu conteúdo na vizinhança, perturbando as células adjacentes. Os resíduos de ácidos gordos polinsaturados são mais vulneráveis ao ataque pelas ROS, devido à presença de carbonos metilénicos *bis*-alílicos (Jezek, 2005; Barreiros, 2006; Franco, 2009).

Os danos referidos anteriormente, bem como a geração de ROS são muitas vezes controlados por diversos mecanismos celulares. Esses mecanismos compreendem diversas moléculas, entre elas, as vitaminas, como o ascorbato (Vitamina C) e o α -tocoferol (Vitamina E), ou tióis não proteicos como o glutathione (GSH). Estas moléculas, quando ingeridas na dieta ou produzidas endogenamente têm a capacidade de reagir com as ROS, tornando-as inócuas para as células e organismos. Porém, muitos destes agentes antioxidantes existem nos

organismos em níveis baixos e muitas vezes não conseguem fazer face á quantidade de ROS gerada. Nesses casos entram em ação outro tipo de agentes antioxidantes, os enzimas. Estas moléculas, na sua maioria proteínas são responsáveis pelo controlo de reações enzimáticas que conduzem à aniquilação das ROS. São moléculas produzidas endogenamente e passíveis de regulação transcricional, aumentando ou diminuindo a sua produção consoante os níveis de ROS. Essa regulação deve-se à capacidade que as ROS têm de, consoante a sua concentração, agirem como ativadores ou inibidores de fatores de transcrição que levam à regulação génica da síntese dos enzimas envolvidos no combate às ROS. Porém, existem casos em que a produção de ROS excede as capacidades antioxidantes das células, ocorrendo uma inversão do ambiente celular, que em condições normais é maioritariamente redutor e torna-se num ambiente oxidante, sinónimo de stress oxidativo. No caso de os danos serem pouco extensos, a célula é capaz de despoletar os mecanismos que conduzem à morte por apoptose, porém em casos de stress mais acentuado, esses mecanismos não são ativados e ocorre a morte por necrose, fenómeno que por vezes está por detrás de patologias como o cancro (Barreiros, 2006; Schrade, 2006; Rowe, 2008; Navrot, 2011; Prosser, 2013).

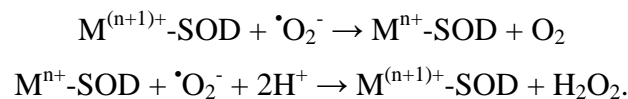
Grande parte dos processos descritos anteriormente estão sujeitos a regulação da expressão génica que controla o metabolismo celular. Um desses enzimas é conhecido como fosfatase alcalina (ALP), uma proteína responsável pela quebra de ligações monofosfoéster, envolvida na disponibilização de energia que assiste ao metabolismo celular. A expressão genética deste enzima é regulada de forma diferencial, ou seja, os seus níveis de transcrição e tradução ao longo do tempo variam de acordo com as necessidades energéticas da célula e a fase do ciclo celular, tornando o ALP um bom marcador de proliferação celular (Souvannavong, 1995; Koksharov, 2013; Liu, 2013; Liu, 2013).

A célula mobiliza energia para desempenhar funções celulares como a génese de novas membranas, metabolização de nutrientes, diferenciação e/ou replicação celular, processos onde o enzima ALP desempenha um papel crucial. Em situações de stress oxidativo ou de morte celular por apoptose essa necessidade energética torna-se equivalente, ou superior aquela que é requerida na replicação, uma vez que se torna necessário repor moléculas afetadas pelas ROS, biossintetizar proteínas e outro tipo de moléculas antioxidantes. No caso da apoptose, necessita ainda de biossintetizar todas as moléculas necessárias para assistir às alterações celulares que permitem a formação de corpos apoptóticos (Onishi, 1979; Souvannavong, 1995).

O aumento dos níveis de ROS celular desencadeia diversos mecanismos para as converter em moléculas inócuas, como já foi referido anteriormente. Numa fase inicial entra

em ação o *pool* de moléculas de baixo peso molecular com características antioxidantes inúmeras anteriormente. Porém, como essas moléculas encontram-se disponíveis em pequena quantidade, o crescente aumento de espécies reativas de oxigénio despoleta defesas enzimáticas parcialmente envolvidas no consumo de ROS, mas também na reposição dos níveis de estado estacionário dos antioxidantes não enzimáticos (Schrader, 2006; Navrot, 2011).

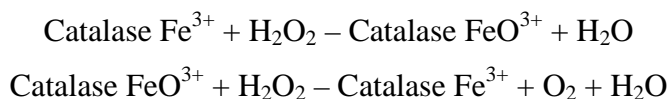
Como já foi referido, o radical $\cdot\text{O}_2^-$ é uma das ROS produzidas em maior quantidade na célula, que se comporta como precursora de outras ROS, com reatividade mais elevada para as biomoléculas. A desintoxicação desta espécie reativa envolve a ação dos enzimas superóxido dismutase (SOD), uma família de metaloproteínas subdividida em três grupos de acordo com o metal que constitui o seu centro ativo. As diferentes isoformas exercem a sua ação em diferentes compartimentos celulares: por exemplo, o isoenzima SOD_{Mn} que possui no seu centro ativo um átomo de manganês atua no mitocôndrio, enquanto que o isoenzima $\text{SOD}_{\text{Cu,Zn}}$ exerce a sua atividade ao nível do citoplasma. São os iões metálicos, que constituem o centro ativo da proteína, os responsáveis pela reação de dismutação, ou seja, uma reação em que um elemento, neste caso o ião metálico da proteína, é alternadamente oxidado e reduzido. Genericamente, a reação catalisada por este enzima pode ser apresentada segundo as seguintes equações onde M representa o ião ou iões metálicos do centro ativo do enzima:



A reação de dismutação anteriormente referida também ocorre de forma espontânea, porém dá-se de forma bastante lenta, motivo que coloca este enzima na frente de resposta à propagação de espécies oxidativas. Contudo o peróxido de hidrogénio, seu produto da reação não é inócuo para a célula, tratando-se de uma molécula com elevada mobilidade entre compartimentos celulares e capaz de originar outras ROS mais deletérias para a célula. Desta forma torna-se de especial importância a existência de outros sistemas enzimáticos capazes de dar continuidade à tarefa iniciada pelo SOD (McCord, 1969; Tainer, 1983; Turrens, 2003).

A prevenção de danos pelo H_2O_2 , levou a célula a desenvolver mecanismos complementares de defesa enzimática como os enzimas catalase, hemoproteínas que exibem uma estrutura quaternária com subunidades de cerca de 60 KDa, envolvidas na dismutação do H_2O_2 em dióxigénio e água. Em procariotas existem também isoenzimas catalase cujo centro ativo possui manganês no centro ativo, em vez de ferro. Tal como referido para o enzima SOD, é o ião metálico, neste caso o ferro, que ao reagir com o H_2O_2 é alternadamente oxidado

e reduzido, dando origem aos produtos da reação referidos anteriormente (Maté, 1999; Turrens, 2003; Schrader, 2006; Nicholls, 2012; Cantemir, 2013; Shi, 2013):



Existem várias isoformas deste enzima em diferentes compartimentos celulares que, por vezes estão envolvidos na manutenção dos níveis de peróxido de hidrogénio moduladores de vias de sinalização celular. Neste trabalho, foram estudadas duas isoformas do catalase (A e T) de *Saccharomyces cerevisiae*. O isoenzima catalase A constitui o principal sistema de defesa antioxidante do peroxissoma, pelo que a transcrição e consequente tradução do gene que codifica este enzima é ativada sempre que ocorre um aumento da proliferação dos peroxissomas, para fazer face às necessidades energéticas, uma vez que, no caso da *S. cerevisiae*, é nesta estrutura sub-celular que ocorre a β -oxidação lipídica. Este aumento de expressão do enzima catalase A deve-se ao fato destas reações de oxidação conduzirem à formação de ROS, como o H_2O_2 , que é posteriormente convertido em produtos inócuos para a célula pelo CAT A que muitas vezes em situações de stress oxidativo, a expressão e atividade do enzima aumenta mais do que os restantes isoenzimas catalase, como o catalase T citoplasmático (Maté, 1999; Zhao, 2006).

Tal como referido anteriormente para o enzima catalase existem outros enzimas responsáveis pela defesa contra o stress oxidativo, como o caso do enzima ascorbato peroxidase, também responsável pela eliminação do H_2O_2 , fazendo-o à custa da oxidação de moléculas de ascorbato. Apesar da reação entre o peróxido de hidrogénio e o ascorbato ocorrer espontaneamente, é muito lenta, pelo que a ação do ascorbato peroxidase é essencial para fazer face às exigências anti oxidativas das células. Trata-se de uma hemoproteína com uma estrutura em forma de anel, indispensável à catálise de reações de transferência de eletrões do ascorbato para o peróxido de hidrogénio, reduzindo-o a água. Os eletrões provenientes de duas moléculas de ascorbato são em primeiro lugar transferidos para o enzima e deste posteriormente transferidos para o H_2O_2 formando-se H_2O . A transferência de eletrões do ascorbato para o enzima dá origem a dois radicais monodesidroascorbato, um deles formado por transferência de um eletrão por parte da primeira molécula de ascorbato e o segundo por transferência de um eletrão por parte da segunda molécula de ascorbato. Estes dois radicais reagem depois entre si originando uma molécula de ascorbato e outra de desidroascorbato que é reduzida a ascorbato através de uma reação catalisada pelo enzima desidroascorbato redutase, que utiliza o glutationato para reduzir a molécula de desidroascorbato. Esse glutationato oxidado é posteriormente reduzido pelo enzima glutationato

redutase. Os radicais de monodesidroascorbato podem também ser reduzidos a ascorbato pela reação catalisada pelo enzima monodesidroascorbato redutase, que obtém o poder redutor a partir do NADPH (Bønsager, 2010; Rosa, 2010).

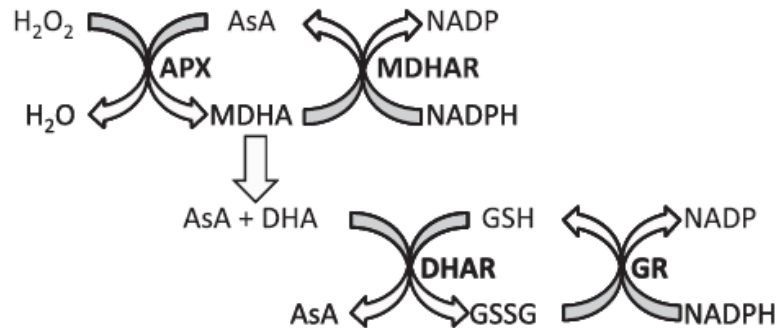


Figura 1.8. Interação ascorbato-ciclo do glutatióno (adaptado de Bønsager, 2010).

Para além dos enzimas atrás referidos, existem outros que se destacam na resposta ao stress oxidativo. É neste contexto que surge uma molécula de extrema importância que se mostra muito eficaz no consumo de ROS, quer na forma livre, quer associada a proteínas. Essa molécula é o tripéptido glutatióno (GSH) ou γ -L-glutamyl-L-cisteinilglycine, principal reserva de tióis não proteicos da célula. É o grupo sulfidrílico (-SH) do resíduo de cisteína que confere as propriedades antioxidantes, pois possui caráter nucleófilo que reage facilmente com moléculas eletrófilas como as ROS, reduzindo-as ao mesmo tempo que se oxida a dissulfureto de glutatióno (GSSG). O GSH existe nas células de mamíferos em concentrações no intervalo de 1-10 mM, sendo que a razão GSH/GSSG é um bom indicador do potencial redox da célula. Este processo de redução das ROS por parte do GSH ocorre naturalmente, mas como referido anteriormente, o processo torna-se mais eficiente e mais rápido na presença de enzimas. No caso do glutatióno, são vários os enzimas que com ele interatuam de forma a manter a homeostase celular (Pastore, 2003; Deponete, 2012)

O enzima glutatióno peroxidase é uma peroxidase, responsável pela redução de peróxidos como o peróxido de hidrogénio e lipoperóxidos. Do ponto de vista estrutural é uma selenoproteína, com selénio no seu centro ativo que se encontra ligado a um resíduo de cisteína, responsável pelas suas propriedades antioxidantes. A catálise segue um mecanismo de ping-pong, com formação inicial de um anião de selénio por desprotonação, um forte nucleófilo formado a partir da selenocisteína e que reage facilmente com os peróxidos da sua vizinhança, convertendo-se no ácido selénico, ao mesmo tempo que reduz o peróxido de hidrogénio ou lipoperóxidos a água ou álcool correspondente. Após este passo de oxidação, o ácido selénico instável, reage com uma primeira molécula de GSH que o reduz, libertando

uma molécula de água. Segue-se um terceiro passo de redução onde uma segunda molécula de GSH é oxidada, para dar origem ao GSSG utilizando a primeira molécula de GSH, que se liberta do enzima para ficar disponível para nova reação (Pastore, 2003; Schrader, 2006; Deponte, 2012; Morais, 2013).

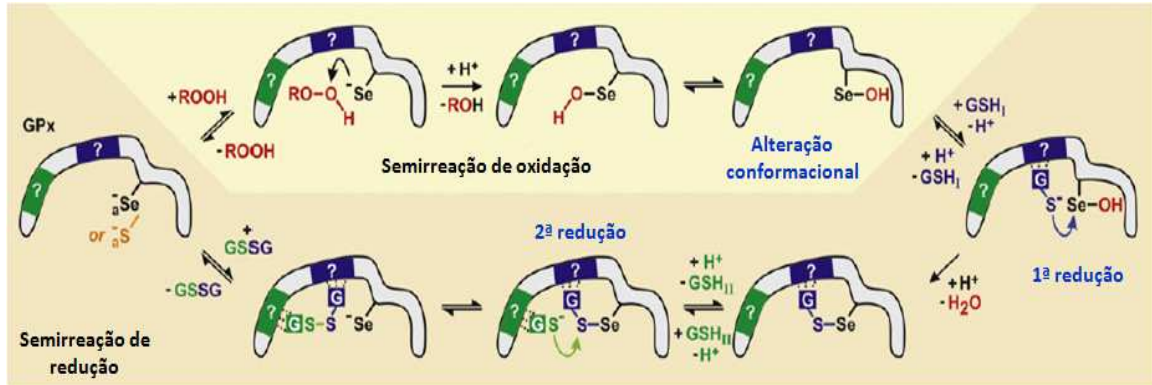


Figura 1.9. Reação catalisada pelo enzima GPx (adaptado de Deponte, 2012).

O GSH é, como referido anteriormente, uma molécula de extrema importância na manutenção do ambiente redox celular, atuando na sua forma livre como defesa primária contra espécies oxidativas e como linha de defesa secundária, quando aliado à atividade de diversos enzimas. Para além disso, o seu papel antioxidante impede a ocorrência de diversas alterações em constituintes celulares como o DNA e lípidos, evitando dessa forma diversas patologias como neoplasias. A manutenção dos níveis de glutationato é pois de extrema importância para fazer face às necessidades antioxidantes da célula. O enzima glutationato redutase é o grande responsável pela reciclagem e manutenção dos níveis intracelulares de GSH (Pastore, 2003; Tanaka, 2012). O enzima GR catalisa a reação de redução do GSSG a GSH segundo uma cinética ping-pong. Este enzima possui locais de reconhecimento para o NADPH e para o GSSG em posições geometricamente opostas, com uma molécula de FAD a estabelecer a ligação entre esses dois locais de reconhecimento dos dois substratos, bem como cistinas responsáveis pela transferência de equivalentes redutores entre esses três locais. O NADPH ao ligar-se ao enzima, é oxidado a NADP⁺, transferindo o seu poder redutor pelas cistinas para a molécula de FAD e reduzindo-a a FADH⁻. Posteriormente a molécula de GSSG liga-se ao GR e recebe o poder redutor do FADH⁻ para o utilizar na redução do GSSG, quebrando a ligação dissulfureto e conduzindo à formação sucessiva de dois aniões GS⁻ que após protonação pelo enzima originam duas moléculas de GSH (Meister, 1988; Rakauskien, 1988; Arias, 2010; Kim, 2010; Tanaka, 2012).

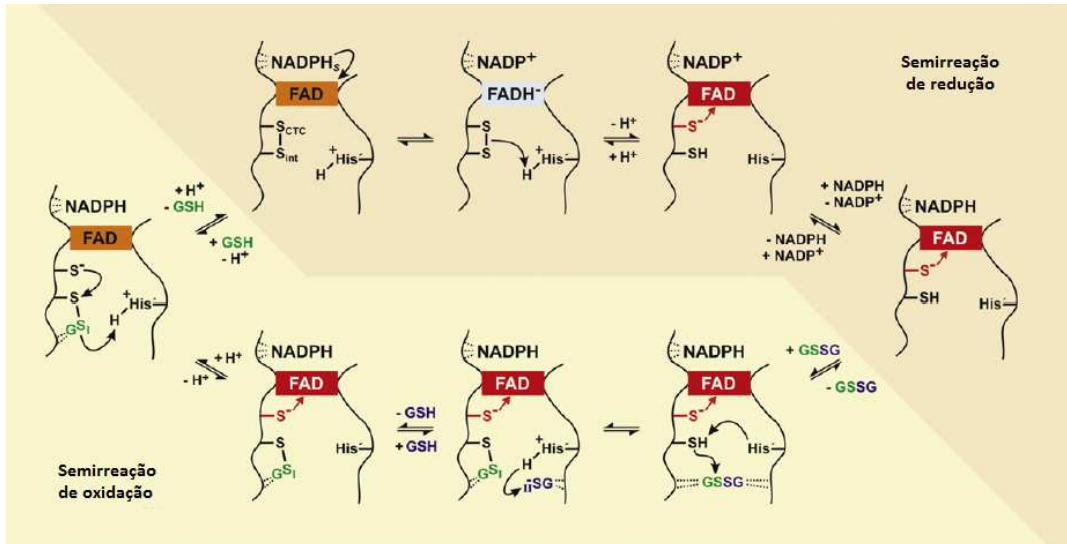


Figura 1.10. Reação catalisada pelo enzima GR (adaptado de Deponte, 2012).

Tal como o glutationo necessita de ser regenerado, para que as células consigam manter a sua capacidade de defesa antioxidante, também o NADP⁺ necessita de ser novamente reduzido a NADPH de forma a manter em funcionamento o ciclo redox do glutationo. Torna-se então vital a ação de um enzima, o glucose-6-fosfato desidrogenase, ou, o enzima regulador da via das pentoses fosfato. Este enzima, é uma oxidorredutase que catalisa a reação que converte a glucose-6-fosfato em 6-fosfoglucono- δ -lactona ao mesmo tempo que reduz o NADP⁺ a NADPH. Como é o enzima regulador da via das pentoses fosfato, torna-se um enzima chave na produção de ribulose-5-P, precursor da biossíntese de nucleótidos, sendo por isso um ponto-chave na reposição dos ácidos nucleicos da célula, úteis na reparação de danos oxidativos. Este enzima é de extrema importância, não só pelo seu papel na biossíntese de ácidos nucleicos, mas também como regenerador do NADPH utilizado no combate ao stress oxidativo e na biossíntese de lípidos, situação que tal como no caso dos ácidos nucleicos pode ser fundamental na substituição de moléculas oxidadas por ROS (Beutler, 1994; Danesi, 2006; Lopes, 2007; Méndez, 2011)

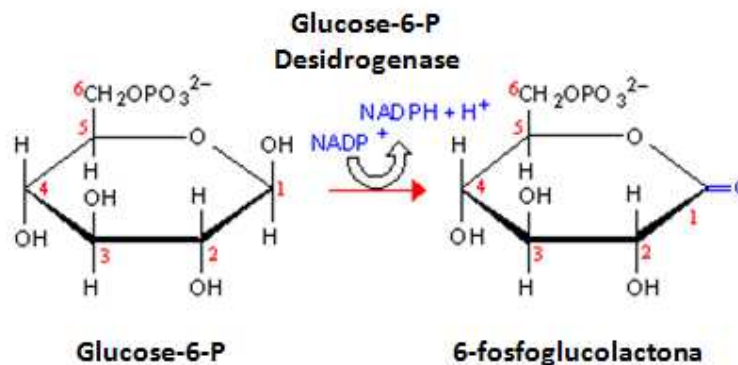


Figura 1.11 Reação catalisada pelo enzima glucose-6-P desidrogenase (adaptado de Quintas, 2008).

O enzima γ -glutamilttransferase, ou γ -GT, de localização transmembranar encontra-se envolvido no ciclo do γ -glutamato e está fortemente relacionada com o glutathione, ao assistir à biossíntese do tripéptido e assim contribuir para a manutenção dos seus níveis celulares (Garcion, 1996; Ristoff, 1998).

O γ -GT corta a ligação γ -Glu-CysGly permitindo a transferência do resíduo glutamato através do tonoplasto onde se forma de novo o glutathione, via ciclo do γ -glutamato. Facilita assim o transporte do glutathione entre tecidos, disponibilizando-o para os locais onde é necessário para manter o saudável ambiente redutor da célula. Por outro lado, a clivagem da ligação peptídica entre o carbono gama do resíduo glutamato e o azoto alfa do resíduo cisteína do glutathione é também de extrema importância pois permite que conjugados do glutathione consigam atravessar o tonoplasto para o vacúolo, em processos de excreção de xenobióticos (Hussein, 1996; Hanigan, 1998; Ristoff, 1998; Castellano, 2010; Priora, 2010).

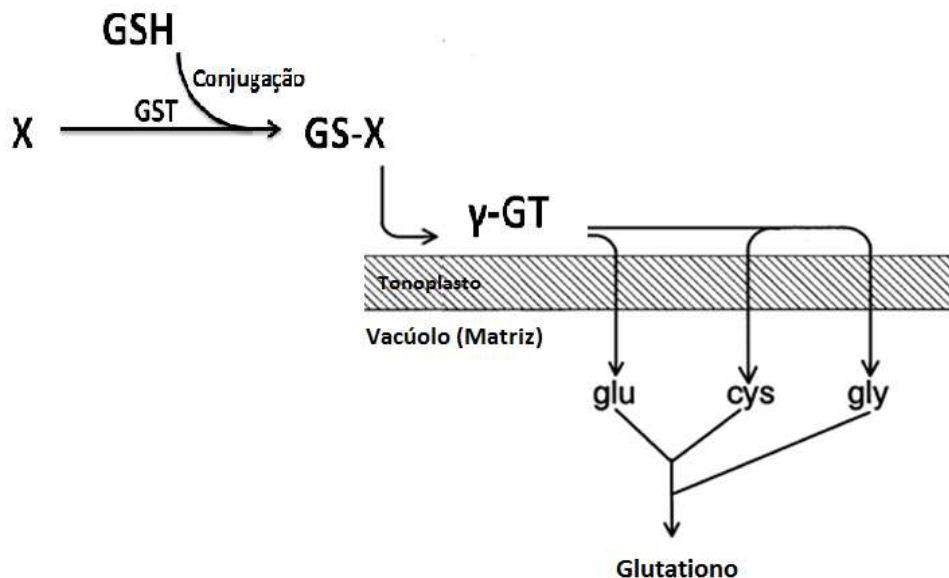


Figura 1.12 Transporte transmembranar do glutathione auxiliado pelo enzima γ -GT (adaptado de Hanigan, 1998).

2. Problema e Objetivos

2.1. Problema

O avanço da síntese química no séc. XX, despoletou a descoberta de novos compostos, na sua maioria com o objetivo de melhorar as condições de vida da população humana. Entre eles destaca-se o diurão, pertencente à classe das fenilureias amplamente utilizado no controlo de infestantes, tanto em culturas agrícolas como em meios urbanos. A sua capacidade herbicida advém do fato de impedir a transferência de equivalentes redutores resultantes da hidrólise da água, impedindo dessa forma a conversão de energia radiante em energia química, conduzindo à morte das plantas.

Como se trata de um composto persistente no ambiente, entra facilmente em contato com outros seres vivos, atingindo o homem com concentrações por vezes muito mais elevadas do que aquelas em que foi aplicado, podendo desencadear inúmeras patologias resultantes de um eventual bloqueio de cadeias transportadoras de eletrões às quais o diurão pode ligar-se.

Pelo exposto, urge avaliar a capacidade do diurão para afetar a sobrevivência de organismos eucariotas, sendo frequentemente utilizada e recomendada a *S. cerevisiae* como modelo biológico adequado a esse tipo de aproximações. Por esse motivo utilizou-se neste estudo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, um organismo GRAS, que dispõe de sistemas antioxidantes e energéticos com elevada homologia com os congêneres humanos, um potente substituinte da experimentação animal recomendada pela política dos 3R.

À semelhança com os animais superiores, o ambiente celular da *S. cerevisiae* é também regulado por estímulos externos, sendo conhecidos diversos agentes químicos capazes de induzir alterações ambientais que podem despoletar condições de stress oxidativo com alteração do usual ambiente redutor celular. Para além do diurão, a escassez de determinados nutrientes como a fonte de azoto ou determinada fonte de carbono como a peptona ou a glucose, respetivamente, testados neste trabalho podem ainda ser responsabilizados por criar condições de stress. Assim, tanto o diurão como a restrição de nutrientes podem conduzir à formação de ROS, por interferência no transporte eletrónico, com deficiente redução do O₂ a H₂O, ou devido a alterações do metabolismo celular, como ocorre na presença de glucose como fonte maioritária de carbono, onde as células se encontram maioritariamente fermentativas, ou na ausência de glucose onde o metabolismo celular se torna predominantemente respiratório.

Pelo que a deteção de flutuações nos níveis de ROS, do conteúdo em tióis não proteicos ou do ciclo do glutatono implicado na sua homeostase, bem como outras atividades antioxidantes primárias ou acopladas ao ciclo do glutatono é relevante no esclarecimento dos mecanismos moleculares de resposta a fitofármacos como as fenilureias. O acompanhar da evolução de vias implicadas na excreção de xenobióticos por conjugação com o glutatono, onde o enzima γ -GT é frequentemente utilizado como bom marcador de vias de excreção é também essencial na caraterização da resposta eucariota a agentes exógenos.

Por outro lado, a possibilidade de quantificar danos celulares, como por exemplo os que resultam da peroxidação lipídica, bem como da funcionalidade membranar, são muito úteis na estimativa das consequências do despoletar de stress oxidativo. Deste modo, a determinação dos níveis de MDA, dos conteúdos em fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol, bem como da atividade ALP, moduladora de vias de sinal, são úteis para descobrir alterações metabólicas e das funções de membrana que são cruciais na identificação de respostas proliferativas.

2.2. Objetivo geral

H0: O diurão não perturba o crescimento, a resposta antioxidante e o metabolismo energético de leveduras do género *Saccharomyces* crescidas em diferentes meios de cultura.

2.3. Objetivos específicos

Conhecer e compreender:

- A curva de crescimento de *S. cerevisiae* na presença e ausência de diurão em meios rico e restritivos;
- A resposta antioxidante de *S. cerevisiae* ao diurão;
- Alterações ao metabolismo energético de *S. cerevisiae* na presença de diurão.

Dar valor:

- Fase de crescimento de exposição ao diurão;
- Qualidade de curvas de calibração;
- Qualidade de curvas de reação para diferentes atividades enzimáticas;
- Alterações de conteúdos e atividades enzimáticas por restrição de fonte de carbono ou azoto, na presença e ausência de diurão;
- Aos modelos de análise estatística.

Aplicar:

- Outras fases de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃;
- A outros meios de cultura;
- A outros eucariotas;
- Ao esclarecimento de mecanismos de toxicidade do diurão;
- À redefinição dos níveis de circulação ambiental do fitofármaco;
- À regulamentação da sua aplicação na indústria agrícola.

3. Metodologia

3.1. Estratégia

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

Local de realização: Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora.

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

Duração: 1 ano letivo.

Modelo Biológico: *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, estirpe isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo e depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora, gentilmente cedida pelo Enólogo Paulo Lauriano. Esta estirpe tem sido utilizada, desde há algum tempo, no Laboratório de Bioquímica Analítica em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias em condições de crescimento restritivas (Rosado, 2009; Ferreira, 2006).

Agente de stress: Diurão.

Ensaio: Leveduras colhidas na fase exponencial média e inoculadas em meio rico YEPD e meios restritivos YEP, sem glucose e YED, sem peptona, na ausência e na presença de diurão, deixadas crescer durante 200 min.

Resultados obtidos ao longo da cultura: Acompanhamento da cultura pela turbidez a 640nm.

Resultados obtidos no final da cultura: Determinação do peso seco e cfu.

Frações sub-celulares selecionadas:

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

Extratos selecionados:

- Lipídico e esteroídico.

Parâmetros analisados nas frações sub-celulares selecionadas:

- Conteúdo em proteínas do sobrenadante e sedimento pós-12000 g;
- Malonodialdeído do sobrenadante pós-12000 g;
- Espécies reativas de oxigênio (ROS) do sobrenadante e sedimento pós-12000 g;
- Glutationo (GSH) do sobrenadante e sedimento pós-12000 g;
- Dissulfureto de glutaciono (GSSG) do sobrenadante e sedimento pós-12000 g;
- Glutationo redutase (GR);
- Glutationo peroxidase (GPx);
- Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD);
- Catalase citoplasmática (CAT T);
- Catalase peroxissomal (CAT A);
- γ -glutamilttransferase (γ -GT);
- Ascorbato Peroxidase (APx);
- Fosfatase alcalina (ALP);

Parâmetros analisados nos extratos selecionados:

- Conteúdo em ergosterol;
- Conteúdo em triacilgliceróis;
- Conteúdo em fosfolípidos.

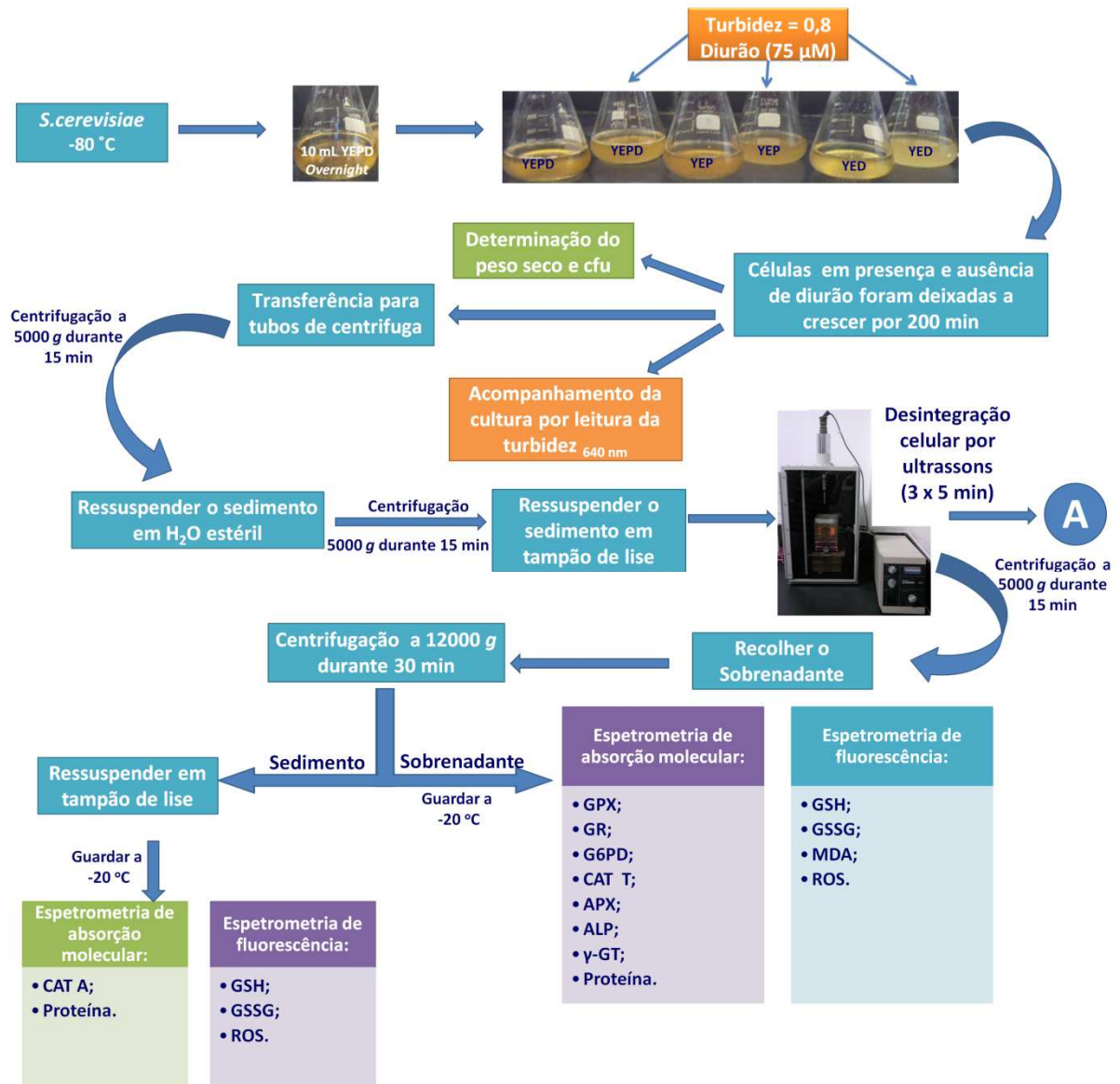
Análise estatística dos resultados: Análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan.

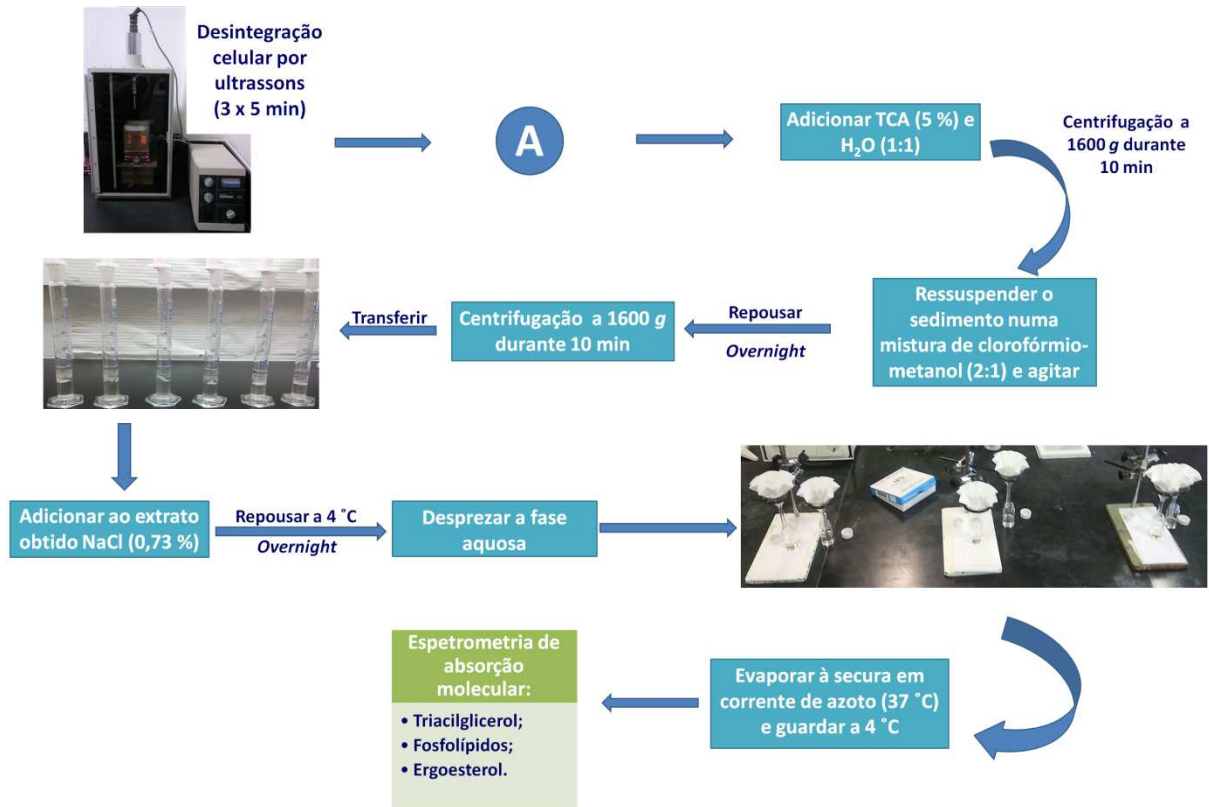
Técnicas utilizadas:

- Cultura de microrganismos;
- Desintegração celular, por homogeneizador de sonda de ultrassons;

- Fracionamento celular, por centrifugação diferencial;
- Espectrometria de absorção molecular (conteúdo em proteínas, ergosterol, fosfolípidos e triacilgliceróis e atividades enzimáticas CAT T, CAT A, GR, GPx e G6PD, γ -GT, ALP e APx);
- Espectrometria de fluorescência (conteúdo em GSH, GSSG, ROS e MDA);
- Ferramentas informáticas - folha de cálculo Excel e *software* para análise estatística SPSS, versão 19, adquirida pela Universidade de Évora.

3.2. Diagrama do trabalho





3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Cultura celular

No presente trabalho, utilizou-se como modelo biológico a levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃, isolada a partir de mostos de vinhos regionais do Alentejo, Portugal. Esta levedura encontra-se depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora. No laboratório de bioquímica analítica encontram-se preservadas a -80 °C em meio de cultura e glicerol, sendo utilizadas em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Candeias, 2010; Rosado, 2009; Ferreira, 2006).

Células de *S. cerevisiae* foram inoculadas em meio líquido YEPD (extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) e glucose (20 g/L)) e deixadas a crescer *overnight* a 28 °C e 150 rpm para garantir uma população celular que tornasse viável a continuação do trabalho ($\geq 10^6$ células/mL). Após ser obtida a população desejada, foram transferidas alíquotas de 0,5 mL para meio líquido YEPD, YEP (extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L)) ou YED (extrato de levedura (10 g/L) e glucose (20 g/L)), as quais cresceram a 28 °C e 150 rpm até atingir um valor de turbidez a um $\lambda_{640\text{nm}}$ de 0,8-1, tendo-se então adicionado o fitofármaco diurão de forma a obter uma concentração final de 75 μM , mantendo culturas em cada meio a crescer na ausência do agente de stress. As culturas, na presença ou ausência da fenilureia, foram deixadas crescer por um período de 200 min, a 28 °C e 150 rpm. No final do tempo de exposição, 200 min, foram recolhidas alíquotas de cada condição de ensaio para leitura da turbidez, obtenção de unidades formadoras de colónias (cfu) e determinação do peso seco por secagem em estufa a 80 °C até peso constante.

O peso seco e a turbidez, são parâmetros indicadores da biomassa total produzida, compreendendo tanto células viáveis como células mortas. De forma a obter o número de células viáveis procedeu-se à realização de diluições decimais sucessivas a partir de alíquotas de amostra, que foram depois utilizadas para inocular em meio YEPD sólido (agar (20 g/L)) e colocadas a crescer em estufa a 28 °C para posterior contagem do número de colónias.

3.3.2. Fracionamento celular e preparação de amostras

Após 200 min de crescimento na ausência ou na presença de diurão as células foram recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 15 min a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado duas vezes em água bidestilada estéril. As células foram ressuspensas em tampão fosfato (10 mM), pH 7,0, seguindo-se a desintegração celular a 4 °C através da

utilização de um homogeneizador de células de ultrassons em três fases de 5 min cada para cada uma das condições de trabalho em estudo.

O lisado obtido foi então sujeito a centrifugação a 12000 g durante 30 min a 4 °C. Tanto o sedimento como o sobrenadante foram divididos por microtubos e guardados a -20 °C para utilização posterior (Todorova 2009).

3.3.3. Quantificação de GSH e GSSG

O glutationo é um tripéptido responsável por inúmeras reações nos organismos, entre os quais a defesa contra moléculas antioxidantes, sendo de extrema importância no combate às ROS e ao stress oxidativo, ajudando a manter o ambiente redutor característico da célula. Este tripéptido é também de extrema importância nos processos de desintoxicação, sendo acoplado a moléculas como xenobióticos para que estes sejam mais facilmente excretados.

O doseamento de GSH, de acordo com o método proposto por Hissin (1976), foi realizado no sobrenadante e no sedimento pós-12000 g adequadamente diluídos em tampão fosfato de sódio (0,1 M), pH 8,0 com EDTA (0,05 M). A esta mistura foi adicionado solução comercial de OPT, que após agitação em vortex foi deixada a reagir durante 15 min a 20 °C. A mistura de reação foi então transferida para uma célula de fluorímetro de quartzo e procedeu-se à leitura da potência de fluorescência a λ_{ext} 350 nm e λ_{emis} 420 nm. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7. A concentração de GSH presente nas amostras foi determinada por interpolação na curva de calibração obtida com padrões de GSH submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig. A1)

Quanto ao GSSG, o seu doseamento foi efetuado por adição de *N*-etilmaleimida (NEM) (0,04 M) ao sobrenadante ou ao sedimento pós-12000 g (Hissin 1976)). Esta mistura foi deixada a reagir durante 30 min à T ambiente permitindo que o NEM forme um complexo estável com o GSH presente na mistura e impedindo que este interfira na quantificação do GSSG. Posteriormente foram adicionadas alíquotas da mistura anteriormente referida a uma solução de OPT em NaOH e deixadas a reagir durante 15 min à T ambiente, após o que se procedeu à leitura da potência de fluorescência a λ_{ext} 350 nm e λ_{emis} 420 nm. A par da mistura de reação foi preparada um branco no qual a amostra foi substituída por tampão fosfato (10 mM) pH 7. A concentração de GSSG na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de GSSG submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig.A2).

3.3.4. Quantificação de ROS

Espécies reativas de oxigênio (ROS) designa um conjunto de moléculas radicalares ou não, que possuem oxigênio na sua constituição. Devido à sua elevada reatividade, provocam facilmente alterações nos constituintes celulares como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, conduzindo a alterações no normal funcionamento celular que pode mesmo conduzir à morte da célula. Estas moléculas são produzidas devido à ação de vários agentes externos como a radiação UV ou pesticidas. Porém são também formadas no decorrer do metabolismo celular. Como são agentes que interferem perigosamente com o metabolismo celular, provocando alterações que estão por detrás de patologias como o cancro, o seu doseamento é de extrema importância, pois abre caminho para o estudo das alterações ocorridas no ambiente redox celular bem como dos danos provocados por estas moléculas.

O doseamento das ROS foi realizado seguindo o método descrito por LeBel (1990), baseado na reação do DCFH com as ROS que emite fluorescência permitindo a sua determinação com elevada sensibilidade. Iniciou-se o doseamento por preparação de uma solução de DCFH (1 mM) em tampão fosfato (25 mM), pH 7,4 e do tampão Tris HCl (40 mM), pH 7,4, utilizado para diluir a amostra (sedimento ou sobrenadante pós-12000 g) numa proporção de 1:40. Seguiu-se um período de incubação de 10 min a 37 °C, após o qual se procedeu à leitura da potência de fluorescência a λ_{ext} 485 nm e λ_{emis} 520 nm. A par da mistura de reação foi preparada um ensaio branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 como substituinte da amostra. Por fim, a concentração de ROS na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de H₂O₂ submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig.A3)

3.3.5. Quantificação de MDA

O malonodialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica. Quando ocorre um aumento de ROS, são muitos os constituintes celulares afetados, entre os quais os lípidos. Estas biomoléculas são de extrema importância para a célula, desempenhando funções tanto metabólicas, como fonte de energia ou estruturais, uma vez que são os principais constituintes das membranas. Ao sofrer a ação das ROS como o radical hidroxilo, é desencadeado um processo denominado peroxidação lipídica, capaz de provocar a lise celular e consequentemente a morte dessa mesma célula. A peroxidação lipídica culmina com a quebra da cadeia carbonada dos lípidos, originando grupos cetona e aldeídos, de entre os quais o

MDA, o que torna o seu doseamento de extrema importância na avaliação dos danos celulares, mais propriamente na peroxidação dos lípidos.

A determinação do teor em MDA nas condições de trabalho em estudo seguiu o método de Yagi (1976). Este método baseia-se na reação do MDA presente na amostra com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O produto desta reação emite fluorescência podendo desta forma detetar-se o teor de MDA através de espectrometria de fluorescência. Inicia-se o protocolo com uma mistura de amostra de sobrenadante pós-12000 g, SDS (8,1 %) e TBA (0,4 %), preparado em tampão acetato (10 %), nas proporções de 1:2:30 respetivamente. Esta mistura foi deixada a incubar durante 60 min a 95 °C, seguindo-se um período de 15 min de arrefecimento em gelo provocando assim a paragem da reação. Após arrefecer, adicionou-se n-butanol e agitou-se no vórtex. Seguiu-se um período de 60 min de espera para que ocorresse a separação das fases aquosa e orgânica, esta última contendo o MDA. Procedeu-se depois a uma centrifugação de 10 min a 1600 g após a qual se procedeu à recolha da fase orgânica, utilizada para determinação da potência de fluorescência a λ_{exc} 515 nm e λ_{emis} 553 nm. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante pós-12000 g. Por fim, a concentração de MDA na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de MDA submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig. A4), sendo que o MDA utilizado para a elaboração dos padrões foi obtido por hidrólise em meio ácido a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

3.3.6. Quantificação de Proteína

A determinação da concentração de proteína é um elemento de extrema importância em estudos bioquímicos, uma vez que permite, entre outras coisas, determinar a atividade específica das reações enzimáticas. Os ensaios para a determinação do teor proteico nas amostras foi realizado seguindo o método descrito Lowry (1951). Este método baseia-se na reação entre o reagente do biureto e as proteínas presentes na amostra, mais propriamente na redução do Cu^{2+} a Cu^+ por parte dos resíduos de aminoácidos constituintes das proteínas. Esta reação ocorre em meio alcalino e o Cu^+ daí resultante reage com o reagente de Folin-Ciocalteu originando um complexo péptido- Cu^+ de cor azul. A intensidade da coloração desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra, sendo por isso, possível o seu doseamento por espectrometria de absorção (Walter, 2003).

O ensaio iniciou-se com a preparação do reagente de Lowry, pela adição de 5 mL de sulfato de cobre (1 %) e 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio (2 %) para um volume final de 50 mL de carbonato de sódio (2 %). De seguida elaborou-se o reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:1 em água. Seguiu-se a elaboração da mistura de reação com a adição de aliquotas de sobrenadante ou sedimento pós-12000 g, NaOH (0,5 M) e reagente de Lowry. A mistura foi homogeneizada no vórtex e deixada em repouso por 10 min a T ambiente para permitir a redução do cobre. Após este período de incubação, adicionou-se reagente de Folin-Ciocalteu diluído e aguardou-se 30 min para que ocorresse o desenvolvimento da coloração e leu-se a absorvência a 720 nm. A par das amostras foram preparadas diversas soluções padrão a partir de uma solução de albumina do soro bovino (BSA, 500 µg/mL), realizadas nas mesmas condições referidas para as amostras. A concentração de proteína foi determinada por interpolação na curva de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA (Fig. A5).

3.3.7. Determinação da atividade glutationo redutase

O enzima glutationo redutase (GR), uma flavoproteína que utiliza o poder redutor do NADPH para reduzir a molécula de FAD do seu centro ativo que por sua vez irá auxiliar na redução da molécula de GSSG e conseqüente formação de GSH, pelo que é um enzima essencial na manutenção do ambiente redutor intracelular e manutenção da homeostase da célula, o que o torna um alvo dos estudos em stress oxidativo.

A determinação da atividade enzimática GR foi realizada recorrendo à espetrometria de absorção molecular, segundo o método descrito por Gooldberg e Spooner (1987). Este método baseia-se na mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M), EDTA (15 mM), GSSG (63,5 mM) e amostra de sobrenadante pós-12000 g (57,91 mg/L). Após agitação da mistura de reação, esta foi deixada a estabilizar por 3 min a 37 °C, após os quais estavam garantidas as condições necessárias para se iniciar a reação. A reação foi então iniciada por adição de NADPH (9,6 mM) e seguiu-se o consumo deste por parte do enzima através da leitura da absorvência a 340 nm por 180 s. A par da mistura de reação foi preparada uma mistura branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,93282 < r < 0,99912$, Fig. A6) e o coeficiente de absorvência molecular do NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.8. Determinação da atividade glutatono peroxidase

O enzima glutatono peroxidase é responsável pelo combate às ROS através da reação de redução de diversos peróxidos a compostos menos agressivos para as células, como a água. Esta reação de redução é realizada à custa da oxidação de moléculas de glutatono. Este enzima é uma das mais importantes moléculas de defesa contra danos oxidativos, pelo que, o seu estudo em projetos envolvendo situações de stress oxidativo torna-se fundamental como forma de perceber se a célula está a responder às alterações provocadas.

Procedeu-se assim à determinação da atividade deste enzima recorrendo-se ao método descrito por Inoue (1999), baseado em espectrometria de absorção molecular. Iniciou-se pela elaboração de uma mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M), pH 7,2, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL) e uma alíquota da amostra de sobrenadante pós-12000 g (57,91 mg/L). A mistura de reação foi deixada a incubar durante 5 min a 37 °C e de seguida adicionou-se NADPH (0,16 mM) e procedeu-se à leitura da absorvência a 340 nm e a 37 °C durante 3 min, após os quais se iniciou a reação por adição de *ter*-butil hidroperóxido (t-BHP). A reação foi seguida por leitura da absorvência a 340 nm durante 5 min e a 37 °C. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação (0,91686<r<0,99223, Fig. A7) e o coeficiente de absorvência molecular do NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.9. Determinação da atividade catalase

Os enzimas catalase (CAT) constituem uma das principais linhas de defesa contra as ROS, a par de outros enzimas peroxidase como o GPx. Estes enzimas são responsáveis pela catálise da reação de dismutação que converte o H₂O₂ em água e dióxigénio, impedindo desta forma a formação de espécies reativas derivadas do H₂O₂ e consequentemente, evitando diversos danos nos constituintes celulares, situações de stress oxidativo e auxiliando na manutenção do ambiente redutor celular bem como da homeostase da célula. O fato de ser um enzima de extrema importância no combate ao stress oxidativo torna-o um alvo muito importante do presente trabalho, uma vez que se pretende perceber quais as consequências das alterações provocadas nas células em estudo.

O presente estudo focou-se na quantificação da atividade dos enzimas CAT T, presente no sobrenadante pós 12000 g, e CAT A detetada no sedimento pós-12000 g baseando-se na decomposição do H₂O₂ (Todorova 2009) na mistura de reação composta por alíquotas da

amostra de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g (CAT T – 57,91 mg/L de proteína e CAT A – 12,29 mg/L), H₂O₂ (30 mM) e tampão fosfato (50 mM), pH 7,0. Após agitação da mistura seguiu-se a reação de decomposição do H₂O₂ por espectrometria de absorção molecular, através da leitura da absorvência a 240 nm e 25 °C, durante 2 min. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante ou sedimento pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação (CAT T – 0,95991 <r<0.99917, Fig.A8 e CAT A - 0,90641 <r<0.99934, Fig.A9) e o coeficiente de absorvência molecular do H₂O₂ de 0,0435 mM.cm⁻¹.

3.3.10. Determinação da atividade glucose-6-P desidrogenase

Apesar dos enzimas de combate ao stress oxidativo como os enzimas CAT e GPx serem de extrema importância para as células, existem outros enzimas sem os quais o combate antioxidante seria impossível. Um desses enzimas é o glucose-6-P desidrogenase (G6PD), o enzima regulador da via das pentoses fosfato, envolvido não só na síntese de moléculas precursoras dos ácidos nucleicos, mas também de equivalentes redutores essenciais na biossíntese lipídica e no combate ao stress oxidativo. Este é então, um enzima de “suporte” ao combate antioxidante, fornecendo o NADPH essencial para a reposição dos níveis de GSH pelo enzima GR. Procedeu-se então à determinação da atividade deste enzima seguindo o método descrito por Postma (1989) e Bergmeyer (1983) baseado na reação de conversão de Glucose-6-fosfato em 6-fosfoglucono-lactona, na qual é formado NADPH, um produto que é possível ser medido através de espectrometria de absorção molecular.

O processo iniciou-se com a elaboração de uma mistura de reação contendo alíquotas de amostra de sobrenadante pós 12000 g (28,96 mg/L), água destilada, tampão Tris-HCl (1 M), pH 8,0, NADP⁺ (0,04 M), MgCl₂ (0,5 M) e glucose-6-P (0,1 M). A mistura de reação foi agitada e seguiu-se a variação da absorvência a 340 nm e a 37 °C durante 180 s. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 substituindo a amostra. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação (0,99628 <r<0,99955, Fig.A10) e o coeficiente de absorvência molecular do NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.11. Determinação da atividade ascorbato peroxidase

Tal como os enzimas CAT e GPx, o enzima ascorbato peroxidase (APx) catalisa a reação de redução do H₂O₂ a H₂O. Porém, nesta reação de redução é realizada à custa da oxidação de moléculas de ácido ascórbico.

A determinação da atividade enzimática do APx foi realizada com recurso ao método descrito por Janda (1998), o qual é baseado na reação de decomposição do ácido ascórbico pelo enzima em questão, decomposição esta que é realizada a par da conversão de H₂O₂ a H₂O. Esta reação é seguida por espetrometria de absorção molecular permitindo posteriormente a determinação da atividade enzimática.

Iniciou-se a realização experimental pela mistura de alíquotas de amostra de sobrenadante pós 12000 g (57,91 mg/L), tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, ácido ascórbico (1 mM), H₂O₂ (10 mM) e EDTA (0,1 mM). A mistura de reação foi deixada a estabilizar por 2 min, após os quais se seguiu a reação por leitura da absorvência a 290 nm e 37 °C durante 300 s. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação (0,91859 < r < 0,99873, Fig. A11) e o coeficiente de absorvência molecular do ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.12. Determinação da atividade fosfatase alcalina

O enzima fosfatase alcalina (ALP) é responsável pela quebra de ligações monofosfoéster, sendo por isso importante para a disponibilização da energia necessária ao metabolismo celular. Além disso, este enzima é um bom marcador de proliferação celular, permitindo através da determinação da sua atividade enzimática, perceber o comportamento celular, mais propriamente a resposta a alterações, tanto internas como externas.

A atividade enzimática ALP é observada seguindo-se o método descrito por Bretau diere (1984) baseado na reação de hidrólise de moléculas de fosfato a partir do *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), tendo como produto da reação, para além das moléculas de fosfato, moléculas de *p*-nitrofenol, que apresentam coloração amarela, permitindo seguir o seu aumento, decorrente da reação do enzima ALP, por espetrometria de absorção molecular.

A mistura de reação é composta por uma alíquota de sobrenadante pós-12000 g (57,91 mg/L) diluída em tampão Tris-HCl (0,5 M), pH 8,5 e água bidestilada, iniciando-se a reação com a adição de *p*-NPP (6mM). Seguiu-se a reação através da leitura da absorvência a 450 nm e a 37 °C durante 180 s. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco

contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante ou sedimento pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente angular das curvas de reação ($0,98141 < r < 0,99744$, Fig.A12) e o coeficiente de absorvidade molecular do *p*-NPP de $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.13. Determinação da atividade γ -glutamil transferase

O tripéptido glutationo é extremamente importante para as células e para os seres vivos que estas constituem, porém é necessário que esteja disponível não só nas quantidades necessárias, mas também no local necessário. Para isso é essencial a ação do enzima γ -GT, responsável pela quebra das ligações peptídicas da molécula glutationo permitindo que esta atravesse as membranas celulares para estar disponível no local necessário. Para além disso também permite que o glutationo conjugado com diversas moléculas como xenobióticos, atravessem as membranas celulares, como o tonoplasto, com o objetivo de atingirem o vacúolo digestivo, facilitando a excreção.

O doseamento deste enzima baseia-se no método descrito por Szasz (1976), baseado na capacidade do γ -GT transferir do grupo γ -glutamato de um péptido para um aminoácido ou para outro péptido. É utilizado o substrato L- γ -glutamyl-4-nitroanilida pois permite uma medição direta da taxa de reação sem recorrer a desproteíntização, sem qualquer tratamento químico dos produtos de clivagem, detetando-se a formação de 4-nitroanilina por espetrometria de absorção molecular.

O procedimento experimental para a determinação da atividade enzimática do enzima γ -GT compreende a reação de uma mistura equitativa de duas soluções R1 e R2, compostas por Tris-HCl (100 mM), pH 8,2, glicilglicina (83 mM) e cloreto de magnésio (10 mM) e γ -glutamyl-*p*-Nitroanilida (4,4 mM) dissolvida em Tris (100 mM), pH 8,2, com uma alíquota de amostra de sobrenadante pós 12000 g (57,91 mg/L). Seguiu-se então a reação através da leitura da absorvência a 405 nm e a 37 °C em intervalos de 5 min, durante 60 min. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo tampão fosfato (10 mM) pH 7 em vez do sobrenadante ou sedimento pós-12000 g. A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente angular das curvas de reação ($0,90536 < r < 0,99744$, Fig. A13) e o coeficiente de absorvidade molecular da *p*-Nitroanilina de $9,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.14. Obtenção do extrato enriquecido em lípidos e ergosterol

Os lípidos constituem um dos principais tipos de biomoléculas das células, desempenhando diversas funções, como a constituição membranar e reserva energética. Alterações nestas biomoléculas, conduzem a desregulações celulares energéticas e estruturais, podendo mesmo levar à morte celular, pelo que a quantificação destas moléculas é de extrema importância para avaliar a integridade e função celular.

A extração de lípidos iniciou-se com a preparação de culturas celulares, efetuada nas mesmas condições referidas nos pontos 3.3.1 e 3.3.2. Após a lise celular adicionou-se uma mistura de TCA (5 %) e água (1:1) e efetuou-se uma centrifugação a 1600 g durante 10 min, cujo sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuscitado em 10 volumes de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1). Agitou-se a solução com uma vareta de vidro e deixou-se em repouso durante 24 h a 4°C. Repetiu-se o processo de adição de clorofórmio e metanol seguido de agitação mais uma vez e no fim realizou-se uma centrifugação a 1600 g durante 10 min. O sobrenadante obtido foi transferido para uma proveta graduada e ressuscitou-se o sedimento com uma mistura de metanol e clorofórmio. A solução foi centrifugada a 1600 g durante 10 min e o sobrenadante obtido foi adicionado na proveta graduada com o sobrenadante anterior. Este processo foi repetido por mais uma vez. Ao extrato obtido e guardado na proveta graduada, juntou-se NaCl (0,7 %) e deixou-se a repousar *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, desprezou-se a fase aquosa formada na proveta durante a noite e filtrou-se a fase orgânica com papel de filtro Whatman (1 PS) para um tubo de vidro previamente tarado. A fase orgânica foi então evaporada à secura em corrente de azoto a 37 °C e os tubos contendo o extrato foram guardados a 4 °C para posterior utilização (Folch, 1956). O extrato lipídico foi posteriormente ressuscitado em 1 cm³ de clorofórmio a 4 °C para a quantificação dos triacilgliceróis e do colesterol.

3.3.14.1. Ergosterol

O ergosterol é uma molécula com diversas funções na célula, estando envolvido em diversos mecanismos que contribuem para a manutenção da homeostasia celular. Para além de ser um dos constituintes das membranas celulares, contribuindo para a estabilização da fluidez desta estrutura, atua também como precursor de diversas moléculas esteroides e como mensageiro, controlando alguns processos de transcrição genética. A sua quantificação permite identificar, quando em conjunto com outros parâmetros, alterações estruturais e metabólicas nas células, fator importante em estudos de *stress* e regulação metabólica. Para a

sua quantificação seguiu-se o protocolo descrito por Abe (2009) que deteta enzimaticamente o peróxido de hidrogénio gerado pela oxidação de esteróis livres pela colesterol oxidase. O enzima colesterol oxidase reconhece o ergosterol com uma eficiência de aproximadamente 90 % relativa à obtida com o colesterol, o substrato-padrão utilizado na construção da curva de calibração.

O procedimento experimental iniciou-se com a ressuspensão dos lípidos anteriormente levados à secura, por adição de clorofórmio. Depois de bem agitado, transferiu-se aliquotas da solução anteriormente referida para diferentes tubos de ensaio, de acordo com as condições de trabalho em estudo, e levou-se as aliquotas à secura em corrente de azoto a 37 °C. Depois de seco, adicionou-se etanol absoluto a 4 °C e meio de reação tamponado constituído por tampão fosfato (0,1 M) pH 7, colesterol oxidase (> 100 U/L), colesterol esterase (>300 U/L), ácido hidroxibenzóico (20 mM), 4-aminofenazona (0,5 mM) e peroxidase (>200 U/L) e deixou-se a reagir durante 10 min. A reação em questão origina um produto corado tornando possível a quantificação do colesterol através de espetrometria de absorção molecular, por leitura da absorvência a 510 nm. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo apenas etanol e meio de reação tamponado. Por fim, a concentração de colesterol na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de colesterol submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig. A14) (Abe, 2009; Allain, 1974).

3.3.14.2. Triacilgliceróis

O triacilglicerol é a molécula de reserva energética por excelência, servindo para armazenar energia em situações de excesso e ceder essa energia armazenada quando é necessário. Alterações nestas biomoléculas conduzem a desregulações no metabolismo energético celular, pelo que é importante avaliar o teor destas biomoléculas de forma a identificar possíveis alterações.

A quantificação do teor de triacilglicerol nas amostras iniciou-se com a ressuspensão dos lípidos anteriormente levados à secura, por adição de clorofórmio. A solução foi depois bem agitada e foram transferidas alíquotas para diferentes tubos de ensaio, de acordo com as condições de trabalho em estudo, e levou-se as alíquotas à secura em corrente de azoto a 37 °C. Depois de seco, adicionou-se etanol absoluto e meio de reação tamponado composto por tampão Pipes (piperazina-N,N'-di(2-etanossulfonato)) (20 mM) pH 6,7, lipoproteína lipase (>350 U/L), glicerol cinase (>0,04 U/L), glicerol fosfatase oxidase (>4 U/L), peroxidase (>0,8 U/L), ATP (>1 mM), 4-aminofenazona (>0,8 mM), cloreto de magnésio (0,6 mM) e ESPT (4-

aminofenazona/N-etil-metilnilina-propanossulfonato de sódio) (2 mM), deixando-se a reagir durante 10 min. Devido ao produto desta reação apresentar cor, foi possível a quantificação de triacilglicerol através de espectrometria de absorção molecular, por leitura da absorvência a 546 nm. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo apenas etanol e meio de reação tamponado. Por fim, a concentração de triacilglicerol na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de triacilglicerol submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig. A15) (Bucolo, 1973; Werber, 1981).

3.3.14.3. Fosfolípidos

Os fosfolípidos representam os constituintes maioritários das membranas celulares, sendo por isso responsáveis pela manutenção da integridade celular, delimitando também o espaço intracelular. Alterações no metabolismo destas moléculas provocam alterações membranares, que afetam toda a célula e em casos extremos podem mesmo conduzir à sua morte, de forma que a sua quantificação é importante.

A concentração do conteúdo em fosfolípidos nas diferentes condições de trabalho foi realizada segundo a reação descrita por Nie (1993) e Takayama (1977), onde os fosfolípidos são hidrolisados em colina e ácido fosfatídico na presença de fosfolipase D. A colina é oxidada pelo colina oxidase em betaína e peróxido de hidrogénio que, na presença da peroxidase, reage com 4-aminoantipirina e um derivado fenólico, formando um composto vermelho. A intensidade da cor deste composto é proporcional à quantidade de fosfolípidos presentes na amostra sendo assim possível efetuar a sua quantificação por espectrometria de absorção molecular, a um λ de 520 nm.

Iniciou-se a quantificação com a ressuspensão dos lípidos anteriormente obtidos, por adição de clorofórmio. Agitou-se a solução e transferiu-se alíquotas para diferentes tubos de ensaio, de acordo com as condições de trabalho em estudo, e levou-se as alíquotas à secura em corrente de azoto a 37 °C. Depois de seco, adicionou-se etanol absoluto a 4 °C e meio de reação tamponado contendo tampão fosfato (50 mmol/L) pH 7,6,4-hidroxi-ácido benzoico, EDTA, Azita de sódio, detergentes, fosfolipase D, colina oxidase, 4-aminoantipirina e peroxidase, deixando-se a reagir com a amostra durante 10 min. A par da mistura de reação foi preparada uma solução branco contendo apenas etanol e meio de reação tamponado. Por fim, a concentração de fosfolípidos na amostra foi determinada por interpolação numa curva de calibração obtida com padrões de fosfolípidos submetidos às mesmas condições de ensaio (Fig. A16).

3.4. Equipamento

- Autoclave da marca AJC, modelo Uniclave 88;
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200;
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205;
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R;
- Espetrómetro de absorção molecular de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant;
- Espetrómetro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC;
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1;
- Homogeneizador de sonda de ultrassons da marca Branson Sonifier, modelo 450;
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34;
- Potenciómetro da marca Metrohm, modelo 691;
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K;
- Vórtex da marca Heidolph, modelo Reax 2000.

3.5. Reagentes

- 1-Butanol, 99,5 %, Panreac, Barcelona;
- 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH)- Sigma, St. Louis;
- 4-aminoantipirina, Sigma, St.Louis;
- 4-aminofenazona, Sigma, St.Louis;
- 4-aminofenazona, Sigma, St.Louis;
- 4-aminofenazona/N-etil-metilnilina-propanossulfonato de sódio, Sigma, St.Louis;
- 7,6,4-hidroxi-ácido benzoico, Sigma, St.Louis;
- Ácido acético glacial, Panreac, Barcelona;
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37,0 %, Merck, Darmstadt;
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St.Louis;
- Ácido hidroxibenzóico, Sigma, St.Louis;
- Ácido L(+)-ascórbico, Prolabo, Leuven;
- Ácido tiobarbitúrico, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Ácido tricloroacético, Fisher Chemical, Leicestershire;

- Adenosina trifosfato, Sigma, St.Louis;
- Agar bacteriológico, Himedia, Mumbai;
- Albumina do soro bovino, Sigma, St. Louis;
- Azita de sódio, Sigma, St.Louis;
- Azoto R, Ar Líquido, Lisboa;
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt;
- Cloreto de magnésio hexa-hidratado, 99 %, Sigma, St. Louis;
- Cloreto de sódio, pró-análise, Merck, Darmstadt;
- Clorofórmio, Fisher Scientific, Leicestershire;
- Colesterol esterase, Sigma, St.Louis;
- Colesterol oxidase, Sigma, St.Louis;
- Colina oxidase, 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;
- Diurão, Sigma-Aldrich, St. Louis;
- Duodecilsulfato de sódio, Sigma, St. Louis;
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8 %, Merck, Darmstadt;
- Extrato de levedura, 99,0 %, Sigma, St. Louis;
- Fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina oxidado (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- Fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- Fosfolipase D, Sigma, St.Louis;
- Glicerol cinase, Sigma, St.Louis;
- Glicerol fosfatase oxidase, Sigma, St.Louis;
- Glicilglicina, Merck, Darmstadt;
- Glucose, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- Glucose-6 Fosfato, Sigma-Aldrich, St. Louis;
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis;
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt;

- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt;
- Lipoproteína lípase, Sigma, St.Louis;
- Metanol, Sigma-Aldrich, St.Louis;
- *N*-etilmaleimida, Sigma, St. Louis;
- *o*-fetaldeído, Sigma, St. Louis;
- Peptona, 99,0 %, Sigma, St. Louis;
- Peroxidase, Sigma, St.Louis;
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30,0 %, Sigma, St. Louis;
- Piperazina-*N,N'*-di(2-etanossulfonato)), Sigma, St.Louis;
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis;
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- *ter*-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis;
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt;
- Tween 20, Sigma, St.Louis;
- γ -Glutamil-*p*-Nitroanilida, Sigma, St. Louis;

4. Resultados/discussão dos resultados

As fenilureias constituem uma classe de herbicidas usualmente utilizadas no controlo de infestantes de culturas agrícolas ou de pavimentos urbanos. O diurão, utilizado como princípio ativo de diversos herbicidas tem sido amplamente utilizado no controlo de diversas variedades de infestantes, tanto de folha anual como perene, gramíneas e musgos. Contudo a difícil degradação química e biológica deste composto levou a fortes restrições na sua utilização pela União Europeia, por ser considerado uma substância perigosa. Sendo um POP, a sua acumulação no ambiente e em particular ao longo das várias cadeias alimentares desencadeia problemas nos diversos ecossistemas sujeitos ao seu contato, bem como de saúde ambiental. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi testar a hipótese nula: O diurão não perturba o crescimento, a resposta antioxidante e o metabolismo energético de leveduras do género *Saccharomyces* crescidas em diferentes meios de cultura. Esta opção prende-se com o fato de se ter procurado caracterizar a resposta a esta fenilureia por uma levedura vínica, tendo em conta a sua eventual ação sobre os ecossistemas das adegas e pelo fato deste modelo biológico constituir um bom exemplo da resposta por eucariotas a agentes químicos. Por outro lado, o seu genoma encontra-se sequenciado e grande parte dos genes que codificam os sistemas enzimáticos de resposta energética e antioxidante exibem níveis elevados de homologia sequencial com genes de organismos superiores, em particular o homem, sendo recomendado como modelo alternativo aos animais, para testes com xenobióticos. Deste modo os resultados deste trabalho serão apresentados de acordo com o plano de realização das tarefas que lhe foram inerentes:

- a) Resposta ao diurão por marcadores de crescimento e sobrevivência celular;
- b) Resposta ao diurão por sistemas antioxidantes e de excreção;
- c) Resposta ao diurão por marcadores lipídicos.

Procurou-se ainda estimar como a disponibilidade das fontes maioritárias de carbono (glucose) e azoto (peptona) influenciam a resposta ao diurão.

4.1. Resposta ao diurão por marcadores de crescimento e sobrevivência celular:

A figura 4.1. revela que a quantidade de biomassa produzida em 200 min de ensaio em meio rico YEPD foi estatisticamente superior ($p < 0,01$) à quantidade de biomassa produzida em qualquer uma das condições de ensaio, incluindo os meios restritivos em fonte de carbono

(YEP) e fonte de azoto (YED). Pela mesma figura pôde-se ainda observar um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da produção de biomassa em células crescidas, em meio rico e restritivo de peptona (YED) na presença de diurão ($75 \mu\text{M}$). Contudo, a presença de diurão no meio de cultura não afetou significativamente ($p < 0,01$) o peso seco de células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP). Os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Kho (2006)

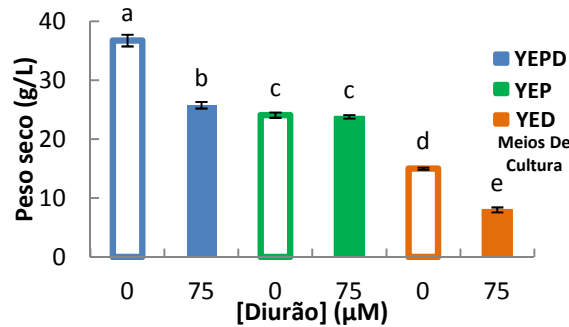


Figura 4.1. Representação gráfica do peso seco de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão ($75 \mu\text{M}$). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.2 mostra-nos que células crescidas em meio rico e restritivos não exibiam diferenças significativas ($p < 0,01$) no conteúdo em lípidos totais. No entanto a presença de diurão ($75 \mu\text{M}$) no meio de cultura, provocou um aumento significativo ($p < 0,01$) no conteúdo lipídico total de células crescidas em meio rico e meio restritivo em peptona (YED).

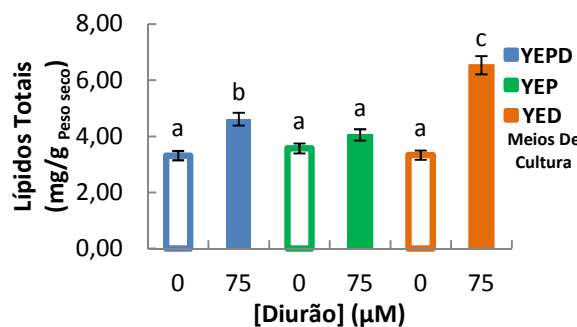


Figura 4.2. Representação gráfica do conteúdo em lípidos totais de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão ($75 \mu\text{M}$). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Outro marcador de crescimento que utilizámos foi o conteúdo em proteína total, que se encontra representado na figura 4.3, para cada uma das condições de ensaio. A figura mostra-nos que o conteúdo proteico era mais elevado em células crescidas em meio YEPD e meio

YED. A presença de diurão em células crescidas em qualquer dos meios induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) deste parâmetro relativamente aos seus respetivos controlos, embora em termos percentuais a diferença seja superior em células crescidas em meio rico (135 %) e meio YED (121 %). Este fato aponta para a necessidade de glucose para indução de síntese proteica, também necessária para assegurar o crescimento fermentativo.

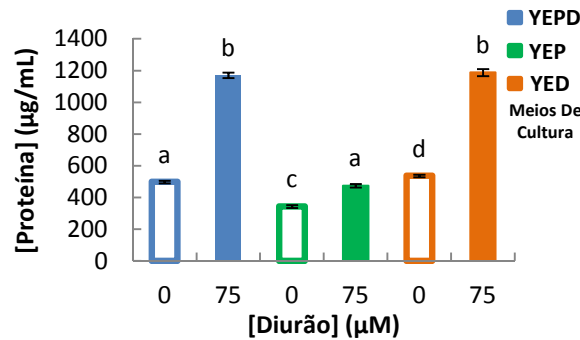
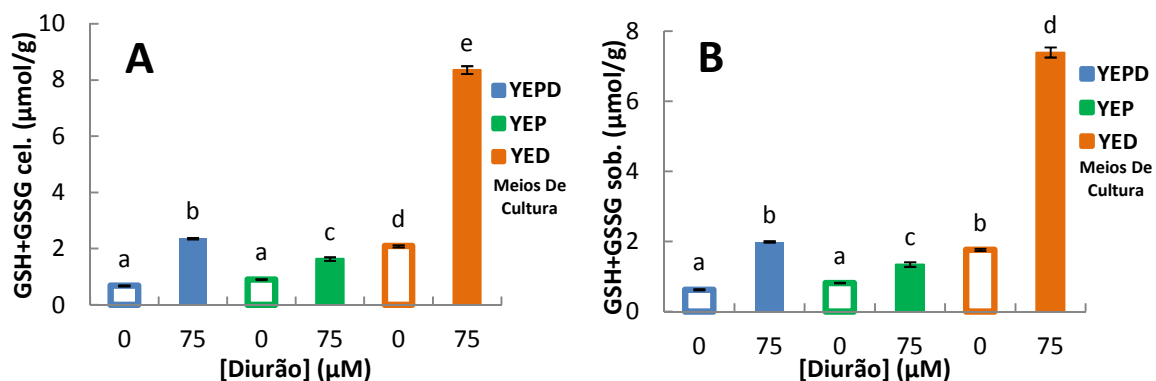


Figura 4.3. Representação gráfica do conteúdo em proteína total da cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.4 A, revela-nos que o conteúdo celular em tióis não proteicos foi superior em células crescidas em meio restritivo em peptona, relativamente ao meio rico ou ao meio restritivo em glucose. Contudo, a presença de diurão induziu aumentos significativos ($p < 0,01$) no conteúdo celular do tripéptido, em qualquer dos meios estudados, detetando-se em termos absolutos uma maior variação em células crescidas em meio YED (3x) e em células crescidas em meio rico (2,5x). Este perfil de resposta, repete-se no conteúdo total de glutathione quantificado no sobrenadante (citoplasma e reticulo endoplasmático) (figura 4.4 B) e sedimento celular (mitocôndrios e peroxissomas) (figura 4.4 C).



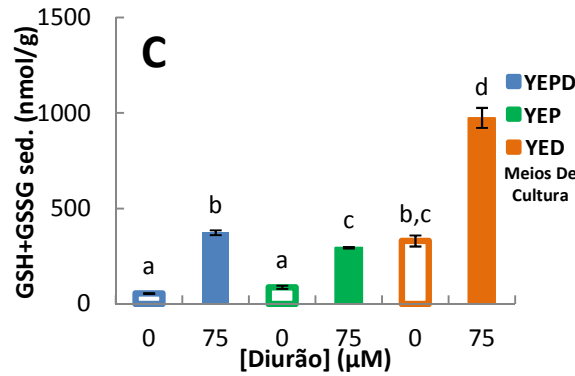


Figura 4.4. Representação gráfica do conteúdo em glutatono total (A) e GSH+GSSG do sobrenadante (B) e sedimento (C) pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No que diz respeito à atividade enzimática fosfatase alcalina, detetaram-se níveis mais elevados deste enzima, em células crescidas em meios restritivos, ocorrendo aumentos significativos ($p < 0,01$) desta atividade em células expostas ao diurão (75 µM), durante 200 min, em meio rico e em meio restritivo em peptona (fermentativas). Convém ainda assinalar que a fenilureia exerceu um efeito significativo ($p < 0,01$) e contrário ao que acaba de ser descrito em células crescidas em meio restritivo em glucose (respiratórias) (fig 4.5). As alterações relativas à presença do diurão na atividade ALP, traduzem a ocorrência de desvios metabólicos ao nível do metabolismo energético mediado por proteínas envolvidas em mecanismos de desfosforilação. Um eventual aumento de ROS (ver figuras 4.9 e 4.12 B) poderá ter induzido alterações no metabolismo energético para assegurar a sobrevivência celular que se mostrou aparentemente menos eficaz em células fermentativas, crescidas em meio restritivo em peptona (YED). Os valores de atividade ALP encontram-se de acordo com os descritos por Rothman (1986).

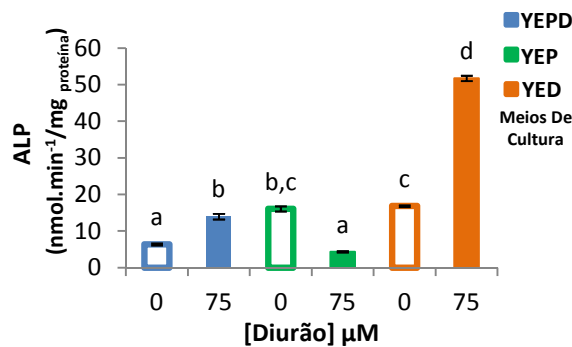


Figura 4.5. Representação gráfica da atividade enzimática ALP determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.6. não revela diferenças significativas ($p < 0,01$) entre células crescidas no meio rico e em qualquer dos meios restritivos. Convém no entanto destacar que se observou um aumento significativo ($p < 0,01$) da viabilidade celular em qualquer das populações expostas ao diurão (75 μM), embora em termos absolutos se observem os valores mais elevados em células crescidas em meio rico (4x) e meio restritivo em glucose (2,3x). Os valores encontram-se de acordo com os descritos por Ayer (2010).

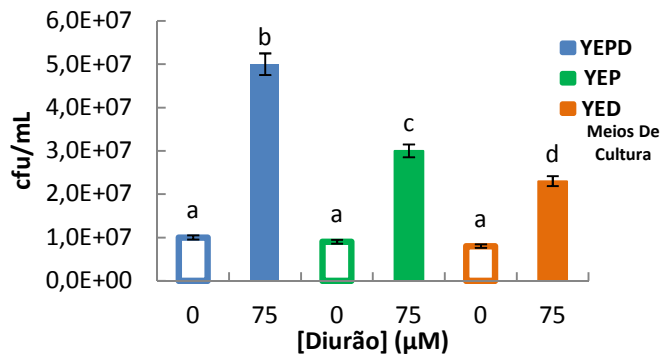


Figura 4.6. Representação gráfica de cfu de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O conjunto de resultados descritos nesta secção permitem concluir que o diurão afeta o crescimento celular de forma significativa, sendo na maior parte dos casos os efeitos observados dependentes do conteúdo em fonte de azoto ou de carbono. Embora a resposta ao diurão, expressa pelo conteúdo em lípidos totais, proteína total, conteúdo em glutathione, fosfatase alcalina e cfu aponte este composto como um indutor de proliferação celular, em particular em meio rico e meio restritivo em peptona, o conteúdo em peso seco parece contrariar este tipo de resposta, ou seja, a quantidade de biomassa total produzida em 200 min de ensaio foi afetada negativamente pela presença da fenilureia em células crescidas em meio rico e meio restritivo em peptona, sem afetar o crescimento celular em meio restritivo em glucose. Este fato permite inferir que o diurão no período inicial de exposição poderá induzir morte celular e que as células sobreviventes despoletaram mecanismos de resposta que detetados no final do período de ensaio, 200 min, sugerem uma resposta adaptativa/proliferativa.

4.2. Resposta ao diurão por sistemas antioxidantes e de excreção:

A partir da figura 4.7 A podemos observar que os níveis de glutathione citoplasmático em meio restritivo em peptona eram significativamente superiores ($p < 0,01$) aos detetados em meio rico ou em meio restritivo em glucose (valores de acordo com os descritos por Izawa (1995)). A presença de diurão (75 μM) no meio de cultura provocou um aumento significativo ($p < 0,01$) da concentração citoplasmática do tripéptido em células crescidas em meio YEPD e em meio YED, sendo a variação em termos absolutos muito superior em células expostas durante 200 min em meio restritivo em peptona (YEPD – 2x; YED – 3x). No que diz respeito ao conteúdo em dissulfureto de glutathione citoplasmático (figura 4.7 B), detetamos um perfil de resposta idêntico ao do tripéptido (GSH), ou seja, as células crescidas em meio restritivo em peptona, exibem um maior conteúdo em dissulfureto de glutathione, não se detetando diferenças significativas ($p < 0,01$) entre células crescidas em meio rico e em células crescidas em meio restritivo em glucose. Assim, a exposição ao diurão (75 μM) causou também, um aumento significativo ($p < 0,01$) deste conteúdo citoplasmático em células crescidas em meio YEPD e células crescidas em meio restritivo em peptona (YED), não se detetando diferenças significativas ($p < 0,01$) entre células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), na presença ou ausência de diurão (75 μM). Contudo, para um grau de confiança de 5 % já se detetam diferenças significativas entre estes dois últimos tratamentos. Em termos absolutos, o maior incremento foi observado em células expostas ao diurão e crescidas em meio restritivo em peptona (YEPD – 2,4x; YEP – 0,5x; YED – 3,4x).

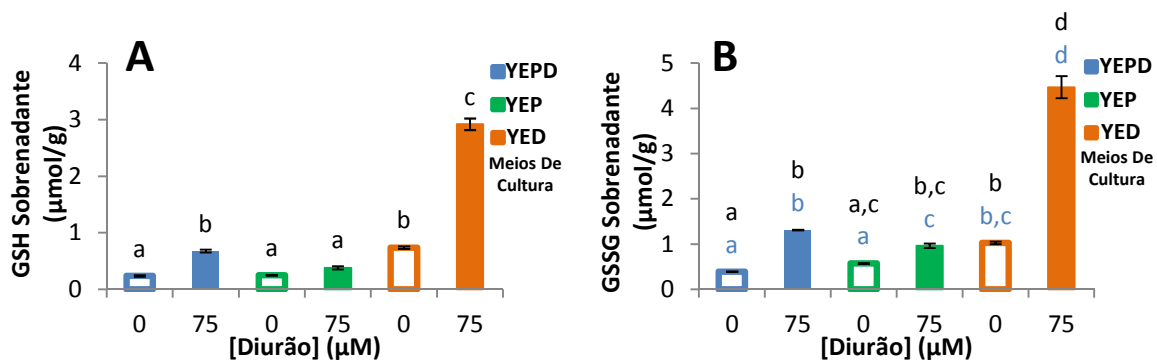


Figura 4.7. Representação gráfica do teor em GSH (A) e GSSG (B) do sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

Quando se avaliou a capacidade tampão exercida pelo par redox GSH/GSSG no citoplasma (figura 4.8), observaram-se valores de razão superiores em células crescidas em meio rico e restritivo em peptona, que diferem significativamente ($p < 0,01$) das células

crescidas em meio restritivo em glucose. Ao comparar-se células expostas ao diurão (75 μ M) com os seus respetivos controlos, não se observou diferenças significativas ($p < 0,01$) devido ao tratamento. Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Bulteau (2012).

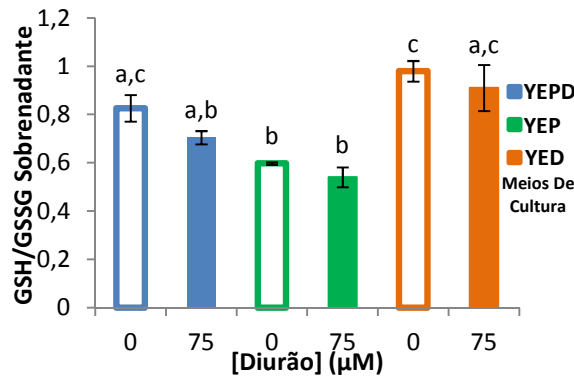


Figura 4.8. Representação gráfica da razão GSH/GSSG do sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μ M). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.9 representa os níveis de ROS citoplasmáticos determinados em cada ensaio, onde podemos observar valores superiores nos meios restritivos, relativamente ao controlo do meio YEPD. A exposição de *S. cerevisiae* ao diurão (75 μ M) durante 200 min apenas induziu um aumento de ROS citoplasmático nas células crescidas em meio YEPD e restritivo em peptona (YED), não perturbando com significado estatístico ($p < 0,01$) os níveis de ROS citoplasmático em células crescidas em meio restritivo em glucose, sendo as diferenças observadas em termos percentuais muito superiores nas células crescidas em meio YED (415 %).

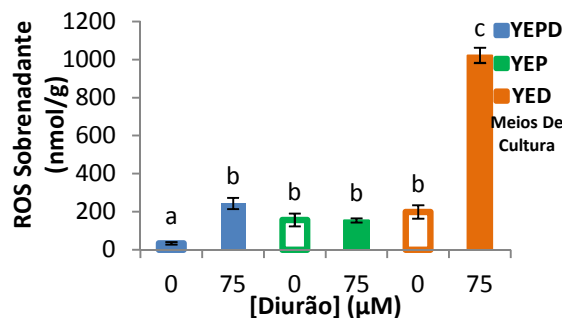


Figura 4.9. Representação gráfica do teor em ROS do sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μ M). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.10 revela o perfil de resposta do conteúdo em GSH do sedimento, quer ao tipo de meio quer à exposição ao diurão (75 μ M), idêntico ao detetado na figura 4.7 A para o

nível de GSH do citoplasma, exceto nas células expostas à fenilureia em meio restritivo em glucose, que sofre um aumento significativo ($p < 0,01$) relativamente ao seu controlo.

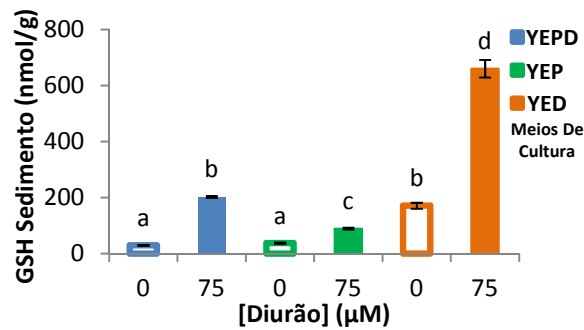


Figura 4.10. Representação gráfica do teor em GSH do sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

É também interessante observar a figura 4.11 que representa os níveis de dissulfureto de glutationo do sedimento pós-12000 g, onde se pode constatar um perfil de resposta idêntico ao da figura 4.10 para qualquer das situações de ensaio ($p < 0,01$). Os valores estão de acordo com os descritos por Izawa (1995).

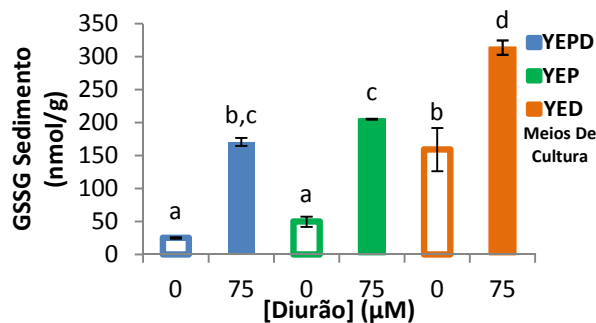


Figura 4.11. Representação gráfica do teor em GSSG do sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No entanto, a estabilização do ambiente redutor pelo par redox GSH/GSSG parece comportar-se de forma idêntica ao que foi detetado no citoplasma apenas para as células crescidas em meio rico, uma vez que nos meios restritivos a resposta ao diurão exhibe um decréscimo significativo ($p < 0,01$) em meio YEP (respiratórias) e um aumento significativo em meio YED (fermentativas) (figura 4.12 A). Este tipo de resposta pode ter comprometido a funcionalidade mitocondrial devido à eventual acumulação de espécies reativas de oxigénio (valores de acordo com os descritos por Bulteau (2012)).

Estes resultados aguçaram a curiosidade de se observar o que se passou em termos de níveis de ROS mitocondrial (figura 4.12 B), pois foi com surpresa que apenas se observou uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre células expostas ao diurão ($75 \mu\text{M}$) e o seu controlo em meio restritivo em peptona. Como o método que utilizámos para quantificar as ROS apenas deteta os níveis de peróxido de hidrogénio, é provável que o eventual bloqueio da cadeia respiratória pelo diurão estivesse acoplado à inibição da desintoxicação do radical anião superóxido em H_2O_2 , pela SOD mitocondrial, ou à indução de reações de Fenton, consumidoras de peróxido de hidrogénio e geradoras de radical hidroxilo que deste modo podem esconder os indícios de danos ao nível do mitocôndrio.

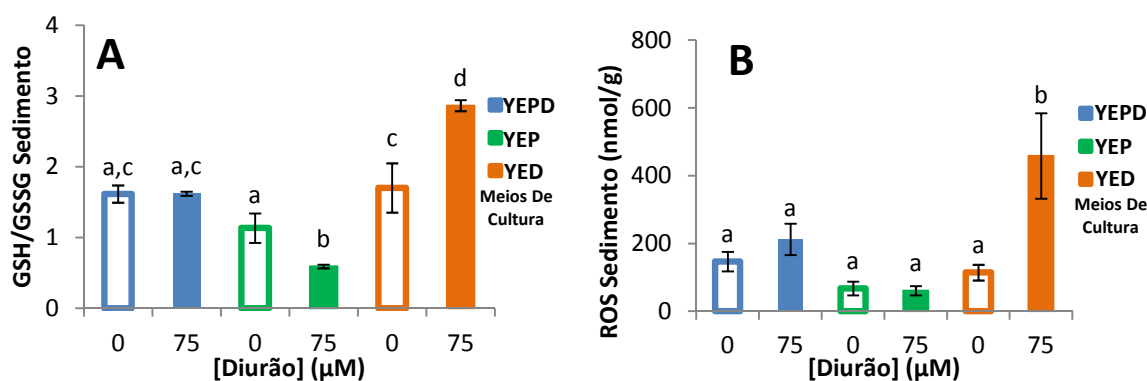


Figura 4.12. Representação gráfica da razão GSH/GSSG (A) e do teor em ROS do sedimento (B) pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão ($75 \mu\text{M}$). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Face ao exposto, a figura 4.13 não exhibe respostas surpreendentes, uma vez que as consequências das alterações nos níveis de glutatono apenas induzem peroxidação lipídica com formação de malondialdeído em células crescidas em meio restritivo em peptona, uma vez que, quer em culturas controlo quer em culturas de exposição ao diurão ($75 \mu\text{M}$) se observaram diferenças significativas ($p < 0,01$) relativamente aos controlos das outras culturas e à exposição à fenilureia. É natural que as diferenças detetadas na estabilização do ambiente redutor mitocondrial (figura 4.12 A) não se manifestem neste parâmetro uma vez que a ordem de grandeza dos níveis totais de glutatono no sobrenadante é muito superior à dos níveis de glutatono total do sedimento (figuras 4.4 B e 4.4 C). Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Espindola (2003).

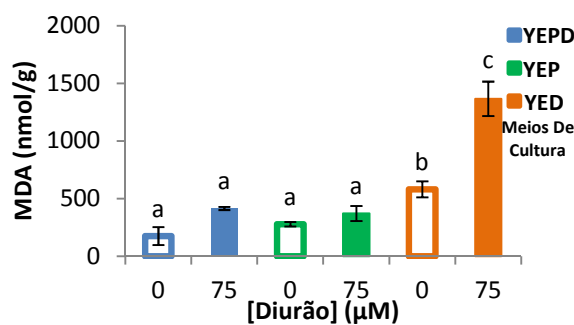


Figura 4.13. Representação gráfica do teor em MDA de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

Esta série de resultados permitiu-nos observar que o diurão aumentou significativamente o conteúdo em GSH, GSSG, ROS e MDA do sobrenadante pós-12000 g de células crescidas na presença de glucose (fermentativas), enquanto que, o conteúdo em GSH, GSSG e ROS do sedimento aumentou em células crescidas em qualquer tipo de meio de cultura, isto é, na presença (fermentativas) ou na ausência (respiratórias) de glucose. Como a razão GSH/GSSG do sobrenadante não é afetada pela presença do diurão em qualquer dos meios de cultura, e no sedimento o poder redutor da célula diminui em células respiratórias (YEP) e aumenta em células fermentativas, com restrição em peptona (YED), estes resultados justificam a morte celular detetada na figura 4.1, no início da cultura, bem como o aumento da capacidade proliferativa no final da cultura, em particular em células crescidas em meios com glucose (fermentativas) YEPD e YED. O decréscimo significativo da razão GSH/GSSG citoplasmático e mitocondrial detetado em células crescidas na ausência ou na presença de diurão (75µM) em meio restritivo em glucose (respiratórias) que deveriam ter despoletado a expressão de enzimas mitocondriais para assegurar, após a fase diáuxica do seu crescimento, acoplado à indução de mecanismos de resposta antioxidantes, protetores nesta nova fase do metabolismo, permite especular que o diurão poderá ter exercido danos moleculares ao nível da homeostase mitocondrial do glutathione. Esta alteração poderá vir a ser, em parte, esclarecida na continuação do texto (ver figura 4.19).

A estabilização do saudável ambiente redutor celular por agentes antioxidantes, como por exemplo o glutathione ou o ascorbato é finamente modulado por uma bateria de enzimas antioxidantes citoplasmáticos, do peroxissoma ou do vacúolo, que estão implicados na desintoxicação das ROS ou de xenobióticos, pelo que iniciaremos a caracterização de alguns destes sistemas interpretando as respostas que os enzimas do ciclo do glutathione e aqueles que

a ele estão diretamente ligados. Deste modo, a figura 4.14 mostra a resposta do enzima glutationo redutase ao meio de cultura e ao diurão. Esta figura revela-nos que a atividade do glutationo redutase assume o valor mais elevado no meio restritivo em glucose (YEP, respiratórias), assumindo valores mais baixos quer em meio YEPD ou YED, fermentativos. A exposição ao diurão causou um aumento desta atividade enzimática, quer no meio rico (YEPD), quer no meio restritivo em peptona (YED), não ocorrendo alterações significativas no meio restritivo em glucose (YEP) ($p < 0,01$). Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Izawa (1995).

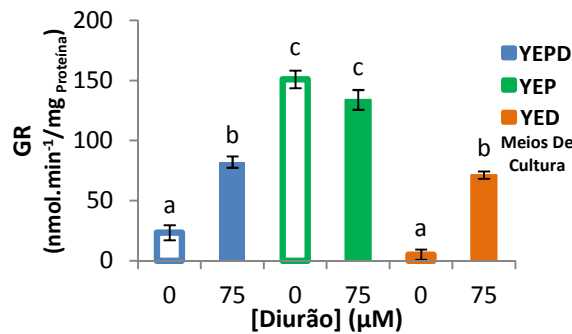


Figura 4.14. Representação gráfica da atividade enzimática GR determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A figura 4.15 revela-nos o comportamento do enzima glutationo peroxidase dependente do selénio em cada meio de cultura, na ausência e na presença de diurão, onde se pode observar que o valor de atividade mais elevado foi detetado nas células que cresceram no meio restritivo em glucose (YEP), não se detetando diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade GPx entre os meios YEPD e YED. A presença do diurão não afetou esta atividade catalítica em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), provocando um decréscimo significativo ($p < 0,05$) em meio rico e meio restritivo em peptona (YED). Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Avery (2004).

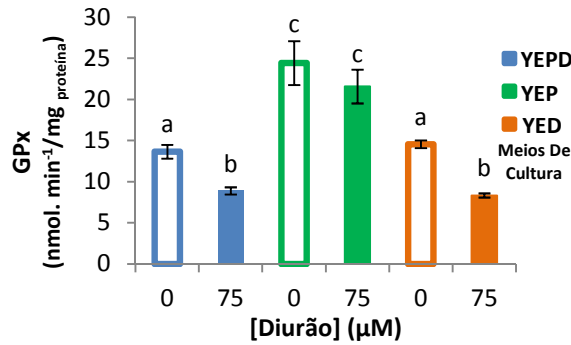


Figura 4.15. Representação gráfica da atividade enzimática GPx determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

Associado ao ciclo do glutatióno encontra-se usualmente o enzima glucose-6-P desidrogenase, o regulador chave da via das pentoses fosfato, principal fonte de equivalentes redutores sob a forma de NADPH e co substrato do enzima glutatióno redutase. A figura 4.16 revela que as células crescidas em meio restritivo em glucose, são aquelas que exibem maior atividade G6PD, sendo no entanto o valor da atividade G6PD determinado em células crescidas em meio YED, superior ao detetado em células crescidas em meio rico. Nas culturas expostas ao diurão, ocorreu um aumento desta atividade catalítica, nas células crescidas em meio YEPD e meio YED (valores de acordo com os descritos por Izawa (1995)) (p < 0,01). Pelas figuras 4.14 e 4.16 pode-se observar que o perfil de resposta exibido pelos enzimas glutatióno redutase e G6PD, vitais para assegurar o saudável ambiente redutor intracelular, é idêntico.

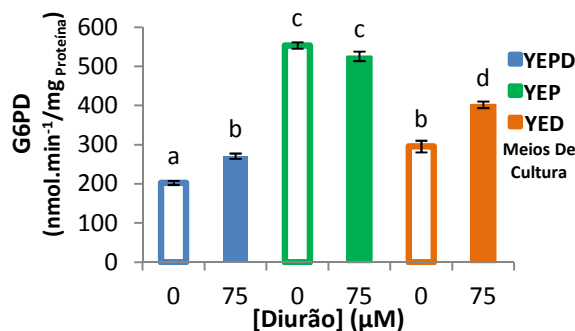


Figura 4.16. Representação gráfica da atividade enzimática G6PD determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

O aumento das atividades GR e G6PD detetadas na presença de diurão em meio rico e restritivo em peptona (YED) pode ainda dever-se à necessidade de disponibilização de

equivalentes redutores sob a forma de GSH e NADPH utilizados na regeneração do ascorbato na sua ação anti ROS via APx do ciclo do ascorbato.

As figuras 4.17 A e 4.17 B ilustram a resposta por catalases de *S. cerevisiae* a diferentes meios de cultura, na ausência e presença de diurão, podendo observar-se que os níveis de atividade catalítica CAT T e CAT A eram superiores em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), assumindo na CAT A o valor menor em células crescidas em meio YED. Por outro lado, a presença do diurão (75 μ M) aumentou significativamente ($p < 0,01$) a atividade catalítica CAT T e CAT A em qualquer dos meios estudados. As atividades catalíticas CAT T e CAT A, disponibilizando-lhes uma maior capacidade de desintoxicação do H_2O_2 no caso dos meios YEPD e YED, poderão compensar a perda de atividade catalítica mediada pela GPx descrita anteriormente. Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Zandycke (2002).

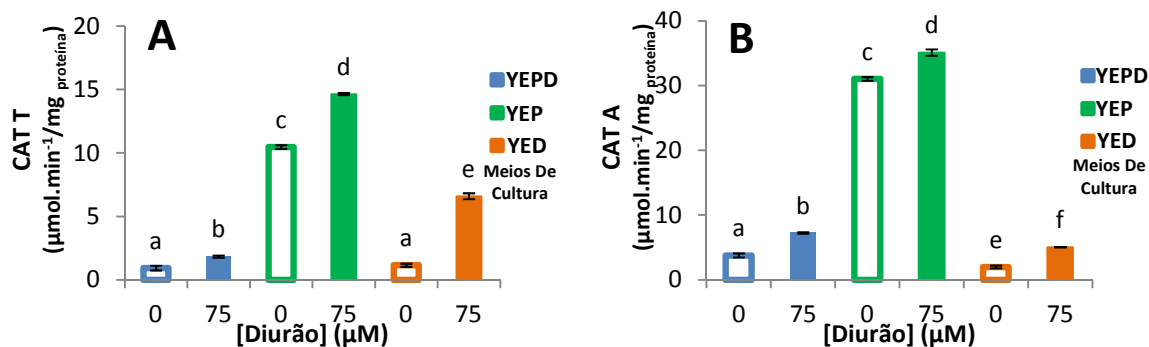


Figura 4.17. Representação gráfica das atividades enzimáticas CAT T (A) e CAT A (B) determinadas por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante e sedimento pós-12000 g, respetivamente, de *S. cerevisiae* UE-ME3 crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μ M). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A atividade catalítica APx (figura 4.18) apresenta um nível superior de atividade em células crescidas em meio rico, embora os valores detetados em meio YED assumam valores estatisticamente intermédios ($p < 0,01$) entre os valores do meio restritivo YEP e meio rico. A presença do diurão no meio de cultura apenas induziu a atividade catalítica de leveduras crescidas em meio restritivo em peptona (YED), parecendo que esta atividade antioxidante, que potencia a resposta contra ROS pelo ascorbato, foi indispensável para compensar o aumento de ROS detetado nas figuras 4.9 e 4.12 B. Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Panchuk (2002).

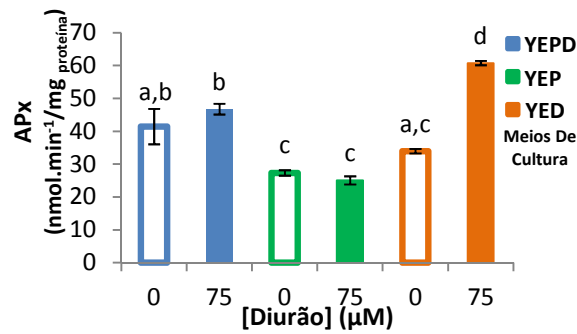


Figura 4.18. Representação gráfica da atividade enzimática APX determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

A figura 4.19 compara a atividade γ -glutamil transferase do tonoplasto de leveduras em diferentes meios de cultura, na ausência e na presença de diurão. Nela pode observar-se que apenas para um nível de confiança de 95 %, esta atividade catalítica, presente em células crescidas em meio restritivo de glucose (YEP) assume valores significativamente superiores aos detetados em meio rico (YEPD) e restritivo em peptona (YED). A presença de diurão no meio de cultura não afetou significativamente (p < 0,05) esta atividade catalítica, pelo que, será pouco provável a excreção do diurão para o vacúolo via conjugação com o glutathione. Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Garcion (1996).

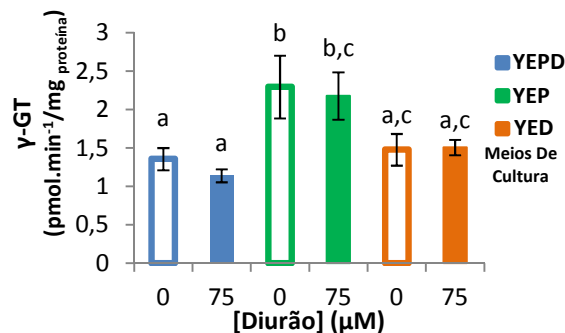


Figura 4.19. Representação gráfica da atividade enzimática γ -GT determinada por espectrometria de absorção molecular no sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 μM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

Convém aqui destacar que os níveis de atividade catalítica e a resposta ao diurão exibida pelos enzimas GR, GPX, G6PD, CAT T e CAT A estão de acordo com o evoluir da curva de crescimento de *S. cerevisiae*, isto é, detetaram-se os valores mais elevados em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), onde se esperava que esta população de leveduras exibisse um metabolismo maioritariamente respiratório. No caso do aumento das

atividades catalíticas detetadas em meio YEPD e YED, onde as células assumiram maioritariamente um metabolismo fermentativo, consequentemente com níveis de resposta antioxidante diminuídos, a presença do diurão comportou-se como um forte indutor de stress, de acordo com o que foi observado nas figuras 4.9, 4.12 B e 4.13, onde o aumento dos níveis de ROS discutidos anteriormente no sobrenadante e sedimento celular, justificam os níveis elevados de MDA detetados, bem como a indução das atividades GR, G6PD, CAT T e CAT A, referidas anteriormente. É provável que a metabolização do diurão permita que as *S. cerevisiae* UE-ME₃ o utilizem como fonte de azoto, um ponto a esclarecer em tarefas futuras.

4.3. Resposta ao diurão por marcadores lipídicos:

A condução deste trabalho previa avaliar efeitos tóxicos do diurão sobre *S. cerevisiae* UE-ME₃, procurando detetar possíveis efeitos deletérios correlacionáveis com os níveis de ROS e a modulação do metabolismo energético por enzimas como a fosfatase alcalina. Nesse contexto, procurou-se avaliar como o meio de cultura e a exposição ao diurão perturbaram a composição absoluta e relativa de fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol.

A figura 4.20 mostra-nos que células crescidas em meio restritivo YED exibiam maior conteúdo em fosfolípidos relativamente ao meio YEPD. Por outro lado, a presença do diurão aumentou significativamente ($p < 0,01$) o conteúdo em fosfolípidos, quer em células crescidas em meio YEPD, quer em células crescidas em meio YED, não afetando significativamente a composição fosfolipídica de células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP).

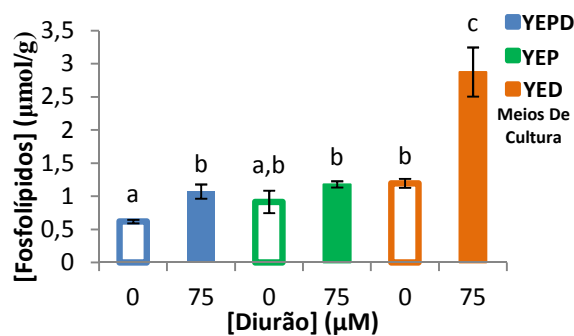


Figura 4.20. Representação gráfica do teor em Fosfolípidos de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Por outro lado, a figura 4.21 revela que as células crescidas em meio rico e em meio restritivo em peptona (YED) são aquelas que exibiam maior quantidade de lípidos de reserva,

nomeadamente triacilgliceróis. A exposição ao diurão aumentou significativamente ($p < 0,01$) o conteúdo em triacilgliceróis nestas células.

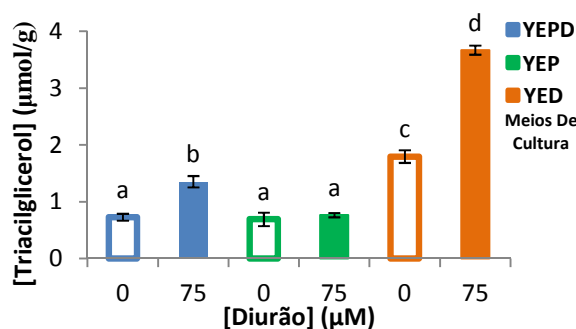


Figura 4.21. Representação gráfica do teor em Triacilgliceróis de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Pela figura 4.22 pode-se observar que o conteúdo em ergosterol também era significativamente ($p < 0,01$) mais elevado em células crescidas em meio restritivo em peptona (YED). No entanto, a exposição ao diurão provocou um aumento significativo ($p < 0,01$) da quantidade deste esteroide em células crescidas em meios cuja fonte de carbono era a glucose (fermentativas), levando no entanto a um decréscimo significativo deste parâmetro em leveduras crescidas em meio restritivo em glucose (YEP). Curiosamente o perfil de resposta aos meios de cultura e à presença de diurão assume um perfil idêntico ao detetado para a atividade enzimática ALP (figura 4.5), fato que nos permite inferir que foi perturbado o efeito modulador do ALP nos mecanismos de fosforilação/desfosforilação envolvidos na manutenção da homeostase do ergosterol. Embora no caso dos fosfolípidos e triacilgliceróis não seja detetada uma resposta negativa, com significado estatístico, exercida pelo diurão nesses conteúdos em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), observa-se o mesmo padrão de resposta descrito para o ergosterol sobre o conteúdo em fosfolípidos e triacilgliceróis em células crescidas em meio rico e em meio restritivo em peptona, igualmente correlacionável com os níveis de atividade ALP. Estes resultados sugerem que a presença de diurão em meios cuja fonte de carbono maioritária era a glucose deverão ter sofrido um deslocamento do *turnover* lipídico no sentido da acumulação desses materiais indispensáveis à proliferação e funcionalidade membranar e à disponibilização de energia que assegure a sobrevivência celular.

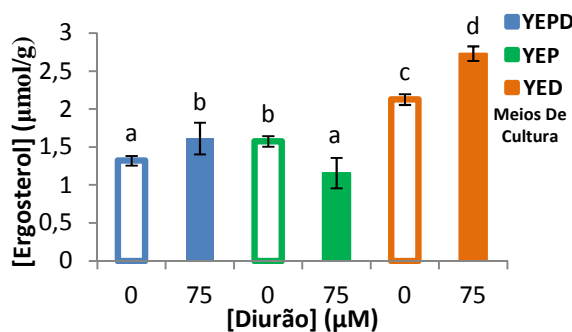


Figura 4.22. Representação gráfica do teor em Ergosterol de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED na ausência e na presença de diurão (75 µM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No que diz respeito à proporção relativa dos componentes maioritários do extrato lipídico (tabela 4.1), continua a observar-se um valor significativamente superior ($p < 0,01$) de fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol em células crescidas em meio restritivo em peptona (YED). No entanto, a proporção de fosfolípidos no extrato total aumentou em todos os ensaios de exposição ao diurão. Este tipo de resposta apenas se manifestou, no que diz respeito à proporção de triacilgliceróis, nas células crescidas em meio rico e em meio restritivo em peptona (YED), ocorrendo a resposta inversa em meio restritivo em glucose (YEP). Por outro lado, embora a proporção de ergosterol permaneça significativamente superior ($p < 0,01$) em células crescidas em meio YED, detetaram-se sempre decréscimos significativos ($p < 0,01$) da proporção deste esterol no extrato total em qualquer das situações de exposição ao diurão. Embora o que foi descrito para a percentagem de triacilgliceróis possa ser justificado pela carência de glucose e eventual diminuição da biossíntese de lípidos de reserva, as alterações do conteúdo relativo em ergosterol dever-se-ão provavelmente a outras causas. Este conjunto de resultados apontam para uma tendência para indução de atividade proliferativa via biossíntese de membranas que poderá ser menos eficaz nos meios restritivos com menor sobrevivência celular à presença de diurão (figura 4.6), provavelmente devido a uma acumulação diferencial de triacilgliceróis e ergosterol. Os valores obtidos estão de acordo com os descritos por Rattray (1975).

Quadro 4.1. Representação da proporção relativa dos componentes maioritários do extrato lipídico

Tratamentos	TG (%)	FL (%)	E (%)
YEPD ₀ (µM)	19,46	14,45	15,42
YEPD ₇₅ (µM)	25,99	18,02	13,51
YEP ₀ (µM)	17,15	19,87	17,03
YEP ₇₅ (µM)	16,74	22,59	11,03
YED ₀ (µM)	47,73	27,83	24,67
YED ₇₅ (µM)	49,72	34,12	16,15

5. Conclusões

Os resultados obtidos com os marcadores de crescimento, peso seco, conteúdo lipídico, proteico e em glutatióno, ALP e cfu permitem-nos inferir que o diurão no período inicial de exposição poderá ter induzido morte celular. Contudo, as células sobreviventes devem ter despoletado mecanismos de resposta, detetados no final do período de ensaio, 200 min, que sugerem uma resposta adaptativa/proliferativa. O fato do peso seco não ser afetado pela presença do diurão permite inferir que a fenilureia poderá ter sido utilizada como fonte de carbono, em condições de carência de glucose.

O diurão aumentou significativamente o conteúdo em GSH, GSSG, ROS e MDA do sobrenadante pós-12000 g de células crescidas na presença de glucose (fermentativas), enquanto o conteúdo em GSH, GSSG e ROS do sedimento aumentou em células crescidas em qualquer meio de cultura, isto é, na presença (fermentativas) ou na ausência (respiratórias) de glucose.

O decréscimo significativo da razão GSH/GSSG citoplasmático e mitocondrial detetado em células crescidas na ausência ou na presença de diurão (75 μ M) em meio restritivo em glucose (respiratórias), que deveriam ter despoletado a expressão de sistemas mitocondriais antioxidantes, permite especular que o diurão poderá ter perturbado a homeostase do glutatióno mitocondrial.

Os níveis de atividade catalítica na presença do diurão exibida pelos enzimas GR, GPX, G6PD, CAT T e CAT A estão de acordo com o evoluir da curva de crescimento de *S. cerevisiae*, isto é, detetaram-se os valores mais elevados em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP), onde se esperava que esta população de leveduras exibisse um metabolismo maioritariamente respiratório. Nos meios YEPD e YED, onde as células assumiram maioritariamente um metabolismo fermentativo, conseqüentemente com níveis de resposta antioxidante diminuídos, a presença do diurão comportou-se como um forte indutor de stress, confirmado pelo aumento dos níveis de ROS do sobrenadante e sedimento celular, que justificam os níveis elevados de MDA detetados, bem como a indução das atividades GR, G6PD, CAT T e CAT A, referidas anteriormente.

O aumento da atividade APx em meio YED (fermentativo) poderá justificar-se como uma resposta específica ao aumento dos níveis de ROS que envolve a interação metabólica entre o ciclo do glutatióno e o ciclo do ascorbato. Como os níveis desta atividade enzimática se encontram mais elevados em meio rico YEPD e sofreram indução em meio YED, ambos

fermentativos, leva a supor que este tipo de interação poderá ser superior em crescimento fermentativo.

Os conteúdos em fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol eram superiores em meio restritivo YED. A presença de diurão (75 μ M) provocou um aumento do conteúdo em fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol em células fermentativas, isto é, crescidas em meio YEPD e YED e um decréscimo do conteúdo em ergosterol em células respiratórias (crescidas em meio YEP). O padrão de resposta da atividade ALP sobrepõe-se ao padrão de resposta do conteúdo em ergosterol. Estes resultados sugerem que na presença de diurão em meios cuja fonte de carbono maioritária era a glucose, as leveduras poderão ter sofrido um deslocamento da homeostase do ergosterol, no sentido de acumulação desse material indispensável à proliferação e funcionalidade membranar, bem como à disponibilização de energia que assegure a sobrevivência celular.

A proporção relativa dos componentes maioritários do extrato lipídico mostrou valores significativamente superiores de fosfolípidos, triacilgliceróis e ergosterol em células crescidas em meio restritivo em peptona (YED). A proporção de fosfolípidos no extrato total aumentou em todos os ensaios de exposição ao diurão, enquanto a proporção de triacilgliceróis apenas aumentou em células fermentativas (crescidas nos meios YEPD e YED), ocorrendo resposta inversa em células respiratórias (meio YEP).

A proporção de ergosterol permaneceu significativamente superior em células crescidas em meio YED, tendo-se detetado decréscimos significativos da proporção deste esterol no extrato total em qualquer das situações de exposição ao diurão. Embora o que foi descrito para a percentagem de triacilgliceróis possa ser justificado pela carência de glucose e eventual diminuição da biossíntese de lípidos de reserva, as alterações do conteúdo relativo em ergosterol dever-se-ão provavelmente a outras causas. Este conjunto de resultados apontam para uma tendência para indução de atividade proliferativa via biossíntese de membranas, na fase final da exposição que poderá ter sido menos eficaz em meios restritivos com menor sobrevivência celular à presença do fitofármaco, provavelmente devido a acumulação diferencial de triacilgliceróis e ergosterol.

O diurão (75 μ M) mostrou-se tóxico para *S. cerevisiae* UE-ME₃, embora, na fase final da exposição existam indicadores da resposta adaptativa/proliferativa das leveduras à fenilureia, em particular quando crescidas em meios fermentativos (YEPD e YED), parecendo que os mecanismos de resposta antioxidante, entre os quais se destaca o APx, poderão contribuir para uma expansão da sobrevivência celular em meios fermentativos, isto é, na presença de glucose.

Referências Bibliográficas

- Abe F, Hiraki T (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 743–752.
- Allain C (1974) Enzymatic determination of total cholesterol, *Clinical Chemistry*, 20, 470–475.
- Altieri MA (1998) Ecological Impacts of Industrial Agriculture and the Possibilities for Truly Sustainable Farming, *Monthly Review*, 5, 60–71.
- Aquaviva J, Wong R, Charest A (2009) The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795, 37–52.
- Arias DG, Marquez VE, Beccaria AJ, Guerrero SA, Iglesias AA (2010) Purification and Characterization of a Glutathione Reductase from *Phaeodactylum tricornutum*, *Protist*, 161, 91–101.
- Avery AM, Willetts SA, Avery SV (2004) Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast GPx3 reveals its functional importance, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 46652–46658.
- Ayer A, Tan SX, Grant CM, Meyer AJ, Dawes IW, Perrone GG (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome, *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 1956–1968.
- Balakrishnan S, Takeda K, Sakugawa H (2012) Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan, *Geochemical Journal*, 46, 169–177.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Química Nova*, 29, 113–123.
- Bergmeyer H, Grabl M (1983) Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida.
- Beutler E (1994) G6PD Deficiency, *Blood*, 84, 3613–363.
- Blankenship RE (2001) Molecular evidence for the evolution of photosynthesis, *Trends in Plant Science*, 6, 4–6.
- Blankenship RE, Hartman H (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis, *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 94–97.
- Bleier L, Dröse S (2013) Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences, *Biochimica et Biophysica Acta*, xxx, xxx-xxx.

Bønsager BC, Shahpiri A, Finnie C, Svensson B (2010) Proteomic and activity profiles of ascorbate–glutathione cycle enzymes in germinating barley embryo, *Phytochemistry*, 71, 1650–1656.

Braconi D, Possenti S, Iaschi M, Geminiani M, Lusini P, Bernardini G, Santucci A (2008) Oxidative Damage Mediated by Herbicides on Yeast Cells, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 3836–3845.

Bretaudiere JP, Spillman T (1984) Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol. II, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.

Bucolo G, David E (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes, *Clinical Chemistry*, 19, 476–482.

Bulteau AL, Planamente S, Jornea L, Dur A, Lesiusse E, Camadro JM, Auchère F (2012) Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 212–225.

Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML (2010) Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15, 186–190.

Can A, Yildiz I, Guvendik G (2013) The determination of toxicities of sulphonylurea and phenylurea herbicides with quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) studies, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, 369–379.

Candeias M (2010) Stress por fenilureias. Efeitos do isoproprurão sobre o metabolismo energético de eucariotas, Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora.

Cantemir AR, Raducan A, Puiu M, Oancea D (2013) Kinetics of thermal inactivation of catalase in the presence of additives, *Process Biochemistry*, 48, 471–477.

Carmona L, Gandía M, López-García B, Marcos JF (2012) Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417, 56–61.

Castellano I, Merlino A, Rossi M, Cara FL (2010) Biochemical and structural properties of gamma-glutamyl transpeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: An enzyme specialized in hydrolase activity, *Biochimie*, 92, 464–474.

Conner AJ (1983) The Comparative Toxicity of Vineyard Pesticides to Wine Yeasts, *American Journal of Enology and Viticulture*, 34, 278–279.

Cunningham TS, Cooper TG (1991) Expression of the DAL80 gene, Whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression, *Molecular and Cellular Biology*, 11, 6205–6215.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases, *Trends in Molecular Medicine*, 9, 169–176.

Danesi EDG, Miguel ÂSM, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Pessoa Jr A (2006) Effect of carbon:nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Engineering*, 75, 96–103.

Deponte M (2012) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3217–3266.

Eriksson E, Baun A, Mikkelsen PS, Ledin A (2007) Risk assessment of xenobiotics in stormwater discharged to Harrestrup Å, Denmark, *Desalination*, 215, 187–197.

Espindola AS, Gomes DS, Panek AD, Eleutherio ECA (2003) The role of glutathione in yeast dehydration tolerance, *Cryobiology*, 47, 236–241.

Estève K, Poupot C, Dabert P, Mietton-Peuchot M, Milisic V (2009) A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1529–1534.

Ferreira R, Alves-Pereira I, Magric OS, Ferraz-Franco C (2006) Comparative effects of NH₄VO₃ on detoxication enzymes and redox state of wine *Saccharomyces*. In: Collery P (ed) Metal ions in biology and medicine. John Libbey Eurotext, 9, 169–174.

Folch J, Lees M, Stanley GHS (1956) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226:497–509.

Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674, 3–22.

Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O (2012) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 1363–1373.

Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits, *Histochemistry and Cell Biology*, 130, 263–279.

Fujiwara H, Kawai S, Murata K (2013) Significance of sulfiredoxin/peroxiredoxin and mitochondrial respiratory chain in response to and protection from 100% O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mitochondrion*, 13, 52–58.

Garcion E, Thanh XD, Bled F, Teissier E, Dehouck MP, Rigault F, Brachet P, Girault A, Torpier G, Darcy F (1996) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates 7-glutamyl transpeptidase activity in rat brain, *Neuroscience Letters*, 216, 183–186.

Garcion E, Thanh XD, Bled F, Teissier E, Dehouck MP, Rigault F, Brachet P, Girault A, Torpier G, Darcy F (1996) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain, *Neuroscience Letters*, 216, 183–186.

Giacomazzi S, Cochet N (2004) Environmental impact of diuron transformation: a review, *Chemosphere*, 56, 1021–1032.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS, *Cell*, 68, 1077–1090.

Goldberg D, Spooner R (1987) Glutathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed, Bergmayer, VCH, New York.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1–14.

Hanigan MH (1998) γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis, *Chemico-Biological Interactions*, 111–112, 333–342.

Hissin A, Hilf PJ (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Analytical Biochemistry*, 74, 214–226.

Hussein AS, Walter RD (1996) Purification and characterization of γ -glutamyl transpeptidase from *Ascaris suum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 77, 41–47.

Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A (1999) Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 17, 27002–27009.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 368, 73–76.

Janda T, Szalai G, Tari I, Páldi E (1998) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays L.*) plants, *Planta*, 208, 175–180.

Jezek P, Hlavat L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 2478–2503.

Kho CW, Lee PY, Bae KH, Cho S, Lee ZW, Park BC, Kang S, Lee DH, Park SG (2006) Glutathione peroxidase 3 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates the activity of methionine sulfoxide reductase in a redox state-dependent way, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, 25–35.

Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ (2010) Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells, *Biochimie*, 92, 927–932.

Koksharov M, Lv C, Zhai X, Ugarova N, Huang E (2013) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase IV acquires activity only late at the stationary phase when produced in *Escherichia coli*. Overexpression and characterization of the recombinant enzyme, *Protein Expression and Purification*, 90, 186–194.

Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, Zimmermann R, Leber R, Zechner R, Kohlwein SD (2006) Obese Yeast: Triglyceride Lipolysis Is Functionally Conserved from Mammals to Yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 491–500.

LeBel PC, Ischiropoulos H, Bondys CS (1990) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Journal of Chemical Research*, 5, 227–231.

Lin SJ, Ford E, Haigis M, (2013) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH, *Genes & Development*, 18, 12–16.

Linder CH, Englund UH, Narisawa S, Millán JL, Magnusson P (2013) Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum, *Bone*, 53, 399–408.

Liu JL, Zabetakis D, Lee AB, Goldman ER, Anderson GP (2013) Single domain antibody–alkaline phosphatase fusion proteins for antigen detection — Analysis of affinity and thermal stability of single domain antibody, *Journal of Immunological Methods*, 393, 1–7.

Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Jones CS, Rasmussen S (2013) Functional characterisation and transcript analysis of an alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*, *Fungal Genetics and Biology*, 54, 52–59.

Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, Greve T, Callesen H (2007) Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and

GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts, *Theriogenology Journal*, 68, 223–236.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–75.

Marcolin E (2008) Avaliação do Potencial Antioxidante do Croton cajuçara Benth e Seus Efeitos Sobre o Estresse Oxidativo no Diabetes Mellitus Experimental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre.

Maris AF, Assumpção ALK, Bonatto D, Brendel M, Henriques JAP (2001) Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria, *Current Genetics*, 39, 197–149.

Martin CE, Seok Oh C, Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 271–285.

Maté MJ, Zamocky M, Nykyri LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Koller F, Fita I (1999) Structure of Catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Molecular Biology*, 268, 135–149.

Mattina MJI (1991) Carrier effect in the analysis of phenylurea herbicides using high-performance liquid chromatography – particle beam-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 549, 237–245.

Mccords JM, Fridovich I (1969) Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6065.

Meister A (1988) Glutathione Metabolism and Its Selective Modification, *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 17205–17208.

Méndez D, Linares M, Diez A, Puyet A, Bautista JM (2011) Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A– deficiency, *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 1305–1313.

Merck (1996) The Merck Index 12th Edition, Merck and Co, Inc, New Jersey.

Moncada A (2004) Environmental Fate of Diuron, CA 95812-4015, Sacramento.

Morais AJ, Bera S, Rachidi W, Gann PH, Diamond AM (2013) The effects of selenium and the GPx-1 selenoprotein on the phosphorylation of H2AX, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3399–3406.

Najafpour MM, Pashaei B (2012) Photosynthesis: How and Why?, *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, InTech, Rijeka.

Navrot N, Finnie C, Svensson B, Hägglund P (2011) Plant redox proteomics, *Journal of Proteomics*, 74, 1450–1462.

Nicholls P (2012) Classical catalase: Ancient and modern, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525, 95–101.

Nie Y, He JL, Hsia SL (1993) A micro enzymic method for determination of choline-containing phospholipids in serum and high density lipoproteins, *Lipids*, 28, 949–951.

Ochoa-Estopier A, Lesage J, Gorret N, Guillouet SE (2011) Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol, *Bioresource Technology*, 102, 1521–1527.

Onishi HR, Tkacz JS, Lampen JO (1979) Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. Formation of active enzyme in the presence of tunicamycin, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 11943–11952.

Ortuño C, Martínez-Pastor MT, Mulet A, Benedito J (2012) Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages, *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 8–15.

Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F (2002) Heat stress and heat shock transcription factor – Dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 129, 838–853.

Parfitt RL, Yeates GW, Ross DJ, Schon NL, Mackay AD, Wardle DA (2010) Effect of fertilizer, herbicide and grazing management of pastures on plant and soil communities, *Applied Soil Ecology*, 45, 175–186.

Parks HD, Beeser AE, Clancy MJ, Cooper TG (1996) The *S. cerevisiae* Nitrogen Starvation-Induced Yvh1p and Ptp2p Phosphatases Play a Role in Control of Sporulation, *Yeast*, 12, 1135–1151.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta*, 333, 19–39.

Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP (1989) Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 468–477.

Priora R, Coppo L, Margaritis A, Giuseppe DD, Frosali S, Summa D, Heo J, Simplicioni PD (2010) The control of S-thiolation by cysteine via gamma-

glutamyltranspeptidase and thiol exchanges in erythrocytes and plasma of diamide-treated rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242, 333–343.

Prosser BL, Khairallah RJ, Ziman AP, Ward CW, Lederer WJ (2013) X-ROS signaling in the heart and skeletal muscle: Stretch-dependent local ROS regulates $[Ca^{2+}]_i$, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58, 172–181.

Quintas A, Freire AP, Halpern MJ (2008) Bioquímica – Organização Molecular da Vida, Edições Lidel, Lisboa.

Rakauskien GA, Cénas NK, Kulys JJ (1989) A “branched” mechanism of the reverse reaction of yeast glutathione reductase. An estimation of the enzyme standard potential values from the steady-state kinetics data, *FEBS Letters*, 243, 33–36.

Ratray JBM, Schibeci A, Kidby DK (1975) Lipids of Yeasts, *Bacteriological Reviews*, 39, 197–231.

Ristoff E, Larsson A (1998) Patients with genetic defects in the γ -glutamyl cycle, *Chemico-Biological Interactions*, 111–112, 113–121.

Romero A, Santos A, Vicente F, González G (2010) Diuron abatement using activated persulphate: Effect of pH, Fe(II) and oxidant dosage, *Chemical Engineering Journal*, 162, 257–265.

Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JAG, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto JM, Margis R, Margis-Pinheiro M (2010) Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice, *Phytochemistry*, 71, 548–558.

Rosado T, Conim A, Alves-Pereira I, Ferreira R (2009) Vanadium pentoxide effects on stress responses in wine *Saccharomyces cerevisiae* strain UE-ME₃, *Ecotoxicology*, 18, 1116–1122.

Rothman JH, Hunter CP, Valls LA, Stevens TH (1986) Overproduction-induced mislocalization of a yeast vacuolar protein allows isolation of its structural gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 3248–3252.

Rowe LA, Degtyareva N, Doetsch PW (2008) DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*, *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 1167–1177.

Schrader M, Dariush FH (2006) Peroxisomes and oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1755–1766.

Shi XL, Shi ZH, Feng MQ, Ye L, Zhu HY, Li JY, Ju DW, Zhou P (2013) High expression of recombinant human catalase and its immunomodulatory effects on H1N1 influenza virus infection, *Process Biochemistry*, 48, 588–592.

Sørensen SR, Albers CN, Aamand J (2008) Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Cariovorax sp.* Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2332–2340.

Souvannavong V, Lemaire C, Nay D, Brown S, Adam A (1995) Expression of alkaline phosphatase by a B-cell hybridoma and its modulation during cell growth and apoptosis, *Immunology Letters*, 47, 163–170.

Szasz G (1976) Reaction-rate method for γ -glutamyltransferase activity in serum, *Clinical Chemistry*, 22, 2051–2055.

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase, *Nature*, 306, 284–287.

Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I (1977) A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids, *Clinica Chimica Acta*, 79, 93–98.

Tanaka K, Kitamura N, Chujo Y (2012) Heavy metal-free ^{19}F NMR probes for quantitative measurements of glutathione reductase activity using silica nanoparticles as a signal quencher, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 96–100.

Todorova T, Petrova V, Vuilleumier S, Kujumdzieva A (2009) Response to different oxidants of *Saccharomyces cerevisiae* ure2 Δ mutant, *Archives of Microbiology*, 191, 837–845.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *The Journal of Physiology*, 552.2, 335–344.

Vance JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 7248–7256.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação, *Química Nova*, 30, 1323–1338.

Voet D, Voet JG (2011) Electron Transport and Oxidative Phosphorylation in Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Walther U, Czermak A, Muckter H, Walther S, Fichtl B (2003) Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines, *Archives of Toxicology*, 77, 131–137.

Werber M, Gabrielson DG, Eastman J (1981) Ultramicro determination of serum triglycerides by bioluminescent assay, *Clinical Chemistry*, 27, 268–271.

Yagi K (1976) A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochemical Medicine*, 15, 212–216.

Zandycke SMV, Sohler PJ, Smart KA (2002) The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 365–373.

Zhao X, Zhang Y, Strong R, Grotta JC, Aronowski J (2006) 15d-Prostaglandin J2 activates peroxisome proliferator-activated receptor-c, promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26, 811–820.

ANEXO

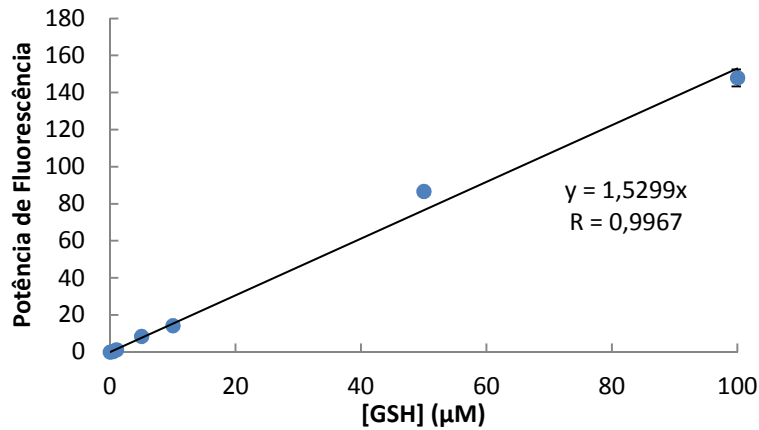


Figura A1. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura de soluções padrão de GSH (0-100 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

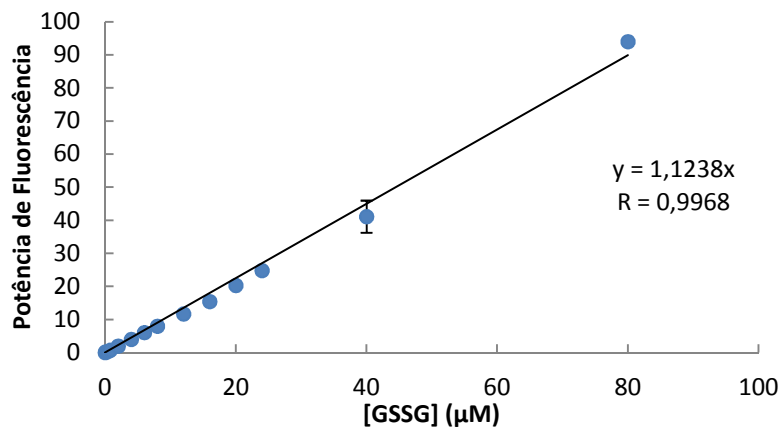


Figura A2. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura de soluções padrão de GSSG (0-80 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

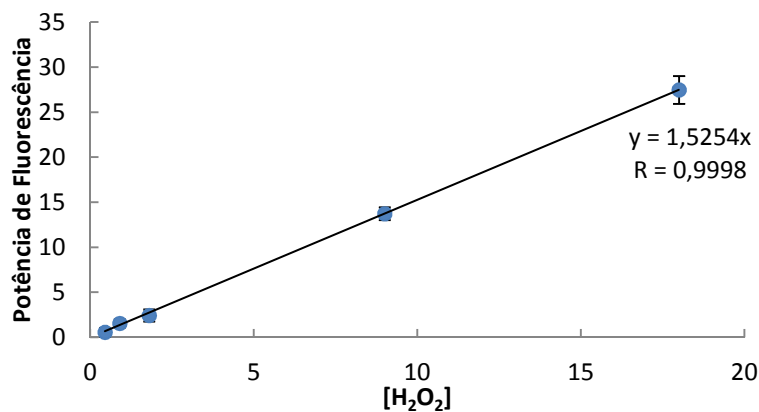


Figura A3. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura de soluções padrão de H_2O_2 (0,45-18 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

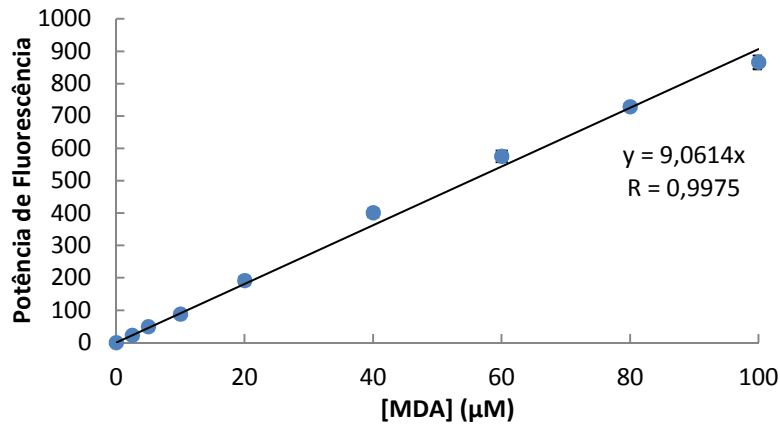


Figura A4. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura de soluções padrão de MDA(0-100 µM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

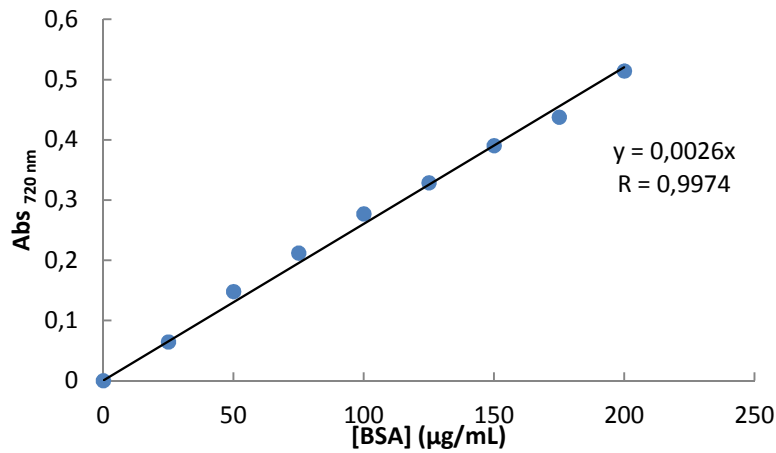
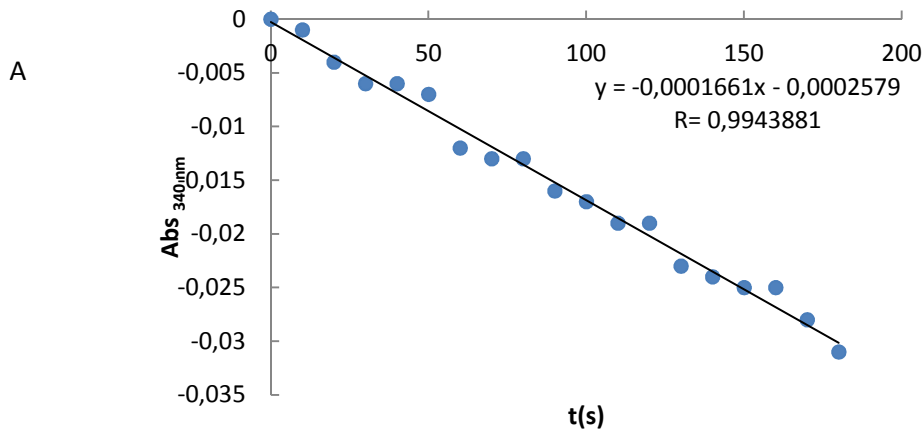


Figura A5. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.



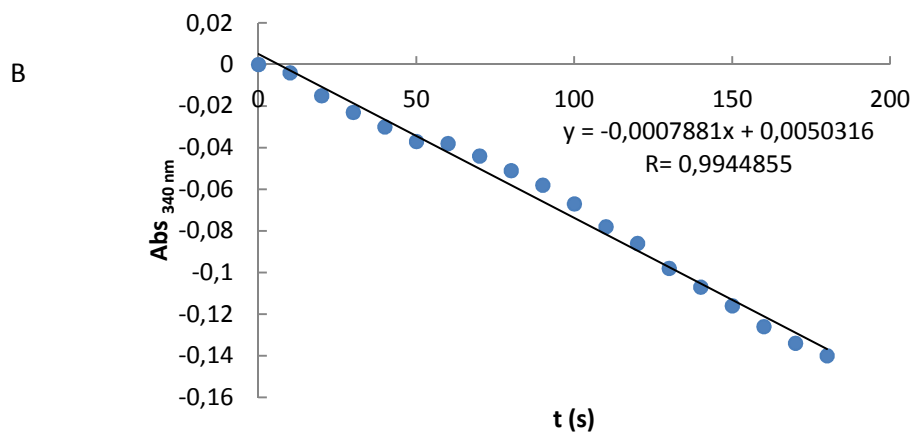


Figura A6. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YEPD₇₅ (B).

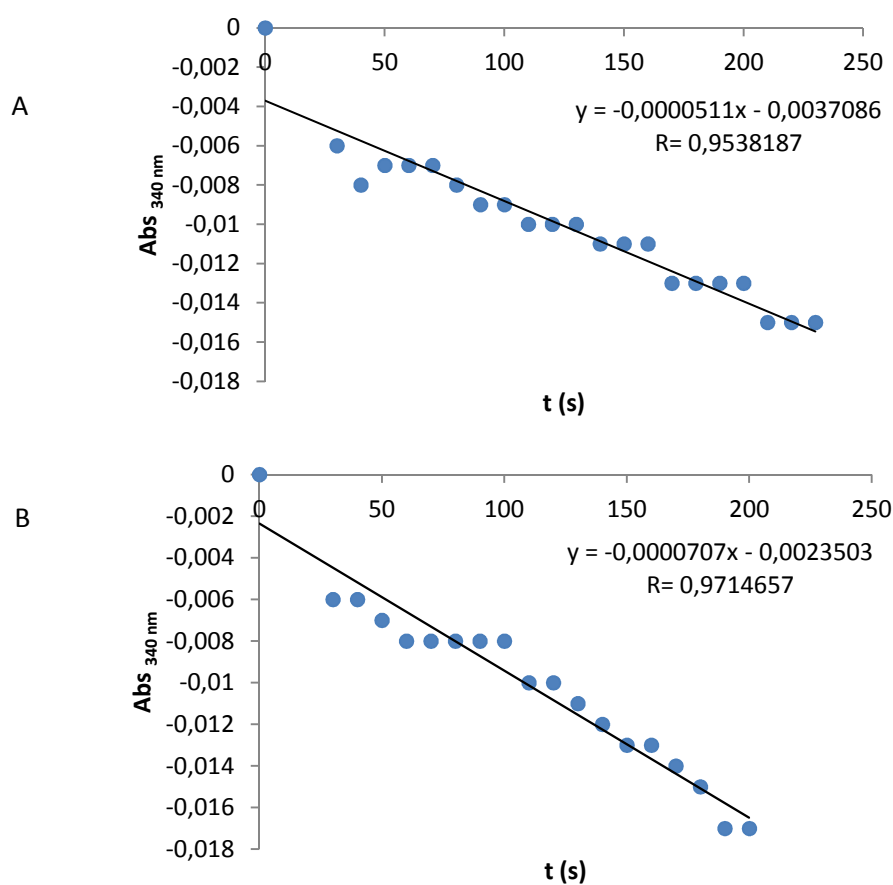


Figura A7. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GPx de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YEP₀ (B).

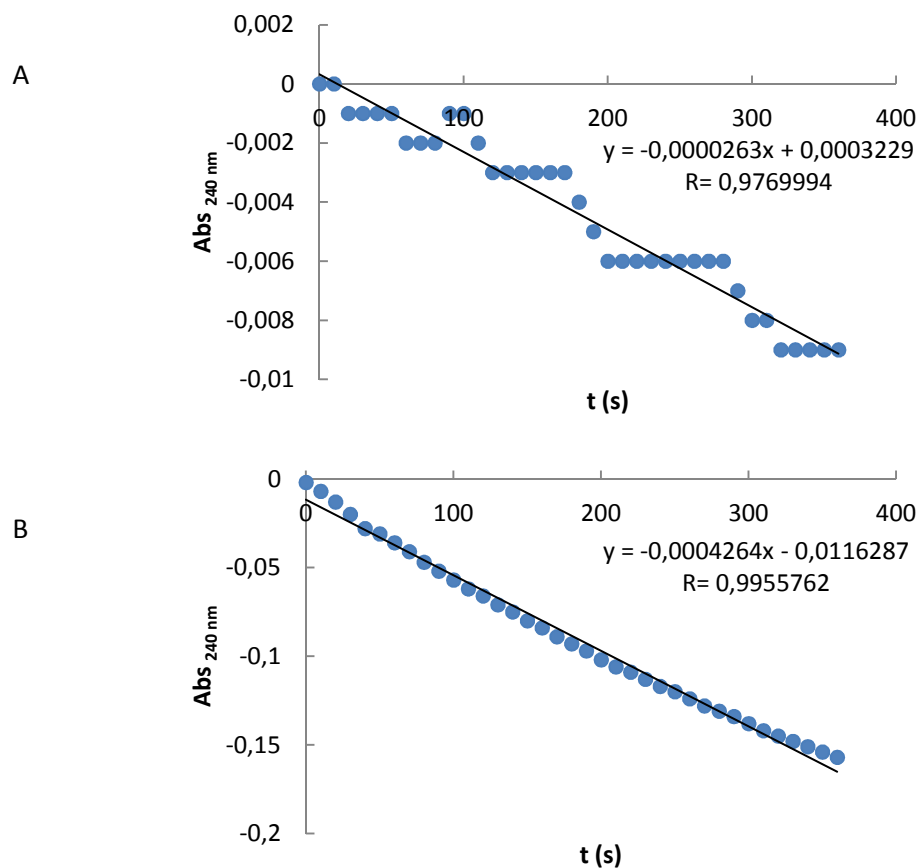
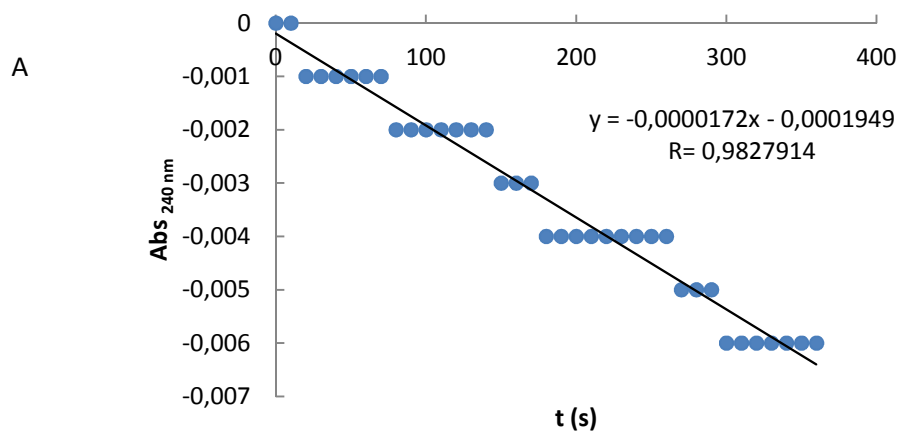


Figura A8. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CAT T de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPA₀ (A) e YEP₇₅ (B).



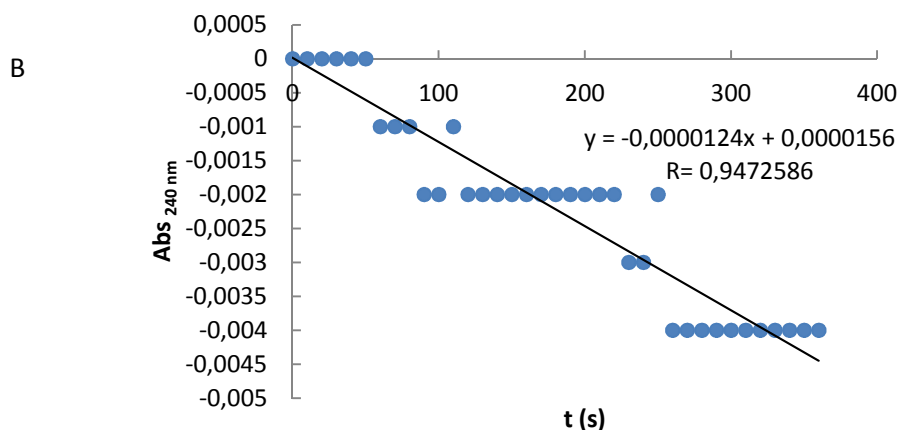


Figura A9. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CAT A de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YED₀ (B).

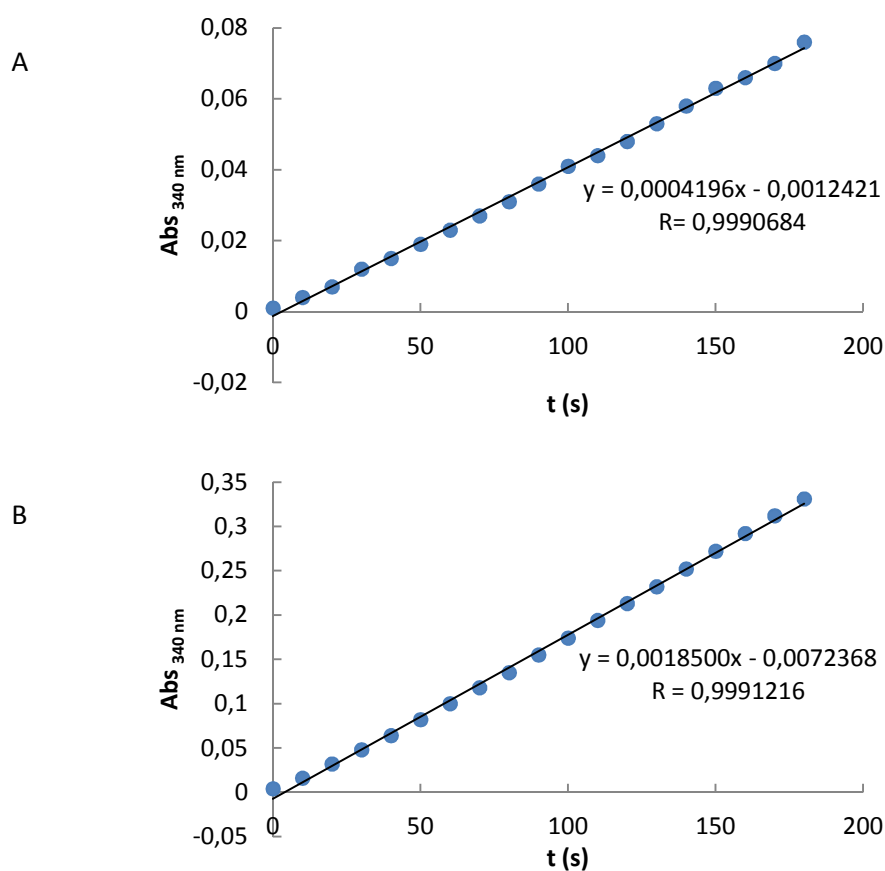


Figura A10. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YED₇₅ (B).

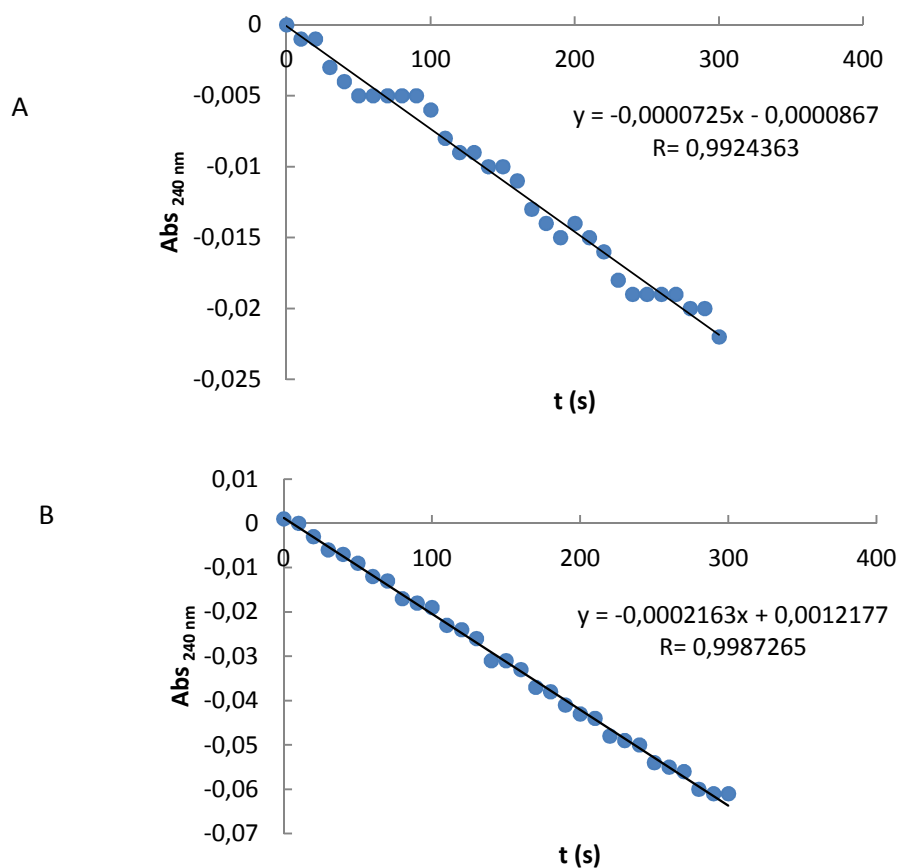
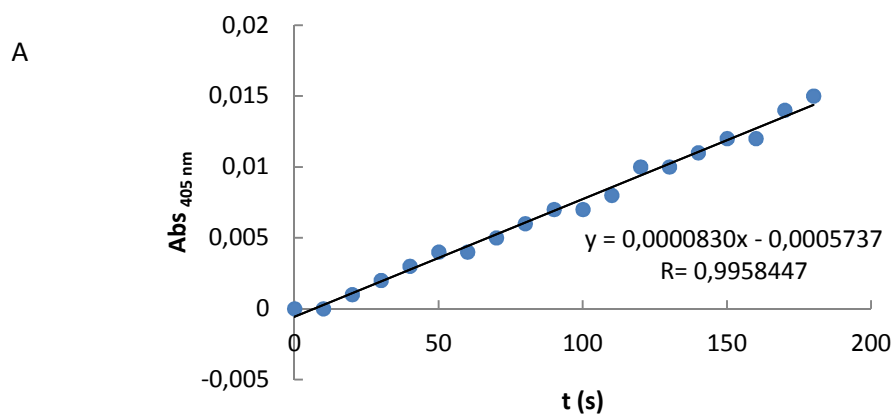


Figura A11. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática APX de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YEPD₇₅ (B).



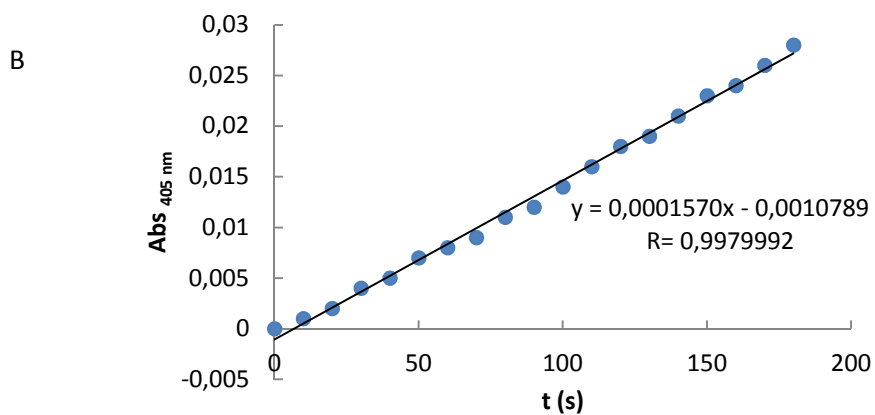


Figura A12. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YEP₀ (B).

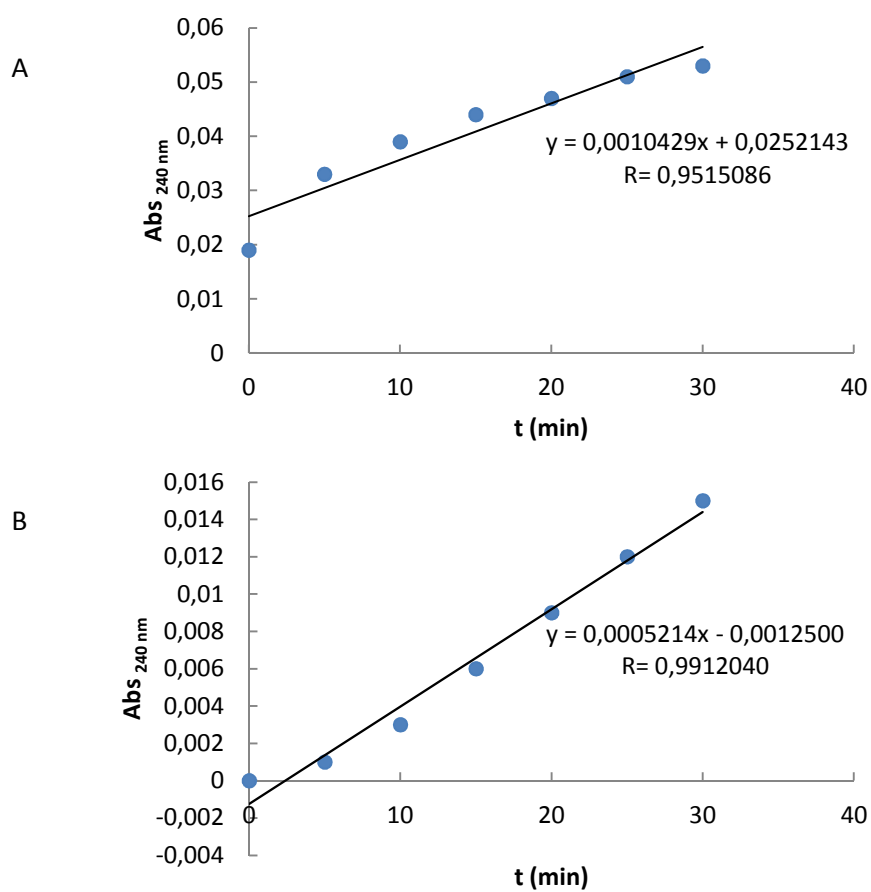


Figura A13. Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática γ -GT de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD₀ (A) e YEP₇₅ (B).

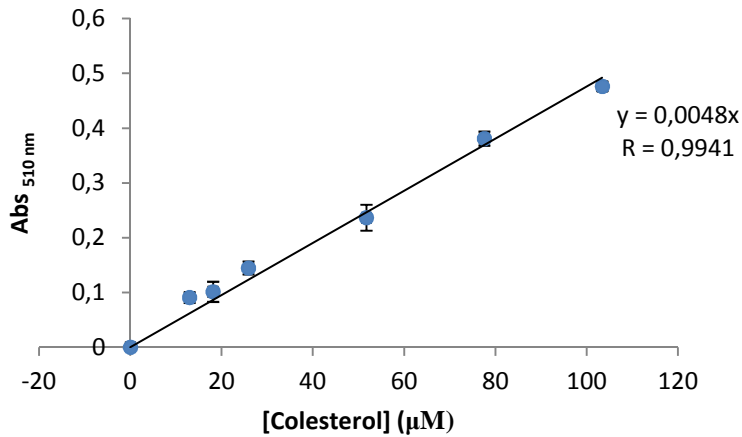


Figura A14. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Ergosterol, construída a partir da leitura de soluções padrão de Colesterol (0-103,4 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

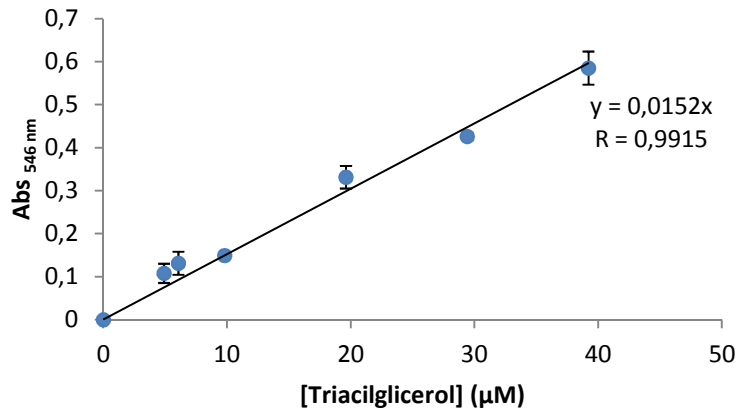


Figura A15. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Triacilglicerol, construída a partir da leitura de soluções padrão de Triacilglicerol (0-39,2 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

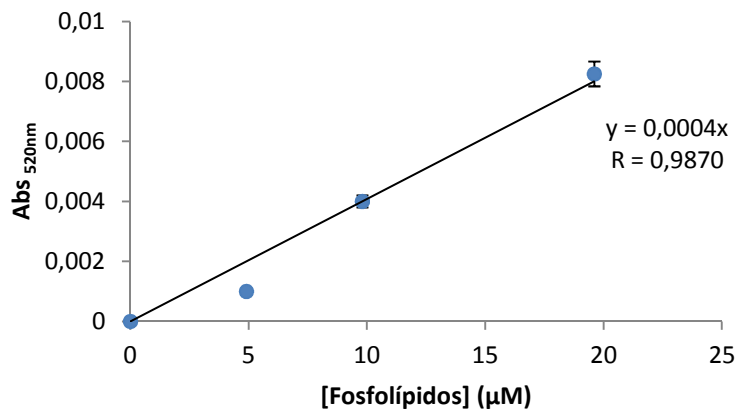


Figura A16. Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de Fosfolípidos, construída a partir da leitura de soluções padrão de Fosfolípidos (0-19,6 μM). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.

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

Parametro	Orig variância	Soma quadrados	GL	Variância	F	Sig.
Peso Seco	Entre grupos	2422,749	5	484,550	1075,450	,000
	No interior de grupos	10,813	24	,451		
	Total	2433,562	29			
Lípidos Totais	Entre grupos	37,926	5	7,585	11,066x10 ³²	,000
	No interior de grupos	,000	24	,000		
	Total	37,926	29			
Proteína Total	Entre grupos	3529567,407	5	705913,481	2477,855	,000
	No interior de grupos	6837,333	24	284,889		
	Total	3536404,741	29			
Soma Glutatio	Entre grupos	204,806	5	40,961	1870,031	,000
	No interior de grupos	,526	24	,022		
	Total	205,331	29			
GSH+GSSG	Entre grupos	160,911	5	32,182	1450,412	,000
	No interior de grupos	,533	24	,022		
	Total	161,443	29			
GSH+GSSG Sedimento	Entre grupos	2748069,221	5	549613,844	574,732	,000
	No interior de grupos	22951,098	24	956,296		
	Total	2771020,319	29			
ALP	Entre grupos	7400,088	5	1480,018	993,751	,000
	No interior de grupos	35,744	24	1,489		
	Total	7435,831	29			
cfu	Entre grupos	679x10 ¹³	5	136x10 ¹³	780,450	,000
	No interior de grupos	417x10 ¹¹	24	174x10 ¹⁰		
	Total	683x10 ¹³	29			
GSH	Entre grupos	26,408	5	5,282	501,202	,000
	No interior de grupos	,253	24	,011		
	Total	26,661	29			
GSSG	Entre grupos	57,236	5	11,447	218,618	,000
	No interior de grupos	1,257	24	,052		
	Total	58,492	29			
GSH/GSSG	Entre grupos	,766	5	,153	11,166	,000
	No interior de grupos	,329	24	,014		
	Total	1,095	29			
ROS	Entre grupos	3240278,999	5	648055,800	156,347	,000
	No interior de grupos	99479,426	24	4144,976		
	Total	3339758,425	29			
GSH Sedimento	Entre grupos	1402333,310	5	280466,662	596,423	,000
	No interior de grupos	11285,955	24	470,248		
	Total	1413619,266	29			
GSSG Sedimento	Entre grupos	279652,827	5	55930,565	103,884	,000
	No interior de grupos	12921,526	24	538,397		
	Total	292574,353	29			
GSH/GSSG Sedimento	Entre grupos	14,226	5	2,845	37,760	,000
	No interior de grupos	1,808	24	,075		
	Total	16,035	29			
ROS Sedimento	Entre grupos	553601,194	5	110720,239	6,626	,001
	No interior de grupos	401042,384	24	16710,099		
	Total	954643,578	29			
MDA	Entre grupos	4419982,843	5	883996,569	108,588	,000
	No interior de grupos	195380,209	24	8140,842		
	Total	4615363,051	29			
GR	Entre grupos	83985,930	5	16797,186	96,186	,000
	No interior de grupos	4191,179	24	174,632		
	Total	88177,109	29			
GPX	Entre grupos	1077,006	5	215,401	20,815	,000
	No interior de grupos	248,359	24	10,348		
	Total	1325,365	29			
G6PD	Entre grupos	511309,070	5	102261,814	214,133	,000
	No interior de grupos	11461,472	24	477,561		
	Total	522770,542	29			
CAT T	Entre grupos	808,574	5	161,715	1429,195	,000
	No interior de grupos	2,716	24	,113		
	Total	811,290	29			
CAT A	Entre grupos	5550,421	5	1110,084	2787,851	,000
	No interior de grupos	9,556	24	,398		
	Total	5559,977	29			
APX	Entre grupos	4470,242	5	894,048	30,866	,000
	No interior de grupos	695,168	24	28,965		
	Total	5165,410	29			
GGT	Entre grupos	5,454	5	1,091	3,824	,011
	No interior de grupos	6,847	24	,285		
	Total	12,301	29			

Diurão: resposta por sistemas antioxidantes e energéticos de *Saccharomyces cerevisiae*
Hugo Tenda

Parametro	Orig variância	Soma quadrados	GL	Variância	F	Sig.
Fosfolípidos	Entre grupos	15,887	5	3,177	68,787	,000
	No interior de grupos	1,109	24	,046		
	Total	16,995	29			
Triacilglicerol	Entre grupos	33,045	5	6,609	591,339	,000
	No interior de grupos	,268	24	,011		
	Total	33,314	29			
Ergosterol	Entre grupos	8,448	5	1,690	66,465	,000
	No interior de grupos	,610	24	,025		
	Total	9,058	29			