



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Toxicidade pelo antimónio
e vanádio em
*Saccharomyces cerevisiae***

Joana Cordeiro da Costa

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Toxicidade pelo antimónio e vanádio em *Saccharomyces cerevisiae*

Joana Cordeiro da Costa

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Este trabalho experimental não teria tido sucesso sem a intervenção de várias pessoas e órgãos institucionais que contribuíram para alcançar os objetivos pretendidos. Posto isto não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos:

- Aos meus orientadores, Prof. Rui Ferreira e Prof.^a Isabel Alves Pereira, pela sua disponibilidade, dedicação, boa disposição, auxílio nas dificuldades surgidas ao longo de todo o trabalho, bem como pela enorme paciência sempre demonstrada;
- Ao Departamento de Química, da Universidade de Évora, pelas facilidades proporcionadas à realização deste trabalho;
- À Marta, Joana, Joana Pavoeiro, Juliana, Hugo e Tiago pelo companheirismo e ajuda demonstrados dentro e fora do laboratório;
- À Raquel, Mariana e Patrícia pela amizade e paciência que tiveram para comigo ao longo de todos estes anos;
- À Carol pelas inúmeras vezes que me ajudou a levantar quando eu pensava que já não conseguia e me fez ser persistente para conseguir terminar este trabalho;
- Ao Ricardo, por ficar sempre do meu lado, por me ajudar mesmo quando eu ficava com mau feitio, por me fazer rir quando só me apetecia chorar enfim, por todo o companheirismo demonstrado ao longo destes anos;
- Aos meus pais e avós, por sempre me terem apoiado em todas as circunstâncias e porque sem eles nada disto seria sequer possível. Muito obrigada mesmo!

Índice Geral

Índice de Figuras	iv
Resumo.....	vii
Abstract	ix
1. Fundamento teórico.....	1
1.1 Antimónio.....	1
1.2 Vanádio	3
1.3 Efeito sinérgico dos metais.....	5
1.4 Espécies reativas de oxigénio e sistemas antioxidantes	6
1.5 Stresse oxidativo.....	7
1.6 Sistemas antioxidantes	10
1.7 Fosfatase alcalina	11
1.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , modelo de estudo da resposta ao stresse.....	12
2. Problemática e objectivos.....	15
2.1 Problemática.....	15
2.2 Objectivo geral	16
2.3 Objectivos específicos	16
3. Metodologia.....	17
3.1 Estratégia	17
3.2 Diagrama do trabalho	19
3.3 Procedimento experimental	20
3.4 Equipamento.....	25
3.5 Reagentes.....	25
4. Resultados e discussão	27
5. Conclusões	39
6. Referências bibliográficas	41
Anexos.....	47

Índice de Figuras

Fig. 1.1: A poluição do ar, a radiação ionizante, luz UV, semi-metals e metais de transição, pesticidas entre outros, induzem a formação de ROS e NOS, envolvendo as vias de sinalização que são ativadas em resposta ao stresse oxidativo (OS).....	9
Fig. 1.2: representação ilustrativa da interação metabólica entre o ciclo do glutatióno, vias de conjugação de xenobióticos, vias das pentoses fosfato e catalases.....	11
Fig. 1.3: Perfil de crescimento característico das leveduras (A) fase “lag”; (B) fase exponencial de crescimento; (C) fase estacionária; (D) fase de morte ou senescência.....	13
Fig. 4.1: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a turbidez (A), peso seco (B) e proteína do sobrenadante (C) e sedimento (D) pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	28
Fig. 4.2: A- Imagem fotográfica de placas (diluição de 10 ⁻⁵); B- unidades formadoras de colónias e C- atividade enzimática fosfatase alcalina do sobrenadante pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas, durante 72 h, em meio YEPD, na ausência ou na presença de cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM).....	29
Fig. 4.3: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre o glutatióno (A), dissulfureto de glutatióno (B), soma do glutatióno e dissulfureto de glutatióno (C) e razão glutatióno/ dissulfureto de glutatióno (D) do sobrenadante pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	32
Fig. 4.4: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre o glutatióno (A), dissulfureto de glutatióno (B), soma do glutatióno e dissulfureto de glutatióno (C) e razão glutatióno/ dissulfureto de glutatióno (D) do sedimento pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	34
Fig. 4.5: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a atividade enzimática do glutatióno redutase (A), glutatióno peroxidase (B) e glucose-6-fosfato desidrogenase (C) do sobrenadante pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	36
Fig. 4.6: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a atividade enzimática da catalase T do sobrenadante pós 12000 g (A) e da catalase A do sedimento pós 12000 g (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	37
Fig. 4.7: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre as espécies reativas de oxigénio (A) e malonodialdeído (B) do sobrenadante pós 12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME3 crescidas em meio YEPD.....	38

Fig. A1: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteína, construída a partir da leitura da absorvência da solução padrão (50 - 200 µg/mL).....	49
Fig. A2: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0,25 -5 µM).	49
Fig. A3: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0,4 e 12 µM).....	50
Fig. A4: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (2,5 -100 M).....	50
Fig. A5: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-400 µM).	51
Fig. A6: Representação da curva de reacção da atividade enzimática ALP para o controlo (a), para o SbCl ₃ (b) e para o NH ₄ VO ₃ (c)	51
Fig. A7: Representação da curva de reacção da atividade enzimática GR para o controlo (a), para o NH ₄ VO ₃ (b) e para a mistura SbCl ₃ + NH ₄ VO ₃ (c)	52
Fig. A8: Representação da curva de reacção da atividade enzimática GPx para o controlo (a), para o para o SbCl ₃ (b) e para a mistura SbCl ₃ + NH ₄ VO ₃ (c)	52
Fig. A9: Representação da curva de reacção da atividade enzimática G6PD para o controlo (a), para o SbCl ₃ (b) e para a mistura SbCl ₃ + NH ₄ VO ₃ (c).....	53
Fig. A10: Representação da curva de reacção da atividade enzimática CAT T para o controlo (a), para o SbCl ₃ (b) e para NH ₄ VO ₃ (c).....	53
Fig. A11: Representação da curva de reacção da atividade enzimática CAT A para o controlo (a), para o NH ₄ VO ₃ (b) e para a mistura SbCl ₃ + NH ₄ VO ₃ (c).	54

Índice de Quadros

Quadro A1: Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de <i>S. cerevisiae</i> UE- ME ₃ , crescidas em meio YEPD, na ausência e na presença dos agentes de stresse em estudo	55
--	----

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

- $\bullet\text{O}_2^-$ - radical anião superóxido
- $\bullet\text{OH}$ - radical hidroxilo
- ALP- Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
- CAT - catalase (EC 1.11.1.6)
- cfu – unidades formadoras de colónias
- CMA – concentração máxima admissível
- CYP – Citocromo P450
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EPA – Agência de proteção ambiental norte- americana
- G6PD- Glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
- GPx- Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
- GR- Glutationo redutase (EC 1.8.1.7)
- GSH – glutationo
- GSSG – dissulfureto de glutationo
- GST – Glutationo-S-transferase (EC 2.5.1.18)
- MDA- malonodialdeído
- NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
- Pi – Fosfato inorgânico
- pNPP- *p*- nitrofenol
- PUFA's – ácidos gordos polinsaturados
- RNS – espécies reativas de azoto
- ROS – espécies reativas de oxigénio
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- SOD- superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
- t- BHP – t-butil hidroperóxido
- TBA – ácido tiobarbitúrico
- YEPD - Yeast Extract Peptone Dextrose

Resumo

O principal alvo deste trabalho foi avaliar os efeitos do cloreto de antimónio e do metavanadato de amónio no crescimento celular e na resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. O cloreto de antimónio induziu morte celular, com decréscimo do poder redutor intracelular e aumento do conteúdo em espécies reativas de oxigénio. O metavanadato de amónio revelou-se mais tóxico, induzindo perda da viabilidade celular com decréscimo dos níveis de tióis não proteicos, do poder redutor celular e aumentando o conteúdo em espécies reativas de oxigénio e malonodialdeído. A exposição simultânea ao antimónio (III) e vanádio (V) desencadeou efeitos cooperativos que tornaram o ambiente celular mais oxidante, com decréscimo da viabilidade celular, aumento das atividades fosfatase alcalina, glutatióno redutase, glutatióno peroxidase, glucose-6-fosfato desidrogenase e catalase citoplasmática e peroxissomal, bem como do conteúdo em espécies reativas de oxigénio e malonodialdeído que eventualmente despoletaram uma transição necrose – apoptose.

Antimony and vanadium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effects of antimony chloride and ammonium metavanadate in cell growth and antioxidant response of *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. The antimony chloride induced cell death decreasing cell reducing power and increasing reactive oxygen species content. The ammonium metavanadate proved to be more toxic, inducing loss of cell viability, increasing non-protein thiols levels, cell reducing power and cell contents in reactive oxygen species and malondialdehyde. The simultaneous exposure to antimony (III) and vanadium (V) triggered cooperative effects that shifted cell environment to more oxidizing, decreasing cell viability and increasing alkaline phosphatase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and peroxisomal and cytoplasmic catalase activities, as well as an increasing reactive oxygen species and malondialdehyde contents that may have triggered a transition necrosis – apoptosis.

1. Fundamento teórico

1.1 Antimónio

O antimónio (Sb) é um elemento químico semimetálico, tri ou pentavalente de cor branco-prateado, quebradiço e brilhante, localizado no grupo 15 e período 5 da tabela periódica. Apresenta número atómico 51 e massa molar 121,760 g/mol (Alloway, 2013).

Foram encontrados fragmentos de uma base de antimónio em escavações, que remontam a 4000 aC. Diversos documentos atestam que os alquimistas e charlatães terão usado compostos de antimónio em medicina, veterinária e cosmética. É incrível que este metalóide tenha sido prescrito no passado, como o medicamento universal para sífilis, dores no peito, praga, melancolia e especialmente para a febre (Smichowski, 2008). Por outro lado, a utilização do antimónio e do chumbo no período romano está associada a uma longa história de contaminação de águas, sedimentos e solos.

A partir dos anos 90 do século XX, a utilização do Sb expandiu-se em escopo, sendo aplicado maioritariamente na preparação de ligas, pigmentos, tintas, produtos farmacêuticos, corantes para papel e tecidos e na vulcanização da borracha (Smichowski, 2008). A utilização atual do Sb inclui ainda: catálise na produção de PET (Politereftalato de etileno), estruturante de calços de travões (como S_3Sb_2), revestimento de cabos, munições e rolamentos, bem como retardador de chama em produtos adesivos, papel, borracha e têxteis. Fontes naturais, como é o caso das minas de antimónio, uma grande parte situada na China (He, 2012), são também responsáveis por emissões deste elemento para o ambiente (Smichowski, 2008).

O antimónio é potencialmente tóxico para níveis de exposição muito baixos e não se encontra descrito para este elemento qualquer função biológica. A sua toxicidade depende do estado de oxidação em que se encontra, presença de ligantes e solubilidade dos seus compostos. O Sb elementar é mais tóxico do que os seus sais e as espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas, devido à forte ligação de Sb(III) e Sb(V) com grupos -SH presentes em muitas proteínas, que levam possivelmente, à inativação de centros funcionais biologicamente relevantes. A espécie trivalente é estável em solução aquosa, porém o mesmo não acontece com a espécie pentavalente. Ao sofrer hidrólise, as espécies de Sb formam os compostos $[Sb^{3+}(OH)_3]$ e $[Sb^{5+}(OH)_6]^{-1}$. O Sb(III), sob a forma de $[Sb(OH)_3]_0$, não apresenta carga elétrica, fato que facilita a sua fácil passagem pela membrana celular. Esta característica provavelmente explica a razão pela qual o antimónio trivalente tem um efeito tóxico mais

acentuado do que o pentavalente. Os compostos de Sb (III) são cerca de 10 vezes mais tóxicos do que os de Sb (V) (Krachler, 2001).

O reconhecimento da toxicidade exercida pelo antimónio conduziu ao estabelecimento de legislação ambiental que estabeleceu níveis de concentração máxima admissíveis (CMA) em água potável e no meio ambiente. A agência de proteção ambiental norte americana (EPA) considera o Sb e seus compostos como poluidores prioritários (EPA, 2008). A União Europeia e o Japão determinaram que a CMA para o Sb em água potável seja entre 2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sánchez-Martínez, 2013).

A Organização Mundial de Saúde recomenda que a CMA de Sb em água potável não ultrapasse 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, não foi classificado, por nenhuma destas agências quanto ao seu efeito cancerígeno (U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS) on Antimony, 1999).

O mecanismo responsável pela genotoxicidade do antimónio não se encontra estabelecido, não existindo evidências experimentais que demonstrem que o Sb possa ser desintoxicado pela via de metilação detetada em mamíferos para o arsénio (Smichowski, 2008).

Diversos grupos de investigação têm investido na caracterização do Sb em vários aspetos, incluindo a sua determinação em matrizes ambientais. Wilson (2009) apresentou uma revisão abrangente, cobrindo os diferentes aspetos dos impactos antrópicos sobre a biogeoquímica e ciclo do antimónio comparativamente com o do arsénio. Foi dada especial atenção às emissões atmosféricas de Sb para o meio ambiente e a sua ocorrência na atmosfera, solos, sedimentos, plantas e águas (Shtangeeva, 2011).

Também foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre a emissão de Sb e áreas de tráfego automóvel intenso. Quiroz (2013) identificou uma forte associação entre a concentração de antimónio em folhas mais velhas de árvores e a distância das mesmas em relação às áreas de trânsito de veículos.

Apesar de tudo o que está acima descrito, existe uma lacuna no nosso conhecimento sobre muitos aspetos do antimónio, como a sua entrada direta e posterior integração no ciclo biogeoquímico do meio ambiente. Esses aspetos foram muito menos estudados comparativamente com os de outros elementos como As, Cr, Hg e Pb uma vez que apenas alguns grupos se concentraram para estudar os aspetos relacionados com Sb em aerossóis atmosféricos (Smichowski, 2008).

1.2 Vanádio

Na crosta terrestre, o vanádio é o décimo nono elemento mais abundante, com uma concentração média de 136 ppm. Encontra-se ubiquamente distribuído por rochas, solos, plantas, animais, existindo em menor extensão em águas, onde os níveis raramente excedem 0,1 ppb (Cun-xiong, 2009).

No ambiente, não existe no estado elementar, mas antes como mineral. A maior parte dos países extrai o vanádio a partir de combustíveis fósseis como o crude (4%), o carvão ou o alcatrão. Nestes materiais, o vanádio encontra-se maioritariamente na forma de porfirinas de vanadilo, existentes também em sistemas vivos. Estes complexos são depois convertidos a quente em pentóxido de vanádio, V_2O_5 , constituindo o principal material de origem para a produção de todos os compostos de vanádio. Durante este processo acabam por ser libertados para a atmosfera quantidades elevadas deste composto, que podem causar problemas tais como a catálise da conversão de SO_2 em SO_3 implicada na génese das chuvas ácidas (Cun-xiong, 2009).

O vanádio é largamente utilizado pela indústria química, especialmente na produção de ácido sulfúrico e plásticos, no endurecimento do aço, na energia atómica, na tecnologia espacial e outras indústrias de alta tecnologia. Em menos de 100 anos, o vanádio passou de um metal raro e obscuro, para se tornar num de grande importância militar bem como um pilar da tecnologia moderna (Harber, 2009).

O vanádio é um metal de transição do bloco d, cuja configuração eletrónica a partir do Ar é $4s^2 3d^3$. Tem número atómico de 23. A sua química é caracterizada por múltiplos estados de oxidação que vão desde (-1) a (+5) (Crans, 1998), exibindo os seus compostos coloração característica. Assim, o metavanadato de amónio (NH_4VO_3) exibe coloração amarela quando se encontra na forma VO_2^+ (+5), azul após redução do VO_2^+ a VO^{2+} , verde ou violeta quando reduzido a V^{3+} ou V^{2+} , respetivamente (Harber, 2009).

Entre os diversos estados de oxidação que o vanádio pode exibir, apenas o V(III), V(IV) e V(V) são biologicamente importantes, já que o V(II) é demasiado redutor para existir em qualquer organismo conhecido, e destes, os mais comuns são o V(IV) e o V(V). A química do vanádio é extremamente rica devido à facilidade que este elemento tem em assumir diferentes geometrias de coordenação (Crans et al., 1998).

O vanádio pentavalente V(V), é a forma redox mais estável em sistemas aquosos. A pH ácido forma um catião, $cis-VO_2^+$ que complexa com agentes quelantes, tais como o EDTA. A valores de pH fisiológicos ou mais elevados, aparecem os vanadatos, que são

aniónicos e que tendem a formar complexos polinucleares. As soluções de vanadato, são normalmente preparadas a partir de ortovanadato de sódio, Na_3VO_4 , contendo espécies orto (VO_{4n}) que são favorecidas a valor de pH entre 1 e 10, ou de metavanadato de sódio, NaVO_3 , contendo espécies meta (VO_{3n}) com existência favorável a pH intermédio (6-8). Estes sais, a pH fisiológico, originam as mesmas espécies em solução após se estabelecer o equilíbrio (Harber, 2009).

O vanádio é um metal tóxico que causa uma grande variedade de efeitos adversos e, portanto, é de contínuo interesse biológico, industrial, ocupacional e ambiental (Li, 2013). O vanádio não foi demonstrado como sendo essencial para os seres humanos e não tem qualquer valor nutricional. As fontes mais comuns, não-ocupacionais, de exposição ao vanádio são alimentos contaminados e água potável. Estudos de dieta total revelaram uma ingestão de vanádio média de 13 g / dia / pessoa no Reino Unido e uma ingestão entre 6-18 g / dia nos EUA (EFSA, 2004). Na Alemanha e no México, a ingestão de vanádio é de 10-20 g / dia para mulheres e > 20 g / dia para homens (Moreno, 2010).

A queima de combustíveis fósseis faz com que cerca de 110 mil toneladas de vanádio entrem na atmosfera anualmente (Moreno, 2010).

Poucos organismos concentram o vanádio em quantidades apreciáveis. Exceções bem conhecidas são alguns cogumelos da espécie *Amanita* e os ascídeos (ou tunicatos). A partir do género *Amanita muscaria*, foi isolado um composto contendo vanádio no estado de oxidação (IV), designado por amavidina, cuja função não está ainda bem esclarecida, mas provavelmente fará parte de um sistema de proteção contra a danificação de tecidos. Também na levedura *Saccharomyces cerevisiae* se verificou que possuía a capacidade de acumular concentrações de vanádio (IV) na ordem dos milimolar, em compartimentos específicos (Bode, 1990).

Alguns estudos epidemiológicos têm revelado que existe uma correlação estreita entre a exposição a partículas de vanádio transportadas pelo ar e a incidência de cancro em residentes de áreas metropolitanas (Moreno, 2010). Trabalhadores expostos ao vanádio correm o risco de desenvolver doenças respiratórias (IARC, 2006) e aumento da frequência cardíaca (Li, 2013), porque as partículas respiráveis podem penetrar profundamente no trato pulmonar.

Estudos experimentais em roedores demonstraram que a inalação crónica de pentóxido de vanádio (V) causa neoplasias bronquíolo-alveolares, alterações histológicas e funcionais no baço, danos neuronais e alterações ultra estruturais nos túbulos seminíferos (Piñón-Zárate,

2008). Em culturas de fibroblastos do pulmão humano, a exposição ao vanádio induz a expressão de genes que medeiam a inflamação e a resposta imunitária e suprime genes envolvidos na paragem do crescimento. Estas respostas parecem ser importantes para a reação fibrótica do pulmão ao vanádio (V) (Rodríguez-Mercado, 2010). Recentemente, o pentóxido de vanádio (V) foi designado como possivelmente cancerígeno para os seres humanos (grupo 2B) pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 2006), e este químico e outros compostos de vanádio foram designados como categoria 2 pela “German Commissions for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area” (Beyersmann, 2008). Em espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos, o vanádio acumula-se principalmente no fígado, rins, ossos, pulmões e baço ligando-se a fosfatos, sulfatos, tióis, e ácidos carboxílicos de aminoácidos ou péptidos. Algumas proteínas de baixo peso molecular podem ligar-se a estes metais e ajudar a desintoxicá-los (Beyersmann, 2008). A inter-conversão de espécies químicas em sistemas biológicos é complexa, e a espécie de vanádio (III) (forma catiónica, V^{3+}) é instável a pH fisiológico ou na presença de dioxigénio. O vanádio (IV) (VO^{2+}), um dos catiões diatómicos mais estáveis é facilmente oxidado a vanádio (V) em condições fisiológicas. As espécies de vanádio (V) podem ainda ser detetadas em aniões como o vanadato ($H_2VO_4^-$, HVO_4^{2-} ou VO_4^{3-}), que facilmente entram na célula pelos canais de fosfato e sulfato, sendo por esse motivo consideradas por diversos autores como as formas mais tóxicas. Contudo podem ser metabolicamente desintoxicados a vanádio (IV) no interior celular (Harber, 2009). Alguns iões de vanádio parecem estar envolvidos em mecanismos de carcinogénese que envolvem eventos não-genotóxicos ou indiretamente genotóxicos. Por estas razões, este metal é considerado como mutagénico fraco (Rodríguez-Mercado, 2010).

1.3 Efeito sinérgico dos metais

As espécies metálicas raramente existem na natureza na forma elementar e, na maior parte dos casos, fazem parte de misturas complexas. No entanto, é pouco usual realizarem-se testes sistemáticos que avaliem efeitos sinérgicos dos metais sobre os seres vivos. Cada elemento metálico pode estar envolvido num espetro largo de vias metabólicas que induzem efeitos tóxicos específicos. No entanto, pouco se conhece acerca dos seus efeitos sobre encruzilhadas metabólicas (Zhu, 2011).

A co-exposição dos seres vivos a poluentes gera efeitos que não são detetáveis nos estudos de exposição a um só composto ou metal. Estudos sobre a exposição humana a

misturas metálicas de arsénio e chumbo têm revelado efeitos interativos sobre órgãos humanos mais severos do que os que resultam da exposição individual a cada metal. O órgão mais afetado foi o rim, pois foram detetados, níveis baixos de expressão do enzima glutationato peroxidase (GPx) na urina (Wang, 2008).

A acumulação de metais nos ecossistemas constitui uma fonte contínua de exposição para os seres humanos. A presença desses metais no corpo humano leva ao desenvolvimento de alguns mecanismos de ação comuns: reação com grupos sulfidrilo de proteínas, interferência com elementos essenciais, (Zn, Cu, Se, Ca, Fe) e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS).

O stresse oxidativo pode ser desencadeado por misturas de metais pesados, uma vez que os mitocôndrios, fonte maioritária de ROS intracelular, são alvos comuns dos metais pesados. Estes podem afetar enzimas antioxidantes, como superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT) e peroxidases, cujos centros ativos possuem oligoelementos metálicos na sua composição, como o Cu, Mn, Zn, Fe e Se ou grupos sulfidrilo. Alterações nos níveis intracelulares de metais podem contribuir para a geração crónica de ROS, devido a desvios na proporção intracelular de oxidantes/antioxidantes que perturba a diferenciação e o crescimento celular (Simeonov, 2010).

1.4 Espécies reativas de oxigénio e sistemas antioxidantes

O termo espécies reativas de oxigénio, ROS, inclui radicais livres como o anião superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) ou o radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), bem como outras espécies químicas não radicalares fortemente reativas como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), por possuírem orbitais antiligantes que facilmente disponibilizam eletrões para participarem em processos químicos. Assim, entende-se como radicais livres átomos ou grupos de átomos onde existem orbitais com eletrões desemparelhados que são altamente reativos e capazes de desencadear reações em cadeia, como a peroxidação lipídica (Forman, 2013).

A existência destas entidades químicas permite atribuir ao oxigénio papéis contraditórios no metabolismo celular. Por um lado o oxigénio é essencial para a vida dos eucariotas uma vez que confere a estes seres vivos vantagens energéticas relevantes, graças à respiração celular. Contudo a redução do dioxigénio a água via cadeia respiratória constitui uma fonte importante de ROS, intermediários como o radical anião superóxido, o radical hidroxilo ou o peróxido de hidrogénio que possuem um potencial elevado para desencadear danos oxidativos, em particular ao nível dos sistemas membranares (Wu, 2013). O radical anião

superóxido pode ainda ser gerado por processos que envolvem oxidases como o NADPH-oxidase e xantina oxidase, auto-oxidação da hemoglobina, e fotólise. Embora o $\bullet\text{O}_2^-$ não seja por si só particularmente reativo, pode ser cataliticamente convertido por superóxidos dismutases em peróxido de hidrogénio, que se decompõe para originar o radical hidroxilo, este sim fortemente reativo, na presença de iões metálicos como o ferro (Wu, 2013).

1.5 Stresse oxidativo

O stresse oxidativo ocorre como consequência do controlo anómalo do processo de oxidação-redução (redox) quando há uma superprodução de ROS e / ou insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes (Franco, 2009). No estado de equilíbrio redox com níveis apropriados de ROS, estes são necessários e benéficos para a função fisiológica normal. Os ROS podem proteger a célula contra infeções, destruindo os agentes patogénicos invasores nos locais de inflamação (Forman, 2013), desempenham um papel fisiológico como mensageiros secundários na regulação do funcionamento de células cardíacas e vasculares; estão, ainda, envolvidos na regulação da concentração de cálcio intracelular, na fosforilação da proteína e / ou desfosforilação, e fator de ativação de transcrição. O metabolismo dos compostos tóxicos pode resultar na geração de metabolitos reativos que têm toxicidade ainda maior e desgastam os antioxidantes celulares. Nos mamíferos, a sobre-regulação do citocromo P450 (CYP) já foi ligada à produção de ROS (Wu, 2013).

Assim, tóxicos ambientais são uma potencial fonte de ROS. A depleção severa da circulação de antioxidantes foi observada em fumadores. Além disso, a exposição a metais, benzeno, pó de cimento, e vários outros agentes, está associada com o aumento da peroxidação lipídica, aumento da oxidação do DNA, e diminuição dos níveis de vitamina E e C (Rossner, 2008). CYP monoxigenases são uma importante fonte de ROS durante a isquemia / reperfusão. Por conseguinte, as drogas que inibem a atividade da CYP protegem as células dos ROS induzidos por danos após isquemia ou bloqueiam a formação de estrogénios de catecol e a sua subsequente oxidação, conduzindo a uma diminuição da lesão oxidativa (Yoshioka, 2008).

Finalmente, evidências sugerem que uma maior ingestão de múltiplos nutrientes, incluindo ácido fólico, potássio e flavonóides, diminui bastante o risco de doença cardiovascular associado com a exposição à poluição atmosférica (Auchincloss, 2008).

Os ROS induzem danos nos ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos e alteram a função destas macromoléculas nas células, tecidos e órgãos. Estas perturbações

suscitam respostas celulares adaptativas que aumentam as defesas antioxidantes e os mecanismos de reparação (por exemplo, a reparação do DNA). Danos oxidativos graves em macromoléculas conduzem à morte celular. Os ROS podem perturbar a manutenção do estado normal de nucleótidos de adenina e piridina, o que pode afectar a viabilidade do DNA, introduzir mutações, e modificar a expressão génica. A oxidação de proteínas por ROS pode levar à perda de grupos sulfidrilo e modificações de aminoácidos que tornam as proteínas não-funcionais. Os ROS também podem causar danos peroxidativos nos lípidos que resultam em danos para a membrana da célula, bem como para as membranas dos organelos celulares (Wu, 2013).

Em particular, os componentes principais de fosfolípidos de membrana, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são altamente suscetíveis à agressão dos radicais livres e auto-oxidação, que gera radicais peróxidos dentro de membranas, o que resulta em estruturas de membrana instáveis, alteração na fluidez e permeabilidade da membrana, bem como diminuição da transdução de sinal. Para além disso, os hidroperóxidos podem decompor-se em espécies tóxicas tais como o malondialdeído (MDA), o principal produto da peroxidação lipídica de PUFA's, conduzindo a múltiplas consequências patológicas na membrana celular (Yao, 2011).

Muitos poluentes ambientais estão envolvidos nas vias de sinalização que são ativadas em resposta ao stresse oxidativo. As mesmas sequências de eventos estão também associadas com a etiologia e patologia precoce de muitas doenças crónicas. Assim, compreender os caminhos que conduzem à indução de respostas antioxidantes irá permitir o desenvolvimento de estratégias para proteger contra danos oxidativos.

Luz UV e radiação ionizante, poluentes ambientais entre muitos outros podem induzir a formação de espécies reativas (Fig. 1.1). No entanto, focar-nos-emos num fator específico, e estudado neste trabalho, a formação de ROS induzida por metais e metalóides.

Devido à sua capacidade para perder eletrões, um metal é principalmente considerado como tóxico em virtude da sua geração de ROS. Assim, a exposição a concentrações elevadas de um único metal pesado pode resultar na sua acumulação e, potencialmente originar danos oxidativos (Pacheco, 2009).

A intoxicação por metais geralmente ocorre através da exposição ocupacional ou através da ingestão de água e alimentos contaminados. Na verdade, os organismos foram expostos a metais tóxicos desde a origem da vida e, por conseguinte, têm desenvolvido vários mecanismos de tolerância precoces durante a evolução (Michael, 2013).

1.6 Sistemas antioxidantes

Para proteger os sistemas biológicos da toxicidade dos radicais livres, há vários mecanismos de defesa antioxidantes celulares que mantêm a produção de ROS normal, incluindo vias enzimáticas e não enzimáticas. Os enzimas antioxidantes principais contra os radicais superóxido incluem a SOD, a CAT e a GPx (Posmyk, 2009).

Estes enzimas atuam em conjunto na via metabólica de radicais livres e alteram a atividade de um enzima, sem alterações de compensação em outros, podendo conduzir à peroxidação lipídica. Para impedir a peroxidação lipídica por radicais superóxido e hidroxilo, o superóxido é primeiro convertido pela SOD em peróxido de hidrogénio, que é então decomposto em água e oxigénio pela CAT, prevenindo assim a formação de radicais hidroxilo. Além da CAT, a GPx é um enzima antioxidante intracelular bem conhecido, o qual converte os peróxidos e radicais hidroxilo em formas não tóxicas, em conjunto com a oxidação do glutathione reduzido (GSH), na forma de dissulfureto de glutathione oxidado (GSSG). O GSSG é depois, novamente, convertido em GSH pela glutathione reductase (GR) (Fig. 1.2) (Wu, 2013).

Outros enzimas que ajudam na desintoxicação dos ROS também constituem uma importante defesa antioxidante. Por exemplo, o glutathione-S-transferase (GST) catalisa a conjugação de GSH a centros electrofílicos sobre uma ampla variedade de substratos, através de um grupo sulfidrilo, o que diminui os níveis de peróxido (Živković, 2013). A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ajuda a manter um fornecimento constante de intermediários metabólicos, tais como GSH e NADPH que são necessários para um funcionamento otimizado dos principais enzimas antioxidantes (Ji, 2008).

Além disso, uma grande contribuição para a capacidade antioxidante total vem de moléculas antioxidantes no plasma. Os componentes antioxidantes não enzimáticos consistem em moléculas que ao interagirem com ROS terminam as reações em cadeia de radicais livres.

Existem várias moléculas antioxidantes no plasma, tais como, ácido úrico, albumina e ácido ascórbico, que correspondem a 85% da capacidade total de antioxidantes, e outros antioxidantes que estão no sangue que incluem bilirrubina, α -tocoferol e β -caroteno (Yao, 2011).

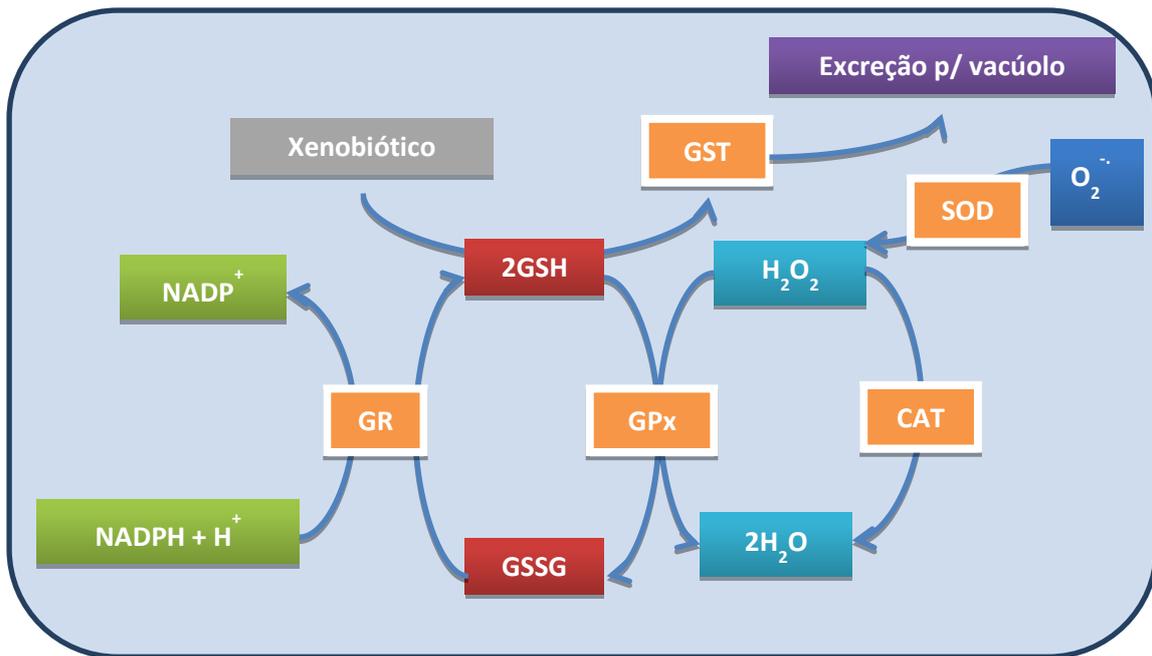


Fig. 1.2: Representação ilustrativa da interação metabólica entre o ciclo do glutatióno, vias de conjugação de xenobióticos, vias das pentoses fosfato e catalases (adaptado de Wu, 2013 e Ji, 2008)

1.7 Fosfatase alcalina

Agora que já compreendemos melhor como as células se defendem da ação dos radicais livres é importante abordar um enzima, que pelas suas características, é utilizado como marcador da diferenciação, crescimento e proliferação celular, a fosfatase alcalina (ALP).

A ALP é um enzima extracelular que ocorre amplamente na natureza, e é encontrada em muitos organismos, desde bactérias ao homem. Com poucas exceções, as ALP são enzimas homodiméricas e cada sítio catalítico contém três íons metálicos, ou seja, dois Zn^{2+} e um Mg^{2+} , necessários para a atividade enzimática. Os enzimas catalisam a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e também catalisam uma reação de transfosforilação na presença de concentrações elevadas de aceptores de fosfato (Golub, 2007).

A fosfatase alcalina é caracterizada por um pH óptimo elevado e uma ampla especificidade de substrato. Este enzima desempenha funções diferentes nos vários organismos e tecidos onde ocorre. É necessária para a manutenção do metabolismo celular. Esta função biológica exata não é ainda totalmente conhecida, no entanto, tem sido sugerido que pode estar relacionado com o transporte de fosfato inorgânico (Pi) na célula. É um enzima, cuja biossíntese adaptativa é controlada pela concentração de Pi no meio (Milan, 2006).

Barrio (1999) observou inibição da ALP em linhas de osteoblastos após incubação com compostos de vanádio (V).

Outros autores consideram-na como marcador de proliferação celular, uma vez que se encontra sobre expressa na membrana citoplasmática de células tumorais (Chen, 2006).

1.8 *Saccharomyces cerevisiae*, modelo de estudo da resposta ao stresse

Na natureza a manutenção da homeostase é um constante desafio para todos os organismos, continuamente submetidos a variações rápidas e drásticas do meio ambiente que podem alterar as funções celulares e impedir o crescimento celular. A capacidade de adaptação, destes organismos, às condições ambientais é um pré-requisito universal para a sua sobrevivência e evolução. O estudo de respostas ao stresse é essencial para a compreensão de como organismos unicelulares e multicelulares se adaptam a diferentes mudanças do meio ambiente. Tais respostas necessitam de um sistema complexo de reconhecimento e transdução de sinal, permitindo o crescimento e proliferação da célula bem como a expressão de genes, atividades metabólicas e outras características da célula (Alberghina, 2012).

As leveduras, em particular a *S. cerevisiae*, é considerada como o organismo modelo no estudo dos mecanismos de resposta ao stresse. Uma vez que é um eucariota, exhibe uma complexa organização intracelular que conseqüentemente leva a mecanismos complexos de regulação da expressão genética tal como nos organismos multicelulares (Zakrajšek, 2011).

A *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, pertencente à classe Ascomycete, subclasse Hemiascomycetidae, ordem Endomycetales, família Saccharomycetaceae e subfamília Saccharomycoideae (Resnick, 2000).

O seu crescimento no meio em que se encontra apresenta fases distintas (Fig. 1.3). A chamada fase "lag", corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura. Nesta fase o metabolismo das células está ativo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas se possam dividir. Posteriormente, na chamada fase "log", há um crescimento exponencial porque o número de células aumenta exponencialmente com o tempo (com energia proveniente da fermentação da glicose). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes; nesta fase o número de células viáveis mantém-se constante, isto é, são iguais os números correspondentes às células que nascem e as que morrem (Zakrajšek, 2011).

A aplicação das leveduras como modelo experimental apresenta inúmeras vantagens a nível genético, bioquímico e fisiológico. A *S. cerevisiae* é de fácil manipulação, tem um

tempo de geração curto e a sua genética muito conhecida implica que a construção de mutantes definidos seja relativamente simples (Alberghina, 2012).

Esta levedura tem desenvolvido mecanismos de resposta a uma variedade de condições de stresse e na maioria dos casos estes mecanismos envolvem alterações na expressão de determinados genes. A existência destes mecanismos moleculares de resposta ao stresse, muitos dos quais altamente conservados ao longo da natureza, fornecem à célula a flexibilidade requerida para se adaptar às diversas variações do meio ambiente. Sendo assim, o aspeto mais relevante da resposta celular ao stresse consiste na reorganização da expressão genética através de mecanismos de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução com o intuito de diminuir a expressão de genes constitutivos e promover a expressão dos genes que codificam proteínas de stresse (Mattiuzzi, 2012).

O fato de *S. cerevisiae* ter o seu genoma completamente sequenciado possibilita a identificação rápida de genes envolvidos na resposta ao stresse com uma função específica, bem como a identificação de ortólogos noutros organismos. Para além disso genes humanos e de outros eucariotas podem facilmente ser expressos e estudados nesta levedura (Alberghina, 2012).

Todas estas características fazem com que a levedura *S. cerevisiae* seja um excelente modelo experimental para o estudo da resposta ao stresse. Além disso, o seu estudo admite a compreensão de determinados mecanismos moleculares utilizados pelos mamíferos na regulação de diversos tipos de stresse, tais como o stresse oxidativo, que pode estar associado a doenças neurodegenerativas, má circulação sanguínea, cancro, anemia, desenvolvimento anormal dos ossos e do sistema nervoso e respostas imunes deficientes (Mattiuzzi, 2012).

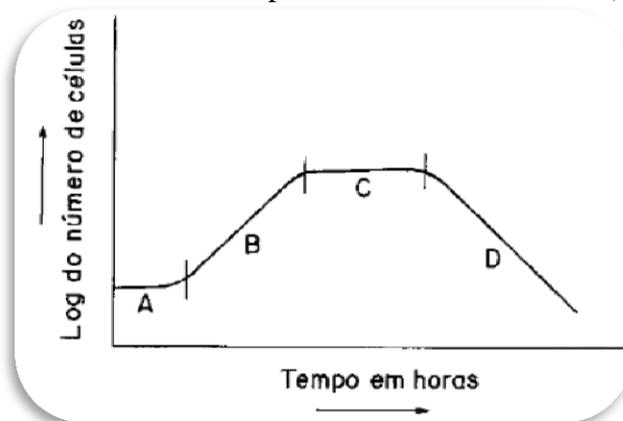


Fig. 1.3: Perfil de crescimento característico das leveduras (A) fase “lag”; (B) fase exponencial de crescimento; (C) fase estacionária; (D) fase de morte ou senescência (adaptado de Rettori, 1999)

2. Problemática e objetivos

2.1 Problemática

O antimónio é um semi-metal amplamente utilizado na indústria siderúrgica, farmacêutica, da borracha, papel e tintas, fontes antropogénicas de compostos que contribuem para aumentar o seu nível de circulação ambiental, tornando-o um poluente merecedor de contínuos estudos relativos à sua reatividade química e biológica. Por outro lado, o vanádio é um metal de transição igualmente utilizado pela indústria do aço e das tintas e vernizes que muito têm contribuído para incrementar a sua contaminação ambiental na periferia das unidades fabris. No entanto, a queima de combustíveis fósseis como o carvão e o petróleo contribui para aumentar a pressão ambiental deste elemento sobre os ecossistemas. Face ao exposto, torna-se crucial determinar as consequências da contaminação ambiental destes elementos sobre os seres vivos, individual e/ou sinérgica, pelo que neste estudo procurou-se avaliar como o cloreto de antimónio (4mM), Sb (III) e o metavanadato de amónio (4mM), V (V), compostos onde o Sb e o V se encontram no estado de oxidação descrito como mais tóxico, influenciam o crescimento celular e a resposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃, uma levedura vínica nativa de mostos do Alentejo. Por outro lado, procurou-se ainda estimar uma eventual contribuição do catião amónio na resposta de *S. cerevisiae* ao vanádio, quando combinado com o ião amónio.

2.2 Objectivo geral

Testar as hipóteses:

H₀: o antimónio não provoca alterações de crescimento e resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃;

H₀: o vanádio não exerce efeitos sinérgicos com o antimónio que perturbem o crescimento e a resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃;

2.3 Objectivos específicos

Conhecer

As propriedades físico-químicas e biológicas de Sb (III) e V (V);

As interferências do Sb (III) e V (V) no crescimento e resposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃;

Compreender

A reatividade do Sb (III) e V (V);

As etapas do crescimento e resposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃;

Dar valor

Aos estados de oxidação do Sb e V;

Aos efeitos sinérgicos do Sb (III) e V (V);

Aos diferentes perfis de crescimento de leveduras;

À ALP como marcador de crescimento e de regulação celular;

Ao GSH e ROS como marcadores de stresse;

A enzimas antioxidantes GR, GPx, G6PD, CAT;

Ao MDA como marcador de danos celulares;

Aplicar

Os protocolos e a estratégia a outros metais;

3. Metodologia

3.1 Estratégia

A concretização dos objectivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano descrito neste capítulo.

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 ICAAM e Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

Duração: 1 ano letivo.

Modelo Biológico: Levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃

Estirpe isolada a partir de mostos de vinhos regionais do Alentejo, depositada na colecção do Laboratório de enologia da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora.

Agentes de stresse: Cloreto de Antimónio (SbCl₃), Metavanadato de amónio (NH₄VO₃), Cloreto de Amónio (NH₄Cl).

Ensaio: Leveduras crescidas em diferentes meios de cultura durante 72h

I- Controlo, sem exposição aos agentes de stresse;

II; III, IV; V- exposição a SbCl₃ (4 mM), NH₄VO₃ (4 mM), NH₄Cl (4 mM) e SbCl₃ (4 mM) + NH₄VO₃ (4 mM), respetivamente.

Resultados obtidos:

Turbidez a 640 nm

Determinação das cfu

Determinação do peso seco

Fracções subcelulares seleccionadas:

- Sobrenadante pós-12000 g
- Sedimento pós-12000 g

Parâmetros a analisar:

- Sobrevivência:
 - Unidades formadoras de colónias (cfu)
 - Peso seco
 - Turbidez
- Conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g e sedimento pós-12000 g;
- Marcador de danos celulares:
 - Espécies reativas de oxigénio (ROS)
 - Malonodialdeído (MDA)
- Marcadores não-enzimáticos de stresse e da disponibilidade intracelular de enxofre:
 - Glutationo (GSH)
 - Dissulfureto do glutathione (GSSG)
- Marcadores enzimáticos de stresse:
 - Glutationo redutase (GR)
 - Glutationo peroxidase (GPx)
 - Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)
 - Catalases (CAT T e CAT A)
 - Fosfatase alcalina (ALP)

Técnicas utilizadas:

Cultura de microrganismos

Desintegração celular, por homogeneizador de sonda de ultra-sons;

Fracionamento celular, por centrifugação diferencial;

Conteúdos - proteínas, por espectrometria de absorção molecular

- MDA, GSH e GSSG, por espectrometria de fluorescência

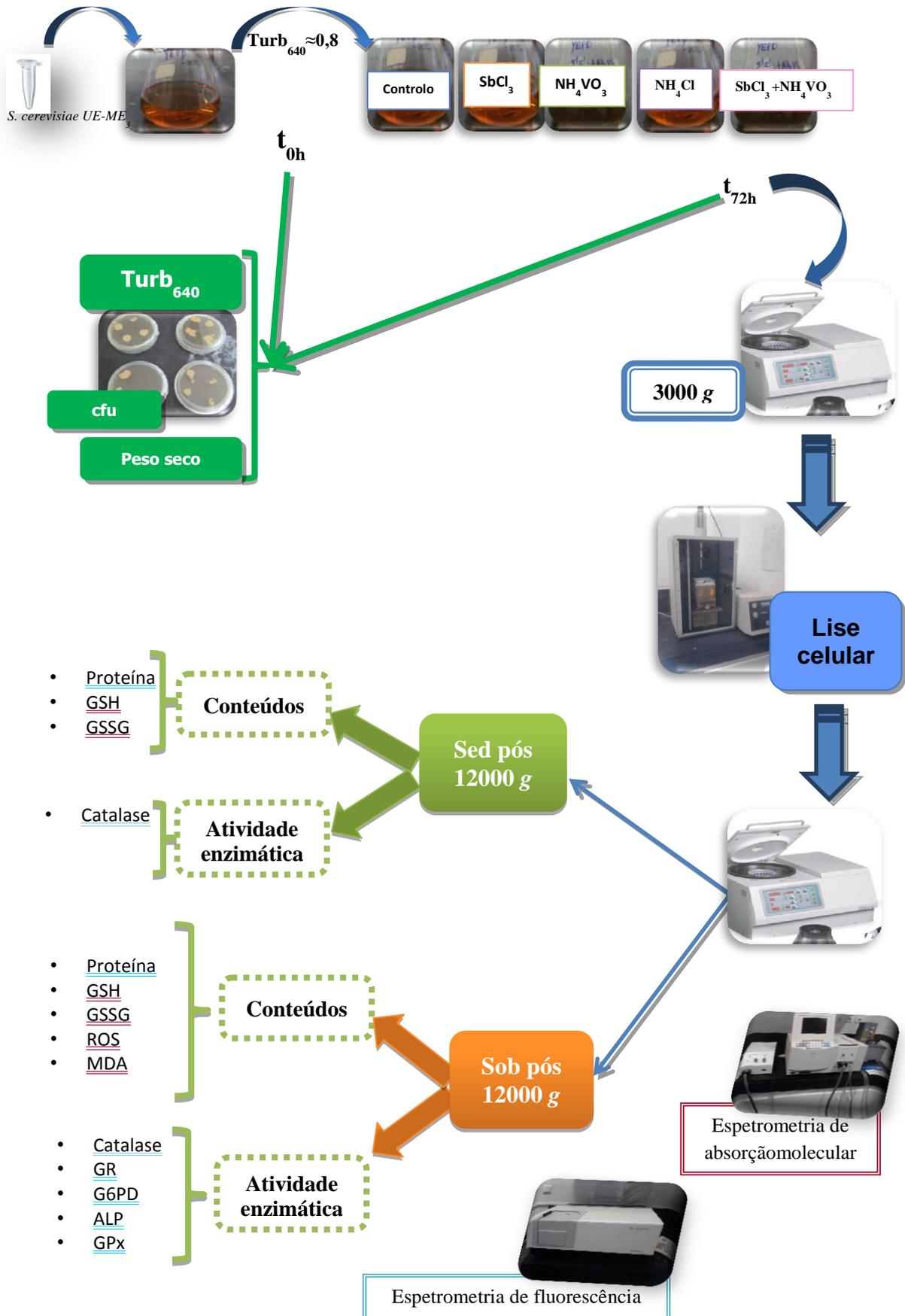
Atividades enzimáticas - CAT T, CAT A, GR, GPx, G6PD, ALP por espectrometria de absorção molecular

Ferramentas informáticas - folha de cálculo e *software* para análise estatística

Análise estatística dos resultados:

Análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan para os resultados incluindo conteúdos e atividades enzimáticas obtidos a partir de cinco experiências independentes.

3.2 Diagrama do trabalho



3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Modelo biológico

Levedura vínica *S. cerevisiae* UE-ME₃ isolada de mostos de vinhos do Alentejo e depositada na coleção do laboratório de enologia da Universidade de Évora. Esta estirpe é desde há algum tempo utilizada no nosso laboratório em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Rosado, 2009; Ferreira, 2006).

As estirpes, no nosso laboratório, estão armazenadas a -80°C em meio de cultura com glicerol.

3.3.2 Meios de cultura

Preparou-se meio YEPD líquido (1/3 de líquido para 2/3 de ar), tendo-se dissolvido extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹) em água ultra-pura e esterilizado por ação de calor húmido; posteriormente adicionou-se glucose (20 g.L⁻¹), esterilizada por filtração (0,22µm). A preparação dos meios YEPD sólidos foi semelhante, com exceção que nestes adicionou-se agar (20 g.L⁻¹) antes da esterilização pelo calor húmido, para aplicação em placa e contagem de cfu.

Para o estudo de exposição de *S. cerevisiae* adicionou-se ao meio YEPD líquido (1/3 de líquido para 2/3 de ar) os agentes de stresse SbCl₃ (4mM), NH₄VO₃ (4mM), NH₄Cl (4mM), SbCl₃ (4mM) em simultâneo com NH₄VO₃ (4mM).

3.3.3 Culturas de microrganismos

As células presentes numa colónia e conservada a -80°C foram inoculadas em meio YEPD líquido e crescidas *overnight*, a 28°C com agitação orbital constante de 150 rpm. Esta cultura fresca foi utilizada para inocular meio YEPD acompanhando-se o seu crescimento, por leitura da turbidez a 640 nm, até à fase exponencial média de forma a permitir a sua utilização como inóculo nos ensaios de exposição aos agentes de stresse e respetivo controlo, iniciados com turbidez 0,1 (640 nm) e incubados, nas condições de agitação e temperatura referidas anteriormente, durante 72 h.

O crescimento das culturas controlo e de exposição, foi acompanhado por leituras de turbidez a 640 nm no início e às 72 h de crescimento. A determinação de cfu foi realizada nos mesmos intervalos de tempo, sobre amostras das culturas que após diluição adequada foram inoculadas em meio YEPD sólido e incubadas a 28°C.

A quantidade de biomassa formada no final do tempo de cultura, 72 h, foi estimada pela quantificação do peso seco das culturas controlo e de exposição. Recolheram-se para cada situação amostras independentes, as quais foram lavadas 3 vezes com água estéril e secas em estufa a 80°C até atingir peso constante.

3.3.4 Fraccionamento celular

Células de culturas controlo e de exposição crescidas durante 72 h foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 10 min. As células foram lavadas por 3 vezes com água ultra-pura estéril. Posteriormente as células foram ressuspensas em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, mantidas a 4°C e lisadas em homogeneizador de ultra-sons.

O fracionamento celular em sedimento e sobrenadante pós-12000 g foi realizado por centrifugação do lisado celular a 12000 g, 20 min a 4°C. Alíquotas do sobrenadante obtido, e do sedimento ressuspensas em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, foram guardadas a -20°C para utilização posterior.

3.3.5 Quantificação de proteínas totais

Foram quantificadas as proteínas existentes no sedimento e no sobrenadante pós-12000 g através do método de Lowry (1951). Uma mistura reaccional foi preparada em tubos de ensaio, pela adição de 0,025 mL de amostra diluída em NaOH (0,5M), para um volume final de 0,25mL, com 1,250 mL de Reagente de Lowry. Esta mistura foi agitada no vortex e deixou-se repousar durante 10 minutos, depois adicionou-se 0,125 mL de Reagente de Folin-Ciocalteu diluído e agitou-se, de novo, no vortex. Aguardou-se 30 minutos para desenvolvimento do cromóforo e leu-se a absorvência a 720 nm. Construiu-se a curva de calibração para o intervalo de concentração de 50 a 200 µg/mL (Fig. A1), utilizando uma solução de soro bovino (BSA) como padrão e calculou-se, por interpolação gráfica, a concentração de proteínas na amostra.

3.3.6 Determinação do GSH e GSSG

Para a determinação do conteúdo celular de GSH e GSSG no sedimento e no sobrenadante pós-12000 g agiu-se de acordo com o método proposto por Hissin (1976). Para cada tratamento preparou-se uma mistura de reacção que continha amostra na diluição adequada ou de padrão (GSH), tampão fosfato (0,1M) com EDTA (0,005M) pH 8 e OPT (*o*-fetaldeído) (100 µg). Posteriormente agitou-se no vortex e foi sujeita a um banho com

agitação à temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente transferiu-se para uma célula de quartzo de fluorímetro e leu-se a fluorescência a um $\lambda_{\text{excitação}}$ de 350 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 420 nm. A concentração de GSH na amostra foi determinada por interpolação na curva de calibração construída no intervalo de concentração ente 0,25 e 5 μM (Fig. A2).

Na quantificação do GSSG fez-se reagir alíquotas da amostra ou padrão, com alíquotas de NEM (*N*-metilmaleimida), a qual incubou 30 min à temperatura ambiente, com agitação. De seguida, incubou-se essa mistura reacional com OPT e NaOH (0,1 M), na proporção de 1:1:1:18, durante 15 min à temperatura ambiente com agitação. A potência de fluorescência foi medida a $\lambda_{\text{excitação}}$ 350 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 420 nm (Hissin, 1976). A concentração de GSSG na amostra foi determinada por interpolação na curva de calibração construída no intervalo de concentração entre 0,4 e 12 μM (Fig. A3).

3.3.7 Doseamento de MDA

O doseamento de MDA no sobrenadante pós-12000 g foi efetuado de acordo com o método proposto por Ohkawa (1979) e Durfinová (2007), tendo-se construído uma curva de calibração para o malonodialdeído no intervalo entre 2,5 e 100 M (Fig. A4). O padrão de malonodialdeído foi preparado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano que o liberta por hidrólise em meio ácido (Turton, 1997).

Procedeu-se à determinação do malonodialdeído através de uma mistura de reação composta por SDS 8,1 %, TBA 0,4 % em ácido acético 10 %, pH 3,5 e amostra, foi preparado um branco com a mesma composição com exceção da amostra que foi substituída por H₂O. Agitou-se no vortex e incubou-se num banho com agitação a 95°C, durante 60 min. Após o tempo de incubação, colocaram-se os tubos com a mistura reacional a 4°C durante 15 min. De seguida, adicionou-se *n*-butanol à mistura, levou-se ao vortex e deixou-se repousar à temperatura ambiente, durante 60 min. Centrifugou-se a 1250 g durante 20 min, para acentuar mais a diferença de fases. Retirou-se uma alíquota da fase superior e leu-se a potência de fluorescência a $\lambda_{\text{excitação}}$ 515 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 553 nm.

3.3.8 Determinação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)

A quantificação de ROS no sobrenadante pós-12000 g foi realizada de acordo com o método descrito por LeBel (1990). Assim, a amostra foi adequadamente diluída em DCFH (1 M) preparado em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 e Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 na proporção de 1:40. A mistura de reacção foi posteriormente incubada a 37°C, durante 10 min, após o que

foi lida a potência de fluorescência a $\lambda_{\text{excitação}}$ 485nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 520nm. Uma solução branco foi igualmente preparada substituindo o sobrenadante pós-12000 g por tampão fosfato (10 mM) pH 7. A concentração de ROS foi estimada por interpolação na curva de calibração obtida para padrões de concentração diferente de H₂O₂ processados nas mesmas condições das amostras (Fig. A5).

3.3.9 Determinação da Fosfatase alcalina (ALP)

Na determinação da atividade da ALP nas frações pós 12000 g procedeu-se de acordo com o método proposto por Breaudiere (1984).

As amostras (0,20 mg/mL de proteína) foram incubadas, em células de absorção molecular, numa mistura de reação constituída por pNPP (6 mM) em tampão tris-HCl (0,5 M) pH 8,5 a 37 °C. Para calcular os valores da atividade fosfatase alcalina usou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9964919 < r < 0,9993050$, Fig. A6), traçadas pelo registo da absorvência a 405 nm durante 120 s, utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o pNPP de $18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3.10 Determinação Glutatio no redutase (GR)

Determinou-se a atividade da GR nas frações pós 12000 g obtidas anteriormente de acordo com o método proposto por Goldberg e Spooner (1987).



Na mistura de reação, em tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, constituída por EDTA (15 mM), GSSG (635 mM) e sobrenadante pós 12000 g (0,20 mg/mL de proteína), após incubação a 37°C durante 5 min, iniciou-se a reação pela adição de NADPH (9,6 mM), tendo-se registado a variação da absorvência a 340 nm durante 180 s.

Na determinação da atividade glutatio no redutase utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9979035 < r < 0,9994232$, Fig. A7), traçadas durante os 180 s, utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{.cm}^{-1}$.

3.3.11 Determinação Glutatio no Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx nas frações pós 12000 g foi determinada de acordo com o método proposto por Inova (1999).

A atividade GPx foi quantificada a 37°C pelo registo da variação da absorvência a 340 nm, devido ao consumo de NADPH, numa mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12

M) pH 7,2, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL), NADPH (1,6 mM) e amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,20 mg/mL de proteína), iniciando a reação pela adição de t-BHP (1 mM).

A atividade glutatono peroxidase foi calculada recorrendo ao coeficiente angular das curvas de reação ($0,9977889 < r < 0,9990480$, Fig. A8), traçadas durante 60 s utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.12 Determinação Glucose-6- fosfato desidrogenase (G6PD)

Determinou-se a atividade da G6PD nas frações pós 12000 g de acordo com o método proposto por Bergmeyer (1983) e Postma (1989).

Em células de absorção molecular a 37°C foi preparada a mistura de reação, em tampão tris-HCl (1 M) pH 8,0, constituída por NADP^+ (0,04 M), MgCl_2 (0,5 M), glucose 6-fosfato (0,1 M), na qual a reação G6PD foi iniciada pela adição de amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,20 mg/mL de proteína). A formação de NADPH foi acompanhada durante 180 s pela leitura da absorvência a 340 nm.

Para determinar os valores da atividade G6PD usou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9983067 < r < 0,9984909$, Fig. A9), traçadas durante os 180 s, utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.13 Determinação da atividade catalase

Determinou-se a atividade catalase no sobrenadante (catalase T ou citoplasmática) e no sedimento (catalase A ou peroxissomal) pós-12000 g, de acordo com o método proposto por Beers (1952).



O enzima foi quantificado utilizando a mistura de reação constituída por tampão fosfato (30 mM) pH 7,0, para garantir as condições ótimas de funcionamento do enzima e H_2O_2 (9 mM), iniciando-se a reação pela adição de uma alíquota de amostra (0,01-0,025 mg/L). A reação foi seguida por leitura da absorvência a 240 nm à temperatura de 25°C durante 180 s. A atividade foi determinada utilizando-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9221891 < r < 0,9985116$, Fig. A10 e A11) e o coeficiente de absorvidade molecular $0,0435 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ do H_2O_2 . O controlo negativo foi realizado pela leitura de um branco com a mesma composição da mistura de reação, substituindo a amostra pelo tampão.

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
- Espetrometro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espetrometro de absorção molecular de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34
- Potenciómetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrífuga da marca HermLe, modelo Z323 K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

3.5 Reagentes

- Ácido acético (CH_3COOH), 99,5%, Panreac, Barcelona
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 99%, Merck, Darmstadt
- Agar- agar, para microbiologia, Himedia, Mumbai
- BSA, Sigma, St. Louis;
- Cloreto de amónio, 99%, Merck, Darmstadt
- Cloreto de antimónio, 99%, Merck, Darmstadt
- D- (+)Glucose, 99%, Himedia, Mumbai
- DCFH, 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis
- Extrato de levedura, para microbiologia, Sigma- Aldrich, St. Louis
- Fosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4), 99%, Pronalab, Lisboa
- Dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), 99%, Merck, Darmstadt
- Glucose-6-P, Sigma-Aldrich, St. Louis;
- GR, 90%, Sigma-Aldrich, St. Louis
- GSH, 98%, Sigma- Aldrich, St. Louis
- GSSG, 99%, Sigma- Aldrich, St. Louis
- H_2O_2 , 30%, Sigma- Aldrich, St. Louis
- KH_2PO_4 , 99,5%, Merck, Darmstadt

- Metavanadato de amónio, 99,7%, Sigma- Aldrich, St. Louis
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis
- NADP^+ , pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- NADPH, pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis;
- NaHCO_3 , 99,5%, Sigma-Aldrich, St. Louis
- NaOH, 98%, Eka chemicals AB, Bohus
- *N*-etilmaleimida (NEM), 98%, Sigma- Aldrich, St. Louis
- OPT, Sigma- Aldrich, St. Louis
- Peptona, para microbiologia, Himedia, Mumbai
- pNpp Sigma St. Louis;
- Reagente de Folin Ciocalteau, P.A., Merck, Darmstadt
- SDS, Sigma, St. Louis;
- Sulfato de cobre , 99%, Merck, Darmstadt
- Tartarato de sódio e potássio, 99%, Merck, Darmstadt
- TBA, 98%, AppliChem, Darmstadt
- ter-butil hidroperóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis
- U-Butanol, 99%, Merck, Darmstadt

4. Resultados e discussão

A utilização do Sb na indústria siderúrgica, farmacêutica, vulcanização da borracha, automóvel, papel, das tintas e corantes e do armamento tem contribuído para aumentar os níveis de circulação ambiental deste semi-metal, podendo atingir na vizinhança de regiões industrializadas níveis que nos permitem considerá-lo um poluente. Embora o vanádio não exista na natureza no estado elementar, a extração de minerais de V nos países industrializados para utilização em siderurgia e na indústria de tintas e vernizes, bem como na queima de combustíveis fósseis como o crude ou o carvão constituem as principais fontes antropogénicas desse elemento que aumentam a sua pressão ambiental sobre os ecossistemas. Considerando que a utilização destes dois elementos pela indústria pesada levanta preocupações sérias relativas aos seus efeitos sobre os seres vivos, a principal preocupação deste trabalho foi avaliar como o SbCl_3 e NH_4VO_3 individualmente, ou em mistura, afetam o crescimento celular e a resposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃. Escolheram-se o Sb (III) e V(V) por se encontrarem no seu estado de oxidação mais tóxico. Procurou-se ainda subtrair a contribuição do catião NH_4^+ na resposta de *S. cerevisiae* ao NH_4VO_3 . Assim, a apresentação e discussão dos resultados procurou concretizar os objetivos traçados para este projeto, de acordo com a estratégia traçada para este plano de trabalho:

4.1 Efeito do SbCl_3 e NH_4VO_3 no crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃

A Fig. 4.1A representa a turbidez dos meios no final da cultura (72 h). Nela podemos observar que células expostas ao SbCl_3 (4mM), ao NH_4Cl (4mM) e à mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ (4mM, 4mM) exibiram valores significativamente superiores aos detetados na cultura controlo. Pelo contrário, células expostas ao NH_4VO_3 (4mM) correspondem à única situação em que se observou um decréscimo significativo da turbidez. A Fig. 4.1B representa a quantidade de biomassa produzida em cada ensaio, podendo-se observar um aumento significativo do peso seco apenas em células crescidas na presença da mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$. Os conteúdos proteicos do sobrenadante e do sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ encontram-se representados nas Fig. 4.1C e 4.1D. Estes resultados revelam um decréscimo significativo do conteúdo em proteínas do sobrenadante de células crescidas na presença de NH_4Cl e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$. Por outro lado, pode observar-se ainda um decréscimo significativo do conteúdo proteico do sedimento em células expostas

individualmente ao SbCl_3 , NH_4VO_3 e NH_4Cl . Apenas células crescidas na mistura SbCl_3 + NH_4VO_3 duplicaram significativamente esse conteúdo.

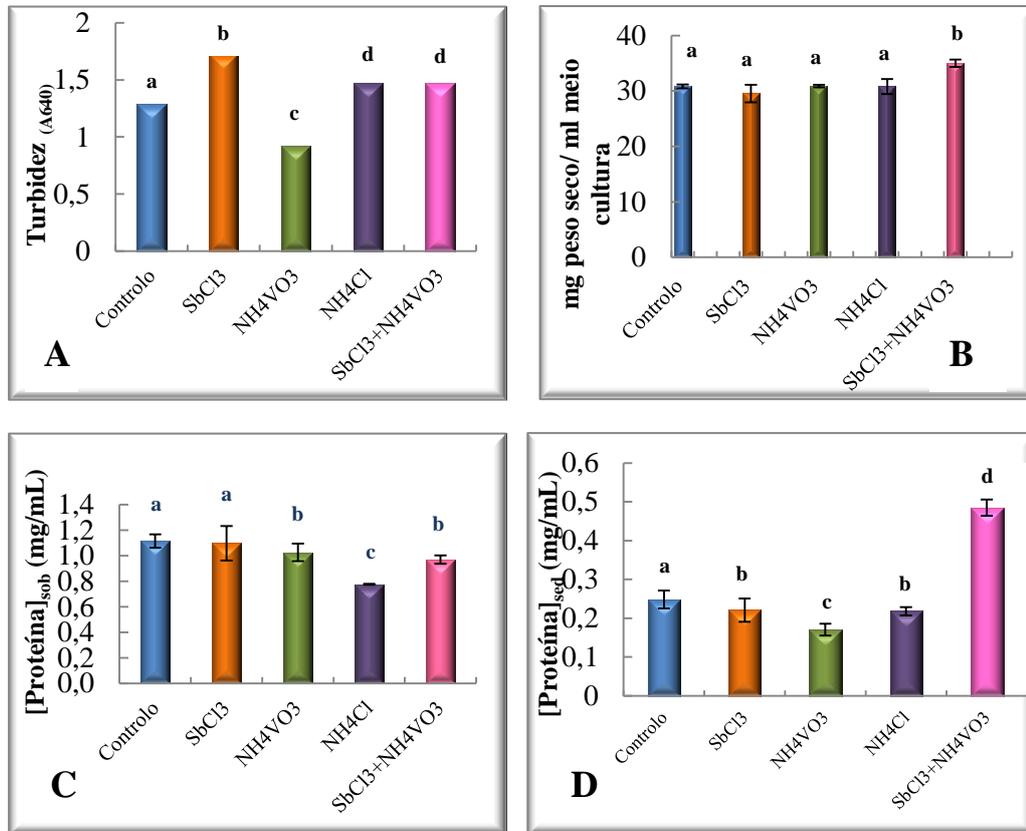


Fig. 4.1: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a turbidez (A), peso seco (B) e proteína do sobrenadante (C) e sedimento (D) pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$)

A partir da Fig. 4.2B consegue detetar-se um decréscimo significativo das unidades formadoras de colónias (cfu) em células crescidas na presença de NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, enquanto que se observa um aumento das cfu em células que apenas estiveram expostas ao SbCl_3 ou ao NH_4Cl , fato que revela perda de viabilidade celular em culturas crescidas na presença de metavanadato de amónio, efeito que aparenta ser ampliado sinergeticamente quando no meio de cultura estão presentes os dois metais, parecendo que o V tem capacidade para desviar a resposta individual ao SbCl_3 . A atividade ALP expressa pelas células de cada tratamento encontra-se representada na Fig. 4.2C que nos mostra um decréscimo significativo desta atividade catalítica para qualquer dos tratamentos exceto em células expostas à mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$.

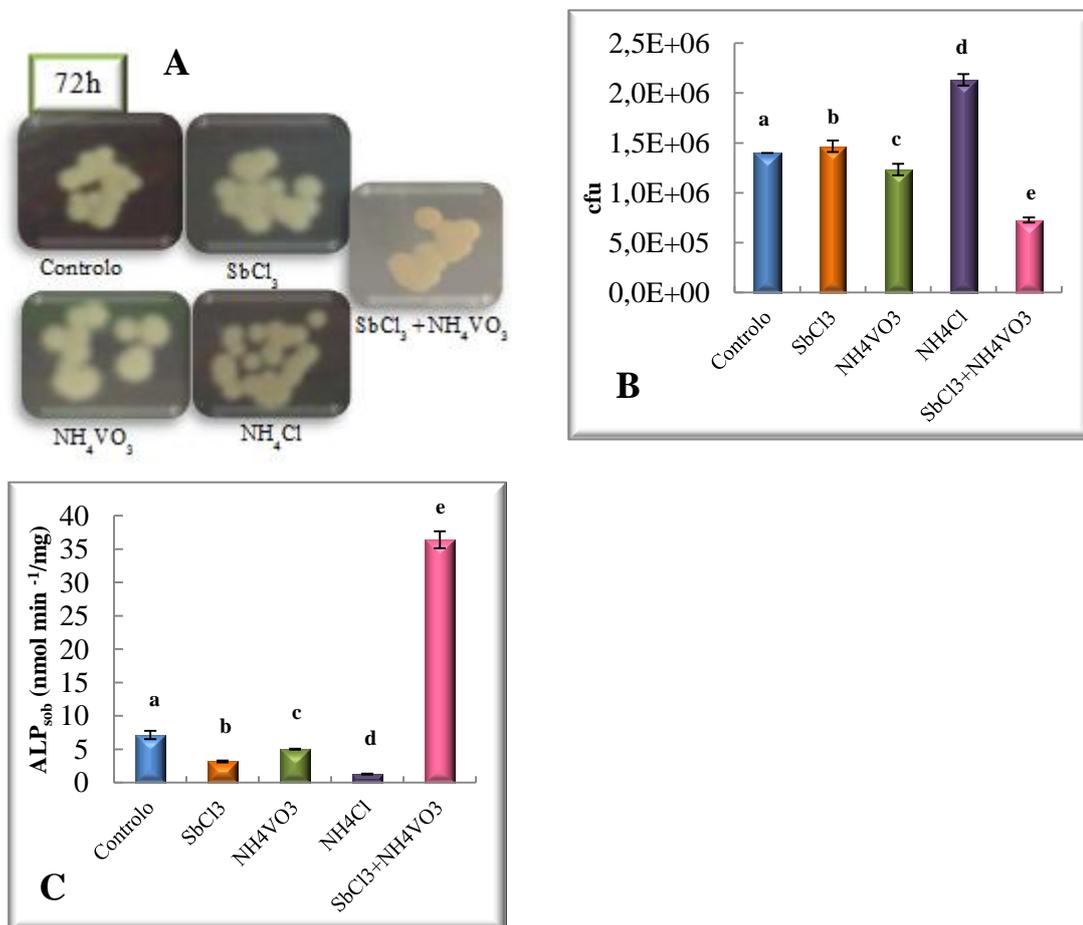


Fig. 4.2: A- Imagem fotográfica de placas (diluição de 10^{-5}); B- unidades formadoras de colónias e C- atividade enzimática fosfatase alcalina do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas, durante 72 h, em meio YEPD, na ausência ou na presença de cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$)

Pelo exposto pode inferir-se que o vanádio (V) (4mM) induziu morte celular em *S. cerevisiae* UE-ME₃, interpretação corroborada pelo decréscimo de turbidez, conteúdo proteico do sobrenadante e sedimento, cfu e ALP às 72h de exposição. Quanto ao cloreto de antimónio, a perda de peso seco, do conteúdo em proteína do sedimento e o decréscimo da atividade ALP permitem indiciar inibição do crescimento, mais evidente no final da cultura, uma vez que o conteúdo proteico do sobrenadante não sofreu alterações e a turbidez exhibe valor superior ao do controlo. Quanto ao efeito da mistura Sb (III) e V (V), o aumento da turbidez e do peso seco às 72h de exposição parece indiciar indução da proliferação celular, contudo o decréscimo significativo das proteínas do sobrenadante e das cfu sugerem que embora possa ter ocorrido no início da cultura um aumento da proliferação celular, é um fato que no final ocorreu um decréscimo da viabilidade celular, apesar do aumento da biomassa detetado durante o tempo total de ensaio. Outro aspeto interessante, que convém identificar foi o aumento do conteúdo proteico do sedimento e da atividade ALP, indiciadores de indução de síntese *de novo* ao nível mitocondrial e de reformulação do metabolismo energético mediado por reações de desfosforilação em que participa a fosfatase alcalina, por vezes associado à morte celular por processo ativo.

4.2 Efeito do SbCl_3 e NH_4VO_3 na resposta antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃

A Fig. 4.3A permite observar que a presença do SbCl_3 (4mM) no meio de cultura induziu um aumento significativo do conteúdo em GSH do sobrenadante pós-12000 g, efeito significativamente oposto ao detetado na presença de NH_4VO_3 , NH_4Cl ou mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$. Esta resposta indicia que o SbCl_3 é capaz de promover a capacidade de regeneração do glutatióno que discutir-se-á um pouco melhor nos comentários tecidos sobre a Fig. 4.5A. No entanto, em presença de V (V) a *S. cerevisiae* não manifestou essa capacidade. Por outro lado, o conteúdo em dissulfureto de glutatióno (GSSG) do sobrenadante pós-12000 g também aumentou com significado estatístico na presença de SbCl_3 , NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, não sofrendo alteração significativa na presença de NH_4Cl . Adiante, no comentário da Fig. 4.5B completar-se-á a discussão desta alteração experimental. O conteúdo em tióis não proteicos (GSH + GSSG) do sobrenadante (Fig. 4.3C) obedeceu ao mesmo padrão de resposta do conteúdo em glutatióno. Reconhecendo a importância do par redox GSH/GSSG, recorreu-se à Fig. 4.3D para avaliar a evolução da razão GSH/GSSG do sobrenadante em cada tratamento, tendo-se observado um decréscimo significativo em qualquer dos ensaios de exposição aos agentes de stresse, ocorrendo um decréscimo de 64,49% e 79,23 % na presença de NH_4VO_3 e da mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, respetivamente. Este conjunto de resultados permitiu inferir que a presença quer do SbCl_3 , NH_4VO_3 ou NH_4Cl tornaram o usual ambiente redutor celular mais oxidante, fato que permitiu depreender que as células se encontravam em stresse oxidativo.

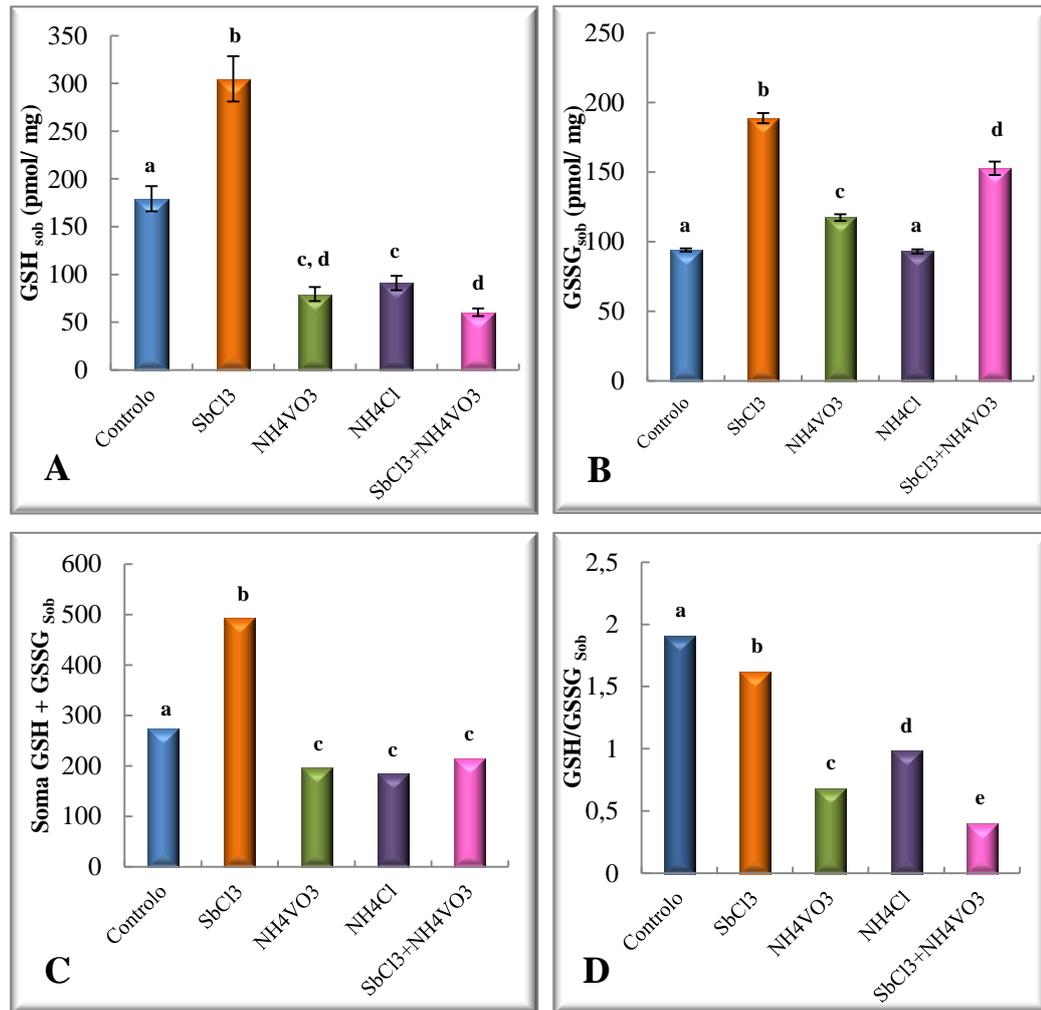


Fig. 4.3: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre o glutationo (A), dissulfureto de glutationo (B), soma do glutationo e dissulfureto de glutationo (C) e razão glutationo/ dissulfureto de glutationo (D) do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. 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 evolução do trabalho permitiu ainda avaliar como foi influenciado o conteúdo em GSH, GSSG e tióis não proteicos do sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae*. Deste modo, a Fig. 4.4A revela que a presença de SbCl_3 ou da mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ no meio de cultura duplicou significativamente os níveis do tripéptido. Efeito contrário foi detetado na presença de NH_4VO_3 e NH_4Cl . Este assunto voltará a ser abordado nos comentários sobre a Fig. 4.5A. A partir da Fig. 4.4B pode observar-se um aumento significativo do conteúdo em GSSG em todas as condições de ensaio exceto na presença de NH_4VO_3 . Voltar-se-á a referir estes resultados nos comentários discutidos na Fig. 4.5B. A Fig. 4.4C mostra então que o conteúdo em tióis não proteicos aumentou significativamente em células crescidas na presença de SbCl_3 , NH_4Cl e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, ocorrendo uma variação inversa com significado estatístico, esperada a partir dos resultados descritos nas Fig. 4.4A e 4.4B. Contrariamente ao descrito na Fig. 4.3D o valor da razão GSH/GSSH do sedimento (Fig. 4.4D) sofreu um aumento significativo em células expostas ao SbCl_3 , embora nas outras três condições de exposição (NH_4VO_3 , NH_4Cl e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$) tenha ocorrido uma transição redutor-oxidante significativa ao nível do sedimento pós-12000 g, enriquecido em mitocôndrios e peroxissomas. Os resultados aqui descritos sugerem que o Sb (III) confere alguma proteção antioxidante ao nível do mitocôndrio e/ou peroxissoma, insuficiente para contrariar de forma saudável o efeito do V (V).

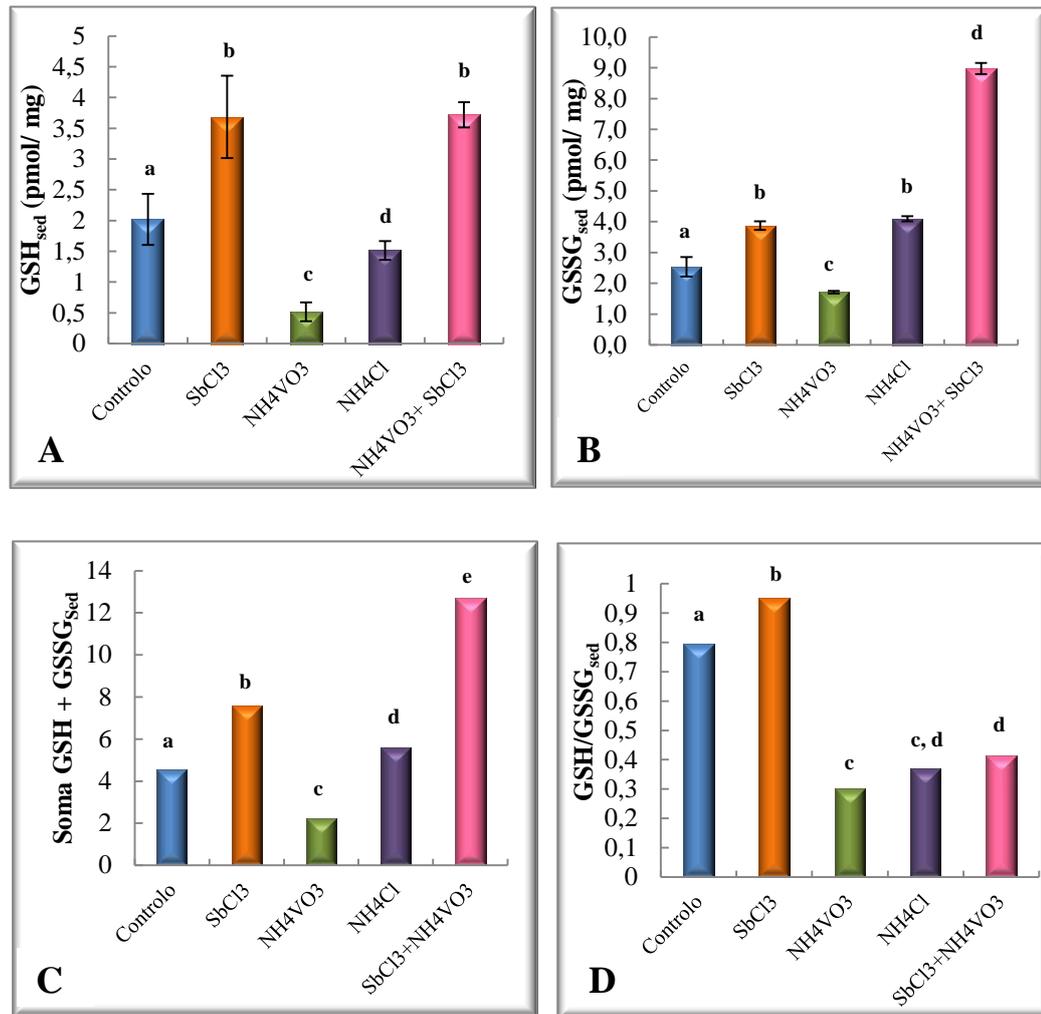


Fig. 4.4: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre o glutationo (A), dissulfureto de glutationo (B), soma do glutationo e dissulfureto de glutationo (C) e razão glutationo/ dissulfureto de glutationo (D) do sedimento pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$)

As Fig. 4.5A e 4.5B procuram comparar a resposta do ciclo do GSH ao SbCl_3 e NH_4VO_3 . Assim, pode inferir-se que a presença de SbCl_3 , NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ no meio de cultura provocou um aumento significativo da atividade GR de *S. cerevisiae*, não se detetando alterações desta atividade catalítica em células crescidas na presença de NH_4Cl . Esta resposta permite, em parte, explicar os níveis elevados de GSH detetados na presença de Sb (III) (Fig. 4.3A). No entanto fica por explicar o decréscimo significativo observado em células crescidas na presença de NH_4VO_3 (4mM), provavelmente dever-se-á a um aumento da taxa de excreção do metal para o vacúolo via sistemas de biotransformação da fase II. Pela Fig. 4.5B pode constatar-se um incremento significativo da atividade GPx em células crescidas em qualquer dos ensaios de exposição, podendo o efeito ser atenuado pela presença de V (V) na mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$. O aumento desta atividade catalítica explica, em parte, o aumento do conteúdo em tióis não proteicos do sobrenadante pós-12000 g, detetado em células expostas ao SbCl_3 , NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ descritos na Fig. 4.3B. O aumento do conteúdo em GSSG, via GPx pode ter contribuído para o decréscimo da razão GSH/GSSG descrito anteriormente (Fig. 4.3D e 4.4D), para o sobrenadante e sedimento de células crescidas na presença de NH_4VO_3 , NH_4Cl e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, um marcador de stresse oxidativo. A Fig. 4.5C permite avaliar a interferência do Sb (III) e V(V) sobre o enzima G6PD, regulador da via das pentoses fosfato e principal fonte de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assiste ao adequado funcionamento do ciclo do GSH. Esse conjunto de resultados mostra que o SbCl_3 individualmente ou em mistura com o NH_4VO_3 induziu um aumento significativo desta atividade catalítica em *S. cerevisiae* que não foi detetada para o NH_4VO_3 . Esta alteração metabólica pode ter sido responsável pela limitação da capacidade das leveduras para gerarem equivalentes redutores sob a forma de GSH, citoplasmático e mitocondrial, em presença de NH_4VO_3 .

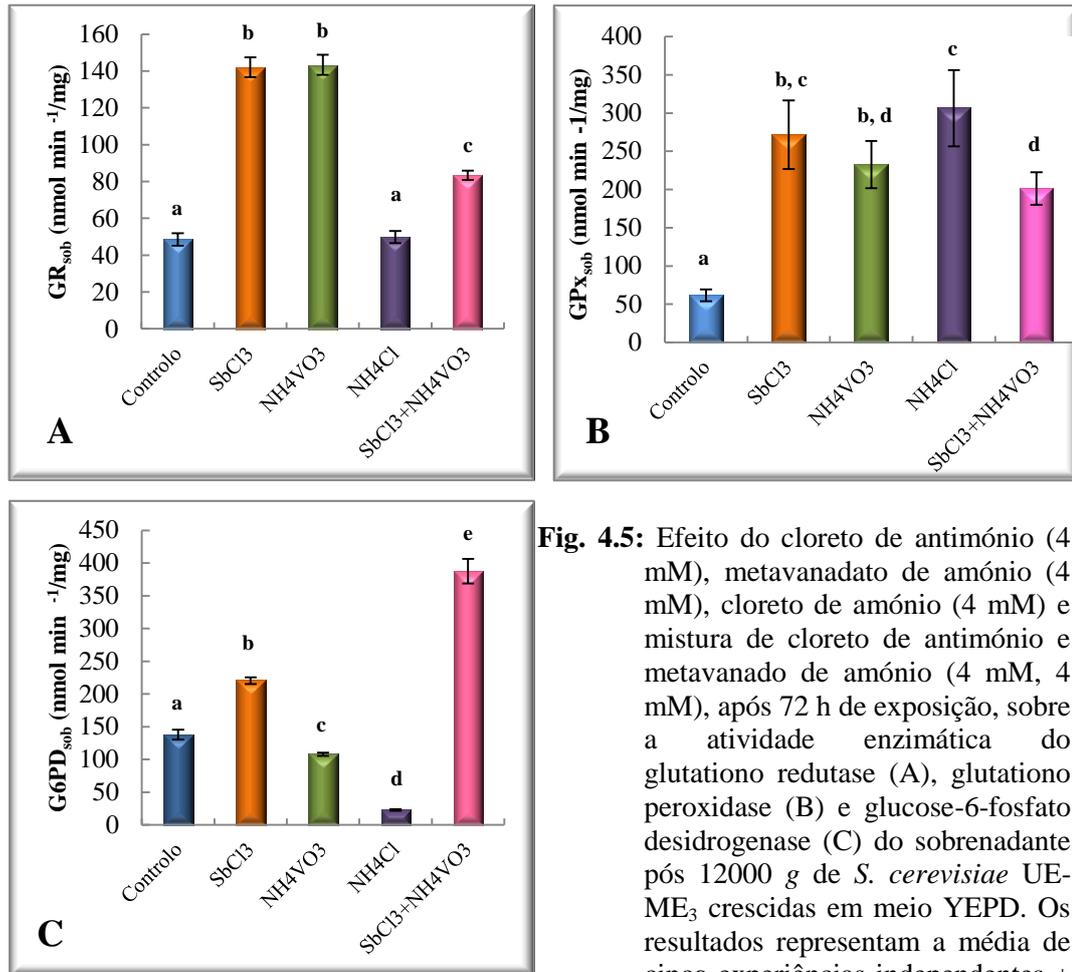


Fig. 4.5: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a atividade enzimática do glutatono redutase (A), glutatono peroxidase (B) e glucose-6-fosfato desidrogenase (C) do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01)

As Fig. 4.6A e 4.6B comparam o efeito do SbCl_3 e do NH_4VO_3 sobre catalases citoplasmáticas e peroxissomais de *S. cerevisiae*. A Fig. 4.6A revela que o SbCl_3 e NH_4Cl não provocaram alterações significativas da CAT T. Embora o NH_4VO_3 e a mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ tenham induzido um aumento significativo desta atividade catalítica, sendo a variação em termos percentuais galopantemente superior à detetada em qualquer uma das outras condições de ensaio. Um perfil de resposta semelhante foi observado na Fig. 4.6B para a catalase peroxissomal, embora a diferença percentual entre o efeito do NH_4VO_3 e o da mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ seja inferior à detetada na Fig. 4.6A. As alterações aqui referidas mostram que existe uma resposta inversa entre catalases e GPx na desintoxicação do peróxido de hidrogénio. Provavelmente, o aumento da atividade CAT A prender-se-á, ainda, com a indução da β -oxidação peroxissomal, a única via oxidativa de lípidos em leveduras. O ATP mobilizado por essa alteração metabólica poderá estar a ser utilizado na indução da síntese *de novo* de proteínas detetada nos sedimentos de *S. cerevisiae*, provavelmente envolvidas na produção de indutores de morte celular por processo ativo. A indução da β -oxidação peroxissomal pode ter sido modulada por reações de desfosforilação onde participa a ALP (Fig. 4.2C) que também aumentou significativamente na presença da mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$. Um processo ativo de morte celular parece ser igualmente confirmado pela indução da CAT T e pelo decréscimo significativo da razão GSH/GSSG detetado no sobrenadante e sedimento de *S. cerevisiae* expostas às referidas condições experimentais.

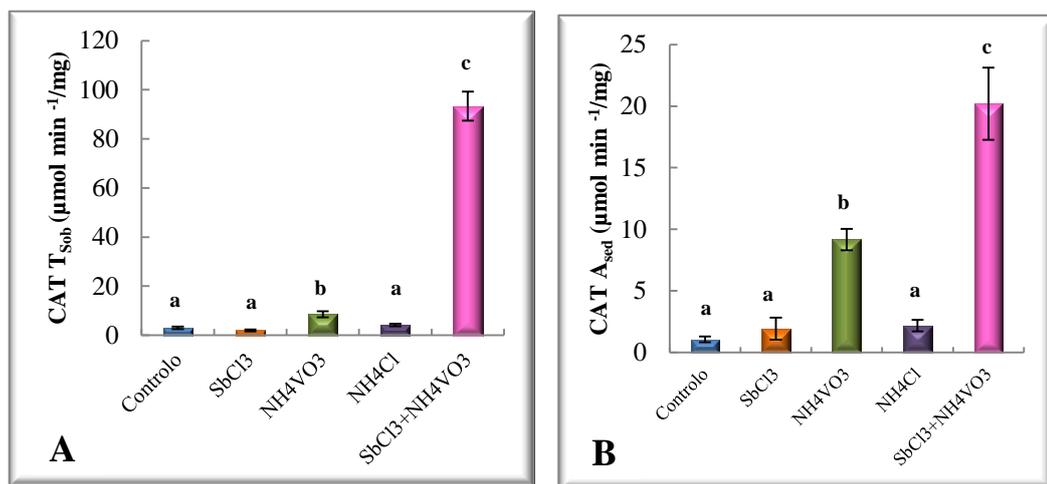


Fig. 4.6: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre a atividade enzimática da catalase T do sobrenadante pós 12000 g (A) e da catalase A do sedimento pós 12000 g (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. 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 Fig.4.7A revela que quer o SbCl_3 quer o NH_4VO_3 individualmente ou em mistura induziram um aumento de ROS, previsível pelo decréscimo da razão GSH/GSSG, fato que parece ser responsável pelo aumento de danos celulares devido à peroxidação lipídica estimada pelo aumento significativo dos níveis de MDA (Fig. 4.7B) e detetados em células expostas ao NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, embora o contributo do SbCl_3 possa ser menor do que o do NH_4VO_3 . As alterações descritas sobre a capacidade antioxidante mediada pelo ciclo do glutatono e ALP parecem explicar a perda de viabilidade celular observada em *S. cerevisiae* crescidas na presença de NH_4VO_3 e mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$, no final da cultura, resposta que parece resultar de um efeito sinérgico entre o Sb(III) e o V(V).

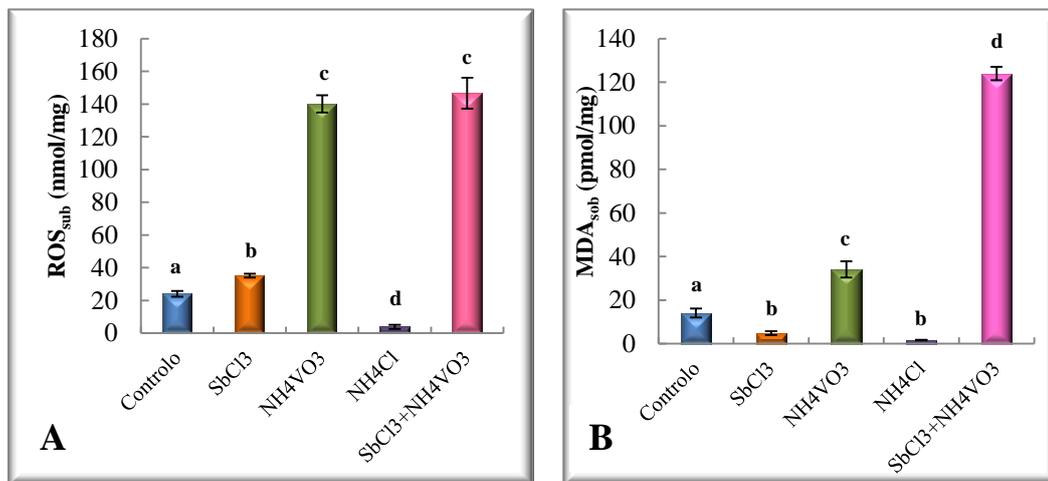


Fig. 4.7: Efeito do cloreto de antimónio (4 mM), metavanadato de amónio (4 mM), cloreto de amónio (4 mM) e mistura de cloreto de antimónio e metavanadato de amónio (4 mM, 4 mM), após 72 h de exposição, sobre as espécies reativas de oxigénio (A) e malonodialdeído (B) do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$)

5 Conclusões

Os parâmetros analisados neste estudo mostram que o SbCl_3 provocou um decréscimo do conteúdo proteico do sedimento, da atividade ALP, da razão GSH/GSSG do sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃, bem como um aumento do conteúdo em GSH, GSSG, tióis não proteicos do sobrenadante e sedimento, das atividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e do conteúdo em ROS. Os níveis de MDA em células expostas ao SbCl_3 permaneceram inferiores ao controlo, muito provavelmente pela razoável capacidade antioxidante assegurada pelos tióis não proteicos. No entanto, estas células exibiam níveis de stresse oxidativo superiores às culturas controlo, mas inferior a qualquer um dos outros tratamentos, fato que nos permite admitir que este agente de stresse na concentração de 4mM induz morte celular maioritariamente necrótica. Por outro lado, o NH_4VO_3 causou um decréscimo do conteúdo proteico do sedimento, da viabilidade celular (cfu), da atividade ALP, dos níveis de GSH e tióis totais não proteicos, da razão GSH/GSSG do sobrenadante e do sedimento, do conteúdo em GSSG do sedimento, bem como um aumento do conteúdo em GSSG do sobrenadante, da atividade GR, GPx, CAT T, CAT A, do conteúdo em ROS e dos níveis intracelulares de MDA. Esta resposta estava também acoplada a um decréscimo da atividade G6PD, regeneradora dos equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao ciclo do glutationo. Este conjunto de resultados permitiu admitir que o NH_4VO_3 foi mais tóxico para *S. cerevisiae* UE-ME₃, tendo em consideração a quantidade de parâmetros afetados e a intensidade dos efeitos observados, comportando-se como um indutor de morte celular que na concentração 4mM poderá ter sido de natureza mista mas deslocada para um processo ativo de morte. A mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ provocou um decréscimo do conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃, da viabilidade celular (cfu), do conteúdo em GSH e GSSG e tióis não proteicos do sobrenadante, bem como da razão GSH/GSSG do sobrenadante, ocorrendo neste último caso uma variação idêntica no sedimento pós-12000 g. A presença dos dois metais no meio de cultura causou ainda um aumento da atividade GR, GPx, G6PD, CAT T, CAT A, bem como do conteúdo em ROS e MDA intracelular. Acresce-se ainda a deteção de um aumento do conteúdo proteico do sedimento celular e da atividade ALP. Face ao exposto, a presença dos dois metais, Sb (III) e V(V), confirma a sua toxicidade e efeitos sinérgicos que para além de induzirem morte celular acentuam uma transição necrose – apoptose mais evidente do que na exposição individual ao NH_4VO_3 .

6 Referências bibliográficas

- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., Vanoni, M. (2012), Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein–protein interaction network, *Biotechnology Advances*, 30, 52–72
- Alloway, B., (2013), Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, *Springer*, vol. 22, 3rd ed.
- Auchincloss, A., Roux, A., Dvonch, J., Brown, P., Barr, R., Daviglius, M., Goff, D., Kaufman, J., O’Neill, M. (2008), Associations between recent exposure to ambient fine particulate matter and blood pressure in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA), *Environmental Health Perspective*, 116, 486–491.
- Barrio, D., Braziunas, M., Etcheverry, S., Cortizo, A. (1999), Maltol Complexes of Vanadium (IV) and (V) Regulate *In Vitro* Alkaline Phosphatase Activity and Osteoblast-like Cell Growth, *J. Trace Elements Med. Biol.*, 11.110-115
- Beers, R. and Sizer, I. (1952), A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-140.
- Bergmeyer, H., Grabl, M.(1983), Method of Enzymatic analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida.
- Beyersmann, D., Hartwig, A. (2008), Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms, *Archives of Toxicology*, 82, 493–512.
- Bode, H., Friebel, C. and Fuhrman, G. (1990), Vanadium uptake by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1022, 163-170.
- Bretaudiere, P., Spillman, T. (1984), Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol.II, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida.
- Chen, K., Wang, K., Kirichian, A., Aowad, A., Lyer, L, Adelstein, S., Kassis, A. (2006), In silico design, synthesis, and biological evaluation of radioiodinated quinazolinone derivatives for alkaline phosphatase–mediated cancer diagnosis and therapy, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 3001-3013.
- Crans, C., Amin, S., Keramidias, D. (1998), J. O. NRIAGU (ed.), Vanadium in the Environment Part 1: Chemistry of relevance to vanadium in the environment, 73-95, *Willey*, New York
- Cun-xiong, L., Chang, W., Zhi-gan, D., Min-ting, L., Xing-bin, L., Gang, F. (2009), Recovery of vanadium from black shale, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20, 127-131

- Ďurfinová, M., Brechtlová, M., Líška B., Barošková, Ž. (2007), Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues. *Chemical Papers*, 61, 4: 321-325.
- EFSA (2004), European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA Journal* 33, 1-22.
- Ferreira, R., Alves-Ferreira, I., Magriço, S., Ferraz-Franco, C. (2008) Comportamento celular e resposta antioxidante diferenciados de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Saccharomyces chevalieri* ao metavanadato de amónio, *Revista de Ciências Agrárias*, 30, 455-464.
- Forman, H., Davies, K., Ursini, F. (2013), How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Radical Biology and Medicine*, 1873-4596
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E., Panayiotidis, M. (2009), Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois, *Mutation Research*, 674, 3-22
- Goldberg, D., Spooner, R. (1987), Glutathione reductase, *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed, Bergmayer, VCH, New York.
- Golub, E., Boesze-Battaglia, K. (2007), The role of alkaline phosphatase in mineralization, *Curr Opin Orthop*, 18, 444-448
- Harber, J. (2009), Fifty years of my romance with vanadium oxide catalysts, *Catalysis Today*, 142, 100-113
- He, M., Wang, X., Wu, F., Fu, Z. (2012), Antimony pollution in China, *Science of the Total Environment*, 421-422, 41-50
- He, M., Wang, X., Wu, F., Fu, Z. (2012), Antimony pollution in China, *Science of the Total Environment*, 421-422, 41-50
- Hissin, H. (1976) A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, (2006), Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Lyon, France, vol. 86.
- Ji, L. (2008), Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling, *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 142-152

- Krachler, M., Emons, H., Zheng, J. (2001), Speciation of antimony for the 21st century: promises and pitfalls, *Trends in analytical chemistry*, 20, 2
- Le Bel, C., Ischiropoulos, H., Bondys, S. (1990), Evaluation of the Probe 2', 7' Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research*, 5, 227-231.
- Li, H., Zhou, D., Zhang, Q., Feng, C., Zheng, W., He, K., Lan, Y. (2013), Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers, *NeuroToxicology*, 36, 49–54
- Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., Randall, J. (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mattiazzi, M., Petrovic, U., Krizaj, I. (2012), Review: Yeast as a model eukaryote in toxicology: A functional genomics approach to studying the molecular basis of action of pharmacologically active molecules, *Toxicology.*, 60, 558- 571
- Michael, S., Montag, M., Dott, W. (2013), Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter, *Environmental Pollution*, 1-11
- Milan, J. (2006), Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes, *Purinergic Signalling*, 2, 335-341
- Moreno, T., Querol, X., Alastuey, A., Rosa, J., Campa, A., Minguillón, M., Pandolfi, M., González-Castanedo, Y., Monfort, E., Gibbons, W. (2010), Variations in vanadium, nickel and lanthanoid element concentrations in urban air, *Science of the Total Environment*, 408, 4569–4579
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, (2), 351-358.
- Pacheco, J., Gonsebatt, M. (2009), The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Mutation Research*, 674, 137-147
- Pinon-Zarate, G., Rodriguez-Lara, V., Rojas-Lemus, M., Martinez-Pedraza, M., Gonzalez-Villalva, A., Mussali-Galante, P., Fortoul, I., Barquet, A., Masso, F., Montano, F. (2008), Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses, *Journal of Immunotoxicology*. 5, 115- 122.

- Posmyk, M., Kontek, R., Janas, K. (2009), Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 596–602
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, A., Van Dijken, P. (1989), Enzymatic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 468-477.
- Quiroz, W., Cortes, M., Astudillo, F., Bravo, M., Cereceda, F., Vidal, V., Lobos, M. (2013), Antimony speciation in road dust and urban particulate matter in Valparaiso, Chile: Analytical and environmental considerations, *Microchemical Journal*, 110, 266- 272
- Resnick, M., Cox, B. (2000), Yeast as an honorary mammal, *Mutation Research*, 451, 1–11.
- Rettori, D., Volpe, P. (1999), Microcalorimetry: a useful technique for studying the diauxism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Química Nova*, 23 (2), 257- 261
- Rodriguez-Mercado, J.J., Alvarez-Barrera, L., Altamirano-Lozano, A. (2010), Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes, *Drug and Chemical Toxicology*, 33, 97 – 102.
- Rodriguez-Mercado, J.J., Alvarez-Barrera, L., Altamirano-Lozano, M.A. (2010), Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes, *Drug and Chemical Toxicology*, 33, 97–102
- Rosado, T., Conim, A., Alves-Pereira, I., Ferreira, R. (2009) - Vanadium pentoxide effects on stress responses in wine *Saccharomyces cerevisiae* strain UE-ME3, *Ecotoxicol*, 18, 1116–1122.
- Rossner, P., Svecovaa, V., Milcovaa, A., Lnenickovaa, Z., Solanskya, I., Sram, R. (2008), Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part II. Oxidative damage to lipids and proteins, *Mutation Research*, 642, 21–27.
- Rowe, L., Degtyareva, N., Doetsch, P. (2008), DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*, *Free Radical Biology & Medicine* 45, 1167–1177
- Sánchez-Martínez, M., Pérez-Corona, T., Cámara, C., Madrid, Y., (2013), Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants, *Food Chemistry* 15;141(2):816-22
- Shtangeeva, I., Bali, R., Harris, A. (2011), Bioavailability and toxicity of antimony, *Journal of Geochemical Exploration*, 110, 40–45.
- Simeonov, L., Kochubovski, M., Simeonova, B. (2010), *Environmental heavy metal pollution and effects on child mental development*, Springer, Bulgária

- Smichowski, P. (2008), Antimony in the environment as a global pollutant: A review on analytical methodologies for its determination in atmospheric aerosols, *Talanta*, 75, 2-14
- Turton, H., Dawes, I., Grant, C. (1997), *Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a yAP-1-Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde, *Journal of Bacteriology*, 179, 1096-1101
- U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS) on Antimony, National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC, 1999.
- U.S. EPA's 2008 Report on the Environment (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/R-07/045F (NTIS PB2008-112484)
- Wang, G., Fowler, B. (2008), Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233, 92–99.
- Wilson, S., Lockwood, P., Ashley, P., and Tighe, M. (2009), The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review, *Environmental Pollution*, 158, 1169–1181
- Wu, J., Kosten, T., Zhang, X. (2013), Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia, *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*
- Yao, K., Keshavan, S. (2011), Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view, *Antioxidant Redox Signal*, 15, 2011-35.
- Yoshioka, N., Nakashima, H., Hosoda, K., Eitaki, Y., Shimada, N., Omae, K. (2008), Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among nickel-cadmium battery workers, *Journal of Occupational Health*, 50, 229–235.
- Zakrajšek, T., Raspor, P., Jamnik, P. (2011), *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level, *Journal of proteomics*, 74, 2837-2845
- Zhao, X., Bai, F. (2009), Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production, *Journal of Biotechnology*, 144, 23–30
- Zhu, B., Wu, Z., Li, J., Wang, G. (2011), Single and joint action toxicity of heavy metals on early developmental stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2193–2202
- Živković, M., Životić, I., Dinčić, E., Stojković, L., Vojinović, S., Stanković, A. (2013), The glutathione S-transferase T1 deletion is associated with susceptibility to multiple sclerosis, *Journal of the Neurological Sciences*

Anexos

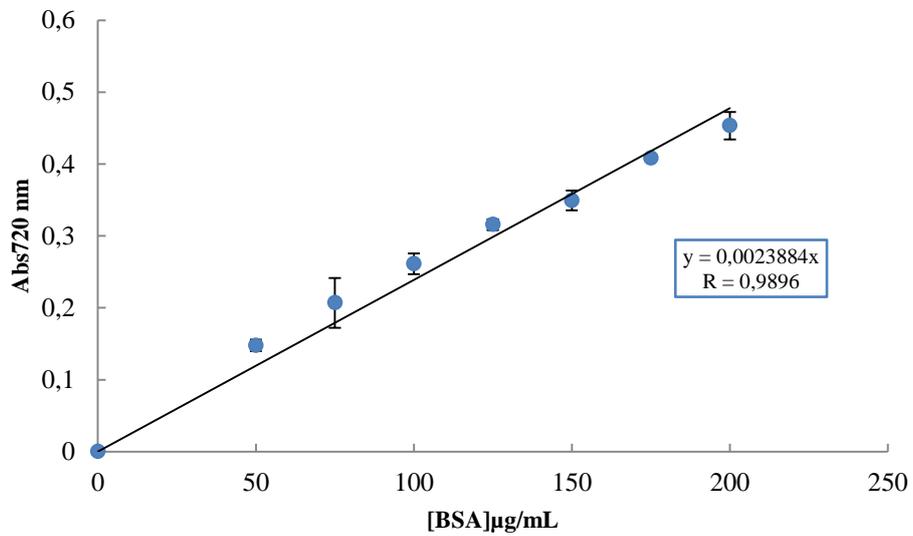


Fig. A1: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteína, construída a partir da leitura da absorvência da solução padrão (50 - 200 µg/mL).

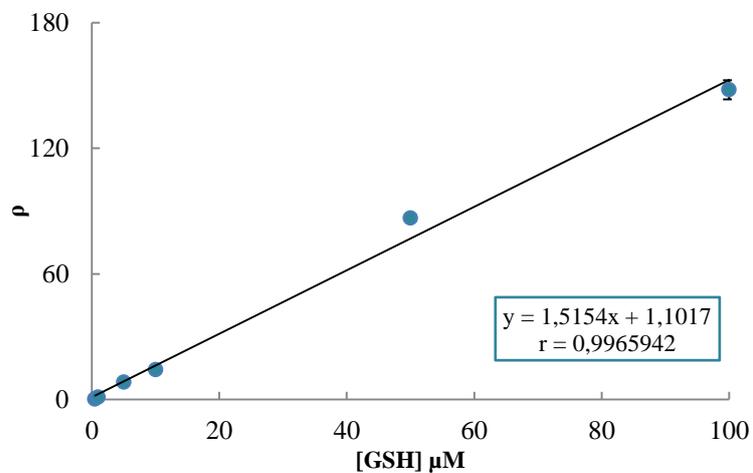


Fig. A2: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0,25 - 5 µM).

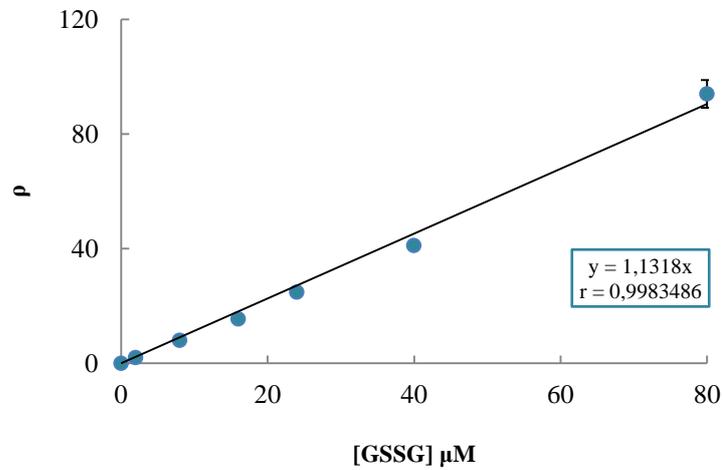


Fig. A3: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0,4 e 12 μM).

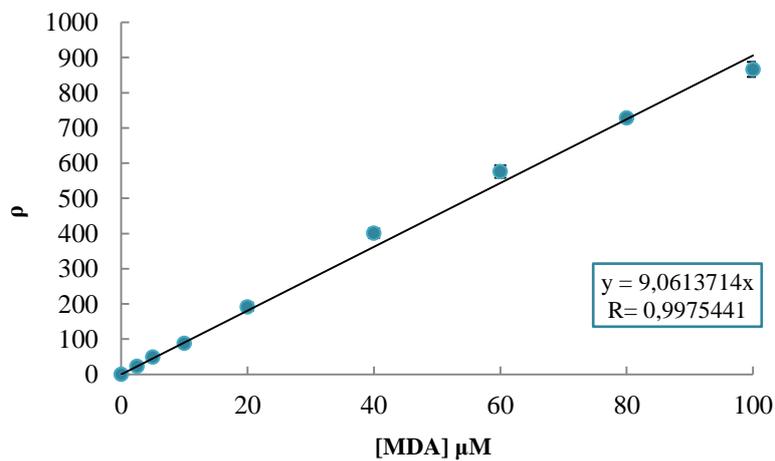


Fig. A4: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (2,5 -100 M).

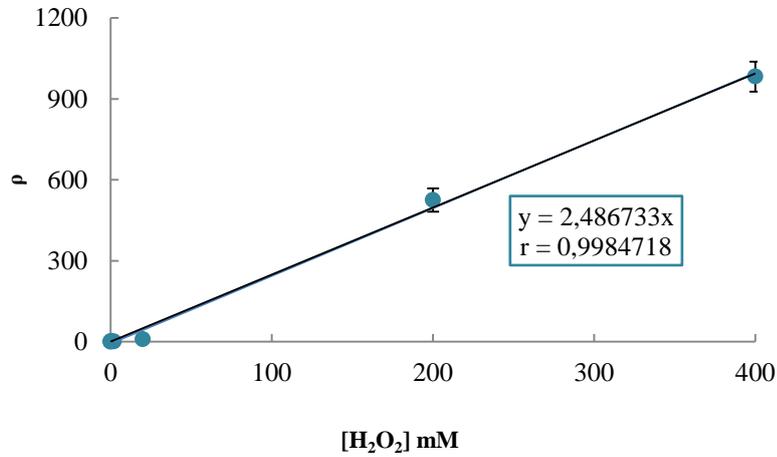


Fig. A5: Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-400 μ M).

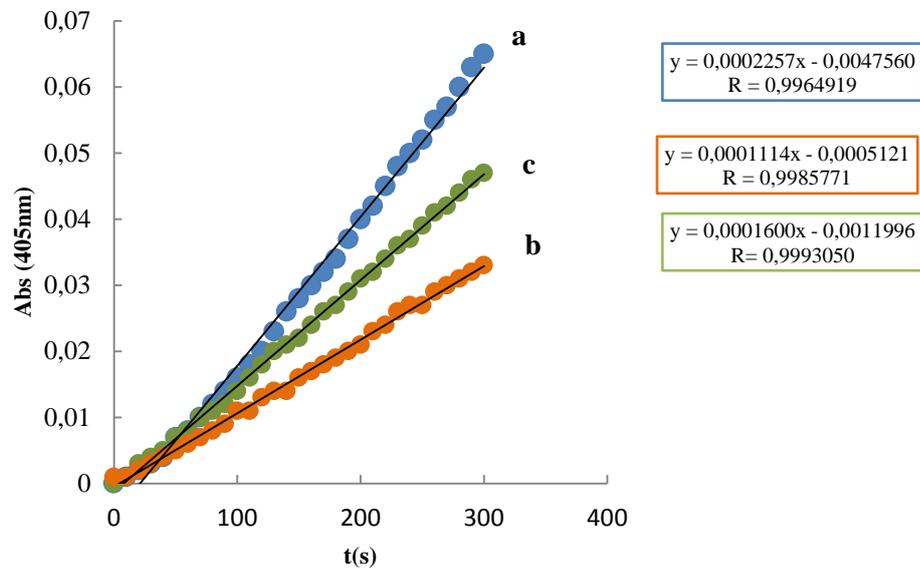


Fig. A6: Representação da curva de reação da atividade enzimática ALP para o controlo (a), para o $SbCl_3$ (b) e para o NH_4VO_3 (c)

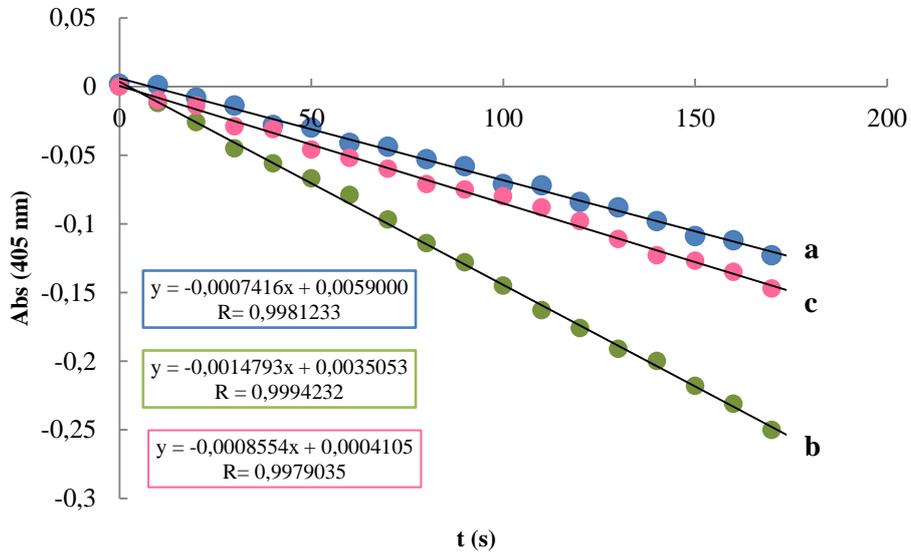


Fig. A7: Representação da curva de reacção da atividade enzimática GR para o controlo (a), para o NH_4VO_3 (b) e para a mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ (c)

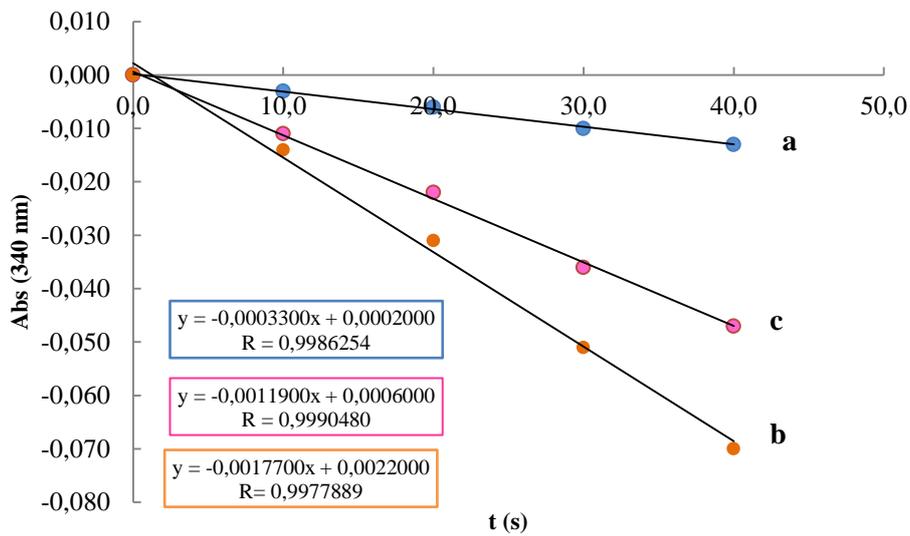


Fig. A8: Representação da curva de reacção da atividade enzimática GPx para o controlo (a), para o SbCl_3 (b) e para a mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ (c)

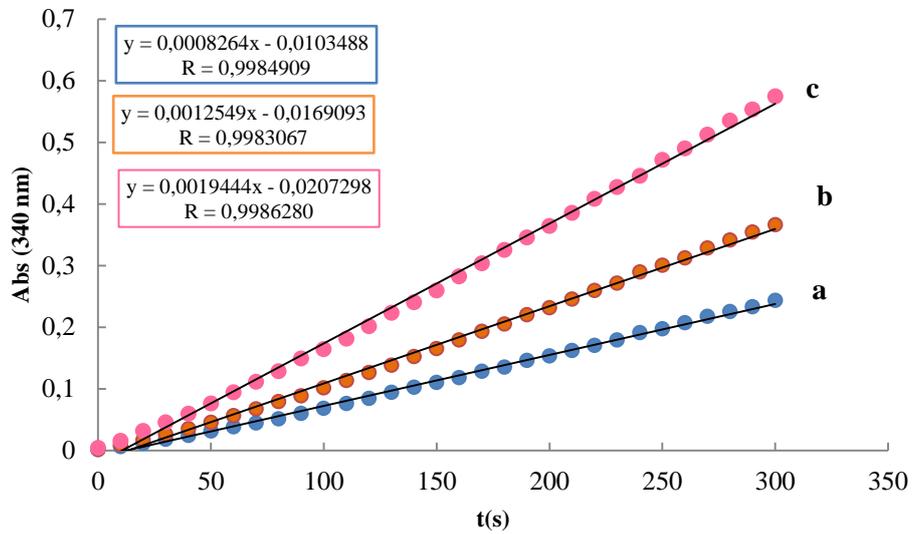


Fig. A9: Representação da curva de reacção da atividade enzimática G6PD para o controlo (a), para o $SbCl_3$ (b) e para a mistura $SbCl_3 + NH_4VO_3$ (c)

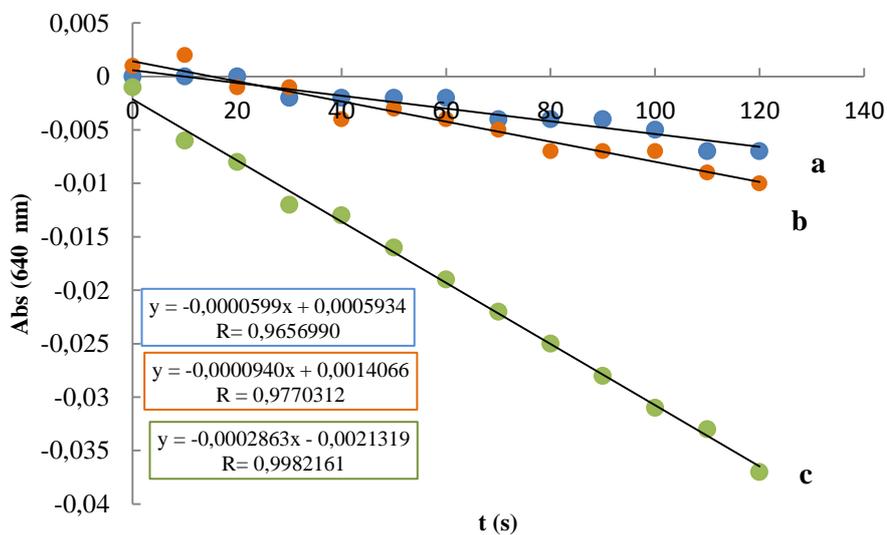


Fig. A10: Representação da curva de reacção da atividade enzimática CAT T para o controlo (a), para o $SbCl_3$ (b) e para NH_4VO_3 (c).

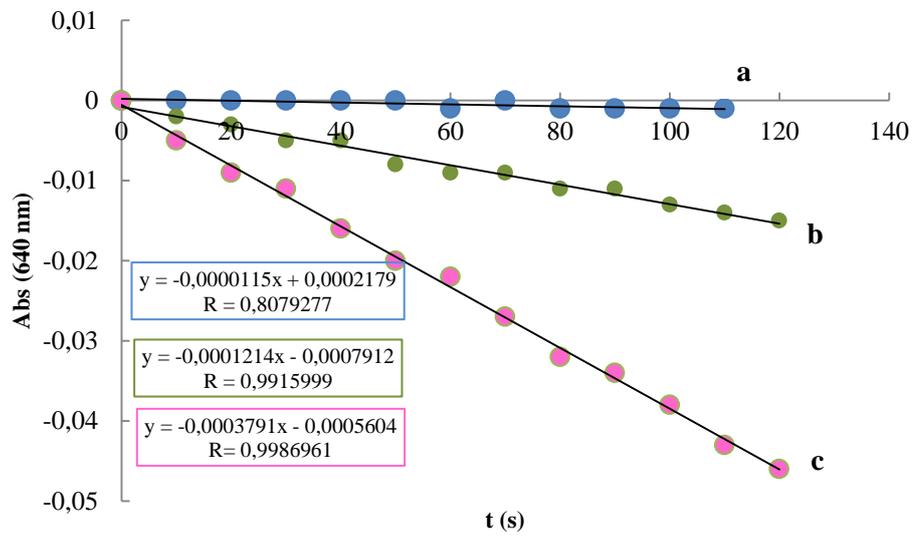


Fig. A11: Representação da curva de reacção da atividade enzimática CAT A para o controlo (a), para o NH_4VO_3 (b) e para a mistura $\text{SbCl}_3 + \text{NH}_4\text{VO}_3$ (c).

Toxicidade pelo antimónio e vanádio em *Saccharomyces cerevisiae*
Joana Cordeiro da Costa

Quadro A1: Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de *S. cerevisiae* UE- ME₃, crescidas em meio YEPD, na ausência e na presença dos agentes de stresse em estudo

Cont. ou At. Enz.	Origem de variâncias	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig.
Turbidez	Entre grupos	1,776	4	,444	47,118	,000
	Dentro dos grupos	,188	20	,009		
	Total	1,964	24			
cfu	Entre grupos	5115288888888,891	4	127882222222,223	1202,654	,000
	Dentro dos grupos	21266666666,667	20	1063333333,333		
	Total	51365555555,558	24			
PS	Entre grupos	86,558	4	21,640	44,005	,000
	Dentro dos grupos	9,835	20	,492		
	Total	96,393	24			
ALP	Entre grupos	4259,492	4	1064,873	3329,129	,000
	Dentro dos grupos	6,397	20	,320		
	Total	4265,889	24			
CATA	Entre grupos	1315,732	4	328,933	165,257	,000
	Dentro dos grupos	39,809	20	1,990		
	Total	1355,540	24			
CATT	Entre grupos	31721,009	4	7930,252	2042,282	,000
	Dentro dos grupos	77,661	20	3,883		
	Total	31798,670	24			
G6PD	Entre grupos	381262,571	4	95315,643	1209,068	,000
	Dentro dos grupos	1576,679	20	78,834		
	Total	382839,250	24			
GPx	Entre grupos	178010,199	4	44502,550	47,063	,000
	Dentro dos grupos	18911,738	20	945,587		
	Total	196921,937	24			
GR	Entre grupos	45294,270	4	11323,568	190,508	,000
	Dentro dos grupos	1188,774	20	59,439		
	Total	46483,044	24			
GSH sob	Entre grupos	202125,132	4	50531,283	292,313	,000
	Dentro dos grupos	3457,336	20	172,867		
	Total	205582,467	24			
GSSG sob	Entre grupos	33972,224	4	8493,056	1067,735	,000
	Dentro dos grupos	159,085	20	7,954		
	Total	34131,310	24			
Soma Sob	Entre grupos	348808,862	4	87202,216	137,730	,000
	Dentro de grupos	12662,800	20	633,140		
	Total	361471,662	24			
Razao Sob	Entre grupos	8,374	4	2,093	201,259	,000
	Dentro de grupos	,208	20	,010		
	Total	8,582	24			
GSH Sed	Entre grupos	39,090	4	9,773	140,172	,000
	Dentro de grupos	1,394	20	,070		
	Total	40,484	24			
GSSG Sed	Entre grupos	159,315	4	39,829	1524,101	,000
	Dentro de grupos	,523	20	,026		
	Total	159,837	24			
Soma Sed	Entre grupos	321,248	4	80,312	295,700	,000
	Dentro de grupos	5,432	20	,272		
	Total	326,680	24			
Razao Sed	Entre grupos	1,725	4	,431	187,813	,000
	Dentro de grupos	,046	20	,002		
	Total	1,771	24			
MDA	Entre grupos	49392,694	4	12348,174	1089,103	,000
	Dentro de grupos	226,759	20	11,338		
	Total	49619,453	24			
ROS	Entre grupos	92424,915	4	23106,229	1008,144	,000
	Dentro de grupos	458,392	20	22,920		
	Total	92883,306	24			
Prot sob	Entre grupos	,373	4	,093	35,511	,000
	Dentro de grupos	,052	20	,003		
	Total	,425	24			
Prot sed	Entre grupos	,308	4	,077	348,679	,000
	Dentro de grupos	,004	20	,000		
	Total	,312	24			