

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Efeitos de extratos aquoso e
etanólico de *Portulaca oleracea* L.,
sub-espécie sativa em
*Saccharomyces cerevisiae***

Sofia Maria de Jesus

Orientação: Prof^a Isabel Alves-Pereira

Prof Rui Ferreira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2017

Agradecimentos

Chegou ao fim mais uma etapa do meu percurso académico a qual só foi possível graças ao apoio, colaboração e contributo de algumas pessoas às quais gostaria de agradecer pois sem elas nada disto teria sido possível.

Um enorme obrigada aos meus orientadores Professor Dr. Rui Alves Ferreira e Professora Dr.^a Isabel Alves-Pereira pela oportunidade que me deram, pela confiança depositada e pelo acompanhamento diário que tive, pelos ensinamentos que levo daqui.

Obrigada ao Professor Eng. Rui Machado do ICAAM, Departamento de Fitotecnia da Escola de Ciências e Tecnologias da Universidade de Évora e ao Mestre Ricardo Vieira Santos pela disponibilização do material vegetal oriundo dos seus ensaios de campo.

Obrigada ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais e Mediterrânicas (ICAAM) e Departamento de Química da Escola de Ciências e Tecnologias da Universidade de Évora (materiais, apoios financeiros) pela realização deste trabalho de investigação.

Aos meus colegas de Laboratório Joana Capela Pires, Marta Candeias, Ana Teresa Rebocho, Ana Rita Casquinha, Inês Pereira, Ana Flores pelos exemplos de trabalho e dedicação, pela troca de experiências, pela disponibilidade.

Às técnicas de laboratório D. Custódia, D. Esperança e D. Anabela pelo apoio demonstrado.

Aos amigos de sempre e aos que fui fazendo na Muy Nobre e Sempre Leal Cidade de Évora durante este percurso e que de uma maneira ou de outra me apoiaram e incentivaram nas horas mais difíceis.

À equipa Lidl pela compreensão demonstrada principalmente durante este último ano de mestrado, tanto na loja de Évora, na loja de Quarteira, Chefes de Loja, Chefes de Vendas, Provedor.

Um obrigada à fisioterapeuta Lídia (CHSF Pombal) que me ajudou na minha recuperação e pela paciência que teve comigo nesta etapa final do mestrado.

Um agradecimento à minha turma de mestrado 2014/2016 pela coragem e incentivo que fomos partilhando, em especial à Eva Afonso por toda a paciência, compreensão ao longo deste percurso.

Como os últimos são sempre os primeiros, um enorme obrigada Mãe por me incentivares e mostrares que nada é impossível e que basta ter força de vontade, por me mostrares que desistir não é opção e que só batalhando se consegue os nossos objetivos, por todos os conselhos e por tudo o que tens feito por mim.

Índice geral

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Índice geral</i>	<i>iii</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>v</i>
<i>Índice de quadros</i>	<i>vii</i>
<i>Abreviaturas e nomenclatura de enzimas</i>	<i>ix</i>
<i>Resumo</i>	<i>xiii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xv</i>
1. Fundamento Teórico	1
1.1. <i>Portulaca oleracea</i> L.	1
1.1.1. Origem, propagação e distribuição	1
1.1.2. Características nutritivas e funcionais	3
1.2. Antioxidantes, propriedades físico-químicas e biológicas	6
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – modelo biológico para estudos de stress	15
1.4. Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)	18
1.5. Mecanismos de defesa antioxidantes	24
1.6. Acetato um agente tóxico	30
2. Problemática e objetivos	33
2.1. Problemática	33
2.2. Objetivo Geral	34
2.3. Objetivos específicos	34
3. Metodologia	35
3.1 Estratégia	35
3.2 Procedimento experimental	37
3.2.1. Preparação de extratos de <i>Portulaca oleracea</i>	37
3.2.2. Caracterização química de extratos de <i>Portulaca oleracea</i>	37
3.2.2.1. Ascorbato	37
3.2.2.2. Fenóis totais	38
3.2.2.3. Prolina	38
3.2.2.4. Capacidade antioxidante pelo método do FRAP	38
3.2.2.5. Capacidade antioxidante pelo método do DPPH	39
3.2.3. Atividade biológica em <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	39
3.2.3.1. Cultura de microrganismos	39
3.2.3.2. Determinação do peso seco	40
3.2.3.3. Viabilidade celular	40
3.2.3.4. Preparação das frações pós-12000 g	41
3.2.3.5. Proteína	41
3.2.4. Determinação de atividade enzimática	42
3.2.4.1. Fosfatase alcalina	42

3.2.4.2. Superóxido dismutase	42
3.2.4.3. Glicose-6-fosfato desidrogenase	43
3.2.4.4. Glutationo redutase	43
3.2.4.5. Glutationo peroxidase	44
3.2.4.6. Catalase	44
3.2.5. Determinação de conteúdos nas frações celulares	45
3.2.5.1. Glutationo e dissulfureto de Glutationo	45
3.2.5.2. ROS	45
3.2.5.3. MDA	46
3.3 Diagrama do Trabalho	47
3.4 Material	48
3.5 Equipamento	48
3.6 Reagentes	49
4. Resultados e Discussão	51
4.1. Determinação da capacidade antioxidante de extratos aquoso e etanólicos de <i>Portulaca oleracea</i> L., sub-espécie sativa	51
4.2. Efeitos biológicos de extratos aquoso e etanólicos de <i>Portulaca oleracea</i> L., sub-espécie sativa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	55
5. Conclusões	67
6. Referências bibliográficas	69
ANEXOS	77

Índice de figuras

Figura 1.1 – Ciclo do oxidação-redução do ascorbato.	9
Figura 1.2 – Via de biossíntese da prolina em células vegetais.	10
Figura 1.3 – Reação de redução do DPPH [•] por um agente antioxidante.....	13
Figura 1.4 – Reação de redução do Fe (III) do complexo férrico-tripiridiltriazina.....	14
Figura 1.5 – Curva de crescimento típica de <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 1.6 – Principais causas e consequências da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula	21
Figura 1.7 – Diagrama ilustrativo das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS).	23
Figura 1.8 – Defesas celulares antioxidantes	24
Figura 1.9 – Representação estrutural do Glutathione: γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina	26
Figura 1.10 – Passos iniciais da via das pentoses fosfato.....	28
Figura 4.1 – Conteúdo em ascorbato presente em diferentes extratos de caules e folhas de <i>Portulaca oleracea</i> L.	51
Figura 4.2 – Conteúdo em fenóis totais presentes em diferentes extratos de caules e folhas de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	52
Figura 4.3 – Conteúdo em prolina presente em diferentes extratos de caules e folhas de <i>Portulaca oleracea</i> L.	53
Figura 4.4 – Capacidade antioxidante estimada pelo método do FRAP de extratos de caules e folhas de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	54
Figura 4.5 – Capacidade antioxidante estimada pelo DPPH de diferentes extratos de caules e folhas de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	55
Figura 4.6 – Peso seco de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25 mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.	56
Figura 4.7 – Contagem de cfu de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ no final da cultura, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.....	57
Figura 4.8 – Atividade enzimática ALP obtida de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.....	58
Figura 4.9 – Atividade enzimática SOD1 obtida de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.....	59
Figura 4.10 – Atividade enzimática G6PD obtida de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega.....	60

- Figura 4.11 – Atividade enzimática GR (A) e GPx (B) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 61
- Figura 4.12 – Conteúdo em GSH (A), GSSG (B), GSH+GSSG (C) e razão GSH/GSSG (D) do sobrenadante pós 12000 g obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 63
- Figura 4.13 – Atividade enzimática CTT1 (A) e CTA1 (B) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega..... 64
- Figura 4.14 – Conteúdo em ROS (A) e MDA (B) do sobrenadante pós 12000g obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega. 65
- Figura A.1 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ascorbato, construída a partir da leitura de soluções padrão de ascorbato (0-30 mg/L). 79
- Figura A.2 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de fenóis totais, construída a partir da leitura de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). 79
- Figura A.3 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de prolina, construída a partir da leitura de soluções padrão de prolina (0-20 mg/L). 80
- Figura A.4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de FRAP, construída a partir da leitura de soluções padrão de Trolox (0-15 mg/mL). 80
- Figura A.5 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de DPPH, construída a partir da leitura de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). 81
- Figura A.6 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de proteína, construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL). 81
- Figura A.7 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática ALP de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 82
- Figura A.8 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática SOD de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 82
- Figura A.9 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática G6PD de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 83
- Figura A.10 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática GR de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 83
- Figura A.11 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática GPx de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. 84

Figura A.12 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática CTA1 de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega..... 84

Figura A.13 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática CTT1 de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega..... 85

Figura A.14 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0-50 µM). 85

Figura A.15 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0-80 µM). 86

Figura A.16 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0,2-20 µM). 86

Figura A.17 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (2,5 -100 µM). 87

Índice de quadros

Quadro 3.1 – Descrição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a extrato de folha de beldroega, a acetato ou a extrato de folha de beldroega e acetato. ... 40

Quadro 4.1 – Conteúdo e capacidade antioxidante de espécies vegetais 52

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA F”) 88

Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA F”) 89

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

ALP	Fosfatase Alcalina (EC 3.1.3.1)
AAC	Ascorbato
AH	Antioxidante
APX	Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
BSO	Butionina sulfoximina
CTA1	Catalase peroxissomal (EC 1.11.1.6)
CTT1	Catalase citoplasmática (EC 1.11.1.6)
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína (forma reduzida)
DHAR	Desidroascorbato redutase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPPH-H	(difenil-picril-hidrazina)
EC	Extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAD⁺	Dinucleótido de flavina e adenina – (forma oxidada)
FADH₂	Dinucleótido de flavina e adenina – (forma reduzida)
FeCl₃	Cloreto de ferro
FRAP	Capacidade antioxidante redutora do fero, do inglês <i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i>
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GLDase	L-galactono- γ -lactona dehydrogenase (EC 1.3.2.3)
GPx	Glutationo Peroxidase (EC 1.11.1.19)
GR	Glutationo redutase (EC 1.8.1.7)
GS•	Radical ti-ilo
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de Glutationo
HK	Hexocinase (EC 2.7.1.1)
IFN-γ	Interferão- γ

L•	Radical lipídico
L-GL	L-galactono- γ -lactona
LH	Lípido
LNA ou LA	Ácido-linoleico
LOO•	Radical peroxilo
LOOH	Lipoperóxidos
LPS	Lipopolissacáridos
MDA	Malonodialdeído
MDHAR	Monodehidroascorbato redutase (EC 1.6.5.4)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
NO•	Radical óxido nítrico
OAT	Ornitina δ -aminotransferase
•OH	Radical hidroxilo
O₂^{•-}	Radical anião superóxido
OPT	<i>o</i> -fetaldeído
pNP	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (EC 2.7.1.137)
Pro	Prolina
ProDH	Prolina desidrogenase (EC 1.5.99.8)
P5C	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	P5C-desidrogenase (EC 1.2.1.12)
P5CR	P5C redutase (EC 1.5.1.2)
P5CS	P5C sintetase (EC 2.7.2.11)
RL	Radicais livres
ROOH	Organoperóxido
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SDS	Duodecilssulfato de sódio

SOD	Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1)
POD	Peroxidases (EC 1.11.1.7)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BHP	<i>t</i> -butil peróxido
TCA	Ácido tricloroacético
TPTZ	(2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
TPC	Conteúdo em fenóis totais
YPD	Meio rico
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros

Efeitos de extratos aquoso e etanólico de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa em *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Portulaca oleracea L. é uma planta com valor nutritivo, funcional e comercial elevado. Neste estudo avaliou-se a capacidade antioxidante de extratos de caules e folhas da planta fertilizada com NH_4NO_3 (60 kg/ha), bem como os efeitos de extratos foliares em *Saccharomyces cerevisiae*, crescidas na ausência e na presença de acetato (25mM). Os extratos aquoso e etanólico (12%) de folhas de beldroega exibiram maior teor em fenóis e capacidade antioxidante estimada pelo DPPH e FRAP, superior no primeiro caso. O extrato de etanol absoluto apresentou maior teor em ascorbato e prolina. A exposição simultânea de *S. cerevisiae* a acetato e extrato etanólico (12%) de folha de *P. oleracea* conservou os níveis de biomassa e danos celulares produzidos, viabilidade celular, razão GSH/GSSG e atividades catalíticas ALP, GPx e CTA1 idênticos aos de células controlo com aumento das atividades GR e SOD1, contrariando o padrão de morte celular pelo acetato.

Palavras Chave: beldroega; levedura; ciclo do glutationo; ascorbato; fenóis

Effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L., sativa on *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Portulaca oleracea L. is a plant with high nutritional, functional and commercial value. In this study it was evaluated the antioxidant power in the extracts of stems and leaves of plant fertilized with NH_4NO_3 (60 kg/ha) as well as the effects of those extracts in *Saccharomyces cerevisiae* grown in the absence and presence of acetate (25mM). The aqueous and 12% ethanol extracts of purslane exhibited higher content of phenols and antioxidant capacity estimated by DPPH and FRAP, higher than in the first case. The absolute ethanol extract showed a higher content of ascorbate and proline. The simultaneous exposure of *S. cerevisiae* to the acetate and of 12% ethanol extract of *P. oleracea* leaves maintained the biomass and cell damages levels, cell viability, GSH/GSSG ratio and catalytic activities ALP, GPx and CTA1, similar to control assay, with an increase in GR and SOD1 activities, counteracting the cell death pattern induced by acetate.

Key Words: purslane; yeast; glutathione cycle; ascorbate; phenols

1. Fundamento Teórico

1.1. *Portulaca oleracea* L.

1.1.1. Origem, propagação e distribuição

Portulaca oleracea L., vulgarmente denominada beldroega, é um dos membros da família *Portulacaceae* (Quadro 1.1), que engloba mais de 120 espécies de ervas suculentas e arbustos (Yazici, 2007; Zhou, 2015; Erkan, 2012). Trata-se de uma erva daninha, com distribuição ubíqua pela Europa, África, América do Norte, Ásia e Austrália, sendo a oitava planta mais comum do globo terrestre, encontrando-se descrito o seu uso em culinária na Ásia, Europa Central e Mediterrânica. A mistura de fitoquímicos com atividade biológica detetados na planta tem contribuído para a sua proteção contra agentes deletérios ambientais e encontram-se associados a efeitos benéficos para a saúde humana (Oliveira, 2009; Chowdhary, 2013; Zhou, 2015; Uddin, 2014; Dkhil, 2011).

Quadro 1.1 – Classificação científica de *Portulaca oleracea* (adaptado de Cocetta, 2014).

Classificação sistemática	
Reino	Plantae (Plantas)
Divisão	Magnoliophyta (Plantas com flôr)
Classe	Eudicotiledôneas
Sub-classe	Caryophyllidae
Ordem	Caryophyllales
Sub-ordem	Cactineae
Família	Portulacaceae
Género	Portulaca L.
Espécie	<i>Portulaca oleracea</i> L.



A sua importância como alimento de origem vegetal depende não só dos seus componentes nutritivos, mas também dos seus constituintes nutracêuticos. Estes desempenham um papel importante na proteção contra patologias graves, tais como o cancro e doenças coronárias (Oliveira, 2009; Zhou, 2015; Dkhil, 2011). A beldroega, é descrita como

planta herbácea anual de folhas suculentas frescas, com elevada taxa de crescimento e uso eficiente de água que tem sido utilizada em saladas e com fins medicinais há centenas de anos. Apesar de a sua origem ser incerta, cresce espontaneamente ou é cultivada em regiões frias do planeta, como o Canadá ou quentes como as Caraíbas, em canteiros de flores, campos de milho e terrenos baldios. A sua existência no continente americano é descrita como pré-colombiana, enquanto que na Europa aparecem referências à planta a partir do final do século XVI, onde cresce bem em regiões com dias longos de 16 h luz média diária e onde a temperatura diurna/noturna é da ordem dos 27/22°C (Fontana, 2006).

A adubação nitrogenada das plantas e genericamente os restantes fatores de produção devem ser utilizados de forma racional, isto é, na quantidade estritamente necessária para se assegurar razoável produtividade, sem custos desnecessários e sem impacte ambiental significativo (Arrobas, 2009).

O nitrogénio representa cerca de 1 a 5 % da matéria seca das plantas, e é um constituinte relevante dos aminoácidos, proteínas, nucleoproteínas e clorofila (Santos, 2012).

Assim, o nitrogénio é considerado um elemento essencial para o bom desenvolvimento das plantas, uma vez que é indispensável ao seu ciclo de vida e responsável por funções específicas, as quais não podem ser substituídas por outro nutriente. Desempenha um papel importante no metabolismo, sendo classificado como macronutriente, na medida em que tende a ser absorvido em grande quantidade pelas plantas (Santos, 2012). O nitrogénio é ainda classificado como um macronutriente maioritário, uma vez que necessita de ser aplicado às plantas, por técnicas de fertilização (Santos, 2014).

Dada a importância que o referido elemento apresenta para o desenvolvimento vegetal, a sua absorção é um processo fulcral para o sucesso da cultura. No que diz respeito à absorção do nitrogénio, esta pode ocorrer, quer através das raízes, quer através das folhas. No entanto, é através das raízes que ocorre a maior absorção, sendo para tal necessário o contacto destas com o referido elemento (Santos, 2014).

O nitrogénio é, em geral, o nutriente que mais influência quantitativamente a produção de uma dada planta, mas é igualmente, o nutriente que mais pode afetar a qualidade da mesma. Quando em excesso, pode provocar perda da qualidade visual e nutricional, podendo até afetar a saúde dos consumidores, devido à acumulação de nitratos na planta (Santos, 2012; Kitchen, 2008). Se uma planta absorver uma quantidade de nitrogénio superior àquela que o seu metabolismo tem capacidade de utilizar, este acumula-se nas folhas na forma de nitratos que podem ser posteriormente convertidos em nitritos, entidades químicas prejudiciais à saúde humana (Santos, 2012). Quando em défice, a planta não dispõe das melhores condições

para o seu desenvolvimento ocorrendo quebra de produção. Face ao que foi aqui descrito, o conhecimento das necessidades em nitrogénio de uma dada espécie vegetal, tendo em conta o uso que se pretende da mesma, assume um papel fundamental na sua produção comercial (Santos, 2014).

O nitrogénio destaca-se entre os nutrientes cuja gestão se torna mais difícil de realizar e para a qual a comunidade científica internacional tem envidado mais esforços para alcançar. A importância deste elemento na produtividade e qualidade dos produtos agrícolas, a sua dinâmica no solo, o impacto potencial das diversas formas de nitrogénio nos ecossistemas e na saúde humana conferem-lhe dificuldades particulares de gestão que exigem cuidados especiais nas recomendações de fertilização (Arrobas, 2009; Kitchen, 2008).

1.1.2. Características nutritivas e funcionais

A beldroega, *Portulaca oleracea* L. é uma planta verde anual, de rápido crescimento, cujos caules e folhas são comestíveis e suculentos, com ligeira acidez, por ser uma planta rica em ferro, exibindo sabor semelhante ao do espinafre (Abd El-Aziz, 2014; Karimi, 2010; Lim, 2007; Erkan, 2012; Rinaldi, 2010). Pode ser consumida cortada em pequenos pedaços, em saladas, como um prato vegetal após cozinhar ou após a secagem da planta, que pode ser fervida em chá ou sopa (Oliveira, 2009; Chowdhary, 2013; Zhou, 2015; Dkhil, 2011; Lim, 2007; Youssef, 2014). As suas sementes também contêm uma elevada percentagem de ácido α -linoleico (LNA) e apresentam ainda propriedades medicinais. Esta planta cresce facilmente em solos que podem ser áridos e salinos (Yazici, 2007; Uddin, 2014; Youssef, 2014).

A água foi descrita como sendo o principal constituinte das beldroegas, tanto nos caules como nas folhas (Erkan, 2012).

Em muitas partes do mundo ainda é considerada como "erva daninha com potencial teor nutricional" sendo descrita como um "alimento do futuro" devido ao seu elevado teor nutritivo e propriedades antioxidantes (Rinaldi, 2010).

Pesquisas recentes indicam que as beldroegas possuem indicadores nutricionais superiores aos dos principais vegetais cultivados, pois a planta é uma excelente fonte de resíduos acilo ω -3, α -tocoferol, ascorbato, β -caroteno e glutatióno, bem como fenóis e cumarinas, compostos químicos com capacidade elevada para neutralizar espécies reativas de oxigénio. Os seus extratos possuem ainda elevado teor em vitaminas A, C e algumas do complexo B, carotenóides, sais minerais de magnésio, cálcio e potássio e aminoácidos como a isoleucina, prolina, fenilalanina, entre outros. Muitos outros constituintes também foram

isolados a partir desta planta, tais como o β -caroteno, glutationo, melatonina e catecol (Oliveira, 2009; Yazici, 2007; Chowdhary, 2013; Zhou, 2015; Uddin, 2014; Dkhil, 2011; Uddin, 2012; Rinaldi, 2010; Karimi, 2010; Erkan, 2012).

Os resíduos acilo ω -3 desempenham um papel importante no fortalecimento do sistema imunitário, na prevenção e tratamento da hipertensão (Simopoulos, 2004), doença coronária, cancro, patologias inflamatórias e auto-imunitárias. A planta é rica em ácido α -linoleico, essencial para o seu crescimento normal e na prevenção de patologias humanas. Grande parte dos efeitos benéficos atribuídos a esta “erva daninha” pode ser indexada a antioxidantes bioativos como os compostos fenólicos produzidos e acumulados nos seus tecidos que contribuem para a prevenção de processos degenerativos causados pelo *stress* oxidativo (Zhou, 2015; Uddin, 2012).

Os flavonóides de *P. oleracea* L. são os constituintes biologicamente ativos, que mais têm sido descritos pela literatura, devido a comportarem-se como antioxidantes, antibacterianos, antivirais e anti-inflamatórios (Xu, 2006). De acordo com a pesquisa bibliográfica, os flavonóides quercetina, campeferol, miricetina, apigenina, luteolina e genisteína constituem os componentes ativos mais abundantes em *P. oleracea* L. (Zhu, 2010).

Os polissacáridos encontrados na *Portulaca oleracea* L. são potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de *Diabetes Mellitus*, devido à sua capacidade para modular os níveis lipídicos e de glicose do sangue (Zhou, 2015; Dkhil, 2011; Behravan, 2011).

A beldroega encontra-se inventariada pela Organização Mundial de Saúde como uma das plantas medicinais mais utilizadas, à qual tem sido atribuído o termo “Global Panacea” (Youssef, 2014; Behravan, 2011; Lim, 2007; Karimi, 2010).

O conhecimento científico assume que o consumo adequado de antioxidantes dietéticos pode diminuir o risco de diversas patologias clínicas graves. As dietas ricas em frutos e vegetais têm sido associadas a benefícios para a saúde, apesar dos seus mecanismos de ação não se encontrarem totalmente esclarecidos. As diferentes variedades, épocas de colheita e condições ambientais podem contribuir para a composição nutricional e benefícios da beldroega (Youssef, 2014; Uddin, 2014; Uddin, 2012).

Na medicina popular, *P. oleracea* é utilizada como antipirético, anti-séptico, diurético e no tratamento de desordens urinárias (Dkhil, 2011). As partes aéreas da planta são utilizadas medicinalmente para diminuir a dor e a tumefação, no tratamento de queimaduras, doenças relacionadas com o intestino, fígado, estômago, tosse, falta de ar e artrite (Behravan, 2011; Erkan, 2012; Uddin, 2014). A planta pode também oferecer proteção contra doenças cardiovasculares, certos tipos de cancro e diversas doenças crónicas potenciando a resposta de

enzimas antioxidantes como GPx, GR, SOD e GST que determinam a homeostasia do glutationo nos tecidos. Além disso, o aumento dos níveis de GPx, GR, GST, CAT e SOD foram correlacionados com níveis elevados do glutationo e baixos de MDA em ratos (Chowdhary, 2013; Oliveira, 2009; Uddin, 2014). A planta é igualmente utilizada como sedativo gástrico, como dissipador de calor e de dor excessiva bem como anti-inflamatório ocular. Além disso, a totalidade da planta, exceto as raízes, é usualmente utilizada como agente antibacteriano, anti-inflamatório e anti-helmíntico (Sanja, 2009). Gongo e colaboradores em 2009, observaram que o extrato de beldroega diminuía o nível de glicose sérica e aumentava o nível de insulina de roedores. Esta planta é preferencialmente utilizada para o consumo humano como vegetal verde, rico em minerais e resíduos acilo ω -3, precursores das prostaglandinas, moduladoras da vasoconstrição (Dkhil, 2011).

Yazici, Turkan, Sekmen e Demiral (2007) sugeriram que a tolerância à salinidade pelas beldroegas pode estar intimamente relacionada com o aumento da capacidade antioxidante para eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) e a acumulação de prolina (Pro) osmoprotetora, sob condições de salinidade.

Youguo, Zhongjia e Xiaoping (2009) descreveram também que alguns polissacáridos da beldroega poderiam eliminar significativamente o radical anião superóxido, bem como os radicais DPPH, óxido nítrico e hidroxilo de forma dependente da dose.

Wang e Yang (2010) descobriram que betacianinas de *P. oleracea* possuem efeito neuroprotetor contra a D-galactose gerada por mecanismos de neurotoxicidade e sugeriram que esse efeito pode, pelo menos em parte, ter origem no aumento de atividades enzimáticas antioxidantes acoplado ao decréscimo do índice de peroxidação lipídica (Erkan, 2012).

Estudos complementares demonstraram que produtos naturais obtidos da planta exibem atividade protetora contra a genotoxicidade desencadeada pelo *stress* oxidativo, motivo pelo qual tem aumentado o interesse de muitos consumidores por substâncias naturais purificadas a partir das plantas (Behravan, 2011).

Estudos farmacológicos revelaram também que extratos de beldroegas exerciam atividade relaxante muscular, abrandamento da atividade locomotora, aumento do tempo de latência em convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol, ação gastroprotetora e analgésica, efeitos anti-inflamatórios e outras propriedades antioxidantes. Por exemplo, *P. oleracea* exerce efeito inibitório sobre as propriedades de lipopolissacáridos (LPS) e do interferão- γ (IFN- γ) induzidos pelo óxido nítrico (Behravan, 2011; Karimi, 2010).

Legumes, frutas, flores e leguminosas constituem fontes naturais de antioxidantes. Os antioxidantes, maioritariamente compostos fenólicos, são capazes de atenuar o estado de *stress* oxidativo por eliminação de ROS (Erkan, 2012; Peksel, 2006; Ismail, 2010).

1.2. Antioxidantes, propriedades físico-químicas e biológicas

Os antioxidantes capturam e eliminam ROS por doação de equivalentes redutores a potenciais agentes oxidantes, antes que estes exerçam os seus efeitos deletérios sobre os materiais celulares, constituindo deste modo, estruturas químicas essenciais para assegurar o bem-estar e a saúde animal (Erkan, 2012; Abas, 2006).

O termo antioxidante designa assim uma substância que em baixa concentração retarda ou previne a oxidação de um substrato que pode ser uma estrutura lipídica ou outra biomolécula, e assim, evita ocorrência ou repara danos celulares, provocados por espécies reativas de oxigénio. Por outro lado, atuam de modo a impedir a formação de novas ROS, convertendo-as em moléculas menos nocivas e evitando a sua propagação por reações em cadeia (Ismail, 2010). Em geral, um bom antioxidante deve possuir grupos funcionais doadores de eletrões, com capacidade para deslocar radicais orgânicos ou para quelar metais de transição implicados em processos oxidativos, bem como aceder ao local de ação, em termos de polaridade e coeficiente de partição.

Os antioxidantes podem ser classificados como primários ou secundários, tendo em conta o mecanismo em que participam e como sintéticos ou naturais, considerando a sua origem.

A capacidade antioxidante de uma dada substância pode ser determinada por diferentes aproximações experimentais realizadas *in vitro*, como estimar a capacidade para capturar radicais livres, seguindo o consumo do radical orgânico DPPH ou a capacidade de redução do ferro pelo método FRAP. Os antioxidantes naturais englobam maioritariamente α -tocoferóis, ascorbato, carotenóides e compostos fenólicos.

A determinação da capacidade antioxidante dos alimentos, além de prenunciar o seu potencial antioxidante após ingestão, estima a proteção contra a oxidação e consequente deterioração do próprio alimento, respostas vitais para a preservação da sua qualidade visual e do seu valor nutricional (Sucupira, 2012; Abas, 2006).

Os compostos fenólicos são substâncias que se encontram ubiquamente distribuídas na natureza tendo já sido detetados mais de 8000 compostos desse grande e complexo grupo de constituintes de vegetais, frutos e produtos derivados. Podem ser pigmentos que dão o aspeto

colorido aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, que normalmente estão implicados em reações de defesa das espécies vegetais contra possíveis agressões do ambiente. Estes compostos atuam então como agentes antioxidantes, não apenas pela capacidade para doar electrões, mas também por formarem radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de alguns ingredientes dos alimentos, principalmente se forem de natureza lipídica (Silva, 2010).

Os compostos fenólicos de origem vegetal podem ser classificados em algumas categorias, sendo elas, fenóis simples, ácidos fenólicos, como os derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, linhanas e linhinas.

O facto dos compostos fenólicos inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro*, torna-os cada vez mais alvo de estudo e de interesse. No que se refere à atividade antioxidante, esta deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, que desempenha um papel importante na neutralização ou captura de radicais livres, na quelatação de metais de transição, bloqueando as etapas de iniciação e propagação de processos oxidativos. Os intermediários resultantes da formação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido ao efeito de ressonância do anel aromático presente na sua estrutura (Sousa, 2007).

Os compostos fenólicos constituem a grande classe de fitoquímicos alimentares cuja estrutura química contém pelo menos um anel aromático ao qual está ligado um ou mais grupos hidroxilo. Nas espécies vegetais existe uma enorme variedade deste tipo de compostos que se encontram agrupados como flavonóides e não flavonóides sendo considerados como os antioxidantes vegetais mais ativos detetados com grande regularidade. Os compostos fenólicos são, em geral, multifuncionais como antioxidantes, uma vez que atuam de diversas formas: combatendo as espécies reativas pela doação de um átomo de hidrogénio ou de um grupo hidroxilo da estrutura aromática, suportando o electrão desemparelhado pela sua deslocalização no sistema de electrões π da molécula; quelando metais de transição como o Fe^{2+} e o Cu^{2+} ; interrompendo a reação de propagação radicalar ligada à oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando lesões de moléculas atacadas por espécies reativas de oxigénio (ROS).

Os compostos fenólicos apresentam-se amplamente distribuídos pelas diversas partes das plantas, sendo os níveis mais elevados detetados em frutos, legumes e seus derivados como o azeite virgem, a cerveja, o vinho tinto, o chá, entre outros. Os cereais e as leguminosas também exibem níveis elevados deste tipo de compostos (Sucupira, 2012). De

um modo geral, o teor em fenóis pode ser determinado por dois métodos espectrométricos, o de *Folin-Ciocalteu* (Singleton, 1965) ou pelo método do azul da Prússia modificado (Graham, 1962), baseando-se ambos em reações de oxidação-redução entre compostos fenólicos e iões metálicos (Silva, 2010).

Neste caso, a determinação espectrométrica de compostos fenólicos da beldroega foi realizada pelo método *Folin-Ciocalteu*, que utiliza um reagente que consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungsténico, na qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação $+6$. Contudo, em presença de agentes redutores como os compostos fenólicos, em meio alcalino, ocorre a formação de um complexo de azul de molibdénio e tungsténio, onde a média do estado de oxidação dos metais se situa entre 5-6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, embora não tenham que ser necessariamente de natureza fenólica (Sousa, 2007). O método obriga à construção de curva de calibração, sendo o padrão mais utilizado o ácido gálico, facto que leva a expressar os resultados em mg de ácido gálico por 100 g de peso seco da amostra (Silva, 2010).

O ascorbato é considerado um dos mais fortes e menos tóxico antioxidante natural. É um sequestrador eficiente de ROS, como o radical anião superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogénio e o oxigénio singuleto. Em soluções aquosas, combate eficientemente, espécies reativas de nitrogénio impedindo a nitração de moléculas. Contudo, o ascorbato pode atuar, por vezes, como oxidante. Na presença de metais com mais de um estado de oxidação (Fe^{2+} e Cu^{2+}), podem ser gerados radicais ascorbato e hidroxilo, iniciando-se o processo de peroxidação lipídica. Entre as principais fontes de ascorbato destacam-se os frutos cítricos, acerola, goiaba, kiwi, além de legumes como brócolos, couve-de-bruxelas, tomate e pimentão (Sucupira, 2012).

O ascorbato ou vitamina C (AAC) é um metabolito importante para a maior parte dos organismos vivos, estando presente em níveis de concentração da ordem dos milimolar. O AAC é conhecido por desempenhar um papel importante no sistema antioxidante que protege as plantas de danos oxidativos, resultantes de fatores bióticos e abióticos, sendo ainda um cofactor para um elevado número de enzimas hidroxilase.

Apesar da importância do ascorbato para as plantas, a sua via biossintética ainda não se encontra totalmente esclarecida, sendo propostos dois percursos metabólicos distintos. A via biossintética proposta por *Isherwood* (1954) e *Mapson* (1954) que inicia na D-galactose e passa pela oxidação da L-galactono- γ -lactona (L-GL) a L-AA pelo enzima L-galactono- γ -lactona dehydrogenase (GLDase) detetada em plantas como a ervilheira, couve, couve-flor e

batateira, entre outras, purificado pela primeira vez por *Oba* (1995) a partir de raízes de batata-doce. Noutra via, proposta por *Loewus* (1988) L-AA é sintetizado a partir de D-glicose via L-sorbosona. A presença de um enzima capaz de converter L-sorbosona em L-AA acoplada à redução do coenzima NADP^+ foi demonstrada em feijões e folhas de espinafre. Assim é razoável admitir que estas vias distintas possam estar expressas em diferentes compartimentos sub-celulares ou em diferentes espécies vegetais (Østergaard, 1997).

O ascorbato é um eficiente sequestrador de radicais apto para interagir com as ROS produzidas nas respostas oxidativas. O AAC encontra-se envolvido no ciclo do ascorbato que se encontra acoplado ao ciclo do glutatióno, processo onde participam a ascorbato peroxidase (APX), monodihidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e glutatióno redutase (GR) (Fig. 1.1). Esta via representa uma forma eficiente de remoção de H_2O_2 detetado na forma ativa em diversos organelos celulares das plantas.

O ascorbato encontra-se ubiquamente distribuído por diversos sistemas biológicos encontrando-se também envolvido em processos fisiológicos animais. Para os seres humanos é considerado uma vitamina importante, a vitamina C, que previne o escorbuto (Cocetta, 2014). Estudos realizados onde se avaliou o efeito do bloqueio do ciclo do ascorbato-glutatióno permitiram detetar mecanismos de resposta ao *stress* e respetivas alterações metabólicas em diferentes espécies vegetais.

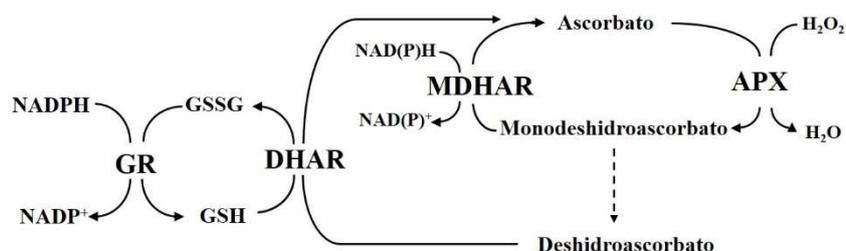


Figura 1.1 – Ciclo do oxidação-redução do ascorbato. O H_2O_2 é convertido em água pela reação catalisada pelo ascorbato peroxidase (APX) com a produção de formas oxidadas de monodeshidroascorbato e desidroascorbato (MDHA e DHA). Monodeshidroascorbato redutase (MDHAR) reduz o MDHA a ascorbato. No entanto, parte do MDHA pode ser convertido a ascorbato e DHA por reações não enzimáticas. Deshidroascorbato é convertido a ascorbato pela desidroascorbato-redutase (DHAR), acoplada ao enzima glutatióno redutase (GR), que catalisa o último passo do ciclo, onde o dissulfureto de glutatióno (GSSG) produzido pela ação do DHAR é convertido em glutatióno (GSH) com consumo de NADPH (adaptado de Cocetta, 2014).

Deste modo, o bloqueio do metabolismo do AAC pode depender da espécie ou do tecido vegetal, bem como da extensão da lesão. Uma estratégia útil para compreender melhor os mecanismos de resposta ao *stress* em vegetais passa pela aplicação de diferentes combinações de tempo e temperatura de exposição durante o processo de armazenamento.

Assim, o teor de AAC tem sido utilizado como marcador de frescura dos vegetais ao longo da cadeia de distribuição (Cocetta, 2014).

A prolina (Pro) acumula-se nas plantas como resposta a uma vasta gama de fatores de *stress* ambientais, como a privação de água, salinidade, flutuações de temperatura, infecções por agentes patogênicos, exposição a metais pesados, anaerobiose, carência de nutrientes, poluição atmosférica, e irradiação UV (Stein, 2011).

A maioria das interpretações que suportam a contribuição da prolina para a tolerância contra fatores ambientais de *stress* dependem da capacidade da prolina para mediar ajuste osmótico, estabilizar estruturas subcelulares, remover radicais livres, bem como o seu envolvimento na transferência de energia química necessária à recuperação do estado de *stress* (Stein, 2011). Nas plantas, a degradação oxidativa da prolina em glutamato decorre no mitocôndrio por reações sequenciais dos enzimas prolina desidrogenase (ProDH) e P5C-desidrogenase (P5CDH) (Fig. 1.2) (Stein, 2011; Cecchini, 2011; Lehman, 2010).

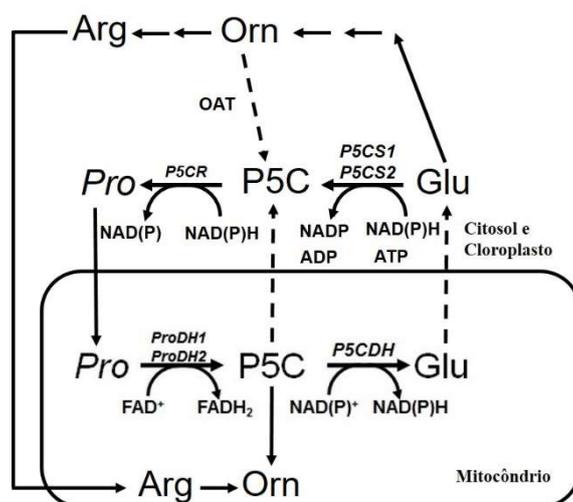


Figura 1.2 – Via de biossíntese da prolina em células vegetais. Substratos: Pro – prolina, Glu – glutamato, Arg – arginina, Orn – ornitina, P5C – Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato. Enzimas: P5CS – P5C sintetase, P5CR – P5C redutase, ProDH – prolina desidrogenase, P5CDH – P5C desidrogenase, OAT – ornitina δ -aminotransferase (adaptado de Stein, 2011; Lehmann, 2010; Verlues, 2010).

O ProDH é um enzima dependente do cofactor FAD, localizado na membrana interna mitocondrial mas orientado para a matriz que é capaz de transferir elétrons diretamente para a cadeia respiratória. O ProDH e o P5CR formam o ciclo da Pro-P5C que oxida a prolina em P5C no mitocôndrio e reduz o P5C em Pro no citoplasma, assegurando assim a homeostase da prolina e do P5C. O P5CDH, o segundo enzima no catabolismo da Pro, catalisa a oxidação de P5C em glutamato (Glu), um processo que em conjunto com o ciclo Pro-P5C controla os

níveis de P5C, prevenindo assim a formação de ROS. As atividades enzimáticas ProDH e P5CDH *in vitro*, são afetadas negativamente pela concentração elevada de aniões Cl⁻, enquanto que em células intactas não foi detetada qualquer inibição pelo Cl⁻ da atividade P5CDH (Stein, 2011; Cecchini, ^b2011; Lehman, 2010).

Alguns autores descrevem que a expressão transcricional do enzima ProDH diminuiu gradualmente após exposição longa a condições de *stress* abiótico, e aumentou rapidamente após a pressão de *stress* abrandar. Assim, uma regulação recíproca dos genes P5CS e ProDH parece ser o mecanismo-chave de controlo dos níveis prolina em condições de *stress* abiótico (Stein, 2011).

ProDH gera ROS em qualquer destas alternativas que pode ser potenciada se o enzima participar no ciclo-Pro P5C. Este ciclo foi originalmente descrito em animais e mais recentemente em plantas, e envolve a interconversão permanente entre a Pro e o P5C, devido à ativação dos enzimas ProDH e P5C redutase, mas não depende do enzima P5CDH. A estimulação deste ciclo aumenta a transferência de equivalentes redutores para o mitocôndrio, alterando a razão NADP⁺/NADPH citoplasmática, com consequentes implicações na via oxidativa das pentoses fosfato que gera vários componentes de defesa (Cecchini, ^b2011). O catabolismo da Pro pode levar frequentemente à acumulação de ROS. Esse efeito encontra-se especificamente associado à ativação do ciclo Pro-P5C, que envolve a participação dos enzimas ProDH e D1-pirrolina-5-redutase carboxilato (P5CR) quando este catalisa o segundo passo na biossíntese de Pro em Glu no citoplasma. Este ciclo funciona quando o aumento da atividade ProDH não corresponde ao aumento da atividade P5CDH, resultando numa oxidação incompleta da Pro e na acumulação de P5C mitocondrial. Neste caso, o P5C é exportado para o citoplasma para ser convertido em Pro por P5CR, com o retorno de Prolina ao mitocôndrio para reiniciar o ciclo (Cecchini, ^a2011).

A Prolina possui um arranjo estrutural com flexibilidade restringida que determina rearranjos das ligações peptídicas na sua vizinhança e conduz consequentemente à estabilização/destabilização da conformação da região da proteína onde se encontra localizada. Enquanto aminoácido livre, a prolina corresponde a um dos solutos que vulgarmente se acumulam nas plantas e bactérias em condições ambientais adversas como a seca, salinidade elevada ou baixa temperatura (Lehmann, 2010).

O catabolismo da prolina inicia-se com a sua oxidação a P5C pela prolina desidrogenase (ProDH), processo que envolve o FAD⁺ como cofactor. O P5C é subsequentemente convertido em glutamato pelo pirrolina-5-carboxilato de etilo

desidrogenase (P5CDH) consumindo NAD^+ . Em todas as espécies mono e dicotiledóneas analisadas este enzima é codificado por um gene de cópia única (Fig. 1.2) (Lehmann, 2010).

O metabolismo da prolina distingue-se em diversos aspetos do metabolismo de outros aminoácidos. O mais relevante prende-se com o facto de a prolina ser o único aminoácido proteogénico onde o grupo α -amina existe como amina secundária. Embora essa distinção assuma maior relevo para os químicos de formação do que para os biólogos vegetais, as propriedades únicas da prolina são muito importantes para a compreensão do seu papel nas plantas. Outro aspeto prende-se com o facto, já atrás referido, de em muitas espécies de plantas, bactérias e fungos, a prolina acumular-se em níveis muito elevados quando responde a diferentes agentes de *stress* (Verslues, 2010).

Nas plantas, o aminoácido L-prolina é sintetizado via glutamato e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reações de redução, as quais são catalisadas pelos enzimas P5C sintetase (P5CS) e P5C redutase (P5CR) ou, alternativamente, a partir da ornitina, pelo enzima ornitina δ -aminotransferase (OAT). A acumulação de prolina também depende da sua via de catabolismo. A degradação da prolina nas plantas é catalisada por dois enzimas. A prolina desidrogenase (ProDH) que catalisa a conversão de prolina em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) e é então oxidada a glutamato pela P5C desidrogenase (P5CDH) (Fig. 1.2) (Carneiro, 2006; Verslues, 2010).

A via do glutamato é predominante nas plantas em condições de *stress* osmótico e falta de nitrogénio. Assim, o enzima P5CS é limitante para a biossíntese da prolina em plantas sendo sensível à inibição por retroalimentação. Tanto o enzima glutamina sintetase, como a atividade γ -glutamil cinase, do enzima bifuncional P5CS, catalisam a fosforilação do ATP dependente do glutamato, para formar o intermediário glutamil fosfato (Carneiro, 2006).

O metabolismo da prolina reveste-se de interesse tanto para aqueles que o procuram para melhor compreender a fisiologia do *stress* da planta, bem como para aqueles que procuram compreender aspetos de regulação metabólica. Embora o metabolismo da prolina tenha sido maioritariamente estudado por investigadores interessados em seca e outros fatores de *stress* abióticos, há cada vez mais evidências de que a prolina, também é relevante na resposta a agentes patogénicos de plantas encontrando-se envolvida na morte celular programada e no desenvolvimento vegetal (Verslues, 2010).

O cerne metabólico da prolina envolve dois enzimas que catalisam a sua biossíntese a partir do glutamato no citoplasma ou no cloroplasto, bem como dois enzimas que catalisam o seu catabolismo em glutamato nos mitocôndrios. Existe ainda uma via alternativa de síntese da prolina que envolve a ornitina (Fig. 1.2). A interconversão da prolina em glutamato é por

vezes referida como o "ciclo da prolina". A sobre-regulação transcricional associada à síntese da prolina a partir do glutamato e à regulação retroativa do catabolismo da prolina em condições de *stress* são considerados como controladores dos níveis de prolina, embora exceções a este padrão já tenham sido observadas (Verslues, 2010).

A literatura descreve diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante de extratos ou substâncias isoladas, sendo utilizado com maior frequência aquele que se baseia na quantificação da captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) de coloração violeta, monitorizada pelo decréscimo de absorvência a 515nm (Sulaiman, 2011). O ensaio com o DPPH é utilizado com frequência na avaliação da capacidade de um potencial antioxidante para capturar radicais livres, sendo considerado um dos métodos espectrométricos normalizados e fáceis de executar que permitem avaliar propriedades antioxidantes de produtos naturais, em particular, de extratos vegetais, grãos de trigo, sementes comestíveis, óleos e farinhas (Mishra, 2012; Martins, 2012).

Os resultados obtidos permitem a determinação da capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais livres, bem como a percentagem de DPPH remanescente do meio reacional (Sulaiman, 2011). Na presença de um doador de elétrons, a solução violeta de DPPH, em metanol, fica amarela (Fig. 1.3) devido, às espécies antioxidantes capturarem o radical estável DPPH, convertendo-o em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina de coloração amarela pálida, observando-se um decréscimo da absorvência a 515nm (Sucupira, 2012; Ferreira, 2007).

A alteração de cor pode ser monitorizada por espectrometria de absorção molecular e utilizada para estimar a capacidade antioxidante de uma determinada substância. Este método foi concebido por *Blois* (1958) (Mishra, 2012).

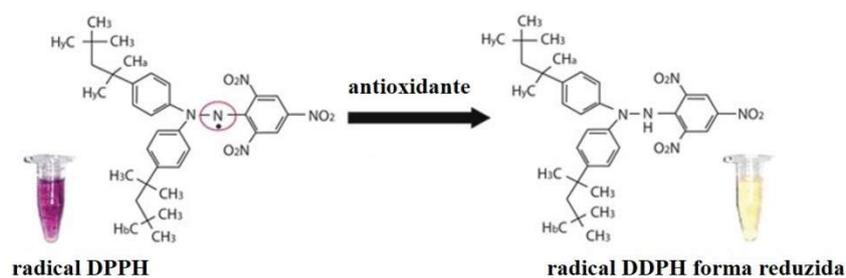


Figura 1.3 – Reação de redução do DPPH' por um agente antioxidante (adaptado de Sucupira, 2012).

Uma vantagem deste método prende-se com o facto de não ser perturbado por reações laterais que envolvem quelantes de iões metálicos e inibição enzimática, contrariamente a outros radicais gerados em laboratório (Amarowicz, 2004).

No entanto, o método apresenta algumas limitações como o facto de o DPPH só se dissolver em solventes orgânicos como os álcoois, poder sofrer alterações por ação da luz, do dióxigénio e do tipo de solvente. Para além disso, parte do DPPH coagula acima de uma percentagem limite de água, impossibilitando a reação DPPH-antioxidantes, transtorno que pode produzir determinações falso-negativas da capacidade antioxidante. Por outro lado, existem outras espécies químicas que absorvem a 515-517nm, como os carotenóides, que podem também interferir nos resultados (Karadag, 2009).

O método designado por FRAP que se baseia na capacidade de um determinado material para reduzir o Ferro, constitui uma aproximação experimental complementar ao do DPPH para se estimar propriedades antioxidantes de produtos naturais. O Fe (III) do complexo férrico-tripiridiltriazina, Fe (III)-TPTZ de coloração amarela, aceita eletrões dos antioxidantes da amostra convertendo-se no complexo ferroso Fe (II)-TPTZ de coloração azul intensa, com máximo de absorção a 595nm que imediatamente forma quelatos corados com o cromóforo:

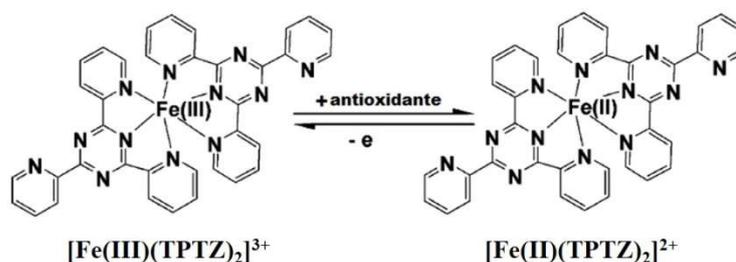


Figura 1.4 – Reação de redução do Fe (III) do complexo férrico-tripiridiltriazina, Fe (III)-TPTZ a Fe(II) do complexo ferroso Fe (II)-TPTZ por um agente antioxidante (adaptado de Berker, 2007).

O aumento da absorvência, devido à formação do complexo Fe (II)–TPTZ é proporcional ao potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) da amostra (Abdi, 2012; Berker, 2007; Sucupira, 2012; Rockenbach, 2008; Amarowicz, 2004; Prior, 2005).

Trata-se de um ensaio simples, rápido, económico e bastante fiável, que pode ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada. Contudo, nem todos os redutores capazes de reduzir o Fe (III) podem ser considerados antioxidantes, uma vez que qualquer substância capaz de doar eletrões com potencial redox inferior ao par Fe (III)/Fe (II) pode influenciar o ensaio. Por outro lado, um antioxidante pode não ser capaz de reduzir o Fe (III), não sendo assim detetado. Outro aspeto a ter em consideração prende-se com a possibilidade de produção simultânea de Fe (II), um conhecido oxidante que pode levar à

produção adicional de radicais, como $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 , um dos mais nocivos detetados *in vivo* (Prior, 2005).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* – modelo biológico para estudos de stress

Os antioxidantes dos alimentos são mobilizados para bloquear os processos de oxidação-redução desencadeados pelas ROS, aumentando o tempo de vida útil do indivíduo e evitando a ocorrência de reações químicas indesejáveis. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui características que a tornam um bom modelo para estudos de *stress* com diferentes substâncias (Gancedo, 1998). A capacidade antioxidante assegurada por um determinado material pode ser avaliada pela sobrevivência de células tratadas com antioxidantes na ausência e na presença dos agentes de *stress*, como por exemplo, o ácido acético ou o peróxido de hidrogénio (Soares, 2004). A levedura, um organismo unicelular eucarionte, constitui um dos modelos biológicos mais simples que expressa processos bioquímicos essenciais, idênticos aos dos seres humanos e que se encontram bem conservados filogeneticamente. As células de levedura possuem muitas vantagens técnicas relativamente às células humanas uma vez que se encontram bem adaptadas a metodologias experimentais, possuem ciclo de vida rápido e podem crescer como células dispersas em meios líquidos ou como colónias em meios sólidos.

As leveduras cultivadas na presença de glicose (respiro-fermentativas), assumem um perfil previsível do crescimento que pode ser dividido em quatro fases: (i) fase lag, (ii) fase exponencial (log), (iii) fase pós-diáuxica (desaceleração), e (iv) fase estacionária. Durante a fase lag o crescimento é muito atenuado ocorrendo a expressão dos enzimas necessários à sobrevivência e habituação ao meio de cultura. Na fase de crescimento exponencial a glicose é dissipada com formação de etanol e ácidos orgânicos. Entre a fase exponencial e a fase pós-diáuxica ocorre o designado desvio diáuxico que permite a síntese de enzimas necessários ao catabolismo do etanol e dos ácidos orgânicos. Na fase pós-diáuxica ocorre um decréscimo do crescimento celular período em que o etanol e os ácidos orgânicos formados na fase anterior são consumidos e o metabolismo respiratório assume predominância. Quando o meio de cultura deixa de conseguir sustentar o crescimento celular, geralmente pela exaustão das fontes de carbono e aumento de produtos tóxicos do metabolismo, inicia-se a fase estacionária

(iv) que é caracterizada pela baixa atividade metabólica, não ocorrendo crescimento celular visível (Fig. 1.5) (Held, 2010; Boender, 2011).

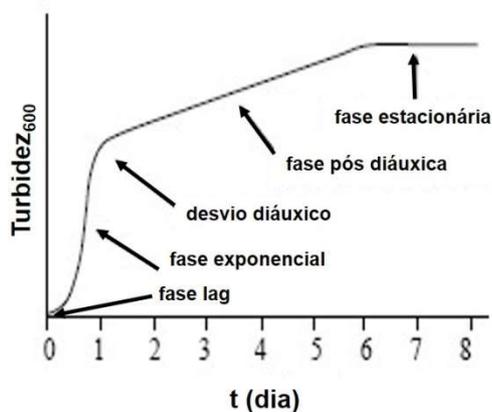


Figura 1.5 – Curva de crescimento típica de *S. cerevisiae* (adaptado de Held, 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante com recurso a animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e exige o sacrifício de elevado número de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos, ferindo as leis de proteção animal. No entanto, os que recorrem aos microrganismos são fáceis, rápidos e permitem a utilização de elevada quantidade de células com as mesmas características genéticas. O metabolismo de *S. cerevisiae* é em muitos aspetos idêntico ao de eucariontes superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica e de desintoxicação que não se encontram expressos em outros unicelulares como as bactérias. Os testes de atividade antioxidantes/oxidante, de inúmeras estruturas químicas, em leveduras é rápida, económica e reprodutível, podendo os resultados obtidos ser facilmente extrapolados para o homem. As células de levedura exibem semelhanças quer ao nível estrutural quer ao nível molecular com as de mamífero. Uma quantidade enorme de proteínas de levedura tem-se mostrado funcionalmente intermutável com proteínas de homologia sequencial muito elevada com as de humanos. O envolvimento do *stress* oxidativo na senescência celular, apoptose e diversas patologias animais tem promovido a realização de estudos que conduzem à descoberta e caracterização de sistemas antioxidantes bem como ao esclarecimento do seu papel fisiológico. Estes e outros motivos tornaram a *S. cerevisiae* um modelo eucarionte unicelular muito popular para estudos de *stress* oxidativo (Costa, 2001; Soares, 2005).

As células de levedura podem crescer em condições aeróbias e, por conseguinte, estão continuamente expostas a espécies reativas de oxigénio geradas como subprodutos do

metabolismo celular. A principal fonte de ROS é a cadeia respiratória mitocondrial, que representa 85-90% do dióxigênio consumido nas células. As ROS, ou seja, o radical anião superóxido, radical hidroxilo e peróxido de hidrogênio, levam à oxidação de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Costa, 2001).

A utilização de *S. cerevisiae*, em fase estacionária tem constituído um sistema modelo útil para avaliar a ocorrência de danos oxidativos durante a senescência celular porque as leveduras em fase estacionária assemelham-se aos organismos multicelulares em diversos aspetos: (i) maior parte da energia é disponibilizada pela respiração mitocondrial, (ii) as células encontram-se na fase G₀, (iii) os danos acumulados ao longo do tempo têm os mesmos mecanismos de defesa dos eucariontes superiores (Zakrajšek, 2011).

O metabolismo respiratório gera grandes quantidades de ROS, cujos efeitos tóxicos devem ser combatidos para manter a viabilidade celular. As células de levedura em fase estacionária possuem mecanismos de proteção ativa para combater qualquer acumulação oxidativa ou outros danos e podem sobreviver por períodos prolongados em água ou em meio mínimo sem nutrientes.

Estudos bioquímicos em fase exponencial do crescimento são particularmente importantes uma vez que o meio rico com glicose como fonte de carbono, induz a repressão da síntese de vários enzimas respiratórios e gliconeogénicos, com alteração da organização estrutural dos mitocôndrios. A membrana interna e as cristas mitocondriais desaparecem, até ser reposto o metabolismo aeróbico que substitui a fermentação alcoólica. Assim, a fermentação é responsável pela maior parte do consumo da glicose. Quando os níveis de glicose entram em declínio a energia que sustenta a sua sobrevivência é disponibilizada pelo metabolismo respiratório (Zakrajšek, 2011).

As leveduras possuem algumas propriedades como crescimento rápido, segura na manipulação por ser um organismo *GRAS*, facilidade no isolamento de mutantes, possuir sistema de transformação de DNA versátil que a tornam bastante adequada para estudos biológicos (Goffeau, 1996; Hughes, 2004; Stambuk, 1999). A *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarionte cujo genoma foi completamente sequenciado e depositado em bases de dados públicos, facto que tem permitido a clonagem de diferentes genes, a sua rápida identificação e caracterização, bem como uma melhor compreensão da sua função celular. Por esse motivo a *S. cerevisiae* tornou-se um modelo eucarionte ideal para manipulação genética, com ferramentas moleculares apropriadas, bem como para estudos de expressão ao nível do transcriptoma, proteoma e metaboloma que têm propiciado o esclarecimento de diversas vias metabólicas (Murphy, 1999; Zigová, 2000; Pena-Castillo, 2007; Maya, 2008; Schuster, 2008).

A *S. cerevisiae* constitui ainda uma fonte biológica excelente para a obtenção de produtos de interesse na indústria farmacêutica, como por exemplo, os enzimas hexocinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose oxidase, proteases entre outros e, de alimentos, pela possível utilização da sua própria biomassa celular como fonte de proteínas na alimentação animal e humana (Silva, 2002).

A *S. cerevisiae* quando submetida a diferentes condições de *stress*, despoletam uma resposta molecular rápida para reparação de danos e proteção das estruturas celulares (Ruis, 1995; Swan, 1998; Estruch, 2000). Essa resposta envolve a síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da H⁺-ATPase, modulação do processo de troca iónica e, no caso de *stress* oxidativo produção de glutationo e de enzimas superóxido dismutase. As células de levedura crescidas em aerobiose, na ausência de glicose (respiratórias) produzem ROS a taxa superior à de leveduras em modo respiratório-fermentativo (Estruch, 2000; Costa, 2001). Essas entidades químicas induzem uma bateria de genes que codificam proteínas antioxidantes, dotando a levedura de uma vasta gama de respostas às ROS que dependem da concentração. Níveis muito baixos de ROS levam a que as células se tornem capazes de se adaptar ao estímulo e de se tornarem resistentes a uma subsequente exposição letal. Todavia níveis de ROS muito elevados ativam um programa de expressão de genes maioritariamente mediado pelos fatores de transcrição Yap1p e Msn2,4p, bem como um atraso do ciclo de divisão celular. Nestas condições a morte de uma proporção de células da população pode ocorrer, inicialmente por apoptose, mas em níveis extremos a morte dá-se por necrose (Perrone, 2008).

1.4. Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados, isto é, possuem orbitais ocupadas apenas por um eletrão. Deste modo, essa substância apresenta forte reatividade com a maior parte das outras espécies químicas. Os radicais livres derivados de oxigénio são genericamente incluídos na designação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que inclui ainda outras estruturas químicas não radicalares como o peróxido de hidrogénio. As ROS representam a classe mais importante de espécies reativas geradas pelo metabolismo normal dos organismos vivos, encontrando-se por vezes envolvidas em vias de sinalização que modulam a proliferação celular, a apoptose e a imunidade. Embora o dióxigénio (O₂) seja essencial para a vida aeróbia, os seus derivados reativos podem ser

tóxicos em determinadas condições. A literatura designa esse fenómeno por “paradoxo do oxigénio” (Ferreira, 2007; Herrero, 2008; Temple, 2005; Matés, 2000; Scherz-Shouval, 2007).

Apesar de pulsos de ROS desempenharem um papel fundamental no metabolismo celular, a sua acumulação em excesso cria condições de *stress* oxidativo que podem promover alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, como por exemplo o cancro.

Os antioxidantes reagem com as ROS impedindo ou diminuindo as condições de *stress* oxidativo e a consequente ocorrência de danos celulares. Entre os antioxidantes mais conhecidos encontram-se as vitaminas C e E e, os flavonóides, como a quercetina (Soares, 2005; Temple, 2005; Matés, 2000).

As espécies reativas de oxigénio como o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical anião hidróxilo ($\bullet OH$) ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) podem ser endogenamente geradas como subprodutos de processos metabólicos, como a respiração, bem como, nos organismos superiores, pelo sistema imunitário, na resposta a agentes patogénicos. Consequentemente, todos os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de proteção dos seus componentes celulares contra as ROS (Jamieson, 1992; Cabisco, 2000).

Embora o dioxigénio possa ser considerado um dirradical por conter dois eletrões desemparelhados na camada externa, não é muito reativo uma vez que ambos os eletrões possuem o mesmo estado de spin. Quando um desses electrões desemparelhados é excitado e altera o seu estado rotacional, a espécie resultante (oxigénio atómico) torna-se um oxidante poderoso. Quando o oxigénio é reduzido por um eletrão, forma-se ao nível dos cloroplastos ou dos mitocôndrios o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), um intermediário relativamente estável. No entanto, esse radical é o precursor de grande parte das ROS e um mediador de reações da cadeia respiratória. A dismutação do radical anião superóxido, quer espontaneamente, quer catalisada pelo enzima superóxido dismutase gera peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que pode ser completamente reduzido a água por várias peroxidases. No entanto, na presença de metais de transição, a redução parcial do peróxido de hidrogénio gera radical hidroxilo ($\bullet OH$), um dos mais potentes oxidantes da natureza. Quando o ferro é o metal envolvido, a reação é conhecida por reação de Fenton (Herrero, 2008; Mittova, 2000; Perrone, 2008). As reações de Fenton envolvem a ação combinada do radical anião superóxido e H_2O_2 , e são catalisadas por metais de transição, tais como Fe^{2+} . Os iões ferrosos reagem com o H_2O_2 para gerar o radical hidroxilo e um ião OH^- com formação de Fe^{3+} . Este pode, então, ser reduzido a Fe^{2+} pelo anião de superóxido e reiniciar o processo. Os radicais

hidroxilo reagem indiscriminadamente com a maioria dos metabolitos e macromoléculas, gerando, em muitos casos, outros radicais. Os processos envolvidos na homeostase de Cu e Fe são, por conseguinte, um componente muito importante das defesas celulares minimizando os danos causados pelas ROS (Perrone, 2008).

As ROS são geradas endogenamente na sequência de processos metabólicos, como a cadeia respiratória ou a β -oxidação de resíduos acilo, mas podem também formar-se pela exposição celular a radiação UV e radiações ionizantes, reciclagem redox ou por exposição a metais pesados citocinas, fatores de crescimento, agentes quimioterapêuticos, toxinas ambientais e hipertermia. Além disso, sistemas enzimáticos citoplasmáticos, incluindo NADPH-oxidases, e subprodutos do metabolismo peroxissomal podem constituir também fontes endógenas de ROS.

Os organismos que crescem aerobiamente encontram-se continuamente expostos a oxidantes reativos, pelo que o *stress* oxidativo ocorre quando a concentração destes oxidantes aumenta para além da capacidade de tamponamento antioxidante da célula.

As ROS atacam resíduos acilo insaturados das biomembranas, despoletando peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas e de DNA, uma série de alterações deletérias que conduzem à inativação dos sistemas biológicos. Assim, os antioxidantes são inibidores importantes da peroxidação lipídica, não só para proteção dos alimentos mas também na defesa das células vivas contra os danos oxidativos. Dada a natureza ubíqua das ROS, é pouco surpreendente que a maior parte, se não todos, os organismos tenham desenvolvido meios para proteger os seus componentes celulares contra agentes oxidantes. Estes mecanismos de defesa antioxidantes encontram-se maioritariamente expressos em *Saccharomyces cerevisiae* (Salmon, 2004; Jamieson, 1998; Peksel, 2006; Temple, 2005; Matés, 2000; Grant, 1997; Perrone, 2008; Jamieson, 1994).

A peroxidação lipídica é uma importante reação de deterioração nos alimentos durante o armazenamento e processamento que provoca perda da qualidade nutricional. A presença de antioxidantes torna-se assim necessária para preservar a qualidade dos alimentos. Suplementos antioxidantes ou alimentos ricos em antioxidantes são igualmente utilizados para preservar o corpo humano de danos oxidativos provocados pelas ROS (Peksel, 2006).

Os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa não enzimáticos e enzimáticos capazes de remover a maior parte das ROS. O equilíbrio entre a geração de ROS e os níveis de antioxidantes constitui uma condição essencial para assegurar o funcionamento adequado de qualquer organismo. Embora pulsos de ROS possam ser benéficos para a célula ao assegurarem processos de sinalização e de modulação metabólica, níveis cronicamente

elevados de ROS devido à sua produção excessiva ou a falhas nas defesas antioxidantes da célula colocam-na em condições de *stress* oxidativo. Nesse caso, o excesso de ROS pode oxidar e danificar lípidos, proteínas e DNA celular, modificando a estrutura e os processos de regulação celulares, culminando em perdas funcionais graves que podem levar à morte celular. O *stress* oxidativo pode ter causas naturais, como acontece em situações de exercício físico extremo, ou nos processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como o contacto com xenobióticos ou patologias infecciosas (Fig. 1.6). A produção descontrolada de ROS tem sido diversas vezes associada ao despoletar de mais de uma centena de patologias humanas, entra as quais se incluem diferentes tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras. A sobreprodução de ROS tem sido fortemente correlacionada com o envelhecimento celular (Ferreira, 2007; Mishra, 2012; Li, 2008; Salmon, 2004).

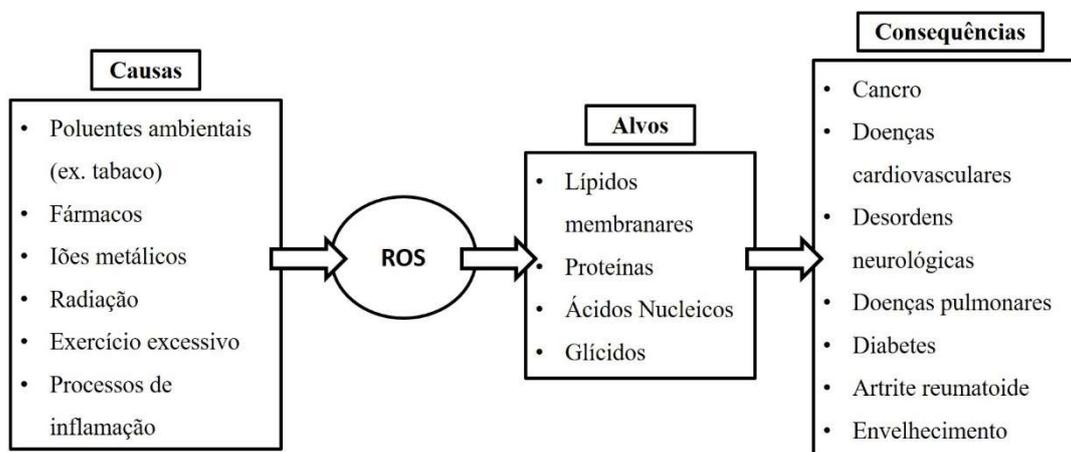


Figura 1.6 – Principais causas e consequências da ação de espécies reativas de oxigénio (ROS) na célula (adaptado de Ferreira, 2007).

À semelhança de outros organismos, a *Saccharomyces cerevisiae* responde ao *stress* oxidativo de vários modos. Quando exposta a níveis de concentração baixos adapta-se, tornando-se mais resistente a agentes oxidantes, ao passo que a níveis elevados de exposição as ROS favorecem a divisão celular, induzem sistemas de proteção e de reparação antioxidantes, constituindo sempre uma ameaça à integridade celular. A levedura desenvolveu vários mecanismos de proteção contra o *stress* oxidativo, tais como a sobre regulação de antioxidantes, a remoção de proteínas específicas pelo sistema ubiquitina-proteossoma e a remoção de proteínas e organelos danificados por autofagia. Em mamíferos, a autofagia constitui o principal processo de exportação de proteínas e organelos para o lisossoma onde são degradados e reciclados, enquanto que em leveduras o vacúolo corresponde ao local de

destino para esse fim (Temple, 2005; Mishra, 2012; Herdeiro, 2006; Scherz-Shouval, 2007; Carmel-Harel, 2000).

A adição de um eletrão ao dioxigénio (O_2) leva à formação do radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é normalmente considerado o ROS “primário”. O anião superóxido é maioritariamente gerado nos mitocôndrios, onde ocorre uma pequena, mas contínua, “fuga” de eletrões da cadeia respiratória. Estes eletrões, ao invés de reduzir o O_2 a água, reduzem o O_2 a radical anião superóxido. Estudos *in vitro* indicam que o complexo III da cadeia respiratória pode ser responsável por mais de 80% das ROS geradas endogenamente em leveduras (Ferreira, 2007; Grant, 1997; França, 2007). Apesar do anião superóxido não ser um radical muito ativo, pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais usualmente designados por ROS “secundários”, entre os quais se destacam o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\bullet OH$). O radical hidroxilo possui um tempo de meia-vida muito curto mas é muito reativo, sendo mesmo a ROS que causa mais danos, nomeadamente por atacar moléculas de DNA, danificando tanto purinas como pirimidinas, bem como o esqueleto de desoxirribose do DNA.

Os sistemas antioxidantes eficazes na desintoxicação do oxigénio ativo encontram-se filogeneticamente conservados na maior parte das espécies. A redução enzimática do radical anião superóxido a peróxido de hidrogénio e a sua subsequente remoção é facilitada nas leveduras pelos enzimas superóxido dismutase, catalases, e citocromo c peroxidase (Davidson, 1996; Ferreira, 2007).

Em leveduras, o peróxido de hidrogénio gerado pela desintoxicação do radical anião superóxido pode também ser gerado como subproduto da oxidação dos resíduos acilo no peroxissoma, de diversas oxidases citoplasmáticas e mitocondriais, assim como do endobrimento de proteínas no retículo endoplasmático. O H_2O_2 pode facilmente atravessar as membranas biológicas. Eventuais danos permanentes provocados no material genético pelo *stress* oxidativo podem representar o primeiro passo em situações de mutagénese, cancerigénese e envelhecimento (Ferreira, 2007; Perrone, 2008).

A cadeia respiratória é constituída por quatro complexos enzimáticos que permitem a transferência de eletrões dos coenzimas NADH e $FADH_2$ para o dioxigénio acoplada à síntese de ATP pela F_1F_0 -ATPase, libertando como subproduto residual o radical superóxido. Apesar de os mitocôndrios constituírem uma das principais fontes de ROS nos organismos eucariontes, são também um dos seus alvos primários. Como a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre na vizinhança desses sistemas membranares. Assim, as ROS têm o acesso

facilitado aos lípidos de membrana, especialmente sensíveis aos ataques por radicais livres que desencadeiam a peroxidação lipídica e promovem a formação de outros tipos de ROS (Fig. 1.7) (Ferreira, 2007; (Scherz-Shouval, 2007; Grant, 1997).

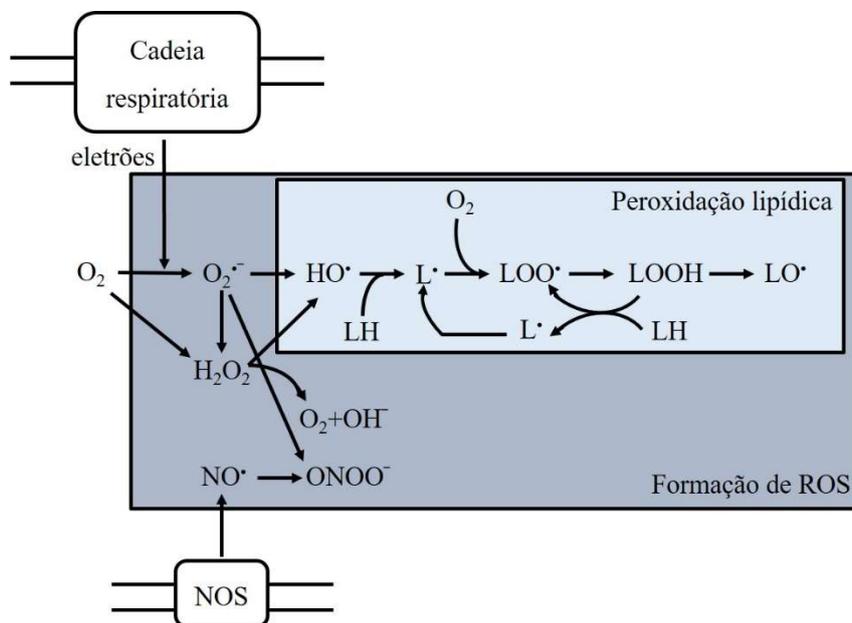


Figura 1.7 – Diagrama ilustrativo das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS). A cadeia respiratória produz aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que pode ser transformado em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidróxido (HO^{\cdot}). Estes radicais podem reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica originando radicais lipídicos (L^{\cdot}), radicais peróxilo (LOO^{\cdot}) e lipoperóxidos ($LOOH$). A síntese do óxido nítrico mitocondrial (NOS) produz óxido nítrico (NO^{\cdot}), que se combina com o anião superóxido para gerar peroxinitritos ($ONOO^-$). Quando em excesso, todos estes ROS podem causar danos mitocondriais e celulares (adaptado de Ferreira, 2007).

A peroxidação lipídica inicia com a remoção de um átomo de hidrogénio de um resíduo acilo polinsaturado (LH) pela ação das ROS como o radical $^{\cdot}OH$ ou o H_2O_2 , formando-se um radical acilo (L^{\cdot}). Este ataque é seguido pela adição de uma molécula de O_2 formando-se um radical peróxilo (LOO^{\cdot}). Se este radical não for neutralizado pelas defesas antioxidantes, vai rapidamente desencadear um fenómeno de propagação da peroxidação lipídica reagindo com outros resíduos acilo adjacentes que levam à formação de lipoperóxidos ($LOOH$). Estes compostos podem facilmente ser decompostos para formar novamente radicais L^{\cdot} . Esta série de reações com produção de radicais peróxilo e acilo, são coletivamente designadas por reações de propagação em cadeia e, se não forem travadas, podem provocar danos potencialmente mais elevados do que as ROS que iniciaram a reação. O mitocôndrio é deste modo um local sensível à ação destrutiva das ROS, apesar de ser um dos locais da célula

peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), entre outros, já abordados anteriormente neste texto (Ferreira, 2007; Grant, 1997; Scherz-Shouval, 2007).

Os enzimas SOD convertem o radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio que pode então ser convertido em água pelos enzimas catalase ou glutathione peroxidase. Por outro lado, o enzima GR desempenha um papel relevante no processo, pois regenera o GSH utilizado como coenzima pelo GPx na redução de peróxidos ou lipoperóxidos a água ou ao álcool correspondente.

O glutathione, GSH é um tripéptido de baixo peso molecular, composto pelos resíduos de aminoácidos γ -glutamato, cisteína e glicina. O grupo tiol da cisteína constitui o principal tampão redox intracelular, comportando-se como quelante de ROS como os radicais $\bullet\text{OH}$, $\text{LOO}\bullet$ e $\bullet\text{ONOO}^-$ ou o H_2O_2 , e por reação direta ou indireta, como coenzima do GPx ou GST, entre outros. No processo de neutralização das ROS, o GSH é oxidado com formação do radical $\text{GS}\bullet$. Esse radical livre é também muito reativo mas, em geral, reage rapidamente com um segundo radical $\text{GS}\bullet$ formando-se dissulfureto de glutathione (GSSG) que não é um oxidante. O GSSG é regenerado de novo em dois GSH pelo enzima GR, que pode ainda ser utilizado para converter outros antioxidantes como o ascorbato ou o α -tocoferol no seu estado ativo (Ferreira, 2007; Scherz-Shouval, 2007).

A capacidade do GSH para regenerar moléculas antioxidantes depende maioritariamente do potencial de redução do par redox glutathione/dissulfureto de glutathione (GSH/GSSG). O GSH pode ainda reagir diretamente com uma elevada variedade de xenobióticos eletrófilos ou como coenzima do GST, convertendo-os em derivados mais solúveis e facilmente excretáveis pela célula. Um dos conjugados formados é o *S*-nitrosoglutathione (GSNO), que resulta da reação do GSH com o radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) (Ferreira, 2007).

Todos os organismos aeróbios utilizam o dióxigénio (O_2) na oxidação aeróbia de nutrientes para disponibilizar o potencial químico necessário ao seu crescimento e manutenção das suas funções vitais de forma eficiente (Izawa, 1995; Mishra, 2012).

Os enzimas antioxidantes, como o GPx, GR, e SOD participam ativamente na manutenção da homeostase do GSH prevenindo a ocorrência de *stress* oxidativo. O enzima GR integrado nos ciclos ascorbato-glutathione, dos quais também fazem parte os enzimas ascorbato peroxidase (APX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e desidroascorbato redutase (DHAR) assistem uma resposta complementar de proteção contra as ROS (Dkhil, 2011; Mittova, 2000; Koca, 2007).

Glutationo

O glutaciono (GSH) (Fig. 1.9) constitui um dos antioxidantes celulares não enzimáticos mais importante contra o *stress* oxidativo (Singh, 2013). O tripéptido é sintetizado enzimaticamente por duas reações dependentes de ATP, idênticas em bactérias, fungos, plantas e animais: (i) produção de γ -glutamilcisteína, catalisada pelo γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS) e (ii) produção de glutaciono, catalisada pelo glutaciono sintetase (GS) (Nagalakshmi, 2001; Grant, 1996).

Uma das principais funções do tripéptido na resposta ao *stress* oxidativo corresponde à redução do ascorbato pela interação entre o ciclo do ascorbato e o ciclo do glutaciono. O glutaciono tem ainda capacidade para reagir não enzimaticamente com oxigénio atómico, o radical anião superóxido e o radical hidroxilo. Como componente dos ciclos ascorbato-glutaciono, o GSH participa ativamente no controlo dos níveis de H_2O_2 das células vegetais (Drażkiewicz, 2003). O H_2O_2 é eliminado nos peroxissomas pelas catalases enquanto que nos cloroplastos, a via de desintoxicação prossegue com o acoplamento da redução de H_2O_2 pelo GSH com recurso ao sistema ascorbato-dehidroascorbato (Nagalakshmi, 2001). O glutaciono é detetado em níveis elevados em todos os organismos aeróbios. A ligação γ -peptídica pouco usual e do grupo α -carboxilo livre previnem a hidrólise do GSH por peptidases que degradam outros péptidos de pequena dimensão. O GSH é o tiol de baixa massa molecular mais abundante na célula. A sua concentração é ≈ 2 mM em leveduras e superior a 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respetivamente (Huber, 2008; Grant, 1996).

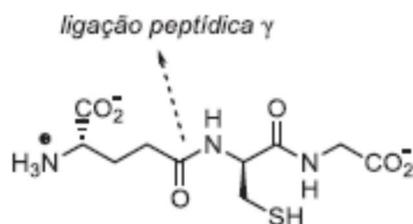


Figura 1.9 – Representação estrutural do Glutaciono: γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina (adaptado de Huber, 2008).

O dissulfureto de glutaciono (GSSG) que se forma por oxidação do GSH, pode ser reduzido pelo enzima glutaciono redutase, à custa de NADPH (Carmel-Harel, 2000).

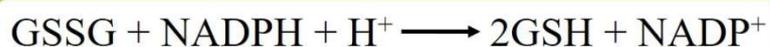
Em geral, um decréscimo do nível celular de GSH tem sido considerado como um bom indicador de *stress* oxidativo pelo etanol, caracterizado pela geração de acetaldeído tóxico e outras moléculas reativas na célula.

Muitas das reações em que participa o GSH dependem do grupo sulfidrilo (SH), polar, facto que o torna um bom nucleófilo em reações com compostos químicos eletrófilos. Esta

capacidade para doar elétrons torna o glutationato um bom redutor. A combinação da sua abundância com as propriedades do grupo sulfidrilo nos organismos aeróbios suporta a hipótese de que o GSH surgiu ao longo do processo evolutivo como um agente protetor contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrófilos gerados por processos oxidativos endógenos e/ou ambientais (Huber, 2008). Em leveduras, uma razão GSH/GSSG $\geq 1,2-1,4$ é condição necessária para a saúde celular, uma vez que o GSSG inibe a síntese proteica, inativando fatores de iniciação (Nagalakshmi, 2001; Hissin, 1976).

Glutationo Redutase

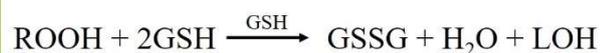
O enzima glutationato redutase (EC 1.8.1.7) é responsável pela redução do GSSG a GSH de acordo com a equação:



Este enzima participa não só na eliminação do H_2O_2 , mas também em vias de sinalização redox, ou de ativação de mecanismos de defesa em condições de *stress*. Os locais de ligação ao GSSG encontram-se localizados na interface das duas subunidades que constituem a sua organização estrutural quaternária, possuindo cada uma delas um domínio distinto de ligação ao coenzima NADPH. O grupo sulfidrilo de um dos resíduos de cisteína, presentes no centro ativo do GR ataca a ligação S-S, libertando uma molécula de GSH e o dissulfureto misto GSSGR. Um ataque intramolecular do grupo sulfidrilo do segundo resíduo de cisteína sobre o GSSGR liberta a segunda molécula de GSH, formando-se dissulfureto cíclico. A conversão do dissulfureto cíclico pelo GR dá-se à custa da oxidação do NADPH a NADP^+ reiniciando-se o ciclo redutor mediado pelo enzima (Huber, 2008; Drażkiewicz, 2003).

Glutationo Peroxidase

O enzima glutationato peroxidase (EC 1.11.1.19) é considerado uma das principais defesas contra peróxidos e lipoperóxidos em células de mamífero. Esta atividade não está presente em bactérias, mas tem sido detetada em *S. cerevisiae*, decorrendo de acordo com as equações:



Recentemente, os genes (GPx1, GPx2, e GPx3) que codificam três homólogos do glutationato peroxidase foram identificados na sequência completa do genoma de *S. cerevisiae*. As funções dos três genes foram investigadas por ensaios fenotípicos com mutantes e por

estudos de expressão induzida de isoenzimas GPx1, GPx2 e GPx3. Estas experiências revelaram que um mutante que não expresse o enzima GPx3 torna-se hipersensível ao H_2O_2 e ao t-butilhidroperóxido. Todavia mutantes para o GPx1 GPx2 não apresentavam um fenótipo tão óbvio. Alguns investigadores também observaram que a expressão da forma isomorfa GPx3 não foi induzida por quaisquer dos agentes de *stress* testados. No entanto a expressão do isoenzima GPx1 foi induzida pela carência de glicose, enquanto a expressão do isoenzima GPx2 foi induzida pelo H_2O_2 e pelo t-butilhidroperóxido dependente do recetor Yap1p (Carmel-Harel, 2000).

Glicose-6-fosfato desidrogenase

O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49), um enzima chave da via das pentoses fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconato. Enzimas como a hexocinase (HK) e G6PDH, são essenciais para o metabolismo celular e são utilizados em estudos clínicos e bioquímicos, como reagentes analíticos para medir a atividade da creatina-cinase, bem como a concentração de ATP e de hexoses (Silva, 2002).

O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) catalisa o passo limitante da velocidade, no ponto de ramificação oxidativa da via das pentoses fosfato (PP) que liberta equivalentes redutores sob a forma de NADPH, sendo a sua expressão e atividade fortemente regulada (Fig. 1.10). Este enzima pode existir quer como monómero inativo quer como dímero ativo. A razão $NADP^+/NADPH$ constitui um dos principais moduladores do enzima G6PDH, comportando-se o coenzima reduzido NADPH como efector negativo da atividade G6PDH, enquanto que a forma oxidada $NADP^+$ assiste à referida atividade enzimática modulando a sua conformação.

O enzima G6PDH pode ainda ser regulado por diversos estímulos extracelulares e vias de sinalização que regulam a sua expressão e modulam a sua atividade por mecanismos pós-tradução (Patra, 2014).

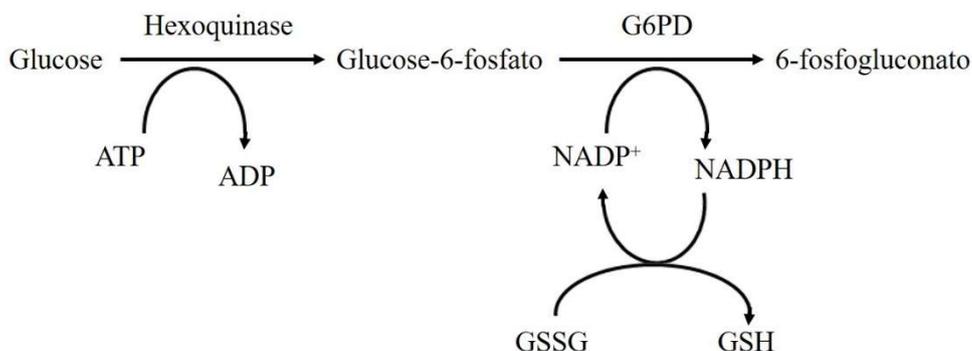
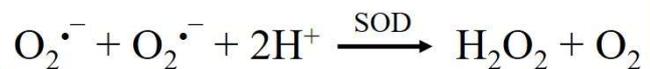


Figura 1.10 – Passos iniciais da via das pentoses fosfato (adaptado de Patra, 2014).

Superóxido Dismutase

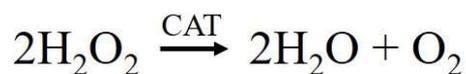
O enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) tem como principal papel biológico a remoção do radical anião superóxido de acordo com a equação:



convertendo-o em peróxido de hidrogénio que pode por sua vez ser eliminado por catalases ou glutatióno peroxidases (Matés, 2000). Outra função dos enzimas superóxido-dismutase é proteger desidratases como o aconitase, 6-fosfogluconato desidratase e fumarase A e B, contra a inativação pelo radical superóxido (Matés, 2000).

Catalase

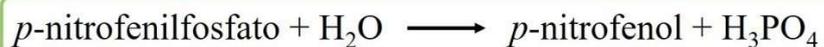
Os enzimas catalase (EC 1.11.1.6) apresentam uma organização estrutural tetramérica de subunidades idênticas com cerca de 60 kDa e um grupo hemo por subunidade. Assim, este enzima contém quatro grupos ferriprotoporfirínicos por molécula, apresentando a proteína, massa molecular de aproximadamente 240 kDa. O enzima é descrito como um dos que apresenta maior eficiência catalítica. Reage com H_2O_2 para formar água e dióxigénio, bem como com doadores de equivalentes redutores como o metanol, o etanol, o ácido fórmico ou o fenol, de acordo com a reação (Matés, 2000):



Apesar de o H_2O_2 poder ser catabolizado enzimaticamente nos organismos aeróbios por catalases ou, em alternativa, por diversas peroxidases, em alguns tipos de células desempenha um papel relevante na tolerância ao *stress* oxidativo (Matés, 2000).

Fosfatase Alcalina

O termo fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1, ALP) designa uma família de enzimas que se encontra ubiquamente distribuída desde as bactérias até ao homem. Esses enzimas catalisam *in vitro* a hidrólise de uma vasta gama de monofosfoésteres, a pH alcalino, de acordo com a equação (Linder, 2013):



Contudo a sua função biológica não se encontra totalmente esclarecida.

Peróxido de Hidrogénio

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o peróxido de hidrogénio oxida resíduos de metionina, diminui a razão de GSH/GSSG, e aumenta a carbonilação e *S*-tiolação de proteínas. Várias proteínas podem ser *S*-tioladas quando células de levedura são expostas ao H₂O₂, sendo o enzima glicolítico gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase o principal alvo da *S*-tiolação proteica (Costa, 2002). Apesar de em condições fisiológicas saudáveis, os danos oxidativos serem minimizados pelas defesas antioxidantes que removem ou previnem a geração de ROS, os níveis constitutivos das defesas antioxidantes conferem uma capacidade limitada de resistência a uma agressão oxidativa súbita e, por conseguinte, a sua indução é essencial para a sobrevivência da célula. Uma resposta oxidativa ao *stress* pode ser acionada quando as células de levedura são expostas a níveis baixos de H₂O₂ que conduzem à aquisição de resistência celular a uma exposição letal subsequente (Costa, 2002).

Malondialdeído (MDA)

O malondialdeído (MDA) é um produto e, portanto, um marcador de peroxidação lipídica mediada pelo *stress* oxidativo (Singh, 2013; Del Rio, 2005). Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA, C₃H₄O₂), podem assim ser utilizados como indicadores da ação das ROS no organismo. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica. A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é assim um parâmetro importante para avaliação de danos oxidativos na célula (Antunes, 2008).

1.6. Acetato um agente tóxico

O acetato (20-80 mM) induz a morte de células de *Saccharomyces cerevisiae* em fase exponencial com características de morte celular programada, como a condensação da cromatina ao longo do envelope nuclear, exposição de fosfatidilserina sobre a superfície exterior da membrana citoplasmática e ocorrência de fragmentação de DNA. Alguns autores também demonstraram que à semelhança do peróxido de hidrogénio, o acetato em concentração elevada (> 120 mM) induz alterações morfológicas celulares típicas de necrose sem marcadores apoptóticos, como o aparecimento dos terminais desoxinucleotidil transferase dUTP nick-end (TUNEL). Embora em *S. cerevisiae* o acetato constitua o produto final da fermentação alcoólica, pode igualmente ser produzido por bactérias que contaminam o ambiente natural da levedura. O composto entra na célula de levedura, na forma não dissociada, por difusão simples. No interior celular, o ácido dissocia-se contribuindo para a acidificação do ambiente celular com acumulação do anião acetato e inibição da atividade

metabólica celular. Deste modo, o ácido acético compromete a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, conduzindo a dois tipos de morte: de elevada e de baixa entalpia (Ludovico, 2001).

A apoptose, ou morte celular programada faz com que as células sejam rapidamente removidas sem lise, prevenindo a inflamação. Para organismos unicelulares como as leveduras, o mecanismo de suicídio parece ser fisiologicamente inútil. Em condições de privação de nutrientes, o suicídio celular "altruísta" pode assegurar que as poucas células sobreviventes possuem substrato suficiente para sobreviver. Por outro lado, após lesão genómica, a apoptose induz a replicação de cópias do genoma ancestral original em vez de dar origem a clones cujos genes alterados poderiam competir com o genoma original (Citterio, 2015).

Em *S. cerevisiae*, um fenótipo típico apoptótico com exposição da fosfatidilserina, marginação da cromatina e formação de fragmentos celulares, foi descoberto, pela primeira vez, numa estirpe mutante. Posteriormente outros marcadores apoptóticos foram detetados, tais como plasmólise celular, fragmentação do núcleo e do DNA, condensação da cromatina, externalização de fosfatidilserina, decréscimo potencial da extensão da membrana mitocondrial, libertação do citocromo c, permeabilização da membrana pelo iodeto de propídio, produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e ativação de caspase-1 de levedura. Alguns dos fatores de *stress* capazes de induzir apoptose são glúcidos, acetato, peróxido de hidrogénio, aspirina, óleos essenciais e a idade, maioritariamente relacionados com a geração de ROS, os reguladores-chave da apoptose em levedura (Citterio, 2015).

Na maioria das estirpes de *S. cerevisiae*, o ácido acético, um subproduto da fermentação alcoólica não é metabolizado por células de levedura reprimidas pela glicose. No interior celular o ácido encontra-se dissociado se o pH extracelular for menor do que o pH intracelular, levando à acidificação intracelular e à acumulação da forma dissociada que depende do gradiente de pH, afetando o metabolismo celular, a vários níveis. A acidificação intracelular provocada pelo acetato afeta negativamente o tráfico celular, dificultando a passagem das vesículas do endossoma para o vacúolo. Apesar do acetato induzir a ativação do enzima ATPase (50 mM, pH 3,5) da membrana citoplasmática, o aumento da atividade não é suficiente para neutralizar a acidificação citoplasmática e vacuolar. O acetato tem sido reconhecido como agente tóxico produzido em diferentes processos biotecnológicos associados aos efeitos negativos da fermentação pelas leveduras. Na última década, o acetato tem sido reconhecido como um indutor de morte celular programada (PCD) (Sousa, 2012).

2. Problemática e objetivos

2.1. Problemática

A *Portulaca oleracea* L., vulgarmente designada por beldroega é uma planta herbácea anual, com folhas suculentas frescas de distribuição ubíqua que se agrupa entre as que apresenta valor nutritivo e comercial elevado, por ser rica em vitaminas, sais minerais, aminoácidos, polifenóis e agentes nutracêuticos que lhe conferem diversas propriedades biológicas e medicinais. Apesar de a sua origem ser incerta, cresce espontaneamente ou é cultivada em todos os continentes. A sua existência na América do Norte é descrita como pré-colombiana, tendo sido identificada na Europa no final do século XVI, onde cresce bem em zonas com dias longos e temperatura diurna/noturna próxima dos 27°C/22°C. Em Portugal, a sua presença é maioritariamente detetada no Alentejo e Nordeste algarvio.

O estudo descrito neste texto inspirou-se em trabalhos realizados por investigadores do ICAAM, na Universidade de Évora cujo principal objetivo foi estabelecer ensaios de campo que permitissem otimizar a produção de beldroega em substrato com recurso à fertilização com nitrogénio. Nesse contexto desenvolveu-se também aproximações preliminares que a autora deste estudo realizou durante o estágio da licenciatura em Bioquímica, de avaliação da capacidade antioxidante de beldroegas cultivadas em diferentes condições de fertilização com nitrogénio. Os resultados então obtidos permitiram concluir que o nível de fertilização que conferiu maior produtividade, sem acumulação excessiva de nitratos foi o de 60 kg/ha. Assim, adotou-se esse nível de fertilização para obter as beldroegas utilizadas no presente estudo, onde se procurou estimar o teor em fenóis, ascorbato e prolina, a capacidade antioxidante medida pelos métodos do FRAP e DPPH em extratos de caules e folhas da planta, obtidos por diferentes aproximações experimentais. Como a *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo GRAS é descrita pela literatura como um bom modelo biológico para testar mecanismos de resposta não enzimáticos e enzimáticos antioxidantes de eucariontes, escolheu-se a *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ nativa do Alentejo, Portugal, para avaliar a resposta antioxidante aos extratos de folhas de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa.

2.2. Objetivo Geral

Testar a hipótese H₀: Extratos aquoso e etanólicos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa não possuem capacidade antioxidante distinta, nem perturbam os sistemas de resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Objetivos específicos

Conhecer e compreender:

- O valor económico *Portulaca oleracea*;
- Os efeitos da adubação com nitratos na produtividade *Portulaca oleracea*;
- As consequências da adubação sobre [fenóis], [Pro], [ascorbato], DPPH e FRAP;
- O perfil de crescimento e antioxidante de *S. cerevisiae*;
- Os protocolos para obtenção extratos vegetais/avaliação propriedades antioxidantes;
- O significado biológico de alterações [GSH], [GSSG], [ROS] [MDA] em eucariontes;
- O significado biológico de alterações das atividades enzimáticas GR, CTT1, CTA1, GPx, G6PD, ALP, SOD.

Dar valor:

- Ao valor nutritivo e funcional de *Portulaca oleracea*;
- Aos extratos vegetais e suas propriedades antioxidantes;
- À atividade enzimática ALP como marcador energético;
- À razão GSH/GSSG como indicador do potencial redox;
- Ao conteúdo em ROS como marcador de *stress* oxidativo;
- Ao conteúdo em MDA como marcador de danos celulares;
- Às atividades GR, GPx, CTT1, CTA1, G6PD e SOD como marcadores da resposta antioxidante;
- À qualidade das curvas de calibração ou de reação.

Aplicar:

- Os métodos testados a outras espécies vegetais;
- Os conhecimentos adquiridos à caracterização de outros produtos hortícolas;
- Os efeitos de extratos vegetais na resposta ao *stress* por *S. cerevisiae*.

3. Metodologia

3.1 Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano:

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

Suporte financeiro: Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas FT/ICAAM (Call 2014) e Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

Duração: 1 ano letivo

Modelos Biológicos: *Portulaca oleracea* L, sub-espécie sativa e
Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.

Agente oxidante: Acetato (25 mM).

Ensaio:

- Extratos aquoso, etanólico 12 % e etanol absoluto de caule e folha de *Portulaca oleracea* L, sub-espécie sativa, proveniente de ensaio de necessidades de azoto da beldroega cultivada em substrato com adubação nitrogenada 60 kg/ha, realizados na Herdade da Mitra, Universidade de Évora.
- Atividade biológica dos extratos foleares em *S. cerevisiae* UE-ME₃ na ausência e na presença de acetato (25 mM).

Parâmetros a analisar:

- ✓ Nos diferentes extratos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa:
 - Ascorbato
 - Fenóis totais
 - Prolina
 - Capacidade antioxidante pelo método DPPH
 - Capacidade antioxidante pelo método FRAP

- ✓ Atividade biológica de diferentes extratos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa em *Saccharomyces cerevisiae* na ausência e na presença de acetato:
 - Peso seco
 - Viabilidade celular por cfu
 - Fosfatase alcalina
 - Superóxido dismutase
 - Glicose-6-P desidrogenase
 - Glutathione redutase
 - Glutathione peroxidase
 - GSH
 - GSSG
 - GSH/GSSG
 - Total de tiois totais não proteicos
 - Catalase CTT1
 - Catalase CTA1
 - ROS
 - MDA

Técnicas utilizadas:

- ✓ Obtenção de extrato aquoso e etanólico
- ✓ Cultura de microrganismos
- ✓ Desintegração celular, por homogeneizador com sonda de ultra-sons
- ✓ Fracionamento celular, por centrifugação diferencial
- ✓ Potenciometria
- ✓ Espetrometria de absorção molecular
- ✓ Espetrometria de fluorescência

Análise estatística dos resultados:

Procedeu-se à análise estatística dos resultados, pela análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan para os resultados obtidos em *Portulaca oleracea* das diferentes amostras e culturas incluindo conteúdos nutritivos e antioxidantes, cfu, peso seco, capacidade antioxidante e atividades enzimáticas. Recorreu-se ao programa SPSS para o Windows, versão 19, licenciado para a Universidade de Évora.

3.2 Procedimento experimental

3.2.1. Preparação de extratos de *Portulaca oleracea*

Os ensaios foram realizados em ambiente protegido, numa estufa existente no terreno da antiga Horta do Pólo da Mitra, caracterizada por armação em metal e revestimento em plástico térmico. Os ensaios de produção de beldroega foram efetuados em recipientes preenchidos com 8 L de substrato obtido comercialmente composto por resíduos florestais e bagaço de uva compostados e turfa loura. As plantas foram mantidas sob as condições hídricas por rega localizada micro-aspersão, num sistema fixo, difusores e controlador automático de rega acoplado a uma torneira. Nas adubações foi utilizado nitrato de amónio, doseando 34,5 % de azoto, sendo 16,9 % na forma nítrica (NO_3^-) e 17,6 % na forma amoniacal (NH_4^+). Este ensaio teve como intuito analisar a influência do azoto na produção comercial da beldroega, e de modo a aumentar a rentabilidade da área de cultivo disponível, a densidade de plantas foi de 2 200 plantas/m², sendo testados os níveis de azoto de 0, 30, 60 e 90 kg/ha, com as aplicações de adubo semanal.

As plantas foram recolhidas na Herdade da Mitra, Universidade de Évora, e guardadas no Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora a -80 °C. As plantas foram recolhidas em quatro repetições de cada um dos ensaios de níveis de adubação nitrogenada.

A preparação das amostras foi iniciada pela pesagem de 2 g de folhas e de 2 g de caules de planta (*Portulaca oleracea*) do nível de adubação azotada de 60 kg/ha, com quatro repetições, seguida de maceração da mesma em almofariz em presença de nitrogénio líquido. Os caules foram homogeneizados, em água (p/v 1:7,5) e etanol 12 % (p/v 1:7,5). Enquanto que as folhas foram homogeneizadas em água (p/v 1:7,5), etanol 12 % (p/v 1:7,5) ou etanol absoluto (p/v 1:7,5). A extração decorreu à temperatura ambiente em agitador orbital durante 1h30min. Os extratos foram clarificados por filtração com papel de filtro Whatman® N°1 e armazenados em alíquotas a -20 °C para posterior utilização.

3.2.2. Caracterização química de extratos de *Portulaca oleracea*

3.2.2.1. Ascorbato

O doseamento do ascorbato foi realizado nos diferentes extratos de caule e folha de beldroega de acordo com o método descrito por Cai (1999), recorrendo às propriedades redutoras do ascorbato. A quantificação do ascorbato foi realizada pela preparação de uma

mistura contendo TCA (5 %), H₃PO₄ em etanol (0,4 %), β-fenantrolina em etanol (0,5 %), FeCl₃ em etanol (0,03 %) e volume adequado de amostra ou padrão. A mistura incubou a 30 °C durante 90 min, levando à formação do complexo Fe (II) – β-fenantrolina. A concentração de ascorbato nas amostras foi determinada por leitura da absorvência a 534 nm e interpolação na curva padrão de ascorbato construída no intervalo de concentração de 0-30 mg/mL (Fig. A.1).

3.2.2.2. Fenóis totais

O teor em fenóis totais dos diferentes extratos de caule e folhas de beldroega foi determinado como descrito por Singleton (1965) recorrendo ao reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfotúngsténico e ácido fosfomolibdico que em condições alcalinas e ao oxidar os fenóis é reduzida a uma mistura de óxidos azuis de tungsténio e de molibdénio. A coloração azul produzida, com máximo de absorção a 760 nm, é proporcional ao teor em compostos fenólicos, expresso como equivalente de ácido gálico, numa curva padrão construída entre valores de concentração de 0-200 mg/L (Fig. A.2).

A mistura de reação continha reagente de Folin-Ciocalteu comercial diluído 10x, carbonato de sódio (7,5 %) e volume adequado de amostra ou padrão. A solução anterior foi cuidadosamente agitada no vortex e incubada ao abrigo da luz a 25 °C durante 90 min, após o que foi lida a absorvência a 760 nm.

3.2.2.3. Prolina

O conteúdo em prolina foi determinado nas amostras recorrendo à ninidrina ácida e segundo o método adaptado de Bates (1973). Em ebulição, a prolina quando em contacto com a ninidrina em meio ácido origina uma formazona de cor vermelha, quantificável a 546 nm.

A mistura de reação era composta pela amostra, ácido acético glacial e ninidrina ácida (ácido acético glacial:água:ácido orto-fosfórico 85% na proporção 6:3:1), na proporção de 1:1:1. Após agitação em vortex a mistura incubou em banho em ebulição durante 1 hora. Após arrefecer foi lida a absorvência a 546 nm.

A concentração em prolina nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de L-Prolina construída no intervalo de concentrações de 0-20 mg/L (Fig. A.3).

3.2.2.4. Capacidade antioxidante pelo método do FRAP

O método FRAP, descrito por Benzie (1999) permite determinar, por espectrometria de absorção molecular, a capacidade antioxidante dependente do ião ferro presente na amostra, dependente da capacidade redutora dos antioxidantes, na presença do reagente de FRAP.

O reagente de FRAP composto por cloreto de ferro (20 mM), TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e tampão acetato de sódio (300 mM) pH 3,6 na proporção de 1:1:10 (v/v/v) foi adicionado a uma alíquota de padrão ou amostra e registada a variação de absorvência a 593 nm, durante 60 s a 37 °C.

A determinação da capacidade redutora do ferro presente nas amostras foi realizada por interpolação gráfica, na curva de calibração, na qual foi usado Trolox como padrão, no intervalo de concentração 0-16 mg/mL (Fig. A.4).

3.2.2.5. Capacidade antioxidante pelo método do DPPH

O método designado por DPPH mede a capacidade antioxidante das amostras para capturar o radical orgânico estável DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), um cromóforo de cor púrpura com um máximo de absorção a 515nm. O antioxidante (AH) ao reduzir o radical DPPH^{*} origina um produto estável, o DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de cor amarela (Blois, 1958). Neste ensaio utilizou-se uma solução de DPPH^{*} (0,03g/L em metanol), a qual foi preparada sempre que necessário e mantida ao abrigo da luz. Adicionou-se a células de absorção molecular a referida solução de DPPH^{*} e volume conhecido da amostra ou do padrão. Acompanhou-se a variação de absorvência a 515nm, a 25°C durante 180s. Estimou-se a capacidade antioxidante das amostras por interpolação gráfica, na curva de calibração, construída utilizando ácido gálico como padrão, no intervalo de concentração de 0-200mg/L (Fig. A.5).

3.2.3. Atividade biológica em *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.3.1. Cultura de microrganismos

A levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, estirpe isolada em vinhos regionais do Alentejo e depositada na coleção do laboratório de enologia da Universidade de Évora, encontram-se armazenadas no nosso laboratório a -80 °C, em meio de cultura com glicerol e foi utilizada neste trabalho para testar a atividade biológica dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *Portulaca oleracea*.

Na realização deste trabalho foi utilizado meio YPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) de acordo com a formulação clássica do mesmo descrito por Atlas (2006), constituído por extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) dissolvidos em água ultra-pura e esterilizado pelo calor húmido, ao qual posteriormente foi adicionada glicose (20 g/L) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µm), bem como volume adequado de acetato e de extratos de beldroega. A

preparação de meio YPD sólido incluiu a adição de agar (20 g/L) antes da esterilização em autoclave.

O meio YPD foi inoculado com *S. cerevisiae* UE-ME₃ preservada a -80 °C e incubado durante 16 h em banho com agitação (150 rpm), termostaticado a 28 °C. Com esta cultura fresca inoculou-se 8 erlenmeyers contendo meio YPD, 1/3 de líquido para 2/3 de ar, e acompanhou-se o crescimento da cultura lendo a turbidez a 640 nm. Quando a cultura atingiu a fase exponencial média, A₆₄₀0,8-1,0 foi iniciada a exposição ao extrato de folha de beldroega (2 %), acetato (25 mM) ou extrato de folha de beldroega (2 %) e acetato (25 mM), como descrito no Quadro 3.1, de forma a iniciar o ensaio com culturas a 0,8 de turbidez. As culturas incubaram, nas condições anteriormente descritas, durante 200 min, correspondente ao tempo de exposição.

Quadro 3.1 – Descrição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ a extrato de folha de beldroega, a acetato ou a extrato de folha de beldroega e acetato.

Designação	Meio
Controlo	YPD
Eaq	YPD c/ Extrato aquoso de folha de <i>P. oleracea</i> (2%)
EetOH12%	YPD c/ Extrato etanólico 12% de folha de <i>P. oleracea</i> (2%)
EetOH98%	YPD c/ Extrato etanólico absoluto de folha de <i>P. oleracea</i> (2%)
Act	YPD c/ Acetato (25 mM)
Eaq+Act	YPD c/ Extrato aquoso de folha de <i>P. oleracea</i> (2%) e Acetato (25 mM)
EetOH12%+Act	YPD c/ Extrato etanólico 12% de folha de <i>P. oleracea</i> (2%) e Acetato (25 mM)
EetOH98%+Act	YPD c/ Extrato etanólico absoluto de folha de <i>P. oleracea</i> (2%) e Acetato (25 mM)

3.2.3.2. Determinação do peso seco

Amostras de células crescidas na ausência ou na presença de pró e antioxidantes foram recolhidas após 200 min. As amostras foram colocadas a secar em estufa a 80 °C, até atingirem peso constante.

3.2.3.3. Viabilidade celular

A sobrevivência celular foi estimada pela determinação de unidades formadoras de colónias (cfu) em placas contendo meio YPD, as quais foram incubadas a 28 °C em estufa até não se observar o aparecimento de novas colónias.

3.2.3.4. Preparação das frações pós-12000 g

A preparação das frações celulares foi realizada seguindo o método proposto por Lake (1987). No final do tempo de exposição (200 min), de acordo com o descrito na secção 3.2.3.1., as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 20 min a 4 °C, lavadas em água bi-destilada estéril, ressuspendidas em 10 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 e desintegradas a 4 °C, recorrendo a homogeneizador de ultra-sons (10 s 3 x 5 min; 0,1 kHz pulso).

Os lisados celulares foram submetidos a centrifugação diferencial a 5000 g durante 10 min, recolheu-se o sobrenadante para nova centrifugação a 12000 g durante 30 min, a 4 °C, recolhendo-se o sobrenadante pós-12000 g e resuspendendo o sedimento em igual volume de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. As frações celulares obtidas foram repartidas em alíquotas e guardadas a -20 °C, para posterior determinação de conteúdos celulares e atividades enzimáticas.

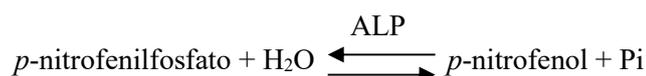
3.2.3.5. Proteína

A concentração de proteína existente nas frações celulares em estudo foi determinada de acordo com Lowry (1951), que se baseia na reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdicofosfotúngstico) e os resíduos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão na construção da curva de calibração. Dado que a reação é catalisada pelo cobre em meio alcalino, forma-se um complexo de heteromolibdémio de cor azul intensa em concentração proporcional à concentração de proteína presente no meio. A mistura de reação foi obtida pela adição de volume adequado de amostra de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g diluída em NaOH (0,5 M), 5,0 mL reagente de Lowry (sulfato de cobre 1%, tartarato de sódio e potássio 2% em carbonato de sódio 2%). A mistura foi agitada no vortex e após repousar 10 min, adicionou-se 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteu comercial, diluído na proporção 1:2 em água destilada, seguido de agitação em vortex. Aguardou-se 30 min e leu-se a absorvência a 720 nm. A metodologia descrita para as amostras foi repetida utilizando soluções de BSA de diferente concentração, entre 0 e 200 µg/mL, de forma a permitir a construção de uma curva de calibração (Fig. A.6), utilizada para obter, por interpolação gráfica, a concentração da proteína presente nas amostras, posteriormente utilizada no cálculo da atividade específica das determinações enzimáticas.

3.2.4. Determinação de atividade enzimática

3.2.4.1. Fosfatase alcalina

A determinação espectral da atividade ALP foi realizada na fração pós 12000 g de acordo com o método proposto por Breaudiere (1984) que permite quantificar a formação de *p*-nitrofenol (*p*NP), pelo aumento de absorvência a 405nm, resultante da hidrólise das ligações monofosfoéster do *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP), o substrato cromogéneo sintético, de acordo com a reação:



A reação decorreu a 37 °C em células de absorção molecular contendo a mistura constituída por *p*NPP (6 mM) em tampão Tris-HCl (0,5M) pH 8,5 e amostras de sobrenadante pós 12000 g (0,075 mg/mL).

A determinação do coeficiente angular das curvas de reação ($0,9689570 < r < 0,9868303$, Fig. A.7) traçadas durante 120 s e o coeficiente de absorvidade molar de 0,01603 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o *p*NPP permitiram determinar os valores da atividade fosfatase alcalina.

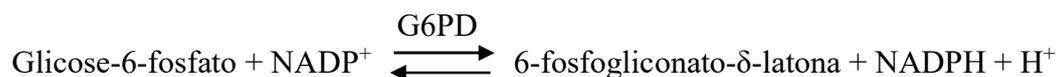
3.2.4.2. Superóxido dismutase

A determinação da atividade SOD1 realizou-se segundo o método descrito por Oberley e Spitz (1984), que se baseia na quantificação do produto cromogéneo da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pelo radical anião superóxido proveniente da ação da xantina oxidase. Trata-se então de um método indireto, uma vez que na presença do enzima SOD1 este compete com o NBT na oxidação do radical anião superóxido.

A mistura de reação, em tampão fosfato (50 mM) pH 7,8 continha xantina (3 mM), EDTA (3 mM), NBT (0,75 mM), BSA (15%, p/v), fração pós 12000 g (0,094 mg de proteína/mL) e xantina oxidase (0,8 U/mg). A reação ocorreu à temperatura de 25 °C, tendo-se registado a absorvência a 560 nm durante 180 s. Para determinar a atividade SOD1 realizou-se um branco no qual não se adicionou a amostra, sendo o valor obtido determinante para apurar a atividade SOD1, sabendo que 1 U corresponde à quantidade de enzima presente na amostra que causa 50 % de inibição da taxa de redução do sal de tetrazólio, utilizando o coeficiente angular da curva de reação do branco e das amostras ($0,9946628 < r < 0,9982830$, Fig. A.8).

3.2.4.3. Glicose-6-fosfato desidrogenase

A determinação espectrométrica da atividade enzimática G6PD foi realizada seguindo a formação de NADPH pela leitura da absorvência a 340nm de acordo com a equação (Postma, 1989; Bergmeyer, 1983):



As amostras incubaram no meio de reação constituído por Tris-HCl (1 M) pH 8, NADP⁺ (dissódico) (40 mM), MgCl₂.6H₂O (500 mM), glicerol (25 %) e volume adequado de fração pós 12000 g (0,037 mg proteína/mL), em células de espectrómetro de absorção molecular. Iniciou-se a reação com a adição de G6P (100 mM) após estabilização a 30 °C durante 1min. Acompanhou-se a formação de NADPH, lendo a absorvência a 340 nm, durante 800 s, a 30 °C (Bergmeyer, 1983). Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação (0,9775553 < r < 0,9968441; Fig. A.9) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.2.4.4. Glutationo redutase

A determinação por espectrometria de absorção molecular da atividade enzimática glutatino redutase fundamenta-se na reação:



Apesar de reversível, a reação dá-se em maior extensão no sentido que conduz à formação do glutatino. A atividade catalítica foi determinada de acordo com o método proposto por Goldberg e Sponer (1986) no sobrenadante pós 12000 g, acompanhando o decréscimo de absorvência a 340 nm, devido à oxidação do NADPH. Incubaram-se alíquotas de amostra (0,075 mg proteína/mL) em células de absorção molecular que continham o meio de reação em tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2 contendo dissulfureto de glutatino (6,35 mM), EDTA (0,15 mM) e NADPH (0,17 mM). Procedeu-se a pré-incubação do meio reacional a 37 °C durante 5 min, e iniciou-se a reação pela adição de NADPH (9,6 mM). Registou-se a variação de absorvência durante 180 s, nas mesmas condições de temperatura. As leituras foram efetuadas contra um branco previamente preparado no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão. Determinou-se a atividade enzimática, a partir

do valor do coeficiente angular de curvas de reação ($0,9203578 < r < 0,9797561$, Fig. A.10) obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2.4.5. Glutatioo peroxidase

O método descrito por Filho (1984) permitiu a determinação indireta da atividade enzimática glutatioo peroxidase. Este baseia-se em duas etapas: oxidação do GSH a GSSG, catalisada pela GPx e redução do GSSG a GSH em simultâneo com a oxidação de NADPH catalisada pela glutatioo redutase. A diminuição da absorvência a 340nm, durante a oxidação de NADPH a NAD^+ é indicativa da atividade GPx, sendo que a atividade deste é factor limitante das duas reações acopladas.

A mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL) e volume adequado de sobrenadante pós 12000 g (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, foi a incubar durante 5 min a 25 °C. Iniciou-se a reação com t-BHP (1mM), registando-se a absorvência durante 180 s. Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação ($0,4286662 < r < 0,782108$, Fig. A.11) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2.4.6. Catalase

A atividade enzimática das Catalase A e T foi determinada segundo o método descrito por Beers (1952), na fração peroxisomal e citosólica respetivamente, em que é acompanhado o desaparecimento de peróxido de hidrogénio a 240 nm.

A reação decorreu a 25 °C, durante 120 s no meio de reação composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H_2O_2 (30 mM) e sobrenadante pós 12000 g (CTT1) ou o sedimento pós 12000 g (CTA1) com concentração aproximada de proteínas de 0,015 mg proteína/mL e 0,004 mg proteína/mL, respetivamente. A atividade enzimática foi determinada a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reação ($0,9268417 < r < 0,9940198$ e $0,9207921 < r < 0,946769$, Fig. A.13 e A.12, respetivamente), utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o H_2O_2 de $0,0435 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2.5. Determinação de conteúdos nas frações celulares

3.2.5.1. Glutationo e dissulfureto de Glutationo

A quantificação de GSH e GSSG foi realizada segundo o método descrito por Hissin (1976), neste é utilizado o o-fetaldeído (OPT) no desenvolvimento de um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência e o *N*-etilmaleimida (NEM) para sequestrar o GSH endógeno presente na amostra.

Na quantificação de GSH, adicionou-se amostras de sobrenadante pós 12000 g ao tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 com EDTA 0,005 M e ao OPT (solução comercial incompleta) na proporção de 1:30:2. Após incubada durante 15 min à temperatura ambiente, com agitação, leu-se a potência de fluorescência da mistura reacional ao λ_{exc} de 350 nm e λ_{em} de 420 nm.

A quantificação de GSSG, em sobrenadante pós 12000 g, foi realizada numa mistura reacional constituída pela amostra em NEM (0,04 M), OPT e NaOH (0,1 M) na proporção de 1:1:18, a qual incubou 15 min à temperatura ambiente. A fluorescência foi lida ao λ_{exc} de 350 nm e λ_{em} de 420 nm.

Construíram-se curvas de calibração do GSH e GSSG, no intervalo entre 0 e 50 μ M de GSH (Fig. A.14) e entre 0 e 80 μ M de GSSG (Fig. A.15), respetivamente, utilizando o mesmo procedimento adotado para as amostras. Estas serviram para determinar a concentração de GSH e GSSG presente nas amostras, por interpolação da potência de fluorescência.

3.2.5.2. ROS

O nível de ROS na amostra foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel (1992) que utiliza a 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para determinar os níveis de peróxido de hidrogénio. O DCFH-DA é hidrolizado por esterases no composto não fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), o qual na presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é rapidamente oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que apresenta fluorescência elevada.

Na determinação da quantidade de ROS presente na fração sobrenadante pós 12000 g, após estabilização do DCFH (25 M) em tampão Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 a 37 °C, durante 5 min, iniciou-se a reação pela adição de uma alíquota de amostra, num volume final de 2 mL, seguida de incubação durante 10 min a 37°C, após o que se fez a leitura da potência de fluorescência da mistura a λ_{exc} de 488 nm e λ_{em} de 525 nm.

A solução DCFH (1 mM) foi previamente preparada em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 com NaOH (0,01 M). Calculou-se a quantidade de ROS nas amostras por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente preparada com peróxido de hidrogénio, no intervalo de valores de 0,2-20 mM (Fig. A.16).

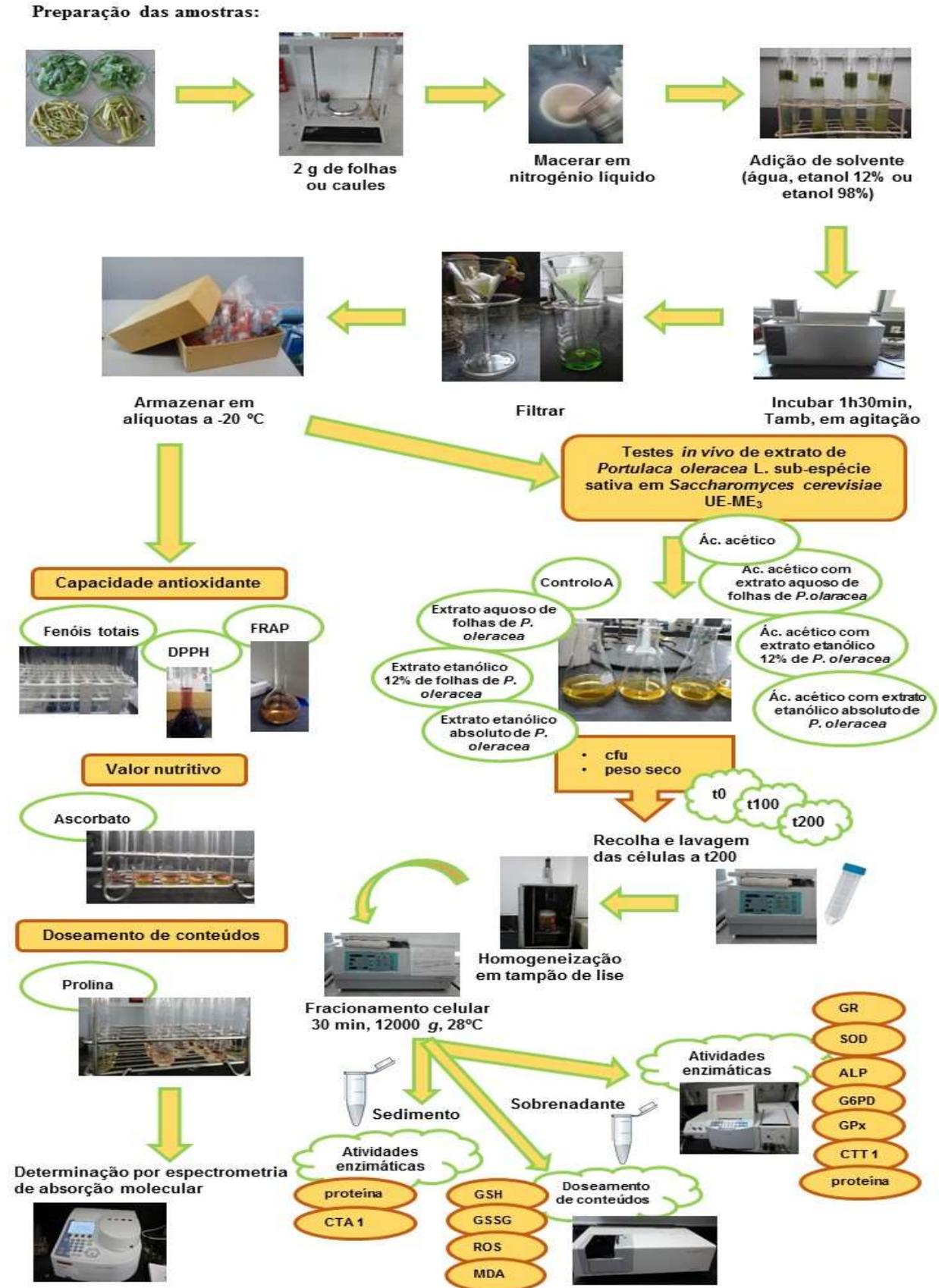
3.2.5.3. MDA

O malonodialdeído (MDA) é um dos subprodutos formados por peroxidação lipídica. Assim, e segundo o método descrito por Ohkawa (1979) a pH ácido e temperatura elevada, o MDA reage com o TBA (ácido tiobarbiturico) por uma reação de adição nucleófila, dando origem a um aduto fluorescente vermelho com elevada intensidade de fluorescência λ_{exc} de 553 nm e λ_{em} de 515 nm, sendo assim possível a sua quantificação.



Calculou-se o teor em MDA das amostras por interpolação gráfica, recorrendo à curva de calibração previamente preparada tendo como padrão o MDA gerado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano pela sua hidrólise em meio ácido, no intervalo de valores de 2,5-100 μ M (Fig. A.17).

3.3 Diagrama do Trabalho



3.4 Material

- Erlenmeyers
- Espátulas
- Filtros Millipore (0,2 μ)
- Frascos de vidro
- Gobelés
- Magnetos
- Micropipetas: P₂, P₁₀, P₂₀, P₁₀₀, P₁₀₀₀, P₅₀₀₀ e respectivas pontas
- Microtubos
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas graduadas
- Pompets
- Seringas
- Suportes
- Tubos de centrífuga
- Tubos de ensaio

3.5 Equipamento

- Autoclave da marca Seleta, modelo microclave
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Espetrometro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espetrometro de absorção molécula de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Espectrometro de absorção molecular de feixe simples da marca Genesys, modelo 10S
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450

- Potenciômetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

3.6 Reagentes

- Albumina do soro bovino, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Acetato de sódio trihidratado, 99, 0-101,0%, Panreac, Barcelona
- Ascorbato, pró-análise, 99%, Fluka, St. Louis
- Ácido acético glacial, 99,5%, Pancreac, Espanha
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, Merck, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St.Louis
- Ácido gálico, pró-análise, Sigma, St Louis
- Ácido orto-fosfórico, 85%, Merck, Darmstadt
- Ácido sulfúrico, 95-97%, Fluka, Suíça
- Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99%, Merck, Darmstadt
- Ácido tricloroacético, pró-análise, 99,5%Merck Darmstadt
- Agar, 99,9%, Merck, Darmstadt
- Batofenantrolina, 99%, Sigma, St. Louis
- *N*-butanol, 99%, Sigma,
- Carbonato de sódio monohidratado, 13,8%, Sigma, St. Louis
- Cloreto de Ferro (III) hexahidratado, pró-análise, Merck, Darmstadt
- Cloreto de sódio, 99,5%, Panreac, Barcelona
- Cloreto de nitrotetrazolio (azul), sigma-aldrich, Suíça
- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo, Sigma, St. Louis
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró análise, 99,0%, Merck, Darmstadt
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, (sal de sódio), pró análise, 98,0%, Sigma St. Louis
- Duodecilssulfato de sódio, Sigma, St. Louis
- Extrato de levedura, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Etanol, pró-análise, Panreac, Barcelona
- *p*-fenilenodiamina, Sigma, St. Louis
- Fenol, 90%, Riedel-de Haen, Alemanha
- Ferricianeto de potássio, pró análise, 99%, Merck, Darmstadt

- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, (sal de sódio), pró análise, 98,0%, Sigma St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, (sal de sódio), pró análise, 98,0%, Sigma St. Louis
- Glicose, 99,9%, Merck, Darmstadt
- Glicose-6-fosfato desidrogenase, Sigma, St.Louis
- Glutationo, pró análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo dissulfureto, pró análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis
- Hidrogenofosfato dipotássio, 99%, Pronalab, Lisboa
- Hidróxido de sódio anidro, pró análise, 99%, Merck, Darmstadt
- L- Prolina, 99%, Sigma, St. Louis
- Metanol, pró análise, Merck, Darmstadt
- Peróxido de hidrogénio, pró análise, 30%, Riedel-de Haën, Alemanha
- Pirocatecol, 99%, Sigma, St. Louis
- Permanganato de potássio, 99%, Fluka, Suíça
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteu, pró análise, Sigma, St. Louis
- Sulfato de cobre, pró análise, 99,5 -102,9%, Panreac, Barcelona
- t-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró análise, 99,9%, Merck, Darmstadt
- 2, 4,6 -Tris (2-piridil)-s-triazina, 99%, Sigma, St. Louis
- Trolox metil éter, 98%, Sigma, St. Louis
- Peptona, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Xantina, 99%, Sigma, St. Louis
- Xantina oxidase, Sigma, St. Louis

4. Resultados e Discussão

O estudo descrito neste texto procurou determinar a capacidade antioxidante de extratos aquoso e etanólicos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa, bem como os seus efeitos nos sistemas de resposta antioxidante do eucarionte unicelular nativo *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ isoladas de mostos de vinhos do Alentejo, Portugal.

4.1. Determinação da capacidade antioxidante de extratos aquoso e etanólicos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa

A Fig. 4.1 representa o conteúdo em ascorbato de extratos de folhas e caules de beldroega crescidas com adubação de 60 kg/ha de nitrato de amónio, obtidos por diferentes processos de extração. Os teores de ascorbato variaram entre 37,48 µg/g e 45,05 µg/g no caule e 51,10 µg/g e 118,55 µg/g nas folhas, valores que são inferiores aos detetados na bibliografia consultada (Uddin, 2012, Lim, 2007) (Quadro 4.1).

Os valores obtidos para o caule, utilizando como mistura de extração etanol a 12% eram significativamente superiores aos determinados no extrato aquoso, embora significativamente inferiores ou idênticos aos detetados nas folhas ($p < 0,05$). Nestas, o extrato que exibia maior quantidade de ascorbato foi obtido com etanol absoluto, sendo significativamente superior ao teor do extrato aquoso ou de etanol a 12%.

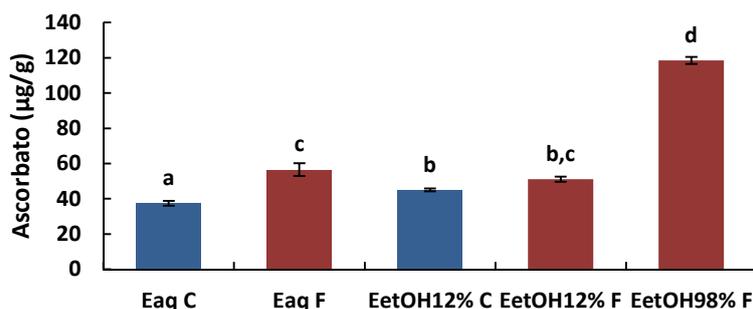


Figura 4.1 – Conteúdo em ascorbato presente em diferentes extratos de caules e folhas de *Portulaca oleracea* L. Os resultados representam a média aritmética de 5 experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Quadro 4.1 – Conteúdo e capacidade antioxidante de espécies vegetais

	Beldroega	Espinafre	Brócolo
Ascorbato (µg/g)	605 (Uddin, 2012) 664 (Lim, 2007)	350 (W1) 190 (Yoon, 2017)	410 (W2) 1240 (Zhang, 2004) 1112,42 (Kaur, 2007) 8000 (Cai, 2016)
Fenóis (mg/g)	3,48 (Uddin, 2012) 1,27 (Lim, 2007)	71,67 (Ismail, 2004) 28,11 (Melo, 2009) 12,2 (Tiveron, 2010)	38,67 (Melo, 2009) 0,4026 (Kaur, 2007) 0,345 (Zhang, 2004) 4 (Cai, 2016)
Prolina (µg/g)	1,20 (Yazici, 2007) 91 (Rahdari, 2012)	7527 (Yoon, 2017) 3700 (Mielmann, 2017)	732 (Murcia, 2001) 270 (Arnáiz, 2012)
DPPH (mg/g)	3,19 (Uddin, 2012) 1,10 (Lim, 2007)	0,216 (Sreeramulu, 2013) 0,6 (Xu, 2015) 0,8506 (Apak, 2007)	0,08145 (Heimler, 2006) 1,02072 (Apak, 2007)
FRAP (mg/g)	4,3 (Uddin, 2012) 0,93 (Lim, 2007)	13,806 (Sreeramulu, 2013) 2,667 (Apak, 2007)	0,029 (Parente, 2013) 3171,84 (Guo, 2011) 0,898688 (Kaur, 2007) 105728 (Nath, 2011)

A partir da Fig. 4.2 pode-se observar que o teor em fenóis totais de extratos de caules de beldroega crescidas com adubação de 60 kg/ha de nitrato de amónio, era inferior ao detetado nas folhas das referidas plantas, onde o conteúdo mais elevado foi observado quer no extrato aquoso quer no extrato de etanol a 12%. Contudo, os valores determinados no caule (0,24 - 0,28 mg/g) e nas folhas (0,49 - 0,72 mg/g) eram muito inferiores aos que se encontram descritos pela bibliografia para outros vegetais como espinafre e bróculos (Quadro 4.1) (Uddin, 2012; Lim, 2007).

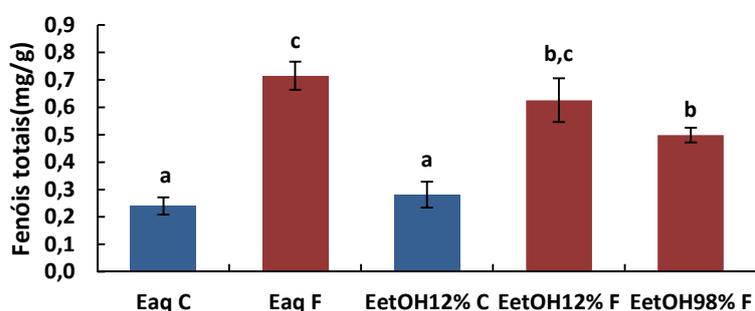


Figura 4.2 – Conteúdo em fenóis totais presentes em diferentes extratos de caules e folhas de *Portulaca oleracea* L. Os resultados representam a média aritmética de 5 experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A caracterização química do teor em antioxidantes de beldroegas crescidas com adubação de 60 kg/ha de nitrato de amónio, prosseguiu com a quantificação da prolina. A Fig. 4.3 mostra que mais uma vez o caule possuía um menor conteúdo em prolina, não tendo sido detetadas diferenças significativas entre os extratos obtidos com água ou etanol a 12%. O teor em prolina das folhas foi sempre mais elevado do que o do caule, não se detetando diferenças significativas entre os extratos aquoso e etanólico a 12% que exibiam níveis significativamente inferiores aos do extrato obtido com etanol absoluto ($p < 0,05$). Os teores em prolina descritos na bibliografia localizam-se no intervalo que pode variar 1,20 - 91 $\mu\text{g/g}$, pelo que admite-se que os valores obtidos neste estudo estão localizados no intervalo de valores publicados, ainda que mais próximos dos teores mais baixos.

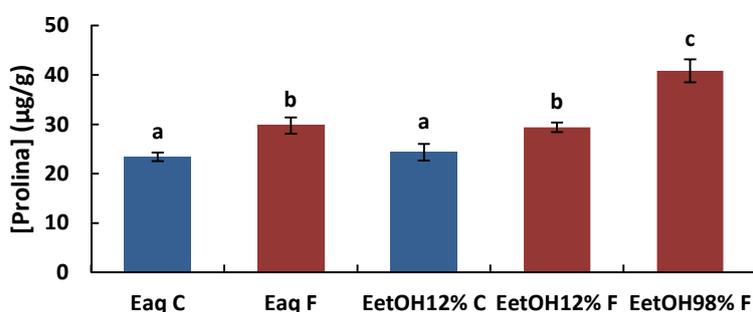


Figura 4.3 – Conteúdo em prolina presente em diferentes extratos de caules e folhas de *Portulaca oleracea* L. Os resultados representam a média aritmética de 5 experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A Fig.4.4 permite observar que a capacidade antioxidante para reduzir o ferro dos extratos, aquoso e etanólico a 12%, de caules de beldroega adubadas com 60 kg/ha, era sempre inferior à capacidade antioxidante foliar, sendo o valor mais elevado detetado no extrato aquoso das folhas ($p < 0,01$). A capacidade antioxidante estimada pelo FRAP em qualquer dos extratos etanólicos não apresentava diferenças com significado estatístico. O nível mais elevado da capacidade antioxidante detetada por este método dever-se-á, provavelmente, ao elevado conteúdo em prolina, ascorbato e fenóis totais detetados nas mesmas condições de ensaio. Embora o extrato etanólico a 12% exiba um conteúdo em prolina, ascorbato e fenóis semelhante ao do extrato aquoso, a sua capacidade antioxidante comparativamente com a deste mostrou-se significativamente inferior ($p < 0,01$). Tal facto poderá ser devido ao tipo de fenóis extraídos pela água que terão conseguido exercer um efeito redutor sobre o ião férrico mais eficaz do que alguns dos fenóis extraídos pelo etanol na presença de água. Algo semelhante poderá ter ocorrido com a extração em etanol absoluto, uma vez que o extrato obtido é aquele que apresenta maior teor de prolina e de ascorbato, bem

como um teor em fenóis totais idêntico ao obtido com etanol a 12% ($p < 0,01$). Embora a capacidade antioxidante estimada pelo FRAP seja estatisticamente idêntica em ambos os extratos etanólicos, é muito inferior à que foi determinada no extrato aquoso ($p < 0,01$). Um perfil idêntico mas mais acentuado para o extrato obtido com etanol absoluto foi detetado com o método do DPPH que será discutido na Fig.4.5.

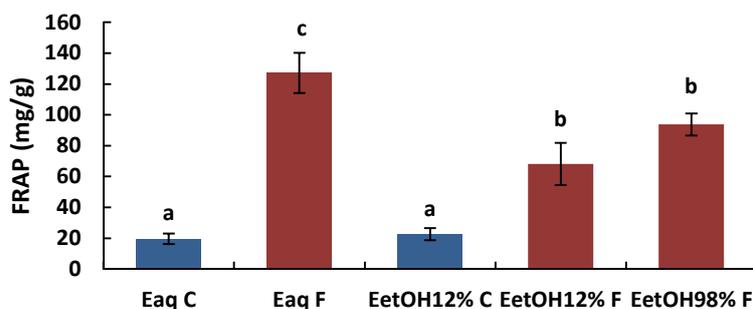


Figura 4.4 – Capacidade antioxidante estimada pelo método do FRAP de extratos de caules e folhas de *Portulaca oleracea* L. Os resultados representam a média aritmética de 5 experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidante medida pelo FRAP (Fig.4.4) eram muito superiores aos descritos pela bibliografia (Uddin, 2012; Lim, 2007) (Quadro 4.1), um bom indicador do valor funcional destas plantas obtidas com adubação de nitrato de amónio 60 kg/ha, em particular se a mistura de extração dos componentes antioxidantes incluir água como solvente.

A capacidade para capturar espécies reativas de oxigénio, como o radical anião superóxido, utilizando o radical estável DPPH^{*}, encontra-se representado na Fig. 4.5. Mais uma vez a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico a 12% dos caules exibiam valores significativamente inferiores aos descritos para as folhas. Uma exceção intrigante pode ser observada com o extrato obtido com etanol absoluto. Considerando que o teor em prolina e ascorbato do extrato aquoso eram significativamente inferiores ao teor dos referidos antioxidantes, no extrato obtido com etanol absoluto e que o conteúdo em fenóis totais do extrato aquoso era muito superior ao detetado em qualquer dos outros extratos foliares, uma interpretação possível para a baixa capacidade antioxidante detetada pelo método do DPPH no extrato obtido com etanol absoluto, poderá depender do tipo de fenóis extraídos na presença ou na ausência da água que poderá ser determinante para a referida propriedade, um campo aliciente para explorar em estudos posteriores.

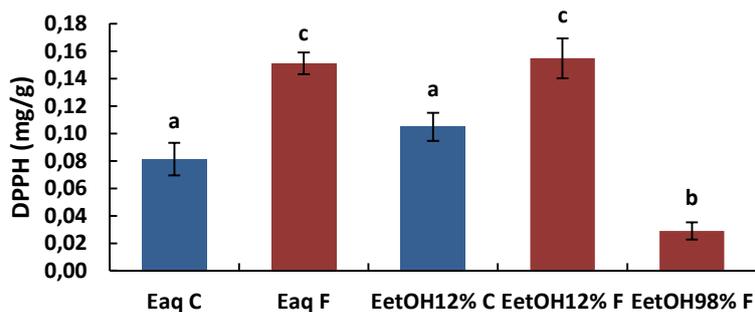


Figura 4.5 – Capacidade antioxidante estimada pelo DPPH de diferentes extratos de caules e folhas de *Portulaca oleracea* L. Os resultados representam a média aritmética de 5 experiências independentes \pm desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O conteúdo e a capacidade antioxidante dos extratos analisados permitem considerar que as folhas de beldroega possuem maior valor funcional do que os caules, característica indicada pelos hábitos populares que recomendam a utilização maioritária das folhas em culinária. Um caldo aquoso de folhas de beldroega conterá certamente maior capacidade antioxidante do que um extrato foliar obtido com etanol absoluto, propriedade que provavelmente dependerá do tipo e da quantidade de fenóis presentes na folha. Este facto valoriza a utilização culinária desta planta que cresce espontaneamente no sul do país.

4.2. Efeitos biológicos de extratos aquoso e etanólicos de *Portulaca oleracea* L., sub-espécie sativa em *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃

O crescimento celular pode ser determinado por várias aproximações experimentais, nomeadamente pela quantificação da biomassa celular. A Fig.4.6 representa a variação de peso seco de leveduras expostas aos extratos aquoso e etanólicos de levedura na ausência ou na presença do acetato (25mM), um produto da fermentação alcoólica em leveduras, conhecido como indutor de morte celular por apoptose (Ludovico, 2001; Perrone, 2008; Ferreira, 2007). A referida figura revela que apenas ocorreu um decréscimo da biomassa produzida em culturas expostas ao extrato obtido com etanol absoluto, quer na ausência quer na presença de acetato (25mM) ($p < 0,01$). A exposição ao extrato de beldroega obtido com etanol absoluto parece conter constituintes tóxicos para *S. cerevisiae*, provavelmente algum tipo de compostos fenólicos que inibem o crescimento da levedura.

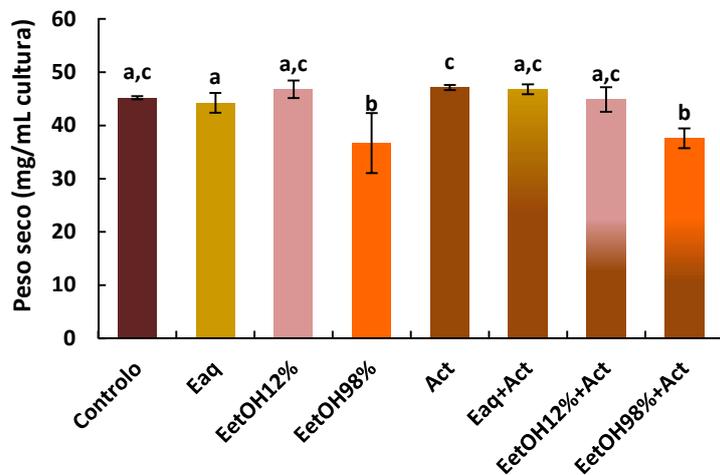


Figura 4.6 – Peso seco de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25 mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Embora os marcadores de crescimento possam ser utilizados como indicadores de toxicidade o número de células viáveis constitui um indicador mais fiel da sobrevivência celular do que apenas a biomassa produzida. A viabilidade celular pode assim ser estimada pelas unidades formadoras de colónias (cfu) geradas por alíquotas com diluição infinita dos meios de cultura em diferentes instantes do crescimento. A Fig. 4.7 representa as cfu contadas no final da cultura. A partir da referida figura pode-se observar que a exposição aos componentes do extrato aquoso provocou um decréscimo significativo da viabilidade celular, um fenómeno inverso foi observado por células crescidas na presença de extrato etanólico a 12% ($p < 0,01$). Os componentes do extrato de etanol absoluto não produziram alterações significativas na viabilidade celular ($p < 0,01$). A presença de acetato (25mM) no meio de cultura provocou um decréscimo acentuado da viabilidade celular em todos os tratamentos exceto naquele em que ocorreu a exposição conjunta com etanol a 12%, cujo número de unidades formadoras de colónias permaneceu idêntico ao de células controlo, prevenindo a perda de viabilidade pelo contacto com o acetato ($p < 0,01$).

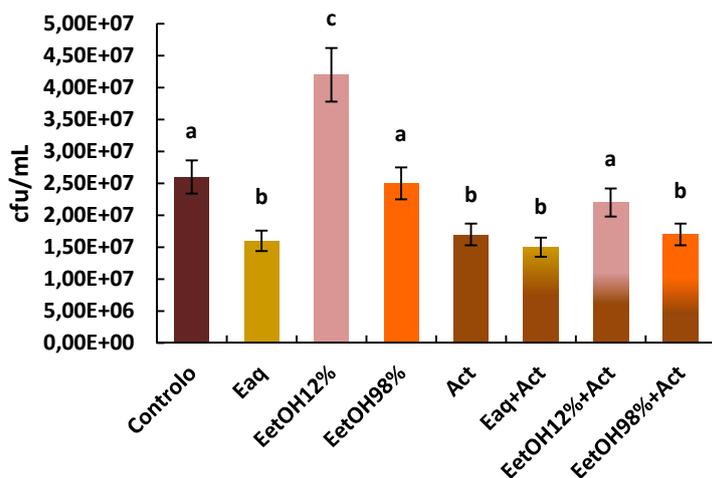


Figura 4.7 – Contagem de cfu de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ no final da cultura, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Por vezes, algumas atividades enzimáticas podem ser utilizadas como marcadores do crescimento e/ou diferenciação celular, como acontece com o enzima fosfatase alcalina que catalisa a hidrólise de monofosfoésteres, com libertação de fosfato inorgânico e disponibilização do potencial químico da ligação fosfato para assegurar os processos biológicos há pouco referidos. A partir da Fig. 4.8 pode-se observar que a presença do extrato aquoso ou de etanol absoluto no meio de cultura provocaram um decréscimo significativo desta atividade catalítica ($p < 0,01$). Contudo, os constituintes do extrato etanólico a 12% não afetaram significativamente este enzima. A presença de acetato (25mM) no meio de cultura provocou um decréscimo significativo da atividade catalítica ALP ($p < 0,01$), mostrando que este indutor de morte celular bloqueia a disponibilização de potencial químico indispensável à ocorrência de processos vitais para a célula. A exposição conjunta ao acetato (25mM) e etanol absoluto não afetou significativamente esta atividade catalítica ($p < 0,01$). Contudo, a exposição conjunta acetato (25mM)/extrato aquoso de *P. oleracea* ou acetato (25mM)/extrato etanólico a 12% e *P. oleracea* conservaram os níveis desta atividade catalítica em valores estatisticamente idênticos aos determinados para as células controlo ($p < 0,01$), revertendo deste modo, este indicador da morte celular induzida pelo acetato (25mM).

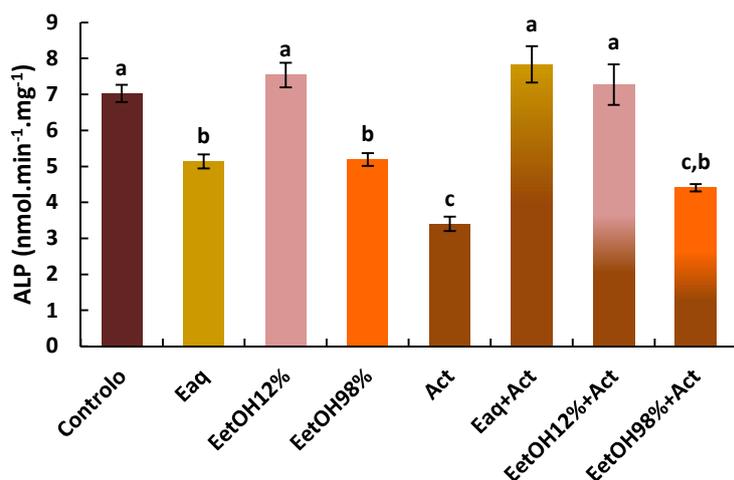


Figura 4.8 – Atividade enzimática ALP obtida de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A geração de pequenos pulsos de espécies reativas de oxigénio pode ser considerada como um fenómeno benéfico para a célula, uma vez que a literatura descreve que pequenos níveis de *stress* oxidativo são indispensáveis para a ativação de vias de sinalização celular. No entanto, a geração excessiva destas entidades químicas e falhas compulsivas dos sistemas não enzimáticos e enzimáticos antioxidantes podem conduzir a célula a condições de *stress* oxidativo crónico, situação que lhe é deletéria. A avaliação da capacidade de resposta de sistemas antioxidantes ao ROS constitui assim um alvo molecular para qualquer estudo que envolva a exposição celular a compostos exógenos. Deste modo, o enzima superóxido dismutase constitui uma das primeiras linhas de defesa contra o *stress* oxidativo uma vez que está implicado no consumo do radical anião superóxido que se forma maioritariamente ao nível dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com respetiva conversão em peróxido de hidrogénio. Na Fig. 4.9 encontram-se representados os valores da atividade SOD1 para cada um dos ensaios traçados para este estudo. Pela referida figura pode observar-se que a presença exclusiva de qualquer dos extratos de *P. oleracea* aumentou significativamente esta atividade catalítica, embora esse valor tenha duplicado em células expostas ao extrato etanólico a 12%, não se observando diferenças significativas entre células expostas ao extrato aquoso ou ao extrato de etanol absoluto ($p < 0,01$). A presença de acetato (25mM) também provocou um aumento desta atividade catalítica, apenas ultrapassado nesta segunda série pela exposição conjunta de acetato com extrato de etanol absoluto de *P.*

oleracea ($p < 0,01$). Os valores mais baixos de SOD1 foram observados em células mantidas em exposição conjunta quer a acetato (25mM)/extrato aquoso quer a acetato (25mM)/extrato etanólico a 12% ($p < 0,01$). As alterações enzimáticas aqui descritas poderão ser interpretadas como um aumento da capacidade celular para capturar o radical anião superóxido, eventualmente produzido em excesso por a célula se encontrar em *stress* oxidativo. Admitindo que esta é a interpretação correta, a manutenção dos níveis de atividade SOD1 mais próximo do controlo em células tratadas com acetato (25mM)/extrato aquoso e acetato (25mM)/extrato etanólico 12%, sugere que a presença destes extratos *P. oleracea* conseguem prevenir a evolução para condições de *stress* oxidativo mais extremas, induzida pela presença de acetato (25mM) no meio de cultura.

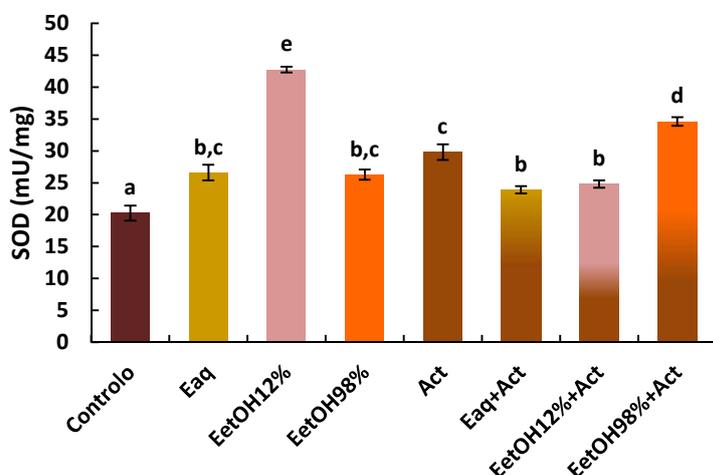


Figura 4.9 – Atividade enzimática SOD1 obtida de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A estabilização do saudável ambiente redutor intracelular é uma condição indispensável para assegurar a sobrevivência celular. O enzima glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, cujo papel metabólico é extremamente diversificado. Embora constitua uma via degradativa da glicose que pode gerar ATP que eventualmente assiste ao crescimento celular, só o faz se houver necessidade de gerar equivalentes redutores sob a forma NADPH. Por outro lado, pode constituir uma fonte indispensável de ribose-5-fosfato, um precursor dos nucleótidos indispensável à biossíntese de DNA, assistindo deste modo aos processos de proliferação celular. Os equivalentes redutores sob a forma de NADPH gerados pela via PP podem seguir dois destinos

metabólicos possíveis: assistir à biossíntese endógena de lípidos e cooperar com o ciclo de oxidação-redução do glutatióno, um mecanismo de proteção celular contra as ROS. A Fig. 4.10 revela que a exposição a qualquer dos extratos de *P. oleracea*, bem como ao acetato (25mM) e acetato (25mM)/extrato etanólico absoluto provocou um decréscimo significativo da atividade catalítica G6PD ($p < 0,01$). Um aspeto interessante prende-se com os resultados relativos à exposição conjunta ao acetato (25mM)/extrato aquoso e acetato (25mM)/extrato etanólico a 12%, que no primeiro caso, a perda de atividade catalítica foi significativamente inferior à observada em qualquer das outras condições de cultura, sugerindo que a manutenção do ambiente redutor via G6PD foi conservada pelos componentes do extrato aquoso e em menor extensão do extrato etanólico a 12%, tendo, eventualmente, como objetivo prevenir a evolução da célula para condições de *stress* oxidativo crónico.

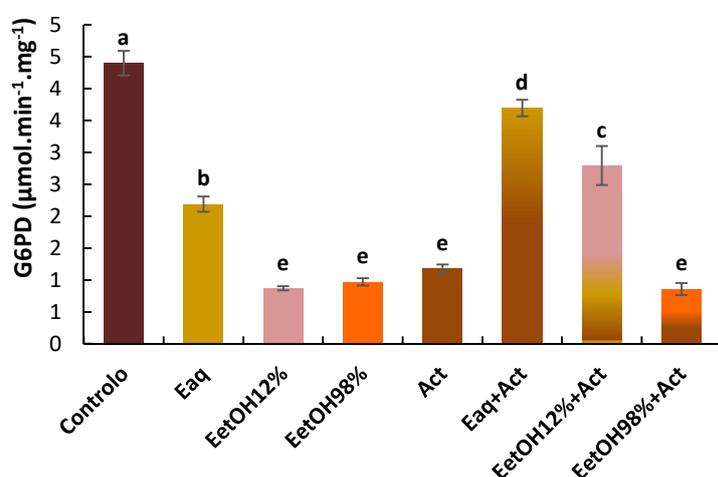


Figura 4.10 – Atividade enzimática G6PD obtida de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A estabilização do ambiente redutor celular não depende apenas dos níveis de coenzimas adenilico-flavínicos reduzidos, mas também da razão da concentração intracelular do glutatióno pelo dissulfureto de glutatióno. Os níveis intracelulares adequados do tripéptido e do seu derivado dimérico oxidado é assegurado pelo ciclo de oxidação-redução do glutatióno e de forma indireta pela via PP atrás referida. A Fig. 4.11.A) mostra que a exposição exclusiva de leveduras ao extrato aquoso e ao extrato de etanol absoluto, bem como a exposição conjunta a acetato (25mM)/extrato etanólico absoluto, provocaram um decréscimo significativo da atividade glutatióno redutase, efeito que não foi estatisticamente

detetado em células crescidas na presença de etanol a 12% ($p < 0,01$). A presença de acetato (25mM) no meio de cultura induziu um aumento desta atividade catalítica que foi potenciado pela presença conjunta de acetato (25mM) com extrato aquoso ou etanólico a 12% ($p < 0,01$). O aumento da atividade GR certamente contribuiu para regenerar o glutationato citoplasmático. A Fig. 4.11.B) representa a evolução da atividade glutationato peroxidase a cada um dos estímulos testados neste estudo. Assim, pode observar-se um aumento da atividade GPx em células crescidas em exclusivo na presença de etanol a 12% ou de acetato (25mM) ($p < 0,01$). Todavia, não se detetaram diferenças estatísticas entre células controlo e células expostas conjuntamente ao extrato aquoso ou de etanol absoluto, nem entre células expostas ao acetato (25mM) e a qualquer dos extratos de *P. oleracea*. O aumento da atividade GPx em células crescidas na presença de etanol a 12% e apenas na presença de acetato (25mM) pode constituir um mecanismo de resposta que envolve a redução do peróxido de hidrogénio gerado pelo aumento da atividade SOD1, ou seja, uma tentativa para minimizar as condições de *stress* oxidativo. Todavia, a presença dos extratos de *P. oleracea* parecem ter influenciado a resposta antioxidante mediada pelo ciclo do glutationato, uma vez que, mantiveram a atividade GPx e induziram um aumento da atividade GR correlacionável com a disponibilidade de NADPH gerado pela via das pentoses fosfato. A eventual resposta protetora parece depender maioritariamente da via SOD1/GR assistida pelo fluxo de equivalentes redutores assegurado pelo enzima G6PD.

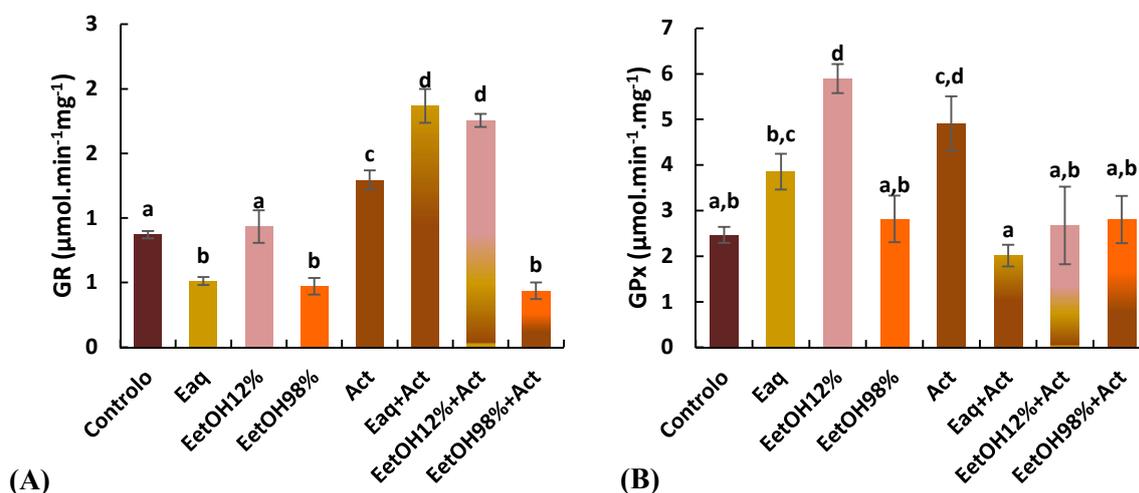


Figura 4.11 – Atividade enzimática GR (A) e GPx (B) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O ciclo de oxidação-redução do glutatióno tem como principal papel estabilizar o ambiente redutor celular, mantendo a razão GSH/GSSG em níveis superiores à unidade em geral próximo de 1,4 em *Saccharomyces cerevisiae* (Hissin, 1976). Embora o glutatióno cumpra este papel na estabilização do ambiente redox da célula, desempenha ainda outras funções, nomeadamente assistindo às vias de excreção de produtos exógenos para o vacúolo. A Fig. 4.12.A) mostra que *S. cerevisiae* crescidas na presença exclusiva de extrato aquoso e extrato etanólico a 12%, acetato (25mM)/extrato aquoso e acetato (25mM)/extrato etanólico a 12% exibiam níveis de glutatióno inferiores ao de células controlo ($p < 0,01$). Todavia a presença de extrato etanólico absoluto na ausência ou na presença de acetato (25mM) mantiveram os níveis de glutatióno estatisticamente idênticos ao controlo ($p < 0,01$). A presença conjunta do extrato aquoso e acetato (25mM) evitou um decréscimo tão acentuado deste conteúdo. Embora o GSH possa ter sido mobilizado na desintoxicação do peróxido de hidrogénio é um facto que o conteúdo em tióis totais não proteicos (Fig.4.12.C)) segue o mesmo perfil de resposta, pelo que o GSH poderá ter sido consumido por outras vias, nomeadamente de biotransformação uma vez que a sua regeneração pelos enzimas GR e G6PD estava assegurada. O perfil de conteúdo em dissulfureto de glutatióno como resposta aos vários estímulos aqui descritos não era idêntico ao do GSH, ou seja, apenas as células expostas conjuntamente ao acetato (25mM) e ao extrato de etanol absoluto exibiam níveis de dissulfureto de glutatióno superiores ao controlo ($p < 0,01$). Embora tenha ocorrido um decréscimo significativo do conteúdo deste dímero não se detetaram diferenças significativas entre qualquer dos restantes tratamentos exceto para as células expostas em conjunto ao acetato e ao etanol 12% ($p < 0,01$). A exposição exclusiva de *S. cerevisiae* ao extrato etanólico a 12% manteve-se idêntica ao controlo. A Fig.4.12.D) reflete em parte o que foi descrito para as figuras 4.12.A) e 4.12.B) observando-se um perfil de resposta à presença exclusiva de extrato aquoso, de extrato etanólico a 12% e de extrato etanólico absoluto, idêntico ao que foi observado para o GSH, sugerindo que os dois extratos em que está presente a água foram capazes de induzir *stress* oxidativo, situação que não parece acontecer com o extrato de etanol absoluto. Uma resposta idêntica aconteceu em *S. cerevisiae* que cresceram na presença de acetato (25mM). Todavia, o decréscimo do potencial redox intracelular de células expostas conjuntamente ao acetato (25mM) e extrato aquoso ou de etanol absoluto foi estatisticamente inferior ao descrito anteriormente ($p < 0,01$). Outro aspeto interessante prende-se com o facto de *S. cerevisiae* expostas ao acetato (25 mM)/extrato de etanol 12%, apresentarem um valor da razão GSH/GSSG estatisticamente próximo do controlo ($p < 0,01$), uma condição perseverante da viabilidade e do crescimento celular, uma vez que parece prevenir a

ocorrência de *stress* oxidativo crónico, despoletado pelo acetato (25mM). Esta resposta parece ter sido assegurada pelo funcionamento eficiente dos enzimas SOD1, G6PD, GR e GPx.

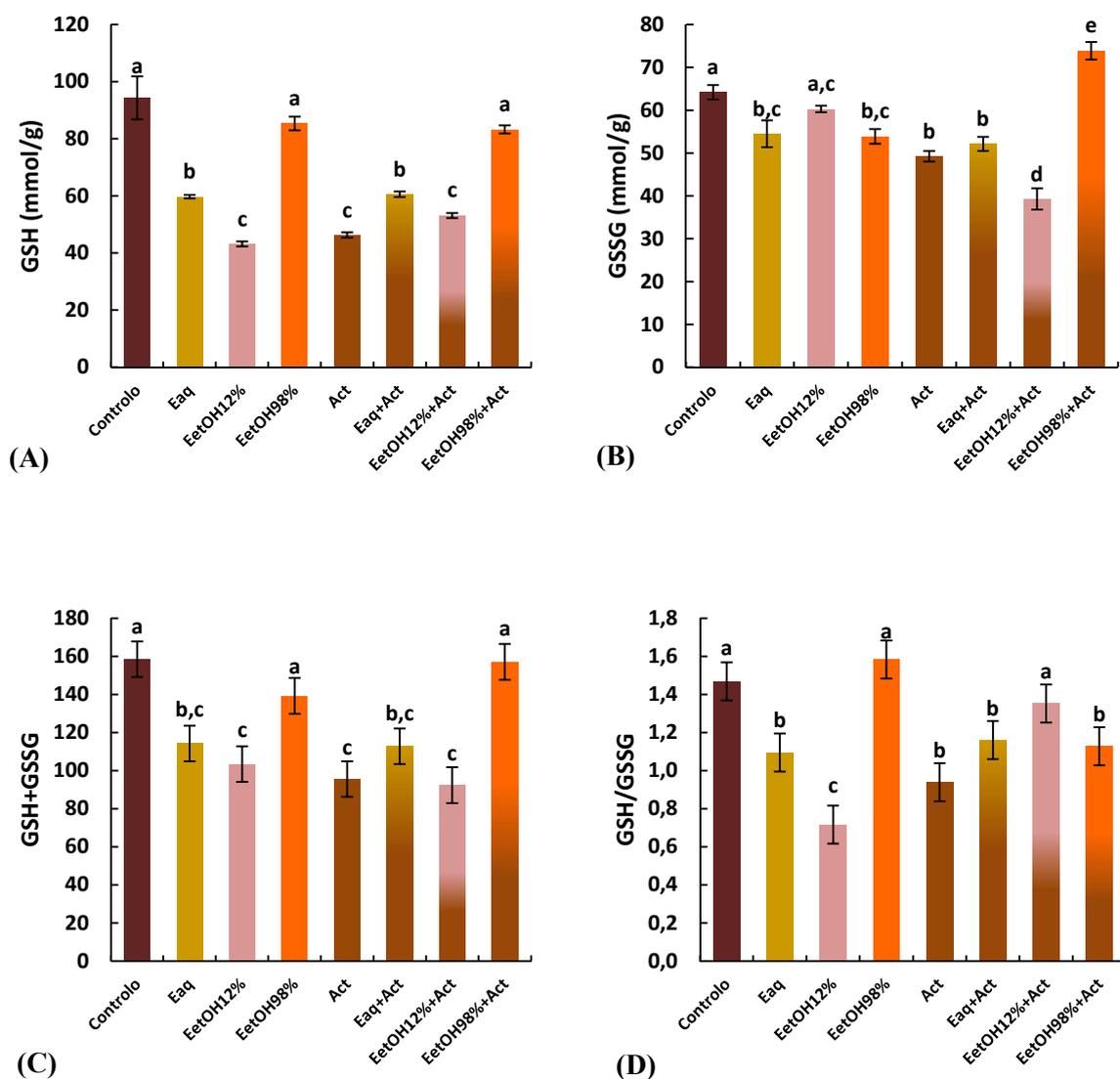


Figura 4.12 – Conteúdo em GSH (A), GSSG (B), GSH+GSSG (C) e razão GSH/GSSG (D) do sobrenadante pós 12000 g obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

Os enzimas catalase constituem uma segunda linha de defesa molecular contra o excesso de peróxido de hidrogénio na célula, por vezes alternativo ao ciclo do glutationo. A Fig.4.13.A) mostra que a exposição exclusiva a qualquer dos extratos de *P. oleracea* e conjunta ao acetato (25 mM)/referidos extratos, provocou um decréscimo da atividade CTT1. Todavia, a presença de acetato (25mM) no meio de cultura despoletou um decréscimo

significativo dessa atividade para níveis estatisticamente inferiores aos observados para qualquer dos tratamentos com extratos ($p < 0,01$). Esta via não parece ser a preferencial para a desintoxicação de ROS nas condições de ensaio descritas neste texto. Contudo, a atividade CTA1 não foi afetada pela presença exclusiva do extrato etanólico a 12% nem pela exposição ao acetato (25mM), nem pela exposição conjunta ao acetato (25mM)/extrato aquoso e acetato (25mM)/extrato etanólico 12%. Todavia, a exposição ao extrato de etanol absoluto na presença ou na ausência de acetato (25mM) levou a um decréscimo significativo desta atividade catalítica ($p < 0,01$). Por outro lado, a exposição exclusiva ao extrato aquoso provocou um aumento significativo da referida atividade enzimática ($p < 0,01$). Provavelmente o aumento ou a estabilização da atividade CTA1 dever-se-á à provável manutenção da β -oxidação de resíduos acilo peroxissomal, indispensável em *S. cerevisiae*, à manutenção da viabilidade celular e ao crescimento, uma vez que a resposta à exposição ao etanol absoluto coincide com um decréscimo do crescimento celular descrito na Fig. 4.6.

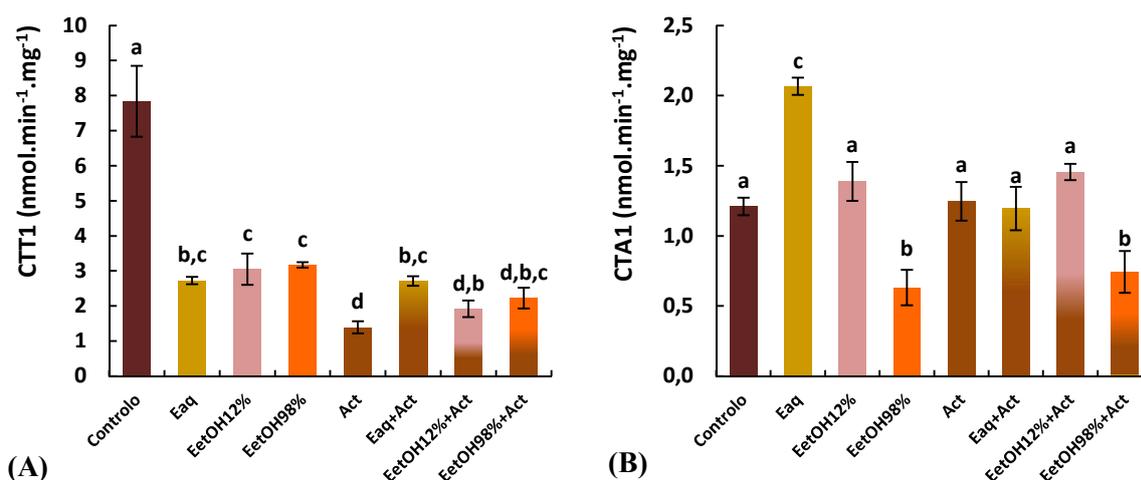


Figura 4.13 – Atividade enzimática CTT1 (A) e CTA1 (B) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O conteúdo em espécies reativas de oxigénio determinado em termos de peróxido de hidrogénio intracelular encontra-se representado na Fig.4.14.A). A referida figura revela que células crescidas na presença de extratos aquoso ou etanólico a 12% de *P. oleracea* e acetato (25mM) exibiam o nível mais baixo do conteúdo em espécies reativas de oxigénio. A presença de extrato de etanol absoluto na ausência ou na presença de acetato (25mM) são os

grupos que apresentam menor diminuição desse conteúdo, comparativamente com o controlo. Embora as células crescidas na presença de extrato aquoso e etanólico a 12% em conjunto com acetato (25mM) exibam valores mais baixos de ROS do que o controlo, estes valores encontram-se acima dos determinados em células crescidas na presença de acetato.

Um dos produtos resultantes da peroxidação lipídica é o malonodialdeído, um marcador de danos celulares. A Fig.4.14.B) revela que apenas as células expostas ao etanol absoluto quer na ausência quer na presença de acetato (25mM) exibiam o conteúdo mais elevado de MDA, não se tendo registado diferenças significativas entre os restantes tratamentos e entre estes e o controlo. Deste modo, os componentes extraídos pelo etanol absoluto parecem ser aqueles que exercem maior toxicidade para *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ pelo superior índice de danos oxidativos, pela menor quantidade de biomassa produzida e menor sobrevivência celular, bem como pelo menor valor de atividade ALP.

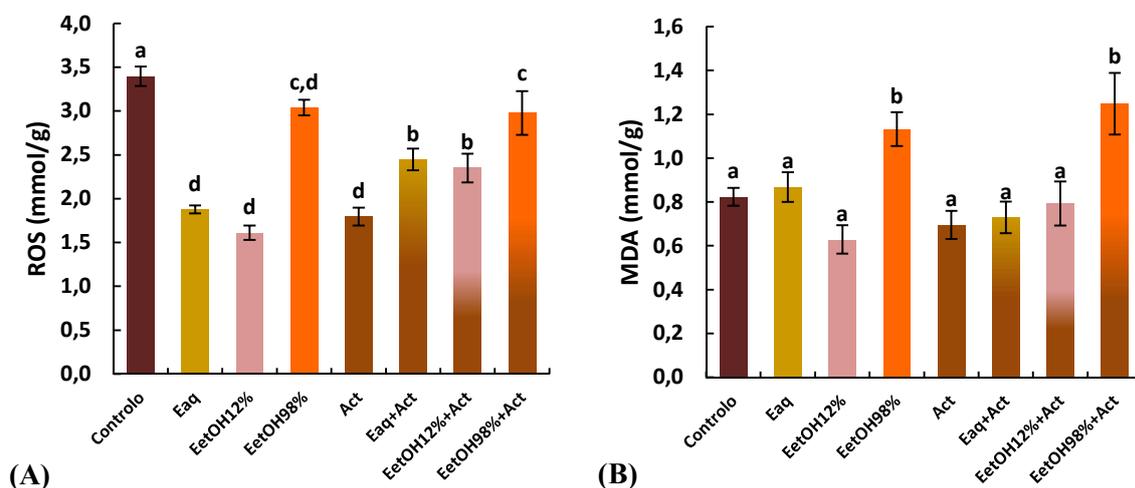


Figura 4.14 – Conteúdo em ROS (A) e MDA (B) do sobrenadante pós 12000g obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos de (2%) folhas de beldroega. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

5. Conclusões

O interesse pela cultura da beldroega no Alentejo com objetivo comercial, tem aumentado devido à sua importância cultural e gastronómica, bem como à possibilidade de se estabelecer condições de cultura com ótimos de produtividade no Alentejo, devido às condições edafoclimáticas da região. Este estudo procurou avaliar a capacidade antioxidante de extratos aquoso e etanólicos de *Portulaca oleracea* L., da sub-espécie sativa, adubada com nitrato de amónio (60 kg/ha), bem como a sua influência em sistemas de resposta antioxidante do eucarionte GRAS, *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, isolado de mostos vinho da região Alentejo.

Os resultados obtidos mostram que o extrato aquoso foliar foi aquele que exibiu maior teor em fenóis e maior capacidade antioxidante estimada pelo DPPH e FRAP, propriedades próximas das detetadas no extrato de etanol a 12%. Por outro lado, o extrato foliar de beldroega, obtido com etanol absoluto foi aquele que apresentou maior teor em ascorbato e de prolina.

A presença de acetato (25mM) no meio de cultura contribuiu para diminuir a viabilidade celular, a razão GSH/GSSG e as atividades enzimáticas ALP e G6PD, provocando ainda um aumento das atividades antioxidantes GR, GPx e SOD1, um perfil indicador de *stress* oxidativo cuja ativação de sistemas de resposta antioxidante terá contribuído para manter o peso seco e os níveis de danos celulares e de atividade CTA1 idênticos aos de células controlo.

A presença de extrato foliar de etanol a 12% contribuiu para aumentar a viabilidade celular e a atividade GPx. Apesar de este extrato contribuir para manter a biomassa produzida, o nível de danos celulares e as atividades enzimáticas ALP, GR e CTA1 próximas do controlo induziu um decréscimo da razão GSH/GSSG, bem como das atividades G6PD e CTT1, contribuindo para despolotar condições de *stress* oxidativo.

Contudo, a exposição conjunta de *S. cerevisiae* de acetato (25mM) e etanol a 12% manteve os níveis de biomassa produzida, viabilidade celular, razão GSH/GSSG, teor em MDA e atividades catalíticas ALP, GPx e CTA1 idênticas às detetadas em células controlo, induziu um aumento das atividades GR e SOD1 e, embora tenha ocorrido níveis de atividade G6PD inferiores ao controlo, o decréscimo foi menor do que o detetado para qualquer dos agentes de *stress* expostos em separado. Estes resultados sugerem que o extrato de etanol a 12% de *P. oleracea* conseguiu prevenir a indução de morte celular pelo acetato (25mM).

A exposição simultânea ao extrato de etanol absoluto e acetato (25mM) foi aquela que se revelou mais tóxica para *S. cerevisiae* UE-ME₃, uma vez que, se detetou uma perda da biomassa produzida, da viabilidade celular, da razão GSH/GSSG, das atividades ALP, G6PD, GR, CTT1 e CTA1, bem como, um aumento do conteúdo em GSSG e de danos oxidativos, apesar de a atividade SOD1 ter aumentado e não se terem detetado flutuações nos níveis de atividade GPx, no teor em glutathione e tióis totais não proteicos. A falha nas atividades ALP e catalases parecem ter sido as que mais contribuíram para as consequências observadas.

6. Referências bibliográficas

- Abas, F., Lajis, N., Israf, D.A., Khozirah, S. & Umi Kalsom, Y. (2006). Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. *Food Chemistry*, 95, 566-573.
- Abd El-Aziz, H., M.H., S.; A.Ahmed, K., Abd El hameed, A., Rahman, Z. et al. (2014). Chemical and remedial effects of purslane (*portulaca oleracea*) plant. *Life Science Journal*, 11(6), 31-42.
- Abdi, K., Hadadzadeh, H., Salimi, M., Simpson, J. & Khalaji, A. (2012). A monocuclear copper (II) complex based on the polypyridyl ligand 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (tptz), $[Cu(tptz)_2]^{2+}$: X-ray crystal structure, DNA binding and *in vitro* cell cytotoxicity. *Polyhedron*, 44, 101-112.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidante activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Antunes, M., Lazzaretti, C., Gamaro, G. & Linden, R. (2008). Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 279-287.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K. & Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Arnáiz, E., Bernal, J., Martín, M.T., Nozal, M.J., Bernal, J.L. & Toribio, L. (2012). Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves. *Journal of Chromatography A*, 1250, 49-53.
- Arrobas, M. & Rodrigues, M.A. (2009). Efeito da adubação azotada, fosfatada e potássica na cultura da batata. Produtividade e eficiência de uso dos nutrientes. *Revista de Ciências Agrárias*. 101-111.
- Behravan, J., Mosafa, F., Soudmand, N., Taghiabadi, E., Razavi, B. & Karimi, G. (2011). Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H₂O₂ – induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. *J Acupunct Meridian Stud* 4(3), 193-197.
- Berker, K., Güçlü, K., Tor, İ. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidante capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagentes. *Talanta*, 72, 1157-1165.
- Boender, L.G.M., Almering, M., Dijk, M., Maris, A.J.A., Winde, J.H., Pronk, J. et al (2011). Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 2133-2144.
- Cabisco, E., Piulats, E., Echaves, P., Herrero, E. & Ros, J. (2000). Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393-27398.
- Cai, C., Miao, H., Qian, H., Yao, L., Wang, B. & Wang, Q. (2016). Effects of industrial pre-freezing processing and freezing handling on glucosinates and antioxidante attributes in broccoli florets. *Food Chemistry*, 210, 451-456.

- Carmel-Harel, O. & Storz, G. (2000). Roles of the Glutathione – and Thioredoxin – dependent reduction systems in the *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* responses to Oxidative Stress. *Annual Reviews Microbiology*, 54, 439-461.
- Carneiro, C., Molinari, H., Andrade, G., Pereira, L. & Vieira, L. (2006). Produção de prolina e suscetibilidade ao glufosinato de amônio em plantas transgênicas de citrumelo Swingle. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41(5), 747-753.
- Cecchini, N., Monteoliva, M. & Alvarez, M. ^a(2011). Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death on diferente kingdoms. *Plant Signaling & Behavior* 6(8), 1195-1197.
- Cecchini, N., Monteoliva, M. & Alvarez, M. ^b(2011). Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155, 1947-1959.
- Chowdhary, C., Meruva, A., K, N. & Elumalai, R. (2013). A review on phytochemical and pharmacological profile of *Portulaca Oleracea* Linn. (Purslane). *International Journal of Research*, 4(1),34-37.
- Citterio, B., Albertini, M., Ghibelli, L., Falcieri, E., Battistelli, M, Canonico, B., Rocchi, M, Teodori, L., Ciani, M. & Piatti, E. (2015). Multiparameter analysis of apoptosis in puromycin-treated *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 197, 773-780.
- Cocetta, G., Baldassarre, V., Spinardi, A. & Ferrante, A. (2014). Effect of cutting on ascorbic acid oxidation and recycling in fresh-cut baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 8-16.
- Costa, V. & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*, insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217-246.
- Costa, V., Amorim, M., Quintanilha, A. & Moradas-Ferreira, P. (2002). Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces Cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(11), 1507-1515.
- Davidson, J., Whyte, B., Bissinger, P. & Schiestl, R. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci, Microbiology*, 93, 5116-5121.
- Del Rio, D., Stewart, A. & Pellegrini, N. (2005). A review of recente studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15, 316-328.
- Dkhill, M., Moniem, A., Al-Quraishy, S. & Saleh, R. (2011). Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), 1589-1563.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E. & Krupa, Z. (2003). Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 164, 195-202.
- Erkan, N. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L.. *Food Chemistry* 133, 775-781.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 469-486.
- Ferreira, I. & Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise, ano IV* (2), 32-39.
- Fontana, E., Hoeberechts, J., Nicola, S., Cros, V., Palmegiano, G. & Peiretti, P. (2006). Nitrogen concentration and nitrate/ammonium ratio affect yield and change the oxalic

acid concentration and fatty acid profile of purslane (*Portulaca oleracea* L.) grown in a soilless culture system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2417-2424.

- França, M.B., Panek, A.D. & Eleutherio, E.C.A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*, 146, 621-631.
- Gancedo, J. (1998). Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H. et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 275, 1051-1052.
- Grant, C., MacIver, F. & Dawes, I. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 29, 511-515.
- Grant, C., MacIver, F. & Dawes, I. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 410, 219-222.
- Guo, R., Yuan, G. & Wang, Q. (2011). Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chemistry*, 129, 1080-1087.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F. & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chemistry*, 99, 464-469.
- Held, P. (2010). Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* – The Utility of Synergy H1 for Providing High Quality Kinetic Data for Yeast Growth Applications. *BioTek Application Note*. (retirado de <http://www.biotech.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>)
- Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D. & Eleutherio, E.C.A. (2006). Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 340-346.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1217-1235.
- Hissin PJ, Hilf R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74(1), 214–26.
- Huber, P., Almeida, W. & Fátima, Â. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170-1179.
- Hughes, T., Robinson, M., Mitsakakis, N. & Johnston, M. (2004). The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 546-554.
- Ismail, A., Marjan, Z. & Foong, C. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87, 581-586.
- Ismail, H., Chan, K., Mariod, A. & Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry* 119, 643-647.
- Izawa, S., Inoue, Y. & Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 368, 73-76.
- Jamieson, D. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6678-6681.

- Jamieson, D., Rivers, S. & Stephen, D. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, 140, 3277-3283.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Karimi, G., Khoei, A., Omidi, A., Kalantari, M., Babaei, J., Taghiabadi, E. & Razavi, B. (2010). Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca Oleracea* against cisplatin induced nephrotoxicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(2), 31-35.
- Kaur, C., Kumar, K., Anil, D. & Kapoor, H.C. (2007). Variations in antioxidante activity broccoli (*Brasica oleracea* L.) cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 621-638.
- Kitchen, N.R., Goulding, K.W.T & Shanahan, J.F. (2008). Nitrogen in the Environment: Sources, Problems, and Management. J.L. Hatfield and R.F. Follett (Eds). *Chapter 15. Proven Practices and Innovative Technologies for On-Farm Crop Nitrogen Management* (483-517).
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. & Türkan, İ. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 344-351.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. & Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39, 949-962.
- Li, H., Wong, C., Cheng, K. & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic content in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41, 385-390.
- Lim, Y.Y. & Quah, E.P.L. (2007). Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemistry*, 103, 734-740.
- Linder, C., Englund, U., Narisawa, S., Millán, J. & Magnusson, P. (2013). Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. *Bone*, 53, 399-408.
- Ludovico, P., Sousa, M., Silva, M., Leão, C. & Côrte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147, 2409-2415.
- Marnett, L. (1999). Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83-95.
- Martins, W. (2012). *Atividade antioxidante, análise fitoquímica e comportamental de extratos da Portulaca oleracea em modelo experimental da doença de Parkinson*. (Tese de dissertação, Universidade Tiradentes, 2012). Retirado de <http://ppg.unit.br/psa/wp-content/uploads/sites/6/2013/07/Waleska-Barros-ATIVIDADE-ANTIOXIDANTE-AN%C3%81LISE-FITOQU%C3%8DMICA-E.pdf>
- Matés, J.M. (2000). Effects of antioxidante enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Maya, D., Quintero, M., Muñoz-Centeno, M. & Chávez, S. (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 30, 979-987.
- Melo, E.A., Maciel, M.I.S., Lima, V.L.A.G. & Santana, A.P.M. (2009). Capacidade antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Niru. = J. Brazilian Soc. Food Nutri.*, São Paulo, SP, 34(1), 85-89.
- Mielmann, A., Bothma, C. & Hugo, C.J. (2017). A comparative study of the chemical composition of lucerne (*Medicago sativa* L.) and spinach beet (*Beet vulgaris var. cicla* L.). *South African Journal of Botany*, 108, 8-14.

- Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH[•] assay: a critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. & Tal, M. (2000). Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 110, 42-51.
- Murcia, M.A., López-Ayerra, B., Martínez-Tomé, M. & García-Carmona, F. (2001). Effect of industrial processing on amino acid content of broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1299-1305.
- Murphy, A. & Kavanagh, K. (1999). Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen implications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 551-557.
- Nagalakshmi, N. & Prasad, M.N.V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160, 291-299.
- Nath, A., Bagchi, B., Misra, L.K. & Deka, B.C. (2011). Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 127, 1510-1514.
- Oliveira, I. Valentão, P., Lopes, R. Andrade P., Bento, A. & Pereira, J. (2009). Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*, 92, 129-134.
- Østergaard, J., Persiau, G., Davey, M., Bauw, G. & Montagu, M. (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30009-30016.
- Parente, C.P., Lima, M.J., Guido, L.F. & Lemos, E.T. (2013). Avaliação fitoquímica e actividade antioxidante de compostos fenólicos presentes em “*Valerianella Locusta*”. (Tese de dissertação, Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária, 2013). Retirado de <http://repositorio.ipv.pt/handle/10400.19/1864>.
- Patra, K. & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 39(8), 347-354.
- Peksel, A., Arisan-Atac, I. & Yanardag, R. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of Purslane (*Portulaca Oleracea* subsp. *Sativa* L.). *Ital. J. Food Sci.*, 3(18), 295-308.
- Peña-Castillo, L. & Hughes, T. (2007). Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes?. *Genetics*, 176, 7-14.
- Perrone, G., Tan, S. & Dawes, I. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1354-1368.
- Prior, R., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rahdari, P., Tavakoli, S. & Hosseini, S.M. (2012). Studying of Salinity Stress Effect on Germination, Proline, Sugar, Protein, Lipid and Chlorophyll Content in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Leaves. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(1), 182-193.

- Rinaldi, R., Amodio, M. & Colelli, G. (2010). Effect of temperature and exogenous ethylene on the physiological and quality traits of purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 147-156.
- Rockenbach, I.I. (2008). *Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (Vitis vinífera L. e Vitis labrusca L.)*. Tese de dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. Retirado de <https://core.ac.uk/download/files/551/30372221.pdf>
- Ruis, H. & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17, 11, 959-965.
- Salmon, T., Evert, B., Song, B. & Doetsch, P. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3712-3723.
- Sanja, S.D., Sheth, N.R., Patel, N.K., Patel, D.V. & Patel, B. (2009). Characterization and evaluation of antioxidant activity of *Portulaca Oleracea*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1).
- Santos, J. Q. (2012). Fertilização: fundamentos da utilização dos adubos e correctivos. 4ª edição, Publicações Europa-América, colecção Euroagro, pág: 40-49.
- Santos, R.J.V. (2014). *Necessidades de azoto da beldroega (Portulaca oleracea Linn.) cultivada em substrato*. (Tese de dissertação, Universidade de Évora, 2014). Retirado de [https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/12327/1/Dissertacao%20Necessidades%20de%20azoto%20da%20beldroega%20\(Portulaca%20ol.pdf](https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/12327/1/Dissertacao%20Necessidades%20de%20azoto%20da%20beldroega%20(Portulaca%20ol.pdf)
- Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *TRENDS in Cell Biology*, 17(9), 422-427.
- Schuster, S., Pfeiffer, T. & Fell, D. (2008). Is maximization of molar yield in metabolic networks favoured by evolution?. *Journal of Theoretical Biology*, 252, 497-504.
- Silva, M., Costa, R., Santana, A. & Koblitz, M. (2010). Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias, Londrina*, 31(3), 669-682.
- Simopoulos, A. (2004). Omega-3 Fatty Acids and Antioxidants in Edible Wild Plants. *Biol Res*, 37, 263-277.
- Singh, M., Gupta, S., Singhal, U., Pandey, R. & Aggarwal, S.K. (2013). Evaluation of the Oxidative Stress in Chronic Alcoholics. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(8), 1568-1571.
- Soares, D., Andreazza, A. & Salvador, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 85(2), 45-47.
- Soares, D., Andreazza, A. & Salvador, M. (2005). Avaliação de compostos com atividade antioxidante da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 95-100.
- Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr, G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D. et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351-355.
- Sousa, M.J., Ludovico, P., Rodrigues, F., Leão, C. & Côrte-Real, M. (2012). Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid in Cell Metabolism – Cell Homeostasis and Stress Response. Intech. 73-100.
- Sreeramulu, D., Reddy, C.V.K., Chauhan, A., Balakrishna, N. & Raghunath, M. (2013). Natural antioxidant activity of commonly consumed plant foods in India: effect of

domestic processing. *Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-12.

- Stambuk, B. (1999). A simple experimente illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochemical Education*, 27, 177-180.
- Stein, H., Honing, A., Miller, G., Erster, O., Eilenberg, H., Csonka, L. et al. (2011). Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Science*, 181, 140-150.
- Sucupira, N., Silva, A., Pereira, G. & Costa, J. (2012). Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *UNOPAR, Cient Ciênc Biol Saúde*, 14(4), 263-269.
- Sulaiman, S., Sajak, A., Ooi, K., Supriatno, Seow, E. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 506-515.
- Swan, T. & Watson, K. (1998). Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trahalose. *FEMS Microbiology Letters*, 169, 191-197.
- Temple, M., Perrone, G. & Dawes, I. (2005). Complex celular responses to reactive oxygen species. *TRENDS in Cell Biology*, 15(6), 319-326.
- Tiveron, A.P. (2010). Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. (Tese de dissertação, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010). Retirado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102010-101541/pt-br.php>.
- Uddin, Md., Juraimi, A., Ali, Md & Ismail, M. (2012). Evaluation of Antioxidant Properties and Mineral Composition of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) at Different Growth Stages. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 10257-10267.
- Uddin, Md., Juraimi, A., Hossain, Md., Nahar, M., Ali, Md. & Rahman, M. (2014). Purslane Weed (*Portualca oleracea*): A Prospective Plant Source of Nutrition, Omega-3 Fatty Acid, and Antioxidant Attributes. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-6.
- Verslues, P. & Sharma, S. (2010). Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1-23.
- Xu, C. & Leskovar, D. (2015). Effectsof *A. Nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 183, 39-47.
- Xu, X., Yu, L. & Chen, G. (2006). Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 493-499.
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A. & Demiral, T. (2007). Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline acumulation. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 49-57.
- Yoon, Y-E., Kuppusamy, S., Cho, K.M., Kim, P.J., Kwack, Y-B & Lee, Y. (2017). Influence of cold stress on contentes of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 215, 185-192.
- Youssef, K. & Mokhtar, S. (2014). Effect of Drying Methods on the Antioxidant Capacity, Color and Phytochemicals of *Portulaca oleracea* L. Leaves. *Nutrition and Food Sciences*, 4(6), 1-6.

- 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.
- Zhang, D. & Hamazu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88, 503-509.
- Zhou, Y., Xin, H., Rahman, K., Wang, S., Peng, C. & Zhang, H. (2015). *Portulaca oleracea* L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects. *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 2015, 1-12.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. & Tang, T. (2010). Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Analytical Methods*, 3, 90-97.
- Zigorvá, J. (2000). Effect of RQ and pre-seed conditions on biomass and galactosyl transferase production during fed-batch culture of *S. cerevisiae* BT150. *Journal of Biotechnology*, 80, 55-62.

WebGrafia

¹<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS608>

²<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS550>

ANEXOS

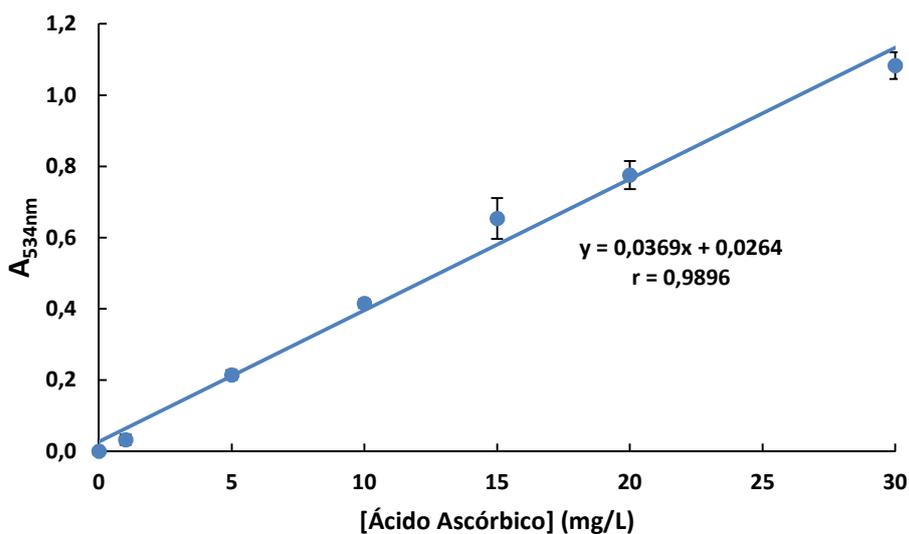


Figura A.1 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ascorbato, construída a partir da leitura de soluções padrão de ascorbato (0-30 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de sete experiências independentes \pm desvio padrão.

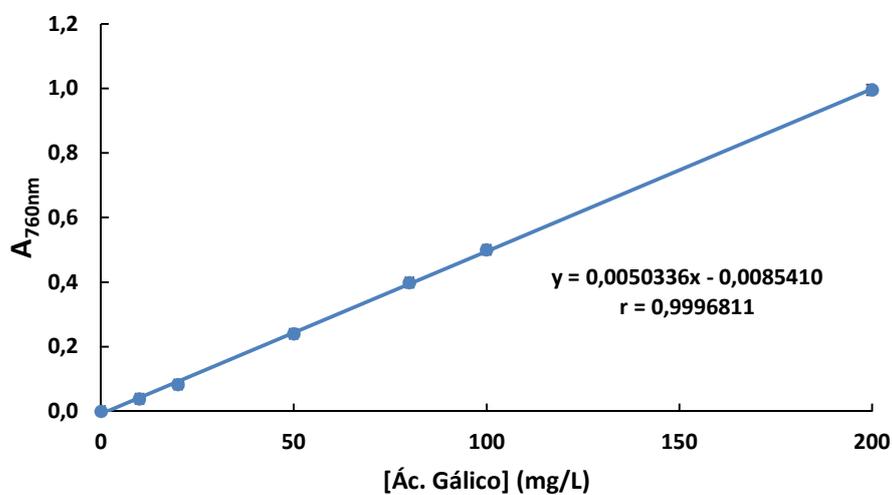


Figura A.2 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de fenóis totais, construída a partir da leitura de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de sete experiências independentes \pm desvio padrão.

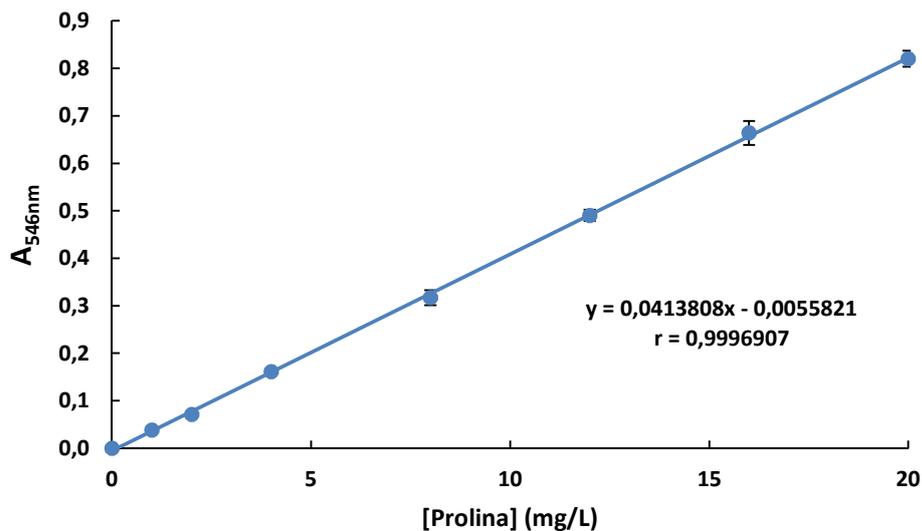


Figura A.3 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de prolina, construída a partir da leitura de soluções padrão de prolina (0-20 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de sete experiências independentes \pm desvio padrão.

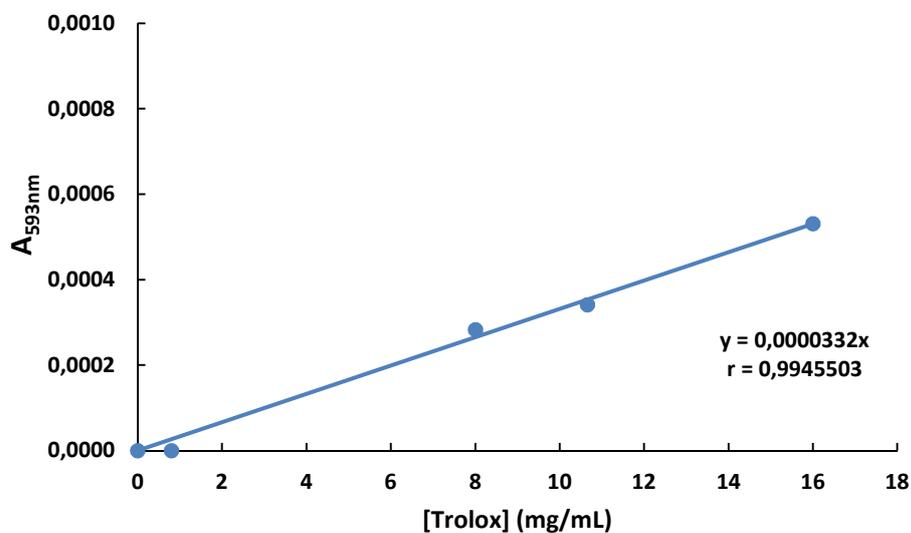


Figura A.4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de FRAP, construída a partir da leitura de soluções padrão de Trolox (0-15 mg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes \pm desvio padrão.

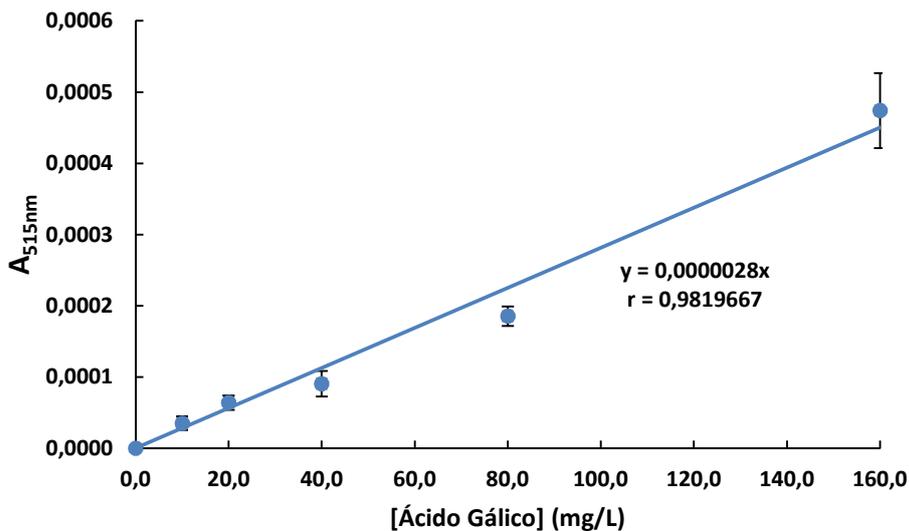


Figura A.5 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de DPPH, construída a partir da leitura de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de seis experiências independentes \pm desvio padrão.

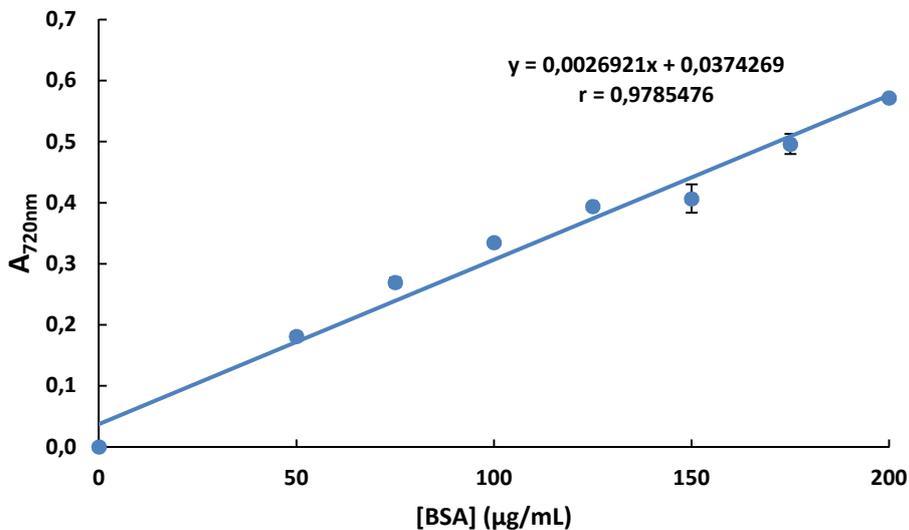


Figura A.6 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de proteína, construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de sete experiências independentes \pm desvio padrão.

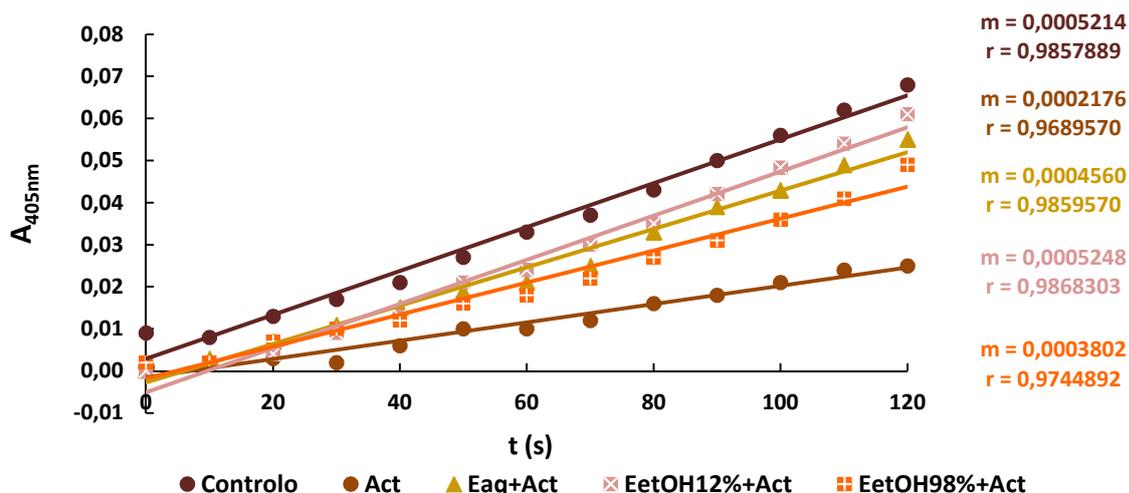


Figura A.7 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática ALP de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

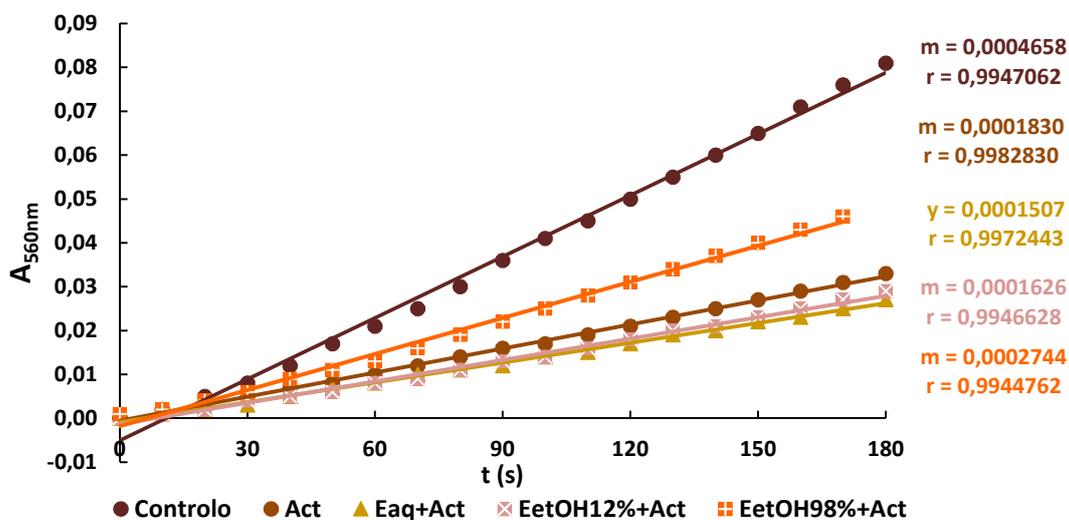


Figura A.8 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática SOD de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e de diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

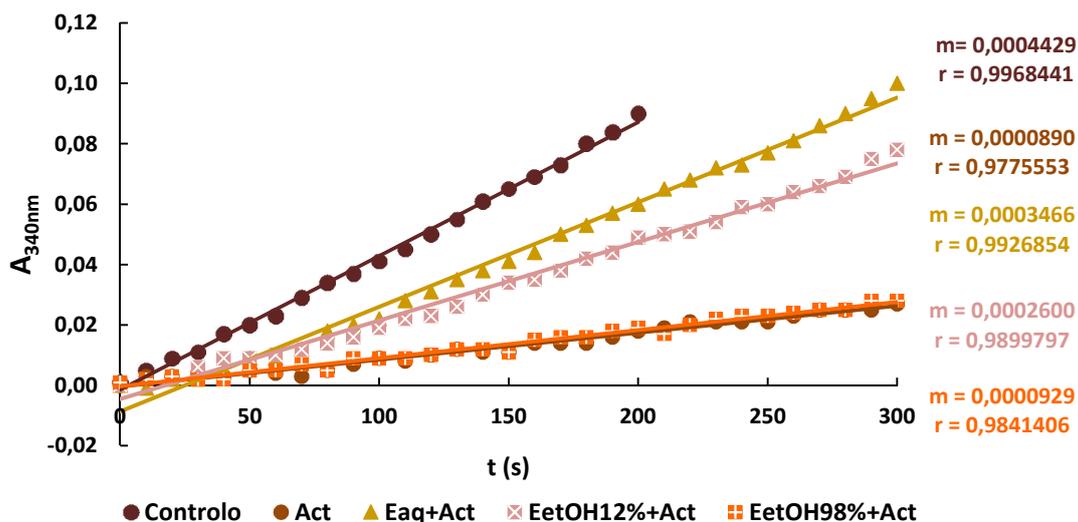


Figura A.9 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática G6PD de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

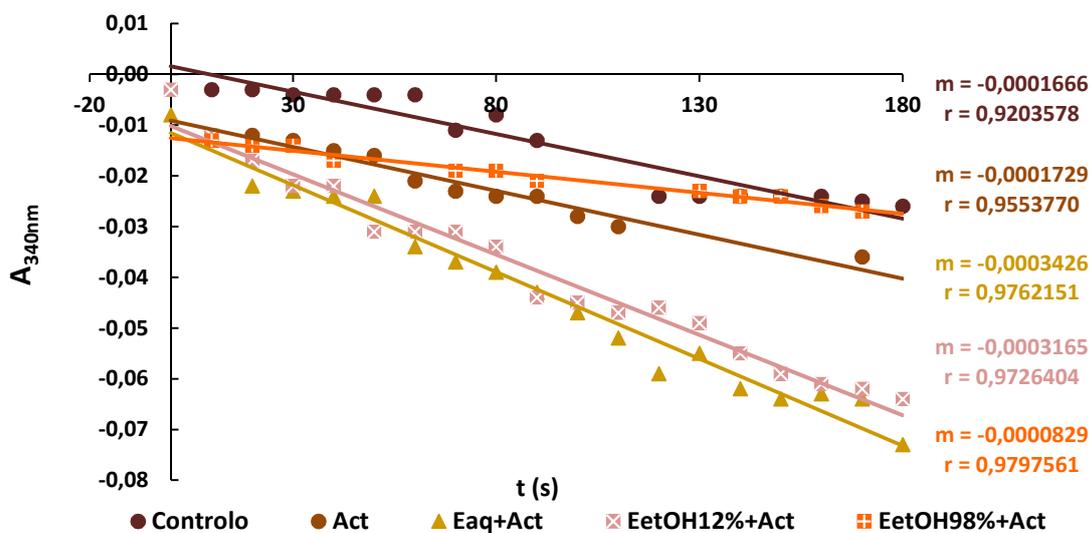


Figura A.10 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática GR de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

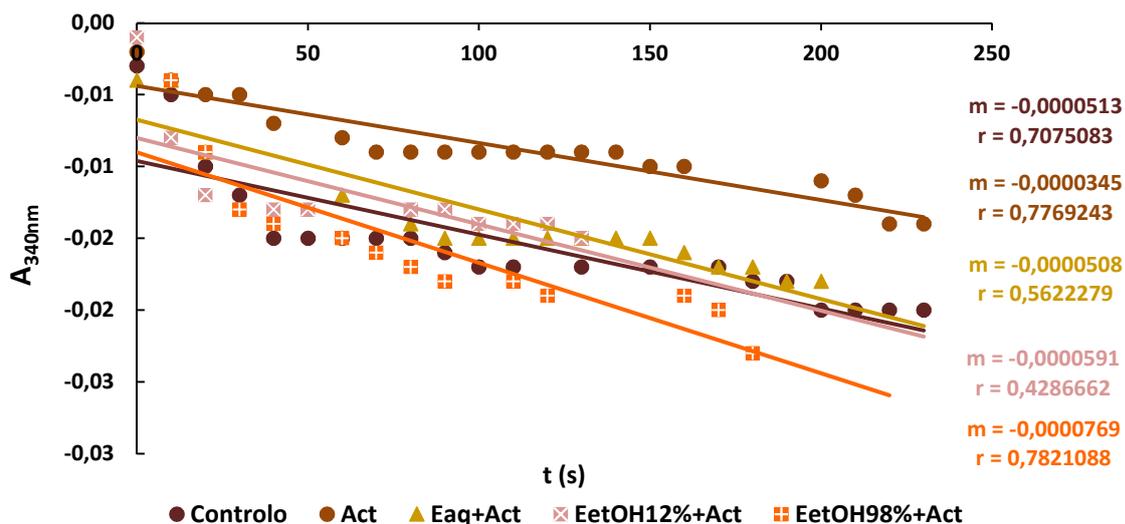


Figura A.11 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática GPx de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

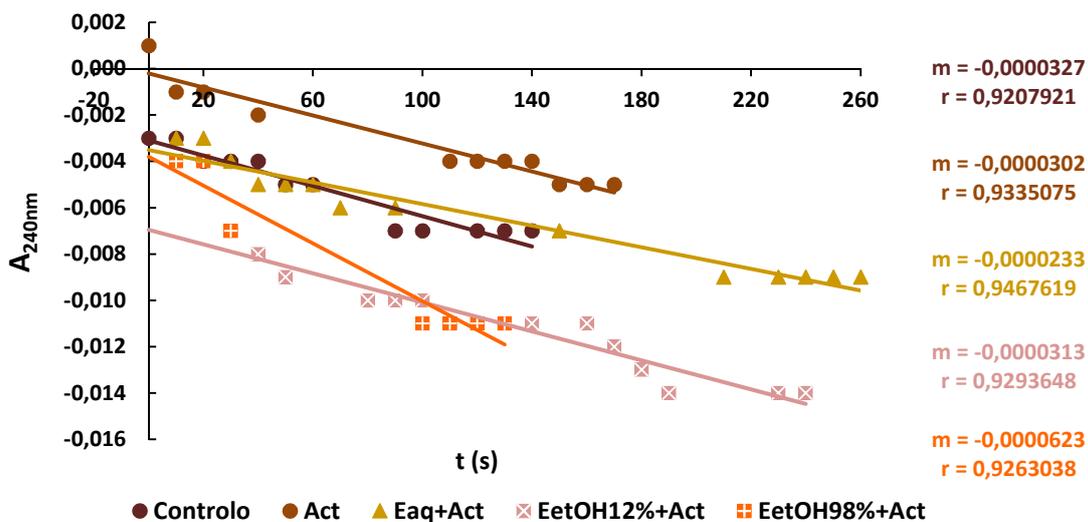


Figura A.12 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática CTA1 de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

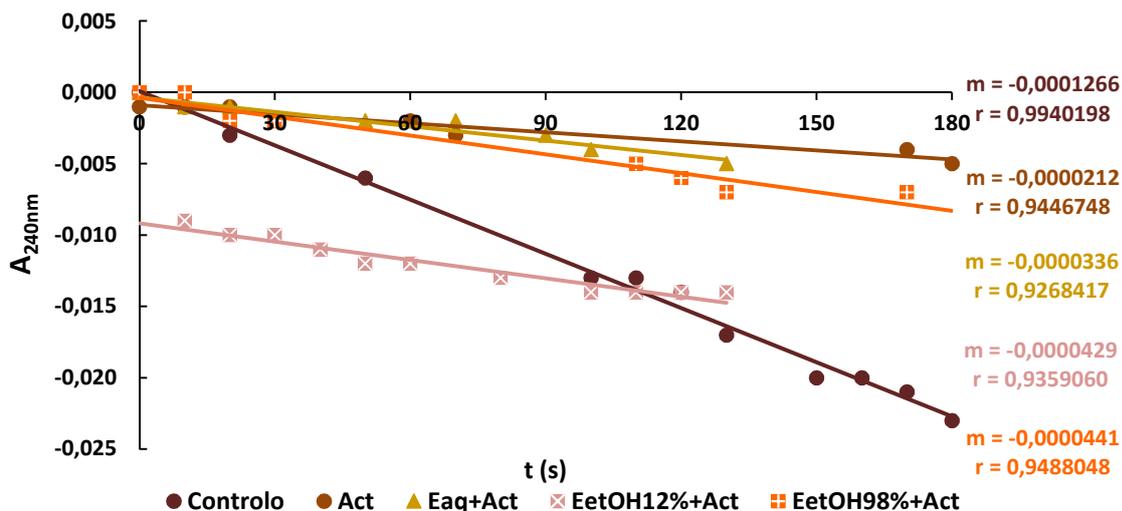


Figura A.13 – Representação gráfica de curvas de reação da atividade enzimática CTT1 de células de *S.cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YPD na ausência e na presença de acetato (25mM), assim como na presença de acetato (25mM) e diferentes extratos (2%) de folhas de beldroega.

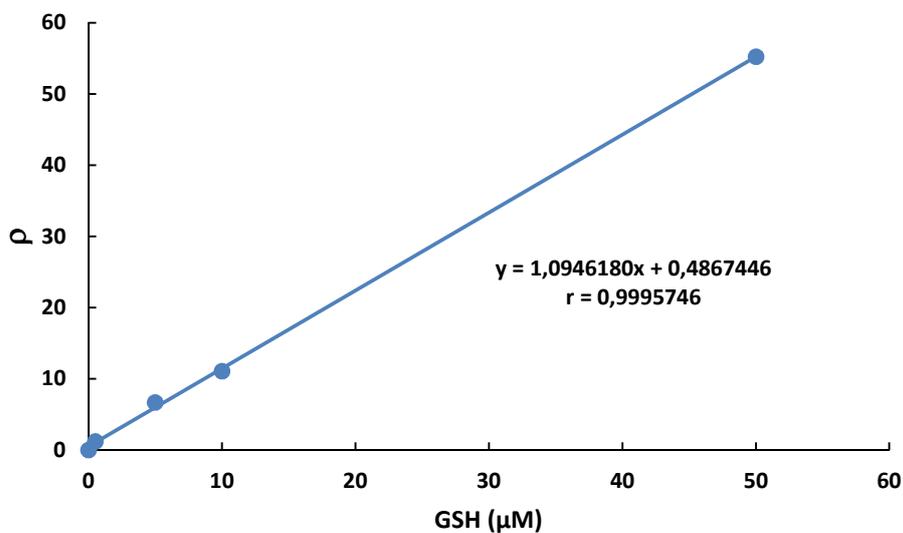


Figura A.14 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0-50 µM).

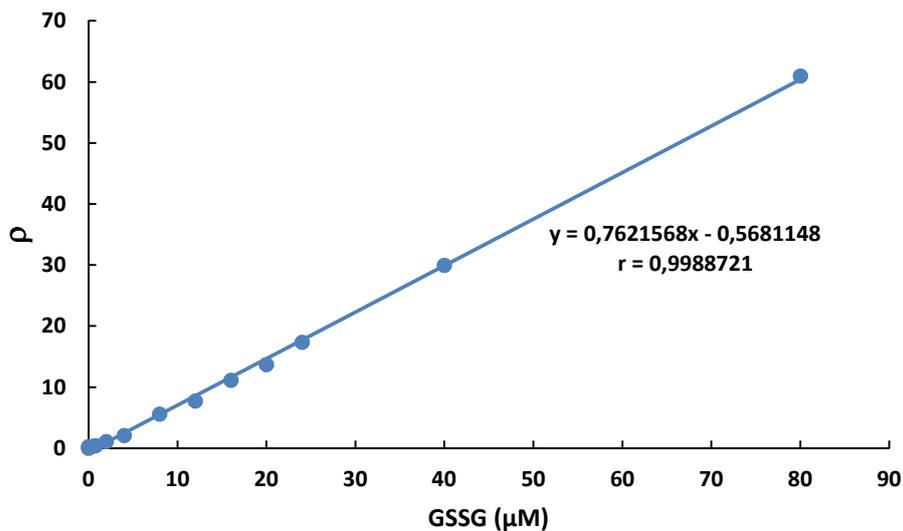


Figura A.15 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0-80 μM).

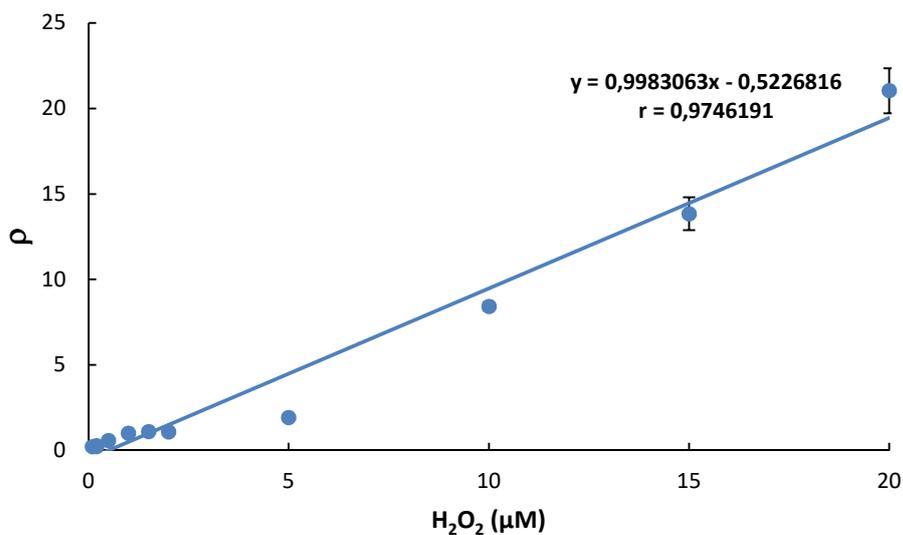


Figura A.16 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (0,2-20 μM).

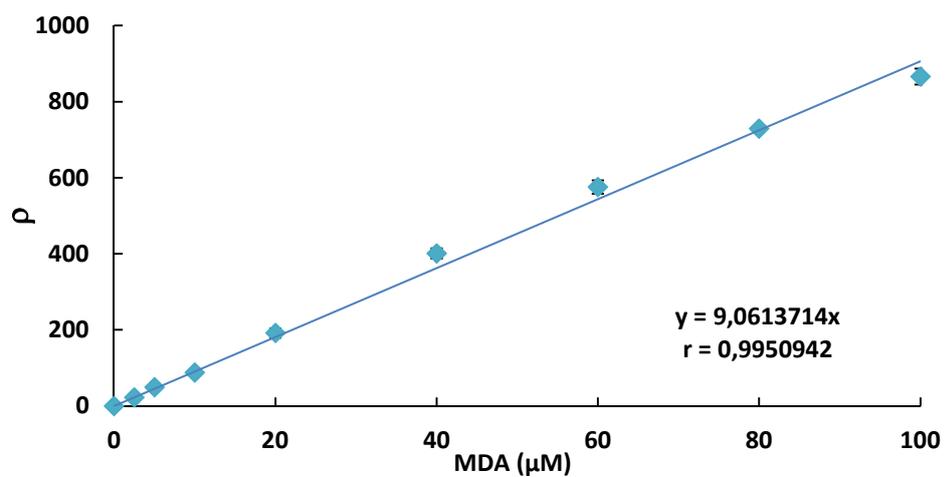


Figura A.17 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão (2,5 -100 μM).

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

Doseamento de conteúdos/propriedades antioxidantes	Origem de variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Fenóis	Entre grupos	,867	4	,217	28,173	,000
	No interior dos grupos	,154	20	,008		
	Total	1,021	24			
DPPH	Entre grupos	,055	4	,014	41,583	,000
	No interior dos grupos	,007	20	,000		
	Total	,061	24			
Ascorbato	Entre grupos	21171,326	4	5292,831	406,819	,000
	No interior dos grupos	260,206	20	13,010		
	Total	21431,532	24			
FRAP	Entre grupos	42765,316	4	10691,329	52,497	,000
	No interior dos grupos	4073,083	20	203,654		
	Total	46838,399	24			
Prolina	Entre grupos	962,000	4	240,500	33,691	,000
	No interior dos grupos	142,767	20	7,138		
	Total	1104,767	24			

Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”)

Conteúdos ou atividade enzimática	Origem de variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Peso seco	Entre grupos	606,119	7	86,588	45,548	,000
	No interior dos grupos	60,833	32	1,901		
	Total	666,953	39			
ALP	Entre grupos	95,469	7	13,638	28,528	,000
	No interior dos grupos	15,298	32	,478		
	Total	110,768	39			
GR	Entre grupos	11325742,503	7	1617963,215	91,718	,000
	No interior dos grupos	564497,906	32	17640,560		
	Total	11890240,409	39			
GPx	Entre grupos	64983785,979	7	9283397,997	12,309	,000
	No interior dos grupos	24134176,472	32	754193,015		
	Total	89117962,451	39			
G6PD	Entre grupos	67728301,467	7	9675471,638	87,678	,000
	No interior dos grupos	3531278,110	32	110352,441		
	Total	71259579,577	39			
SOD	Entre grupos	1758,803	7	251,258	77,200	,000
	No interior dos grupos	104,149	32	3,255		
	Total	1862,951	39			
CTT1	Entre grupos	139,148	7	19,878	65,245	,000
	No interior dos grupos	9,750	32	,305		
	Total	148,897	39			
CTA 1	Entre grupos	6,716	7	,959	21,648	,000
	No interior dos grupos	1,418	32	,044		
	Total	8,134	39			
GSH	Entre grupos	13086,609	7	1869,516	43,392	,000
	No interior dos grupos	1378,692	32	43,084		
	Total	14465,301	39			
GSSG	Entre grupos	3757,400	7	536,771	28,277	,000
	No interior dos grupos	607,434	32	18,982		
	Total	4364,834	39			
ROS	Entre grupos	284,881	7	40,697	191,725	,000
	No interior dos grupos	6,793	32	,212		
	Total	291,674	39			
MDA	Entre grupos	1,643	7	,235	12,367	,000
	No interior dos grupos	,607	32	,019		
	Total	2,250	39			