



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Influência da temperatura na proliferação de *Saccharomyces cerevisiae*
em presença de nanopartículas de dióxido de titânio**

Joana Manuela Capela Pires

Orientador:

Rui Manuel Alves Ferreira

Co-Orientador:

Isabel Maria Simão Alves-Pereira Ferreira

Outubro, 2011

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Influência da temperatura na proliferação de *Saccharomyces cerevisiae*
em presença de nanopartículas de dióxido de titânio**

Joana Manuela Capela Pires

Orientador:

Rui Manuel Alves Ferreira

Co-Orientador:

Isabel Maria Simão Alves-Pereira Ferreira

"Quando duvidares de ciência e da fé, não te restará mais nada em que acreditar. Acredita cegamente, pois no meio da escuridão que há por descobrir, deixares-te levar pelo instinto é a solução mais razoável; apesar da invisibilidade do real."

J.C.

Índice geral

Índice geral	5
Índice de figuras.....	7
Índice de quadros.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
AGRADECIMENTOS.....	13
ABREVIATURAS E NOMENCLATURA DE ENZIMAS.....	15
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
1.1. Influência da temperatura nas reacções enzimáticas.....	17
1.2. Nanopartículas, ambiente e toxicidade	20
1.3. Stress oxidativo e metais	22
1.4. Levedura - modelo biológico em estudos de <i>stress</i>	25
2- PROBLEMA E OBJECTIVOS.....	29
2.1- Problema.....	29
2.2 - Objectivos	30
2.2.1 - Objectivo geral	30
2.2.2 - Objectivos específicos.....	30
3 - METODOLOGIA	31
3.1 - Estratégia	31
3.2 - Diagrama do trabalho.....	33
3.3 - Equipamento.....	34
3.4 - Reagentes.....	34
3.5 - Procedimento Experimental	35
3.5.1 - Cultura de microrganismos	35
3.5.2 - Preparação de nanopartículas	36

3.5.3 - Contagem de cfu.....	37
3.5.4 - Determinação do peso seco.....	37
3.5.5 - Obtenção de fracções celulares.....	37
3.5.6 - Quantificação de proteínas.....	38
3.5.7 - Quantificação do GSH e GSSG.....	38
3.5.8 - Determinação da capacidade antioxidante pelo DPPH.....	39
3.5.9 - Quantificação do malonodialdeído.....	40
3.5.10 - Quantificação de ROS.....	40
3.5.11 - Determinação de actividades enzimáticas.....	41
3.5.11.1 - Fosfatase alcalina.....	41
3.5.11.2 - Glucose-6-fosfato desidrogenase.....	41
3.5.11.3 - Glutatioo reductase.....	42
3.5.11.4 - Glutatioo peroxidase.....	42
3.5.11.5 - Catalases T e A.....	42
3.5.11.6 - Lipoxigenases.....	43
3.5.12 - Análise estatística dos resultados.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME₃.....	45
4.1.1 - Crescimento celular.....	45
4.1.2 - Capacidade antioxidante não enzimática.....	51
4.1.3 – Capacidade antioxidante enzimática.....	53
4.1.4 – Resposta pró-oxidante.....	56
4.2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741.....	59
4.2.1 – Crescimento celular.....	59
4.2.2 – Capacidade antioxidante não enzimática.....	63
4.2.3 – Capacidade antioxidante enzimática.....	65
4.2.4 – Resposta pró-oxidante.....	68
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	85

Índice de figuras

Figura 1.1- Definição de diferentes classes de partículas (adaptado de Nowack, 2010).....	20
Figura 1.2- Vias de circulação de nanopartículas antroposfera/ambiente, reacções no ambiente e exposição dos seres humanos (adaptado de Nowack, 2010).....	21
Figura 1.3- Relação entre o diâmetro das nanopartículas e a respectiva área superficial (adaptado de Huang, 2010).....	22
Figura 1.4- Papel das lipoxigenases na formação de lipoperóxidos e interacção metabólica com o ciclo do glutatono, um mecanismo de desintoxicação celular (adaptado de Brash, 1999).	24
Figura 3.1- Espectro de absorção molecular de NP-TiO ₂ imediatamente antes da adição ao meio YEPD.	37
Figura 4.1- Conteúdo em proteína total (A), do sobrenadante (B) e do sedimento (C) pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	46
Figura 4.2- Peso seco (A) actividade enzimática ALP (B) e conteúdo em tióis não-proteicos (C) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	48
Figura 4.3- Dependência da temperatura da V _{max} de ALP de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	50
Figura 4.4- Conteúdo em glutatono (A) dissulfureto de glutatono (B) razão GSH/GSSG (C) e capacidade antioxidante pelo DPPH (D) de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	53
Figura 4.5- Actividade glucose 6-fosfato desidrogenase (A), glutatono reductase (B) e glutatono peroxidase (C) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	55
Figura 4.6- Actividade catalase T (A), catalase A (B) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	56
Figura 4.7- Actividade lipoxigenases (A), conteúdo em ROS (B) e em malonodialdeído (C) de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	58
Figura 4.8- Conteúdo de proteína total (A), do sobrenadante (B) e do sedimento (C) pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	59
Figura 4.9- Peso seco (A), actividade enzimática fosfatase alcalina (B), conteúdo em tióis não-proteicos (C) de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	61
Figura 4.10- Dependência da temperatura da V _{max} de ALP de <i>S. cerevisiae</i> BY4741	62
Figura 4.11- Conteúdo em glutatono (A) dissulfureto de glutatono (B) razão GSH/GSSG (C) e DPPH (D) de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	64
Figura 4.12- Actividades glucose 6-fosfato desidrogenase (A) glutatono reductase (B) e glutatono peroxidase (C) de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	66
Figura 4.13- Actividades catalase T (A) e catalase A (B) de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	68

Figura 4.14- Actividade lipoxigenases (A) conteúdo em ROS (B) e em malonodialdeído (C) de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	69
Figura A1- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, pelo método de Lowry, construída a partir da leitura de absorvência de solução padrão de BSA (0-200 µg/mL).	87
Figura A2- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-100 µM).	87
Figura A3- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-80 µM).	87
Figura A4- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de DPPH, construída a partir da leitura de absorvência de solução padrão (0-8 µM).	88
Figura A5- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura da potência de fluorescência (0-100 µM).....	88
Figura A6- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura por absorção molecular de solução padrão (0-400 mM).	88
Figura A7– Representação gráfica da curva de reacção ALP no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1 µg/mL).	89
Figura A8– Representação gráfica da curva de reacção G6PD no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1 µg/mL).	89
Figura A9– Representação gráfica da curva de reacção GR no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1 µg/mL).	89
Figura A10– Representação gráfica da curva de reacção GPx no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1µg/mL).	90
Figura A11– Representação gráfica da curva de reacção CAT T no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1 µg/mL).	90
Figura A12– Representação gráfica da curva de reacção LOX no sobrenadante da fracção pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO ₂ (1 µg/mL).	90

Índice de quadros

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , crescidas em meio YEPD, a diferentes temperaturas na ausência e na presença de NP-TiO ₂ (0,1 e 1 µg/mL). ...	91
Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, a diferentes temperaturas na ausência e na presença de NP-TiO ₂ (0,1 e 1 µg/mL). ..	92

Resumo

Influência da temperatura na proliferação de *Saccharomyces cerevisiae* em presença de nanopartículas de dióxido de titânio

S. cerevisiae UE-ME₃ e BY4741, em choque térmico 28/40 °C responderam à exposição a NP-TiO₂ (1 µg/mL) com um decréscimo significativo do conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g, em tióis não-proteicos, actividades enzimáticas ALP, G6PD, GPx e CAT A, bem como, um aumento significativo da actividade LOX. Os níveis exíguos de MDA e ROS detectados nestas condições podem ser explicados, para a estirpe UE-ME₃ pelo aumento da actividade CAT T, enquanto que para estirpe BY4741 pela elevada capacidade antioxidante (DPPH), eventualmente dependente do teor em compostos fenólicos. Os resultados sugerem indução de morte celular pelo choque térmico 28/40 °C conjugado com a exposição a NP-TiO₂ (1µg/mL) nas estirpes estudadas, mais evidente na UE-ME₃ com óptimo de crescimento a 28 °C e mínimo a 40 °C. Esta resposta mostrou-se distinta da observada no estudo da influência da temperatura, entre 25 e 40 °C, sem choque térmico.

Abstract

Influence of temperature on *Saccharomyces cerevisiae* proliferation in the presence of nanoparticles of titanium dioxide

S. cerevisiae UE-ME₃ and BY4741, replied to 28/40 °C heat-shock and NP-TiO₂ (1 µg/mL) exposition with a significant decrease of supernatant post-12,000 g protein and non-protein thiols contents, ALP, G6PD, GPx and CAT A activities, as well as a significant increase in LOX activity. The tight MDA and ROS levels detected in these conditions can be explained for UE-ME₃ strain by the increase of CAT T activity, while for BY4741 strain by the upper antioxidant power (DPPH), possibly dependent of phenolic content. These results suggest an induction of cell death by 28/40 °C heat shock combined with exposure to NP-TiO₂ (1µg/mL) in both strains, most evident in the UE-ME₃ with an optimal growth at 28 °C and a minimum at 40 °C. This response was shown distinct from that observed in the study of the influence of temperature, between 25 and 40 °C without heat-shock.

Agradecimentos

No término deste trabalho, não podia deixar de agradecer a todo um conjunto de pessoas, que permitiu reunir um sem número de factores, que viabilizou a realização do mesmo, e sem os quais não conseguiria realizar da mesma forma esta actividade de investigação. Desta forma não posso deixar de agradecer com o maior carinho do mundo:

☺ Aos meus orientadores, Prof. Rui Ferreira e Prof.^a Isabel Alves-Pereira, pela presença constante, e pelo incentivo a fazer sempre mais e melhor; obrigada pela paciência dispensada.

☺ Ao ICAAM (Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas), pela utilização do espectrómetro de fluorescência, bem como, pelo apoio financeiro para a concretização deste projecto.

☺ Ao Departamento de Química da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora, pela disponibilidade de espaço laboratorial e equipamentos.

☺ À D. Anabela e D. Aida, por toda a ajuda no trabalho desenvolvido no laboratório, e pela amizade.

☺ A todos os elementos da Universidade de Évora intervenientes no meu percurso académico.

☺ À Laura, a melhor afilhada do mundo e grande amiga, sempre pronta para a música.

☺ À Marta Candeias, Juliana Agostinho, Catarina Coelho, Elsa Vieira, Débora Pereira, Ana Filipa Pereira, Sílvia Arantes, Vanessa Paixão, Joana Ferreira, Nelson Lisboa e Margarida Silvano pela vossa eterna amizade.

☺ À minha família, minha essência e suporte de todas as horas, AMO-VOS, espero um dia poder recompensar-vos POR TUDO ☺ .

☺ À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, meus 3 amores simplesmente ADORO-VOS, vocês sabem o quanto (LY).

☺ A Deus, pela existência deste mundo e de todas as pessoas maravilhosas que conheci, que à sua maneira vão desenhando na minha vida um destino, como um artista desenha numa tela, tentando criar felicidade a cada gesto, e amor em cada olhar.

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

ADP	Difosfato de adenosina
ALP	Fosfatase alcalina
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalases (E.C 1.11.1.6)
CAT A	Catalase A (E.C 1.11.1.6)
CAT T	Catalase T (E.C 1.11.1.6)
cfu	Unidades formadoras de colónias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
[E]	Concentração de enzima
Ea	Energia de activação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C 1.1.1.49)
GPx	Glutationo peroxidase (E.C 1.11.1.7)
GR	Glutationo redutase (E.C 1.6.4.2)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>generally recognized as safe</i>
GSH	Glutationo
GSS	Glutationo sintetase (E.C 6.3.2.3)
GSSG	Dissulfureto de glutatióno
k	Coefficiente de velocidade
K1	Constante de formação do complexo enzima-substrato
Ks	Constante de dissociação do complexo enzima-substrato
LOX	Lipoxigenases (EC 1.13.11.12)
MDA	Malonaldeído, malonodialdeído
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)
NEM	N-etilmaleimida
NP	Nanopartículas
O ₂ ^{•-}	Anião radical superóxido

OH•	Radical hidroxilo
OPT	o-fetaldeído
ORF	Sequência de DNA que engloba as regiões codificantes de um gene, do inglês <i>open reading frame</i>
p	Probabilidade de ocorrência da reacção
r	Coefficiente de correlação
R	Constante dos gases ideais
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
[S]	Concentração de substracto
T	Temperatura
V	Frequência de colisões eficazes
V _{max}	Velocidade máxima
Z	Frequência de colisões
ΔG	Variação da energia de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia

1. Fundamento teórico

1.1. Influência da temperatura nas reacções enzimáticas

A velocidade de qualquer reacção química em meio homogéneo depende da frequência de colisões entre os reagentes, factor que é influenciado pela concentração dos mesmos e pela energia cinética que lhe está associada, pelo que, para uma reacção entre o enzima E e o substrato S, a frequência de colisões é igual ao produto de uma constante por $[E][S]$. A frequência de colisões não é igual à velocidade da reacção, pois apenas uma pequena proporção ocorre com energia suficiente, a energia de activação, E_a , para a promover. A lei de Maxwell-Boltzman indica que a fracção de moléculas de um dado sistema que atinja esse mínimo de energia a uma dada temperatura, T, é aproximadamente proporcional ao termo $e^{-E_a/RT}$, onde R representa a constante dos gases perfeitos. Deste modo, a frequência de colisões eficazes é dada pela equação:

$$\text{Frequência de colisões eficazes} = v = \text{constante } [E][S] e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

a qual pode ser reescrita na forma:

$$v = k[E][S] \quad (2)$$

onde, o coeficiente de velocidade, k, é igual ao produto de uma constante de tempo por $e^{-E_a/RT}$, ou mais especificamente

$$k = pZ e^{-E_a/RT} \quad (3)$$

onde p representa a probabilidade de uma reacção ocorrer quando os reagentes colidem entre si e depende de vários factores que incluem a orientação das moléculas em colisão; onde Z representa a frequência de colisões, ou seja, o número total de colisões por unidade de tempo, por unidade de concentração, para uma reacção bimolécula; $e^{-E_a/RT}$ representa a fracção total de moléculas reagentes com energia igual ou superior à de activação e k representa o coeficiente de velocidade, como por exemplo k_1 para a reacção de formação do complexo enzima-substrato. O parâmetro Z é um factor de energia cinética que consequentemente varia

com a temperatura T . No entanto, pequenas alterações desta, exercem um efeito relativamente pequeno sobre Z (Cornish-Bowden, 2001; Low, 1973).

A relação expressa na equação (3) foi descoberta empiricamente por Arrhenius em 1889, antes da teoria das colisões dos gases ser divulgada, sendo usualmente representada pela equação

$$k = A \quad (4)$$

Num sistema simples em equilíbrio, $V_{\max}/[E]_t = k_p$ um coeficiente de velocidade de ordem 1, pelo que uma representação gráfica do logaritmo neperiano de $V_{\max}/[E]_t$ em função do inverso da temperatura, permite calcular a energia de activação para o passo catalítico. Na prática, basta representar apenas o logaritmo neperiano de V_{\max} , uma vez que a velocidade máxima de uma determinada preparação é proporcional ao k_p , tendo em mente que a representação do $\log V_{\max}$ em função do inverso da temperatura $1/T$ é linear. Como o K_m varia com a temperatura, não se pode assumir que uma determinada concentração de substrato seja saturante a todas as temperaturas estudadas. Para muitas reacções enzimáticas o V_{\max} depende de vários coeficientes de velocidade em que cada um deles é afectado por alterações na temperatura, pelo que a E_a calculada a partir da representação de Arrhenius será sempre um valor aparente ou "médio". A própria representação de Arrhenius pode ser não linear, se os passos limitantes forem diferentes a temperaturas diferentes. Em alguns casos a representação gráfica pode apresentar um declive acentuado a determinada temperatura, denominada de transição, onde as alterações do V_{\max} dependem do passo limitante. A temperatura de transição pode ser correlacionada com a composição de resíduos acilo da membrana celular e presumivelmente os resultados de transição podem ser associados a alterações na fluidez da membrana. Uma queda brusca na representação de Arrhenius sugere desnaturação proteica (Talsky, 1971; Fox, 1972). Para explicar a necessidade de um mínimo de energia para a espontaneidade de uma reacção, Eyring (1935) propôs a teoria do estado de transição. Esta teoria estabelece que as moléculas reagentes devem ultrapassar uma barreira de energia e passar por um estado de transição denominado complexo activado antes de darem produtos de reacção. O complexo activado é considerado instável e transitório onde as ligações químicas e a sua orientação se encontram distorcidas. Quando os reagentes atingem o estado de transição estão preparados para dar produto da reacção a uma taxa independente da temperatura e da natureza dos reagentes, isto é, transitam para o outro lado da barreira de energia para atingir o novo estado fundamental. Se assumirmos a hipótese do equilíbrio entre moléculas reagentes

que atingem o topo da barreira de energia de activação as diferenças de energia podem ser descritas por funções termodinâmicas, K^\ddagger , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , assim como pela E_a e k_1 , sendo o K^\ddagger uma constante de equilíbrio dinâmica mais próxima do K_m em vez de K_s . Neste contexto o coeficiente de velocidade da reacção pode ser calculado de acordo com a equação:

$$\text{---} \text{---} \text{---} \quad (5)$$

Aplicando o \ln a ambos os termos da equação podemos obter uma representação linear relativa à teoria do estado de transição

$$\text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \quad (6)$$

Assim, quando se determina o coeficiente k a diferente temperatura, a representação gráfica de $\ln(k/T)$ em função do inverso de T permitirá calcular a partir do coeficiente angular da curva. Deste modo, com a representação gráfica do $\ln(V_{\max}/T)$ em função do inverso de T pode calcular-se a variação da entalpia de formação do complexo de estado de transição para os passos que afectam V_{\max} (Quapp, 2010; Santos, 2010; Scherer, 2010; Packard, 2008; Walsh, 2008; Cornish-Bowden, 2001).

Os organismos vivos, regulam as suas actividades e modelam as suas interacções com o ambiente para alcançarem a homeostase. Flutuações mínimas nas condições de crescimento nos limites de tolerância dos sistemas celulares são tamponadas pelos componentes existentes. No entanto, em eventos em que ocorram alterações ambientais maioritariamente citotóxicas, todos os tipos de células são capazes de distinguir a natureza desse factor de *stress* e activar programas de resposta apropriados para se adaptarem e sobreviverem. Esta resposta multifacetada inclui remodelação metabólica, paragem transitória do crescimento e alterações na transcrição. A *S. cerevisiae* tem sido considerada um sistema experimental para testar hipóteses acerca da resposta ao choque térmico, sobre a natureza do mecanismo sensorial ao *stress* térmico, ou simplesmente como é que as células reconhecem subidas graduais de temperatura (Postmus, 2008; Pinto, 1989). A via de sinal Msn 2p/4p regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo, como o que codifica a hexocinase, reguladora da via glicolítica, a catalase citoplasmática, CAT T e a superóxido dismutase mitocondrial, SOD 2, participando activamente na remodelação metabólica e na resposta ao *stress* ambiental (Watanabe, 2010).

1.2. Nanopartículas, ambiente e toxicidade

A circulação e concentração pontual de novos materiais, como as nanopartículas de metais de transição, torna prioritária a sua caracterização físico-química e os seus mecanismos de acção sobre os seres vivos, uma vez que algumas dessas substâncias podem ser nefastas para o Homem, ou exibir propriedades com aplicação farmacológica.

A nanotecnologia liberta para o ambiente substâncias com dimensão entre 1 e 100 nm (Fig. 1.1) cujas propriedades físico-químicas são pouco conhecidas, bem como a influência que exercem sobre a vida, constituindo um tema de investigação aliciante em toxicologia bioquímica pela novidade do seu comportamento (EPA, 2007).

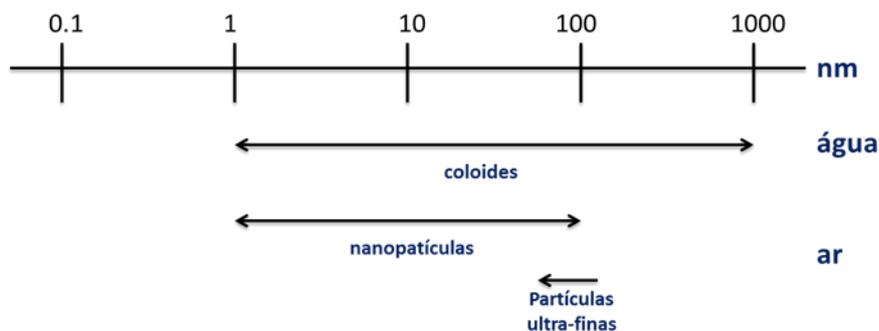


Figura 1.1- Definição de diferentes classes de partículas (adaptado de Nowack, 2010).

Apesar de os seres vivos contactarem com as nanopartículas há milhões de anos devido à sua deposição na crosta terrestre por fenómenos de vulcanismo, a sua produção e acumulação regular resultante da actividade humana é recente graças à sua aplicação em electrónica, biomedicina, fármacos, cosméticos e catálise, como ilustrado na Fig. 1.2, razão pela qual tem havido um aumento à escala mundial dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de trabalhos com nanopartículas (Nowack, 2007; Guan, 2006).

O dióxido de titânio (TiO_2) tem sido utilizado ao longo dos anos como uma substância inerte, e considerada como segura para a saúde pública pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América, permitindo a sua utilização como aditivo em fármacos e cosméticos de aplicação externa tais como protectores solares, bem como na produção de papel e plásticos (Douglas, 2000; Wang, 2007).

Estudos realizados com nanopartículas de dióxido de titânio (NP- TiO_2) em mamíferos, sugerem que estas podem ser absorvidas por inalação, ingestão e penetração dérmica,

distribuindo-se por órgãos, como pulmões (Warheit, 2007; Wang, 2007), nódulos linfáticos (Bermudez, 2004), fígado (Wang, 2007; Jani, 1994), rins (Wang, 2007) e cérebro (Thomas., 2006).

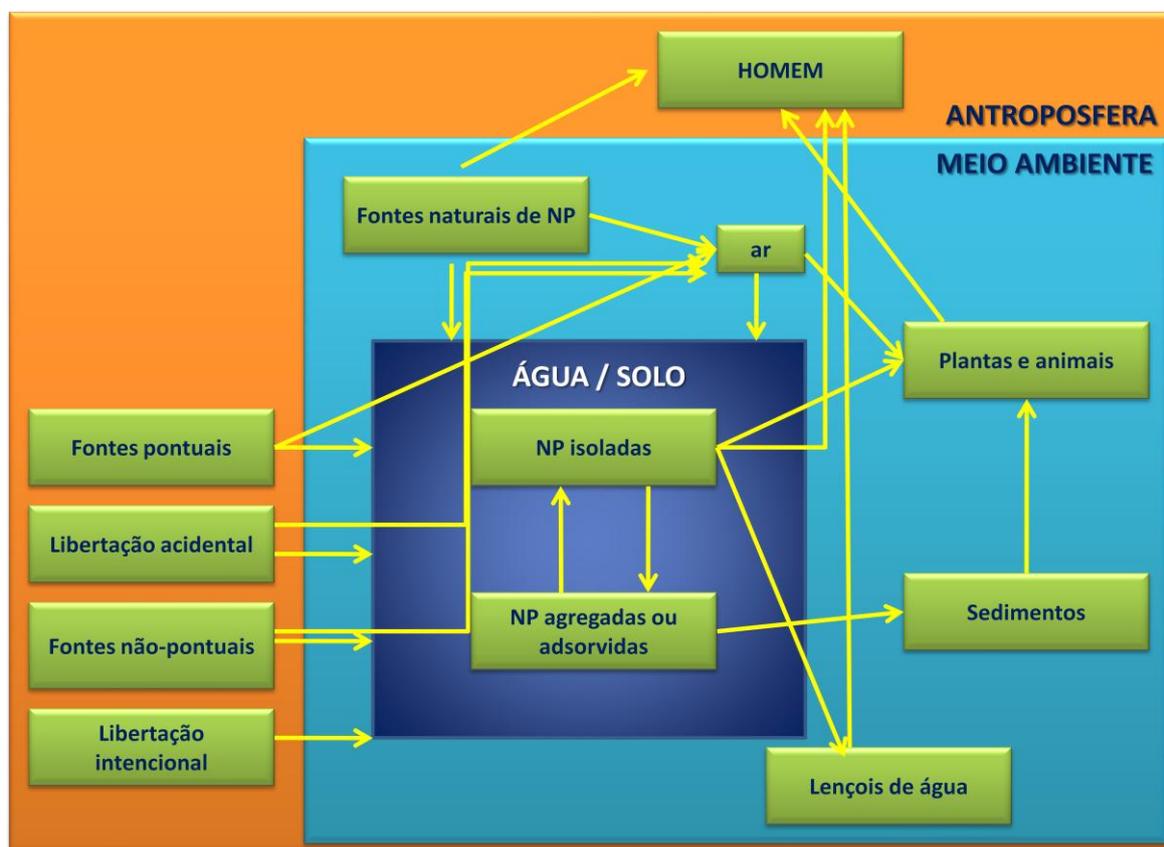


Figura 1.2- Vias de circulação de nanopartículas antroposfera/ambiente, reacções no ambiente e exposição dos seres humanos (adaptado de Nowack, 2010)

Segundo Donaldson (2000) e Oberdorster (2000), a dimensão das nanopartículas condiciona a sua toxicidade sendo muitas vezes mais importante do que a composição das mesmas, devido ao aumento da área superficial, à medida que a sua dimensão diminui (Fig. 1.3) que no caso das nanopartículas metálicas produz alterações das suas propriedades magnéticas e termodinâmicas (Huang, 2010; Wang, 1998).

O titânio é um elemento de transição que apresenta excelentes propriedades físicas, entre as quais se destaca o seu elevado ponto de fusão (1668 °C) e de ebulição (3287 °C), a baixa massa específica (4,54 g.cm⁻³) e o módulo de elasticidade acima de 12,7 x 10⁴ MPa (Lide, 2001; Kononen, 2001). Este metal combina-se muito facilmente com outros elementos principalmente gases, como o hidrogénio, o azoto e o oxigénio, os quais se dissolvem rapidamente no metal líquido ou sólido acima de aproximadamente 400 °C provocando a perda de ductilidade ou a sua fragilização.

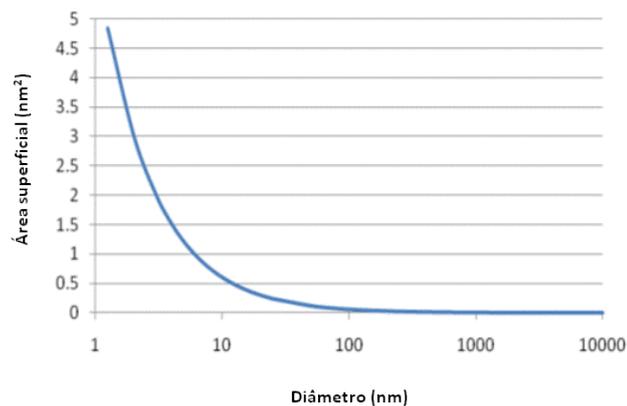


Figura 1.3- Relação entre o diâmetro das nanopartículas e a respectiva área superficial (adaptado de Huang, 2010)

O dióxido de titânio é um material polimórfico que pode ser encontrado na natureza em três fases: rutilo (tetragonal), anatásio (tetragonal) e bruquita (ortorrômbico). Geralmente a fase bruquita é instável e de baixo interesse industrial. A fase rutilo forma-se a temperatura elevada ($> 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$), enquanto que a fase anatásio forma-se a temperaturas inferiores (cerca de $450\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Wang, 2007).

Ferin e Oberdorster (1985) demonstraram que tanto a forma anatásio como a rutilo do TiO_2 é tóxica, e que o seu tempo de retenção nos organismos vivos é muito longo (51-53 dias). A forma anatase de TiO_2 foi apontada como a mais tóxica de todas as fases que este composto pode apresentar, induzindo danos no DNA, peroxidação lipídica e formação de micronúcleos (Federici, 2007; Long, 2006)

A nanotoxicologia, um campo emergente de investigação, estabelece que as nanopartículas possuem três propriedades peculiares que condicionam a sua acção: massa fixa, densidade unitária e bioreactividade em superfícies (Curtis, 2006; Oberdorster, 2005). Estudos recentes têm revelado que este tipo de materiais comporta-se como gerador de espécies reactivas de oxigénio, ROS, facto que justifica a importância da sua introdução em estudos de *stress* (Huang, 2010; Stone, 2006).

1.3. Stress oxidativo e metais

A utilização do O_2 pelos primeiros seres autotróficos, provavelmente como aceitador de cadeias de transporte de electrões, levou ao desenvolvimento de sistemas antioxidantes para os proteger da toxicidade das ROS, geradas nas várias etapas do metabolismo aeróbio, sistemas que facilitaram a adaptação desses seres vivos ao dioxigénio (Sheu, 2006; Droge, 2002). As células vivas em condições aeróbias encontram-se pois continuamente expostas a

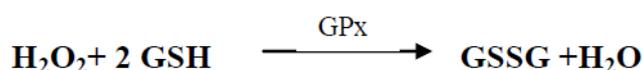
oxidantes de origem endógena, como o radical anião superóxido, o peróxido de hidrogénio e lipoperóxidos, ROS que se formam no mitocôndrio e sistemas membranares, bem como metais e xenobióticos de origem exógena (Chen, 2000; Halliwell, 1999; Berlett, 1997).

As espécies reactivas geradas pela cadeia respiratória, lipoxigenases, superóxido dismutases e NADH oxidases, são entidades quimicamente instáveis com capacidade para induzir *stress* oxidativo que se manifesta quando a quantidade de ROS formada supera a capacidade antioxidante da célula. Este pode manifestar-se pontualmente e contribuir para activação de vias de sinalização celular, ou tornar-se crónico provocando danos e morte celular por apoptose ou necrose (Halliwell, 2006; Mathews-Roth, 2000; Halliwell, 1999; Tyrrell, 1995; Taira, 1992).

A oxidação de moléculas-alvo, como o DNA, proteínas e lípidos pode ocorrer por remoção de um átomo de hidrogénio ou de um electrão, ou ainda por adição de oxigénio. A oxidação do DNA e de proteínas pode inviabilizar a transcrição e a tradução, ou ainda formar aductos após a tradução que determinam o funcionamento inadequado de receptores ou de enzimas, levando ao bloqueio de funções celulares vitais (Kaplán, 2007). Por outro lado, a peroxidação lipídica compromete a integridade membranares, bem como a regulação de processos bioquímicos dependentes da compartimentação celular (Poulsen, 2005; Sohal, 1996).

O ambiente intra-celular, usualmente redutor é estabilizado nas leveduras por sistemas de oxidação-redução, como aquele em que participa o glutathione. A detecção de alterações no estado redox da célula constitui, em geral, um bom indicador de *stress* oxidativo (Zechmann, 2008; Rodriguez, 2003).

O glutathione (GSH) encontra-se presente em quantidade elevada na maior parte das células vivas, incluindo os seres procariontes, evitando a transição para um estado oxidante quando na célula ocorrem alterações endógenas do metabolismo, geradoras de ROS, ou é exposta a agentes de *stress* como os metais de transição (Babušíková, 2008; Penninckx, 2002). O GSH, através do seu grupo sulfidrílo captura espécies reactivas de oxigénio convertendo-se em dissulfureto de glutathione (GSSG) de acordo com a reacção catalisada pelo enzima GPx (Abegg, 2010; Schafer, 2001; Anderson, 1998):



integrada no ciclo de oxidação-redução do glutathione do qual também faz parte o enzima glutathione redutase, implicado na regeneração dos equivalentes redutores sob a forma de GSH

a partir do dissulfureto de glutationo GSSG. O funcionamento deste ciclo é assistido pelo enzima G6PD, regulador da via das pentoses fosfato que gera equivalentes redutores sob a forma de NADPH, utilizados pelo enzima glutationo redutase, GR (Fig. 1.4) (Gonzalez-Parraga, 2008; Espindola, 2003; Rice-Evans, 1996; Scruton, 1990).

O funcionamento adequado da célula viva corresponde, em geral, a situações que maximizam a razão GSH/GSSG, garantia de um ambiente fortemente redutor e estável. Por esse motivo, alterações neste parâmetro são utilizadas frequentemente para indicar *stress* oxidativo, que pode despoletar fenómenos como crescimento e diferenciação celular, activação de vias de sinalização e apoptose (Kim, 2006; Kon, 2004; Pias, 2003; Espindola, 2003; Filomeni, 2002; Sen, 2000).

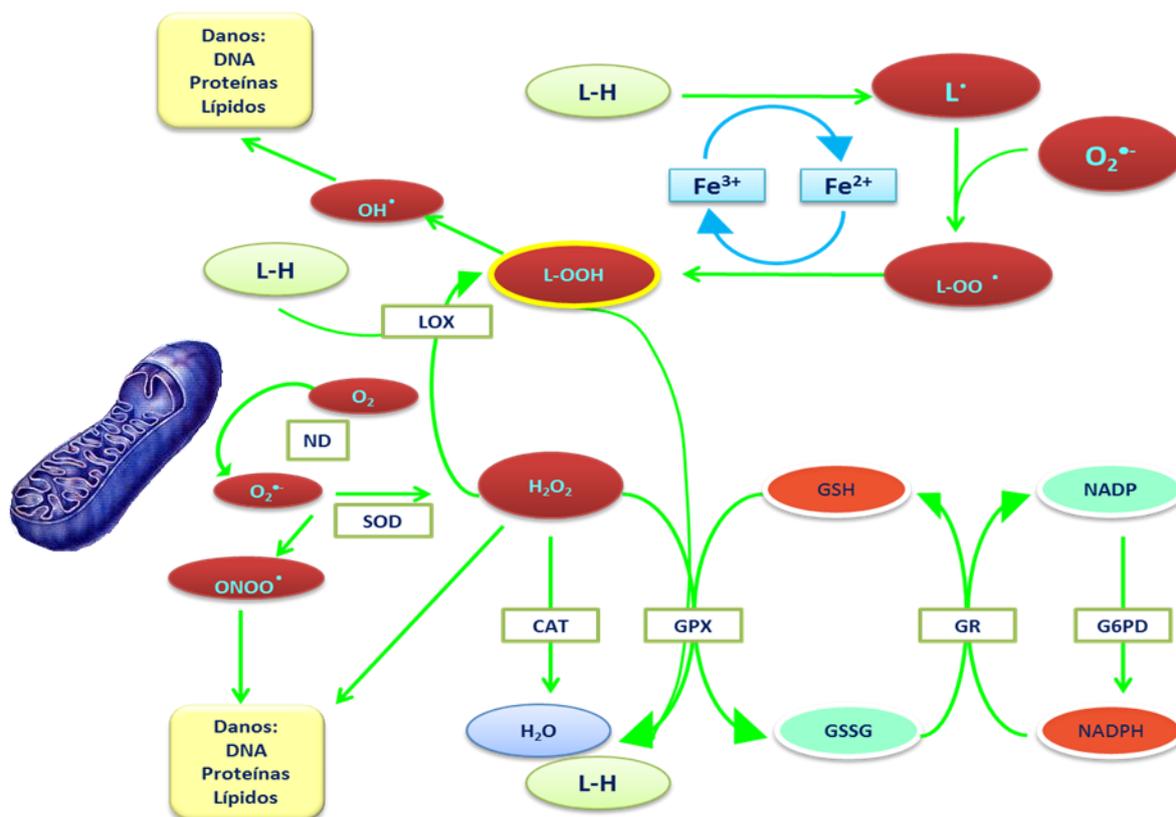


Figura 1.4- Papel das lipoxigenases na formação de lipoperóxidos e interacção metabólica com o ciclo do glutatão, um mecanismo de desintoxicação celular (adaptado de Brash, 1999).

Por vezes a geração de espécies reactivas de oxigénio na presença de metais de transição pode ocorrer de acordo com as clássicas reacções de Fenton, podendo formar-se o radical hidroxilo, um oxidante potente capaz de gerar radicais lipídicos que na presença do radical anião superóxido se podem converter em lipoperóxidos (Ďurfinová, 2010; Federico, 2007; Chen, 2000; Berlett, 1997). As lipoxigenases catalisam a oxidação de resíduos acilo

polinsaturados, contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, a lipoperóxidos (Hall, 2004; Batista, 2002; Siedow, 1991). Em células danificadas por agentes patogénicos ou mecânicos, ocorre uma degradação sequencial dos seus componentes lipídicos que envolve também a participação de lipoxigenases e leva à formação de lipoperóxidos (Fig. 1.4) (Hu, 2011; Batista, 2002; GafSney, 1996; Croft, 1993; Farmer e Ryan, 1992). Os substratos maioritários das lipoxigenases são os ácidos linoléico e linolénico (Hall, 2004; Wang, 1999; Farmer e Ryan, 1992; Hildebrand, 1988). As ROS como o radical anião superóxido, e o radical hidroxilo, formam-se durante a redução do oxigénio molecular. O potencial dessas espécies para a produzir danos sobre as biomoléculas é elevado, despoletando, por vezes; outros sistemas antioxidantes como os enzimas catalase, que catalisam a conversão de peróxidos em água. (Flekac, 2008; Izawa, 1996; Kono, 1982)

1.4. Levedura - modelo biológico em estudos de stress

O ambiente natural onde crescem os organismos vivos é aquele em que uma população localizada aumenta exponencialmente até exceder a sua capacidade ou encontrar factores limitantes. A população então colapsa com a maior parte das células morrendo, revertendo a uma taxa metabólica muito baixa, ou esporolando. O período de tempo destes ciclos pode ser curto e medido em horas. Todas as células que crescem em ambientes aquosos, devido à elevada capacidade térmica mássica da água, resistem a alterações rápidas da temperatura. Em estudos termodinâmicos, pode-se garantir que a temperatura de crescimento microbiano permanece constante durante um ciclo de crescimento a pressão constante. O crescimento biológico é pois um evento químico que não difere de qualquer reacção química orgânica que ocorra em meio aquoso, excepto o facto de ser extremamente complexo e por isso poder ser designado por processo. É impossível expressar de forma precisa as reacções que têm lugar no interior celular durante o crescimento. É no entanto menos difícil escrever uma equação para o processo de crescimento em termos do estado inicial de substâncias que façam parte da composição celular e que entrem na composição das células em formação, e do seu estado final, o qual engloba células e outros produtos do crescimento (Pinto, 1989).

Um dos principais desafios enfrentados pelos organismos unicelulares é o seu ambiente externo não ser estável, mas pelo contrário, o seu ambiente interno garantir a estabilidade necessária para salvaguardar um crescimento o mais ordenado possível. Alterações drásticas no ambiente têm a capacidade de romper o ambiente celular interno, afectando funções críticas da célula e deste modo evitar o crescimento normal (Gasch, 2002).

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo cujas respostas ao potencial de destruição resultante de alterações ambientais, ou *stress*, levam à atenuação ou inibição total do crescimento, pela indução de genes que codificam proteínas envolvidas na reparação de danos intra-celulares, com perda de capacidade interna de reparação dos materiais celulares e de retorno a condições de crescimento adequadas. Por outro lado, bloqueiam ainda a tradução de proteínas ribossomais, de enzimas envolvidos no metabolismo glucídico, de desintoxicação de ROS, no *folding* e degradação de proteínas, que podem ser interpretadas como uma resposta directa ao *stress* expressa em diminuição de taxa de crescimento (Gasch, 2000).

Na literatura encontra-se descrito que os níveis de ROS intracelular aumentam com a temperatura, podendo situações de choque térmico ser interpretadas como equivalentes a condições de indução de *stress* oxidativo (Sugiyama, 2000), onde a sobreposição de choque térmico com outro agente de *stress* como metais de transição pode despoletar respostas pró e antioxidantes que contribuam para a morte celular ou para a termotolerância (Jamieson, 1995). Estes factos, podem ser corroborados por estudos onde se observa que *S. cerevisiae* mutantes privadas de catalases, superóxido dismutases (SOD) e citocromo c peroxidases, enzimas antioxidantes, mostraram maior sensibilidade ao calor (50 °C) do que células onde ocorra a sobreexpressão de catalases e SOD's as quais exibem maior termoprotecção (Davidson, 1996).

A *S. cerevisiae* é um organismo eucarionte, GRAS, amplamente utilizado em estudos de *stress* oxidativo. A sua rápida disponibilidade, fácil manipulação genética, célere tempo de replicação, aliados ao facto desta levedura conter ORF's homólogas às humanas, faz deste organismo um bom modelo biológico para a investigação de mecanismos específicos de resposta ao *stress* (Costa, 2001; Ruis, 1997).

A *S. cerevisiae* UE-ME₃ é uma estirpe vínica nativa do Alentejo, Portugal e possui propriedades fisiológicas específicas e únicas que lhe facilitam a sobrevivência em ambientes extremos, como o dos mostos onde ocorrem níveis elevados de glúcidos (140-160 g/L) e de álcool (superior a 15 % (v/v)), pH ácido (3,0- 3,5) e baixo teor em azoto, lípidos e vitaminas (Carrasco, 2001; Bauer, 2000). A estirpe UE-ME₃ é desde há alguns anos utilizada no Laboratório de Bioquímica Analítica da Universidade de Évora, em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Candeias, 2010; Rosado, 2009; Ferreira, 2006).

A *S. cerevisiae* BY4741 é uma estirpe comercial adaptada em laboratório, pertencente à colecção da Eurocast que deriva da S288C (Brachmann, 1998) e que tem sido exaustivamente utilizada na sequenciação sistemática do genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau, 1996) e em

estudos fisiológicos e bioquímicos (Paciello, 2009; Belinha, 2007; Cohen, 2007). Por esse motivo constitui um bom modelo de comparação com a estirpe vínica nativa.

2- Problema e objectivos

2.1- Problema

A presença de nanopartículas na natureza é ubíqua, sendo a sua origem maioritariamente geológica e ligada a fenómenos de vulcanismo. Por esse motivo é expectável que a grande maioria dos seres vivos tenham desenvolvido filogeneticamente mecanismos adaptativos aos níveis ambientais pré-industriais.

A natureza inerte e baixa toxicidade dos compostos de titânio, incluindo nanopartículas geradas por estimulação ultra-sónica, reconhecidas por organizações internacionais, tem incrementado a sua utilização na indústria da cosmética e do medicamento, óptica, electrónica e aeroespacial, criando focos de pressão ambiental deste tipo de compostos. Embora preocupações ecológicas, descritas na literatura, justifiquem alguns estudos complementares para avaliar a resposta pelos seres vivos a este tipo de materiais, não se encontram relatadas estratégias experimentais com a preocupação de avaliar propriedades de nanopartículas de titânio como princípio activo e eventual aplicação terapêutica.

A elevada capacidade térmica mássica da água garante que as células em crescimento sejam capazes de resistir a alterações rápidas de temperatura. O crescimento biológico é considerado por diversos autores como um evento químico que não se distingue de qualquer reacção orgânica em meio aquoso, excepto pela sua complexidade, sendo possível avaliar este processo em termos do estado inicial das substâncias que fazem parte da composição das células em formação, e do seu estado final que engloba as células e produtos do crescimento. Alterações drásticas extracelulares podem romper o ambiente interno da célula, afectando funções críticas e prejudicando o crescimento.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um modelo eucariota, cujas respostas ao potencial de destruição resultante de alterações ambientais, ou *stress*, conduzem à atenuação ou até à inibição total do crescimento, no seguimento da indução de genes que codificam funções de reparação de danos intra-celulares, sem retorno a condições de crescimento adequadas.

Consequentemente estudos que avaliem a influência da temperatura, do choque térmico e da exposição a nanopartículas sobre processos metabólicos que modelam a multiplicação de *S. cerevisiae*, preocupação desta dissertação, poderão abrir portas a um novo campo no controlo da proliferação celular de eucariotas, eventualmente aplicável em biomedicina.

2.2 - Objectivos

2.2.1 - Objectivo geral

Avaliar a influência da temperatura e do choque térmico na proliferação de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, em presença de NP-TiO₂.

2.2.2 - Objectivos específicos

Conhecer e compreender:

- ✓ as propriedades físico-químicas das NP-TiO₂ e o protocolo para a sua preparação;
- ✓ a curva de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741;
- ✓ a influência da temperatura, choque térmico e/ou exposição a NP-TiO₂ sobre o crescimento, actividades enzimáticas ALP, G6PD, GR, GPx, CAT T, CAT e LOX, capacidade antioxidante, medida pela razão GSH/GSSG e DPPH, bem como níveis intracelulares de MDA em *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741.

Valorizar:

- ✓ as propriedades físico-químicas das NP-TiO₂, bem como o protocolo para a sua preparação;
- ✓ a influência da temperatura e/ou exposição a NP-TiO₂ no crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741;
- ✓ a influência do choque térmico e/ou exposição a NP-TiO₂ no crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741;
- ✓ alterações dependentes da temperatura, choque térmico e/ou exposição a NP-TiO₂ na disponibilidade citoplasmática em tióis não-proteicos, indicadores do crescimento celular e de *stress* oxidativo, na capacidade antioxidante para capturar radicais livres, detectada pelo DPPH, bem como nos níveis citoplasmáticos de MDA indicador de danos celulares;
- ✓ alterações dependentes da temperatura, choque térmico e/ou exposição a NP-TiO₂ das actividades enzimáticas ALP, marcadora da proliferação celular, G6PD e GR, marcadoras da disponibilização de equivalentes redutores, GPx, CAT T e CAT A marcadoras da resposta antioxidante contra lipoperóxidos e peróxidos, bem como da LOX, marcadora da peroxidação lipídica.

Aplicar:

- ✓ os conhecimentos adquiridos sobre a influência da temperatura, em particular do choque térmico e/ou exposição a NP-TiO₂ em *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, no controlo da proliferação celular de eucariotas.

3 - Metodologia

3.1 - Estratégia

No decorrer deste trabalho de dissertação recorreu-se a pesquisa bibliográfica, técnicas laboratoriais e de processamento matemático que permitiram atingir os objectivos definidos.

Suporte financeiro

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

Local de realização

A execução deste trabalho teve lugar no laboratório de Bioquímica Analítica, ECT, Universidade de Évora, Évora.

Período de realização

1 ano lectivo (2 semestres).

Modelo biológico

Saccharomyces cerevisiae estirpes UE-ME₃ e BY4741

Agente físico-químico de stress

Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) de dimensão molecular <100 nm; Mr 79,67gmol⁻¹; densidade 4,26 g/L a 25°C; àrea superficial >14,0 m²/g; testadas na concentração de 0,1 e 1 µg/mL no meio de cultura.

Agente físico de stress

Temperatura de 25, 28, 30, 40 e choque térmico 28/40 °C.

Procedimentos prévios

Preparação de solução de NP-TiO₂.

Ensaio

Células de *S. cerevisiae* da estirpe UE-ME₃ ou BY4741, em fase exponencial média de crescimento, cresceram durante 200 min ao valor de temperatura testado ou em choque térmico na ausência ou na presença de NP-TiO₂ (0,1 ou 1 µg/mL).

Fracções subcelulares utilizadas

sobrenadante pós-12000 g

sedimento pós-12000 g

Parâmetros analisados:

- proteínas totais
- proteínas de sedimento obtido após centrifugação a 12000 g
- proteínas do sobrenadante obtido após centrifugação a 12000 g
- peso seco
- fosfatase alcalina
- cfu
- glutatio
- dissulfureto de glutatio
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)
- glucose-6-fosfato-desidrogenase
- glutatio redutase
- glutatio peroxidase
- catalase T
- catalase A
- lipoxigenases
- malonodialdeído
- ROS

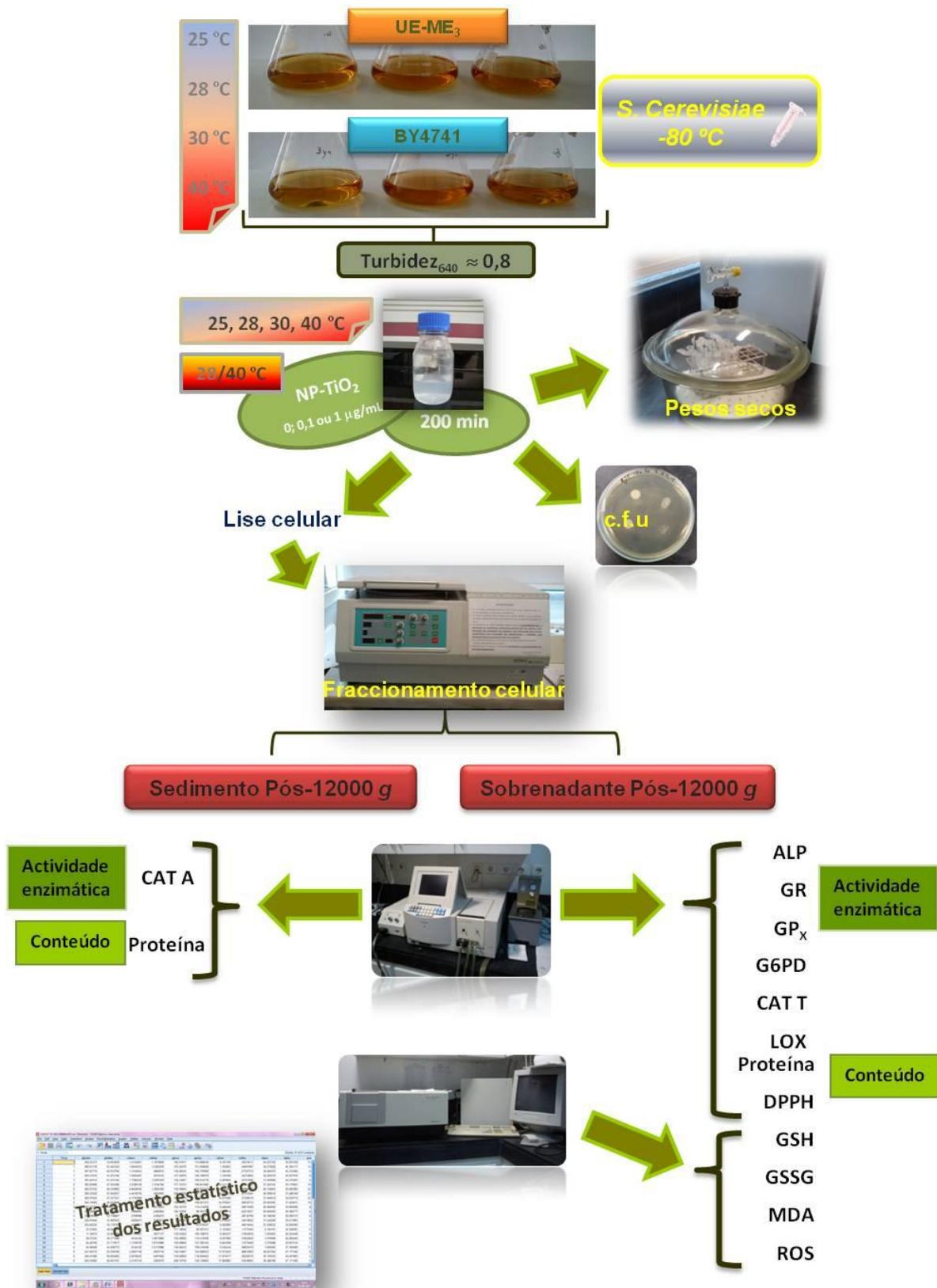
Técnicas

cultura de microrganismos;
preparação de solução de nanopartículas recorrendo homogeneização por ultra-sons;
desintegração celular por ultra-sons;
fraccionamento celular por centrifugação diferencial;
determinação de conteúdos e actividades enzimáticas por espectrometria de absorção molecular e de fluorescência.

Análise estatística de resultados

Análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan para os resultados obtidos experimentalmente, nas diferentes condições de cultura, incluindo peso seco, conteúdos e actividades enzimáticas.

3.2 - Diagrama do trabalho



3.3 - Equipamento

Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200

Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205

Autoclave da marca Selecta modelo Microclav

Banho termostatzado com agitação marca Memmert, modelo 3200 R

Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34

Vórtex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

Potenciômetro da marca Metrohm, modelo 691

Centrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K

Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450

Estufa da marca Kowell, modelo D2-1

Espectrofotômetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho com circulação de água da Grant.

Espectrômetro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC

3.4 - Reagentes

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

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

2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma, St. Louis

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

Ácido gálico, MERCK, Darmstadt

Ácido linoleico, Sigma, St. Louis

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

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

Cloreto de magnésio hidratado, 99%, Sigma, St. Louis

Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt

Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt

Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), 97,0 %, Sigma, St. Louis

Duodecilsulfato de sódio, Sigma, St. Louis

Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt

Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (sal sódico), 98,0%, Sigma, St. Louis

Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), 98,0%, Sigma, St. Louis

Glicilglicina, 98,0%, MERCK, Darmstadt

Glucose-6-fosfato desidrogenase, pró-análise, Sigma, St. Louis

Dissulfureto de Glutathione, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis

Glutathione redutase, pró-análise, Sigma, St. Louis

Glutathione, pró-análise, Sigma, St. Louis

Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt

Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt

Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt

N-etilmaleimida, 97,0%, Sigma, St. Louis

Nanopartículas de dióxido de titânio, pró-análise, Sigma, St. Louis

o-fetaldeído, pró-análise, Sigma, St. Louis

Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30%, Sigma, St. Louis

Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteu, pró-análise, Sigma, St. Louis

Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5 %, Panreac, Barcelona

Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt

t-butil hidroperóxido, pró-análise, Sigma, St. Louis

Tris-(hidroximetil)-aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt

Tween 20, pró-análise, MERCK, Darmstadt

3.5 - Procedimento Experimental

3.5.1 - Cultura de microrganismos

Neste estudo utilizou-se como modelo biológico duas estirpes do eucariota unicelular *Saccharomyces cerevisiae* L. A estirpe UE-ME₃ foi isolada de mostos de vinhos regionais do Alentejo encontrando-se depositada na coleção do laboratório de Enologia da Universidade de Évora e desde há alguns anos utilizada no nosso laboratório em estudos bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Candeias, 2010; Rosado, 2009; Ferreira, 2006). A estirpe BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ; EUROSCARF, Germany) adaptada em laboratório é referida na literatura em estudos de *stress* (Belinha, 2007; Cohen, 2007). No nosso laboratório as leveduras encontram-se armazenadas a -80 °C em meio de cultura com glicerol.

As células durante o ensaio de avaliação da influência da temperatura e de NP-TiO₂ na proliferação celular cresceram em meios YEPD preparados pela dissolução de extracto de levedura (1 %) e peptona (2 %) em água ultra-pura seguido de esterilização pelo calor húmido e posterior adição de glucose (2 %), esterilizada por filtração (0,22 µ).

As células das estirpes UE-ME₃ e BY4741 mantidas a -80 °C foram utilizadas para obter culturas frescas posteriormente utilizadas para iniciar o ensaio pela inoculação de meio YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) e deixadas crescer com agitação constante (150 rpm) à temperatura de 25, 28, 30 ou 40 °C, acompanhando-se o seu crescimento por leitura da turbidez a 640 nm. O ensaio de exposição às NP-TiO₂ nas diferentes temperaturas iniciou-se quando as células estavam na fase exponencial média de crescimento (turbidez ≈ 0,8) pela adição de água ultra-pura estéril ou da solução de NP-TiO₂, previamente preparadas de acordo com 3.5.2, obtendo-se para ambas as estirpes de *S. cerevisiae* o ensaio na ausência de nanopartículas e os de exposição a 0,1 ou 1 µg/mL de NP-TiO₂. As leveduras cresceram durante 200 min ao valor de temperatura igual ao inicial ou, no caso do choque térmico, a cultura que tinha crescido a 28 °C passou para 40 °C (28/40 °C).

3.5.2 - Preparação de nanopartículas

O agente físico-químico de *stress* objecto de estudo nesta investigação, as nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂), de tamanho inferior a 100 nm, e grau de pureza superior a 97 % foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Os ensaios de exposição de *S. cerevisiae* a nanopartículas presentes no meio YEPD foram possíveis após a preparação de uma solução concentrada de NP-TiO₂ (10 g/L) em água ultra-pura estéril recorrendo a homogenização em banho de ultra-sons durante 40-60 min com frequência de 35 kHz. A qualidade da preparação de NP-TiO₂ foi determinada traçando o espectro de absorção molecular entre 250 e 700 nm com máximo de absorção a 329 nm (Fig. 3.1) (Federici, 2007; Lovern e Klaper, 2006).

A utilização deste tipo de nanopartículas deve-se ao facto de já existirem estudos que apontam para a possibilidade da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio poder induzir respostas inflamatórias devendo-se a sua toxicidade ao tamanho da partícula e à sua área superficial (Warheit, 2007; Monteiller, 2007; Renwick, 2004; Dick, 2003; Rehn, 2003).

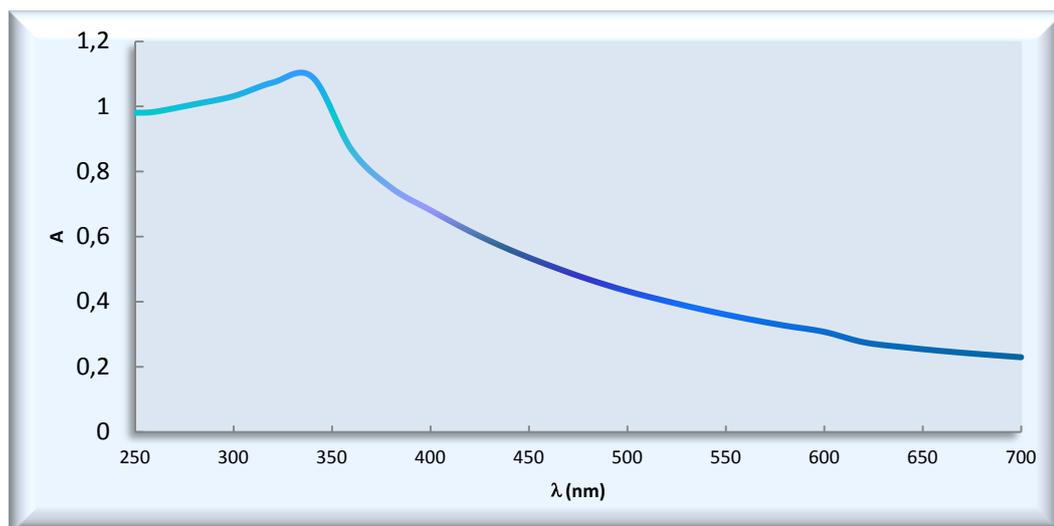


Figura 3.1- Espectro de absorção molecular de NP-TiO₂ imediatamente antes da adição ao meio YEPD.

3.5.3 - Contagem de cfu

A determinação de cfu foi efectuada no final do ensaio, após diluição adequada das amostras, inoculação em meio sólido e incubação a 28 °C, até não se observar o aparecimento de novas colónias (Madigan, 2004; Pelczar, 1993).

3.5.4 - Determinação do peso seco

A determinação da quantidade de biomassa formada nas diferentes condições de *stress* foi realizada pelo peso seco no final do ensaio. Assim, foram recolhidas alíquotas em todas as situações em cinco experiências independentes e levadas à secura em estufa a 80 °C até se observar peso constante.

3.5.5 - Obtenção de fracções celulares

No final do ensaio de exposição a NP-TiO₂ durante 200 min a temperatura controlada, as células foram recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 10 min, lavadas em água bidestilada estéril, ressuspensas em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 e desintegradas recorrendo a homogeneizador de ultra-sons (10 s 3 x 5 min; 0,1 kHz pulso).

Os homogeneizados foram submetidos a centrifugação diferencial a 12000 g durante 20 min recolhendo-se o sobrenadante pós-12000 g e resuspendendo o sedimento pós-12000 g em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. As fracções celulares obtidas foram repartidas em alíquotas e

guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior determinação de conteúdos celulares e actividades enzimáticas (Lake, 1987; Sugimoto, 1990).

3.5.6 - Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteína total e das fracções celulares estudadas, foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry (1951). Este método fundamenta-se na reacção que se estabelece entre os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano presentes nas proteínas e o reagente de Folin-Ciocalteu, catalisada por iões Cu^{2+} , a pH alcalino que gera como produto final um complexo de heteromolibdénio que apresenta cor azul intensa. A elevada sensibilidade deste método justifica a sua escolha, assim como o facto de alguns interferentes, como aminoácidos e seus derivados encontrarem-se muito diluídos.

O reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1 % (p/v) e tartarato de sódio e potássio 0,2 % (p/v) em carbonato de sódio a 2 % (p/v) foi preparado imediatamente antes da sua utilização. Adicionou-se a 0,250 mL de solução-padrão de BSA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou de amostra diluída em NaOH (0,5 M), a 1,25 mL de reagente de Lowry. Agitou-se no vórtex e após 10 min adicionou-se 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu comercial, diluído 1/2 em água ultra-pura. Agitou-se e deixou-se em repouso 30 min à temperatura ambiente, antes da leitura da absorvência a 720 nm. Os valores de absorvência obtidos para os padrões de BSA permitiram traçar a curva de calibração até 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. A1) a partir da qual foi possível determinar a concentração de proteínas nas amostras por interpolação gráfica.

3.5.7 - Quantificação do GSH e GSSG

O tripeptído glutationo, γ -glutamil-l-cisteinilglicina (GSH) é composto por resíduos de glutamato, glicina e cisteína, contendo um grupo sulfidrilo que desempenha o papel de nucleófilo e redutor. O GSH sofre oxidação reversível a dissulfureto de glutationo (GSSG). O glutationo (GSH) é considerado um dos componentes mais importantes do sistema defensivo antioxidante da célula estando presente em concentração elevada no citoplasma, no núcleo e no mitocôndrio, evitando os danos causados por ROS.

A razão GSH/GSSG permite avaliar o estado redox da célula viva nomeadamente em presença de agentes de *stress*. Além disso, a soma (GSH+GSSG) é uma medida da reserva celular em tióis não-proteicos.

Na determinação do conteúdo em GSH e GSSG recorreu-se ao OPT para desenvolver um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência e à NEM para sequestrar o GSH endógeno respectivamente, tendo sido construída uma curva de calibração para cada parâmetro a avaliar, de acordo com o descrito por Hissin (1976).

Para a preparação da mistura de reacção de quantificação do GSH, alíquotas de sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada, padrão (GSH) ou tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, no caso do branco, foram adicionadas a tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 com EDTA (0,005 M) e OPT na proporção de 1:30:2. A mistura de ensaio foi agitada e após 15 min de incubação à temperatura ambiente leu-se a potência de fluorescência a λ_{exc} 350 nm e ao λ_{em} 420 nm. A concentração em GSH, por g de peso seco, no sobrenadante pós-12000 g das amostras, foi determinada por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente construída com padrões de GSH, para o intervalo de concentração 0-100 μ M (Fig. A2).

A quantificação do GSSG (Carru, 2003) foi realizada em alíquotas de sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada, incubadas durante 30 min com NEM, numa concentração final de 20 μ M. Esta mistura reaccional foi adicionada a OPT comercial e NaOH (0,1 M) na proporção 1:1:18, incubando 15 min à temperatura ambiente. A sua potência de fluorescência foi lida ao λ_{exc} 350 nm e ao λ_{em} 420 nm. A concentração em GSSG, por g de peso seco, na fracção sobrenadante pós-12000 g das amostras foi calculada por interpolação gráfica, recorrendo a curva de calibração previamente construída com GSSG para o intervalo de concentração 0-80 μ M (Fig. A3).

3.5.8 – Determinação da capacidade antioxidante pelo DPPH

O método de determinação da capacidade antioxidante designado por DPPH (Brand-Williams, 1995) baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes presentes na amostra, produzindo um decréscimo da absorvência a 515 nm. Este método foi modificado por Sánchez-Moreno (1998) para medir os parâmetros cinéticos. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido directamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A mistura de reacção era constituída pelo sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada, e radical DPPH (30 mg/L) na qual foi lida a absorvência a 515 nm durante 120 s a 25 °C. A capacidade antioxidante, por g de peso seco, foi determinada por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente construída com ácido gálico de concentração conhecida no intervalo de 0 a 8 μ M (Fig. A4).

3.5.9 - Quantificação do malonodialdeído

O malonodialdeído é um composto que possui elevada reactividade com grupos amina, e como tal, a sua interacção com proteínas e fosfolípidos é elevada, podendo modificá-los e produzir respostas auto-imunitárias.

O procedimento adoptado para a quantificação do MDA foi fazer reagir o ácido tiobarbitúrico (TBA) com o sobrenadante pós-12000 g de cada amostra, levando à formação de um fluoróforo passível de ser quantificado por fluorescência Ohkawa (1979) e Durfinova (2007). Construiu-se uma curva de calibração para o malonodialdeído no intervalo entre 0 e 100 μM (Fig A5). O padrão de MDA foi preparado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano que o liberta por hidrólise em meio ácido (Turton, 1997). De seguida aliquotas do sobrenadante pós-12000 g reagiram com o com SDS (8,1%) TBA 0,4 % em ácido acético (10 %) pH 3,5 (1:2:30) adicionado, em banho a 95°C com agitação constante durante 1 h. Na preparação do branco usou-se tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, em vez de sobrenadante pós-12000 g.

Interrompeu-se a reacção colocando os tubos a 4 °C durante 15 min.

Adicionou-se então *n*-butanol na proporção de 1:1 e aguardou-se 1 h até se estabelecer o equilíbrio de fases, levando posteriormente os tubos a uma centrifugação de 1600 g, durante 10 min.

O sobrenadante foi recolhido e utilizado nas leituras de potência de fluorescência recolhendo-se a λ_{exc} 515 nm e λ_{em} 553 nm.

3.5.10 - Quantificação de ROS

O nível de ROS na amostra foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel (1990) que utiliza o 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH) para estimar os níveis de peróxido de hidrogénio. A DCFH na presença de peróxido de hidrogénio é rapidamente oxidada a DCF que apresenta fluorescência elevada. Fez-se reagir alíquotas do sobrenadante pós-12000 g com 2 mL de solução DCFH (1M) preparada em tampão fosfato (25 mM) pH 7, 4 e tampão tris-HCl (40 mM) pH 7,4 na proporção 1:40, durante 10 min a 37 °C, após o que se leu a potência de fluorescência da mistura a λ_{exc} 488 de nm e a λ_{em} 525 nm. Calculou-se a quantidade de ROS nas amostras por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente preparada com peróxido de hidrogénio no intervalo de 0-400 μM (Fig. A6).

3.5.11 - Determinação de actividades enzimáticas

3.5.11.1 - Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina constitui um marcador enzimático funcional de proliferação celular, utilizado em estudos de toxicidade por metais. A sua actividade catalítica foi determinada no sobrenadante pós-12000 g de acordo com o método proposto por Bretauiere (1984) acompanhando a hidrólise das ligações fosfoéster do substrato cromogéneo sintético p-nitrofenilfosfato (pNPP), pelo aumento de absorvência a 405 nm devido à formação de p-nitrofenol (pNP), produto da reacção e fosfato inorgânico.

As alíquotas de fracção sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada de proteína (0,15 mg/mL) foram incubadas em células de absorção que continham a mistura de reacção constituída por pNPP (6 mM) em tampão Tris-HCl (0,5 M) pH 8,5. Os valores de actividade ALP referente a cada amostra foram calculados a partir do coeficiente angular de curvas de reacção lineares ($0,9291501 < r < 0,999714$, Fig. A7), traçadas ao longo de 180 s a 37 °C, utilizando o coeficiente de absorvência molar para o pNPP de $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.11.2 - Glucose-6-fosfato desidrogenase

O enzima glucose-6-fosfato desidrogenase catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona com a concomitante produção de NADPH sendo o enzima regulador da via das pentoses fosfato cuja actividade é modelada pela razão NADPH/NADP⁺.

A actividade enzimática foi determinada em alíquotas do sobrenadante pós-12000 g (concentração proteína 0,15 mg/mL) de acordo com o método proposto por Postma (1989) e Bergmeyer (1983) utilizando como meio de reacção, solução tampão tris-HCl (50 mM) pH 8,0, contendo NADP⁺ (dissódico) (400 µM), MgCl₂.6H₂O (5 mM). Iniciou-se a reacção com a adição de G6PD (5 mM), após estabilização a 37°C durante 1 min. Os valores de absorvência a 340 nm, lidos contra um branco onde a amostra foi substituída por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, foram registados ao longo de 180 s.

A actividade enzimática foi então determinada pelo coeficiente angular das curvas de reacção ($0,945284 < r < 0,998512$, Fig. A8), utilizando o coeficiente de absorvência molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.11.3 - *Glutathione reductase*

O enzima GR que catalisa a redução de GSSG a GSH, utilizando NADPH como coenzima, é uma flavoproteína pertencente ao ciclo do glutathione cuja actividade específica foi determinada no sobrenadante pós-12000 g, de acordo com o método descrito por Goldberg e Sponer (1987). A mistura de reacção constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, EDTA (15 mM), GSSG (63,5 mM) e sobrenadante pós-12000 g (concentração proteína 0,15 mg/mL), incubou durante 5 min a 37 °C. Iniciou-se a reacção com adição de NADPH (0,17 mM). A absorvência a 340 nm foi lida em contínuo durante 300 s, contra um branco com composição semelhante, à excepção da amostra que foi substituída por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A actividade enzimática foi determinada a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas ($0,994143 < r < 0,996272$, Fig. A9), utilizando o coeficiente de absorvência molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5.11.4 - *Glutathione peroxidase*

O enzima GPx desempenha um papel essencial ao reduzir lipoperóxidos e peróxido de hidrogénio a alcoóis, ou água.

A determinação desta actividade enzimática seguiu o protocolo proposto por Flohé, (1984). Preparou-se a mistura de reacção constituída por tampão fosfato (70 mM) pH 7,2, GSH (500 μM), GR (12 mU), NADPH (160 mM) e volume adequado de sobrenadante pós-12000 g (concentração de proteína 0,15 mg/mL) a qual foi incubada durante 10 min para estabilizar a temperatura a 37 °C. A reacção foi iniciada pela adição de t-BHP (100 μM). A reacção foi monitorizada pela leitura, em contínuo, da absorvência a 340 nm contra um branco com composição semelhante, com excepção da amostra, cujo volume foi substituído por tampão fosfato (10 mM) pH 7,0.

A actividade enzimática foi determinada a partir do coeficiente angular das curvas de reacção obtidas ($0,934933 < r < 0,967419$, Fig. A10), utilizando o coeficiente de absorvência molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5.11.5 - *Catalases T e A*

Os enzimas designados como catalase têm como função decompor o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água e dióxigénio, os quais são menos nocivos para a célula, pertencem à subclasse das oxidoredutases e são enzimas com distribuição ubíqua pelos seres vivos. Encontra-se em leveduras sob 2 formas, a T (citoplasmática) e a A (peroxissomal).

Neste trabalho a determinação da actividade enzimática foi realizada de acordo com o método proposto por Beers (1952) acompanhando a degradação do H_2O_2 pela variação de absorvência a 240 nm, a 25 °C, durante 120 s contra um branco constituído por meio de reacção onde a amostra foi substituída por igual volume de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. Em cada caso incubou-se sobrenadante pós-12000 g (CAT T) ou o sedimento pós-12000 g (CAT A) com concentração aproximada de proteínas de 0,035 mg/mL e 0,115 mg/mL, respectivamente, num meio de reacção composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H_2O_2 (30 mM).

A actividade enzimática foi determinada a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reacção ($0,986322 < r < 0,949147$, Fig. A11), utilizando o coeficiente de absorvência molar para o H_2O_2 de $0,0435 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5.11.6 - Lipoxigenases

Lipoxigenases são isoenzimas que catalisam a oxidação de ácidos gordos poli-insaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, para formar hidroperóxidos.

A determinação da actividade enzimática LOX foi realizada de acordo com o método descrito por Gata (1996). A mistura de reacção constituída por tampão acetato (50 mM) pH 5,6 e um volume adequado de sobrenadante pós-12000 g (0,157 mg/mL de proteína) incubou 3 min, a 27 °C, após a qual a reacção foi iniciada pela adição de ácido linoleico (10 mM), NaOH (0,02 M) e uma alíquota de Twen-20 pró-análise. O registo da absorvência a 234 nm a 27 °C durante 180 s permitiu acompanhar a formação de ácido peroxilinoleico.

A actividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente angular das curvas de reacção obtidas ($0,926687 < r < 0,992057$, Fig. A12), utilizando o valor do coeficiente de absorvência molar do ácido peroxilinoleico de $25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5.12 - Análise estatística dos resultados

Os parâmetros bioquímicos determinados, em cinco experiências independentes de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741 nas diferentes condições de *stress* físico e físico-químico deste estudo, foram submetidos a uma análise de variância simples, ANOVA I, e ao teste de significância de Duncan utilizando o programa SPSS para Windows, versão 19, licenciado para a Universidade de Évora.

4. Resultados e discussão

O plano traçado para este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência da temperatura, bem como do choque térmico 28/40 °C sobre a proliferação de duas estirpes de *S. cerevisiae*, na ausência e na presença de dois níveis de nanopartículas de dióxido de titânio no meio de cultura. Na secção 4.1 são lidos e discutidos os resultados obtidos com a estirpe UE-ME₃, enquanto que a secção 4.2 dedica-se maioritariamente à leitura e discussão dos resultados obtidos com a estirpe BY4741, fazendo-se sempre que possível uma discussão mais alargada que compare os resultados entre estirpes.

4.1 - *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃

4.1.1 - Crescimento celular

O crescimento celular em qualquer sistema biológico pode ser definido como o aumento ordenado de todos os seus componentes químicos. O aumento da biomassa por si só poderá não indicar o crescimento real uma vez que, as células poderão estar apenas a aumentar o seu conteúdo em produtos de reserva. Durante um período de crescimento equilibrado a duplicação da biomassa é acompanhada pelas restantes propriedades mensuráveis da população, como por exemplo proteínas, RNA, DNA, tióis não proteicos e água intracelular, pois as culturas em crescimento equilibrado mantêm uma composição química constante. Contudo, a determinação do peso seco, proteína ou tióis não-proteicos são apenas uma medida da quantidade de biomassa produzida num determinado período de tempo, não discriminando materiais provenientes de células mortas e vivas. A contagem de unidades de formação de colónias (cfu) permite estimar o crescimento em termos de células viáveis, pelo que, a estimativa do crescimento celular pelo conteúdo em proteína, tióis totais não-proteicos, peso seco, actividade ALP e cfu foram as opções neste trabalho (Madigan, 2004; Pelczar, 1993).

Os resultados representados na Fig. 4.1A mostram que o conteúdo total em proteínas diminuiu significativamente com a temperatura entre 28 e 40 °C, detectando-se valores idênticos em células crescidas a 25 e 28 °C. No que diz respeito à resposta às nanopartículas, observou-se que a presença de NP-TiO₂ no meio de cultura em células crescidas a 25 e 30 °C provocou um aumento do conteúdo total em proteínas, apenas significativo ($p < 0,01$) para o nível de 1µg/mL no meio de cultura. Contudo, a 28 °C não foram detectadas diferenças com

significado estatístico e a 40 °C observou-se uma resposta inversa com decréscimo do conteúdo total de proteínas no caso da concentração de 1 µg/mL ($p < 0,01$).

No que diz respeito às células expostas ao choque térmico, 28/40 °C, o nível de proteínas mostrou-se significativamente superior ao das células crescidas a 40 °C, mas o perfil de resposta ao agente de *stress* revelou-se idêntico com significado estatístico para o nível de 1 µg/mL no meio de cultura. Estes resultados sugerem que a temperatura induz morte celular traduzida por perda de biomassa que se revelou mais acentuada na presença de NP-TiO₂ na concentração de 1 µg/mL em células crescidas a 40 °C ou sujeitas a choque térmico 28/40 °C.

Quando se discriminou o conteúdo em proteínas do sobrenadante pós-12000 g (citoplasmáticas e microssomais), Fig. 4.1B, do conteúdo proteico do sedimento pós-12 000 g enriquecido em mitocôndrios e peroxissomas, fig 4.1C, as respostas observadas são divergentes entre cada fracção. Enquanto que nas proteínas do sobrenadante (Fig. 4.1B) ocorreu um perfil de resposta idêntico ao das proteínas totais, com um decréscimo deste parâmetro correlacionado com a temperatura entre 25 e 40 °C ($p < 0,01$; $r = 0,95833$) e recuperação na situação de leveduras submetidas a choque térmico para valores próximos de células crescidas a 30 °C, observou-se a ocorrência de um aumento significativo do conteúdo proteico do sedimento (Fig. 4.1C) em todas as situações de temperatura eleitas para este estudo, excepto na situação de choque térmico 28/40 °C que não apresentou diferenças significativas, quando comparado com os valores determinados em células crescidas a 25°C.

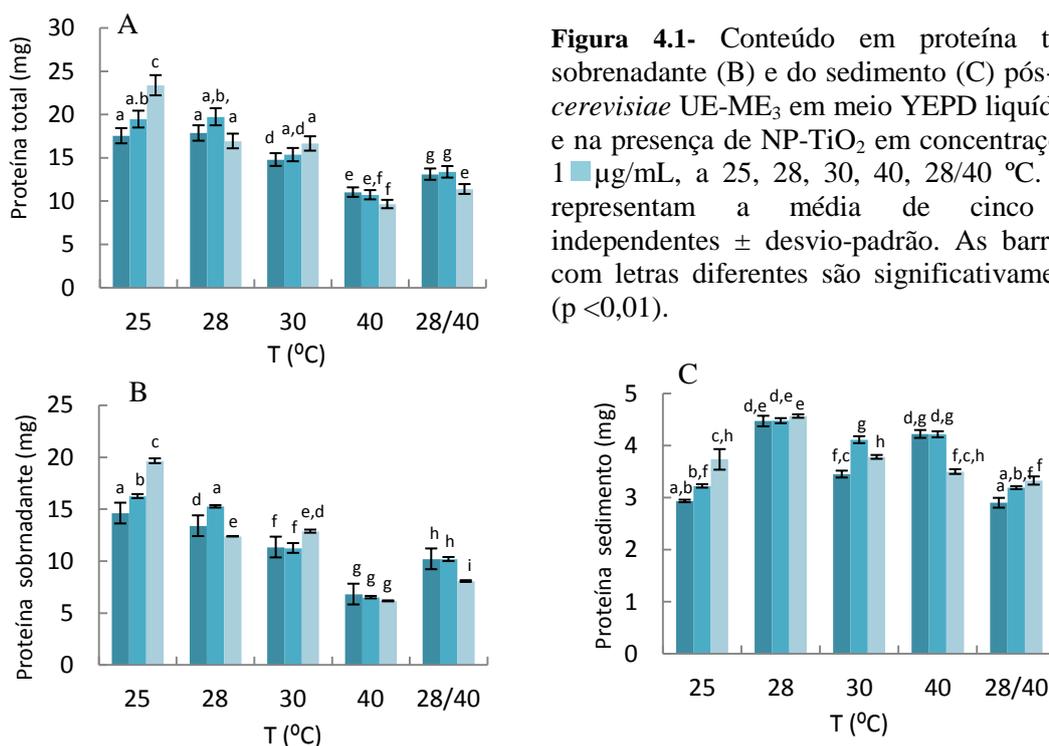


Figura 4.1- Conteúdo em proteína total (A), do sobrenadante (B) e do sedimento (C) pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD líquido, na ausência e na presença de NP-TiO₂ em concentrações de 0,1 e 1 µg/mL, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A presença de NP-TiO₂ induziu um aumento das proteínas do sedimento em células crescidas a 25, 30 e 28/40 °C com significado estatístico para qualquer dos níveis de concentração, resposta que não foi observada em células de culturas mantidas a 28 e a 40 °C, onde neste último caso até ocorreu um decréscimo significativo para as leveduras expostas a 1 µg/mL. O acréscimo do conteúdo em proteínas detectado na presença de NP-TiO₂ e descrito nas três situações anteriores pode de algum modo ser indicador de indução de síntese *de novo* de proteínas, provavelmente ao nível do mitocôndrio, facto que pode sugerir um processo activo de morte (Perrone, 2008).

Pela observação da Fig. 4.2A constata-se um acréscimo significativo da biomassa total entre células cultivadas a 25 e a 28 °C, não se observando flutuações a 25, 30 e 40 °C ($p < 0,01$). A presença de NP-TiO₂ contribuiu para um decréscimo do peso seco de células crescidas a 28 °C em qualquer dos níveis de concentração testados, assim como, um decréscimo significativo deste parâmetro em células crescidas a 40 °C e expostas ao nível de 0,1 µg/mL. Por outro lado, a Fig. 4.2B mostra-nos que o aumento da temperatura entre 25 e 28 °C causou um aumento significativo da actividade enzimática fosfatase alcalina que não se mostrou afectada em células crescidas a 30 °C mas que se apresenta com valor residual em leveduras crescidas a 40 °C, 6 % da actividade específica observada a 28 °C. No que diz respeito ao choque térmico 28/40 esta actividade enzimática apresenta o valor controlo mais elevado do que a 25, 30 e 40 °C. Relativamente à resposta à presença de NP-TiO₂ no meio de cultura, observou-se que estas a 25, 28 e 40 °C não provocaram alterações com significado estatístico, mas a 30 °C ocorreu um aumento significativo nas células expostas à concentração 0,1 µg/mL. Em situação de choque térmico, os valores da actividade enzimática ALP mostraram-se da mesma ordem de grandeza dos que foram detectados em células crescidas a 28 °C, mas neste caso a presença de NP-TiO₂ 1 µg/mL causou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) desta actividade catalítica. Os resultados obtidos em termos de fosfatase alcalina sugerem uma forte inibição da proliferação celular em células cultivadas a 40 °C quer na ausência quer na presença de NP-TiO₂. No entanto, os resultados obtidos com leveduras sujeitas a choque térmico apontam para um decréscimo significativo da proliferação celular em células com exposição a 1 µg/mL de NP-TiO₂ durante 200 min. Esta resposta contribuiu para confirmar as alterações de crescimento descritas nas Fig. 4.1A e B. No que diz respeito ao conteúdo em tióis não-proteicos (Fig. 4.2C) detectou-se um perfil de resposta à temperatura semelhante ao das proteínas totais e do citoplasma (Fig. 4.1A e B), com uma diminuição significativa deste valor. Mais uma vez a resposta às NP-TiO₂ encontra-se circunscrita e segregada pela temperatura, embora a 25 e 30 °C não se detectem alterações

com significado estatístico ($p < 0,01$), entre células cultivadas na ausência e presença do agente de *stress*. A 28 e a 40 °C observou-se um acréscimo significativo deste conteúdo nas células expostas às NP-TiO₂, que no caso dos 40 °C só foi significativamente diferente para a concentração mais baixa ($p < 0,01$). Em condições de choque térmico observou-se um decréscimo de cfu em culturas expostas a 1 µg/mL de NP-TiO₂ (Fig 4.2D).

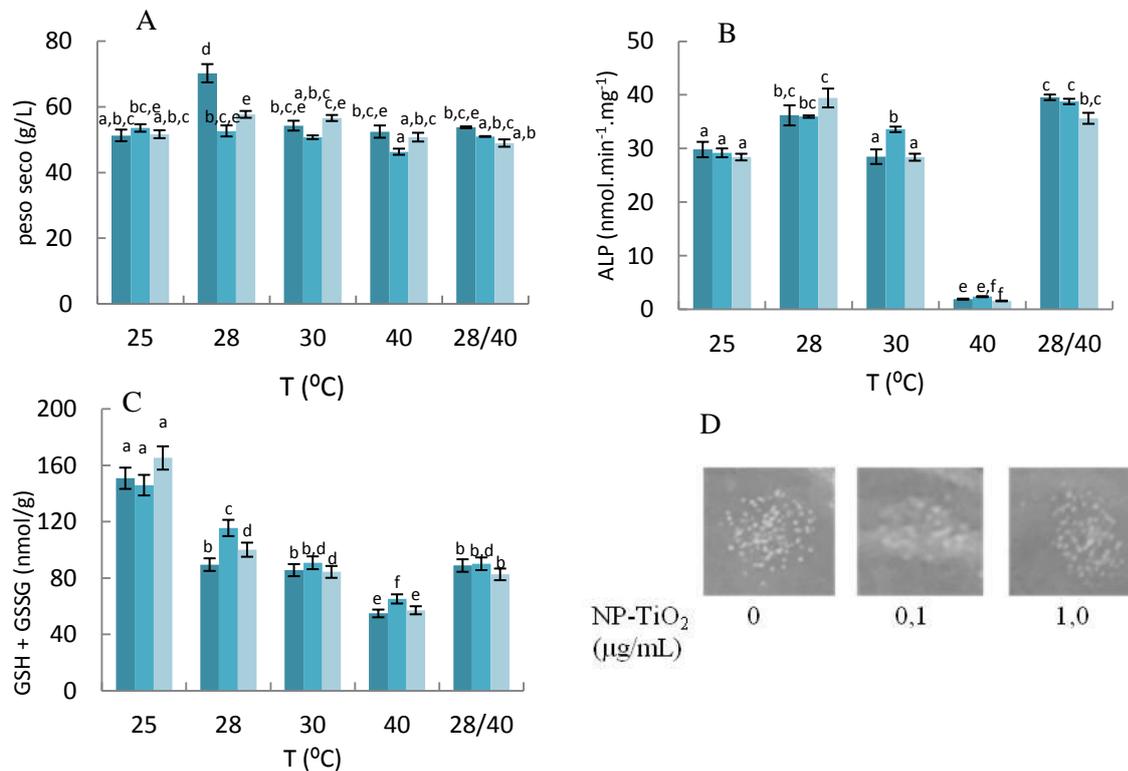


Figura 4.2- Peso seco (A) actividade enzimática ALP (B) e conteúdo em tióis não-proteicos (C) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂, 0,1 ■ ou 1 ■ µg/mL a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C; cfu de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em choque termico 28/40 °C, diluição 10⁻⁵ (D). Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A representação gráfica de Arrhenius (Fig. 4.3) expressa a dependência com a temperatura da V_{max} de ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em YEPD líquido, na ausência e na presença de NP-TiO₂ 0,1 ou 1 µg/mL entre 25 e 40 °C, de acordo com a equação (6). A actividade ALP, como hidrolase é descrita na literatura como um bom marcador do crescimento celular e de aplicação da equação de Arrhenius (Cornish-Bowden, 2001). O gráfico de Arrhenius construído com valores de temperatura de crescimento da levedura a 25, 28, 30 e 40 °C apresentou nas condições de exposição estudadas, um comportamento parabólico ($0,9982 < r < 1$; Fig. 4.3A), diferente do previsível comportamento

linear com declive negativo. O ponto de inflexão da curva em torno dos 28 °C permitiu suspeitar que a levedura nativa UE-ME₃ exibia no intervalo entre 25 e 28 °C resposta distinta daquela observada no intervalo entre 28 e 40 °C. Assim, procurou-se realizar um ajuste linear dos pontos experimentais em cada um desses intervalos, tendo-se determinado comportamento linear com declive positivo ($\Delta H^\ddagger/R$) entre 28 e 40 °C ($0,9906 < r < 0,9977$; Fig. 4.3B) e declive negativo entre 25 e 28 °C, resposta comum na ausência e na presença de NP-TiO₂ (Fig. 4.3B). Essas aproximações matemáticas, revelaram ainda que a variação da entalpia de formação do complexo de transição (ΔH^\ddagger), assumiu valor negativo entre 28 e 40 °C (-201,1 kJmol⁻¹ na ausência de nanopartículas; -189,8 e -218,3 kJmol⁻¹ na presença de NP-TiO₂ 0,1 ou 1 µg/mL) e valor positivo entre 25 e 28 °C (45,8 kJmol⁻¹ na ausência de nanopartículas; 49,3 e 79,1 kJmol⁻¹ na presença de NP-TiO₂ 0,1 ou 1 µg/mL).

Embora a variação de entalpia negativa esteja relacionada com eventos pouco usuais, na literatura, tais situações tem sido por vezes associadas com a natureza das reacções químicas que envolvem a formação e a captura de espécies químicas reactivas, instáveis. Esse é o caso da oxidação do óxido nítrico pelo dióxigénio (Olson, 2002) ou da adição de radicais hidroxilo a anéis aromáticos (Oracz, 2007; Cheney, 1996). A interpretação deste fenómeno, particularmente interessante, merece ser explorada na leitura dos resultados apresentados neste trabalho. A ΔH^\ddagger determinada entre 25 e 28 °C pode ser explicada pela geração de ROS inevitável para a ocorrência de pulsos de *stress* oxidativo, regulados por via enzimática, pró-oxidante como a que envolve LOX, NADH e NADPH oxidases e antioxidantes como CAT T e A, GR, SOD e GPx que criam condições óptimas de crescimento para a levedura da estirpe UE-ME₃ a 28 °C. No entanto, leveduras crescidas acima dos 28 °C, em particular a 40 °C poderão ter perdido essa capacidade de gerar pulsos de *stress* oxidativo, devido a desnaturação proteica. Embora a capacidade antioxidante mantida pelo glutationato (GSH/GSSG) possa conferir alguma resposta antioxidante, a quantidade disponível em tióis totais não-proteicos revelou-se insuficiente para garantir esse poder redox tamponante (Fig. 4.2C). Nessas condições o ROS formado poderá ter origem não enzimática e conduzir a condições de *stress* oxidativo crónico responsável pelo aumento de danos e consequente morte celular. Pelo que, a resposta de *S. cerevisiae* UE-ME₃ à temperatura, aqui estimada pela actividade específica ALP, pode envolver a geração de ROS provavelmente por via não enzimática. A auto-oxidação de lípidos com geração de espécies radicalares com o aumento da temperatura pode ser uma explicação possível. Esta dependência da temperatura de processos bioquímicos controla a sobrevivência e o crescimento a todos os níveis de

organização desde o indivíduo até à população (Postmus, 2008; Poulsen, 2005; Penninckx, 2002; Sohal, 1996; Pinto, 1989).

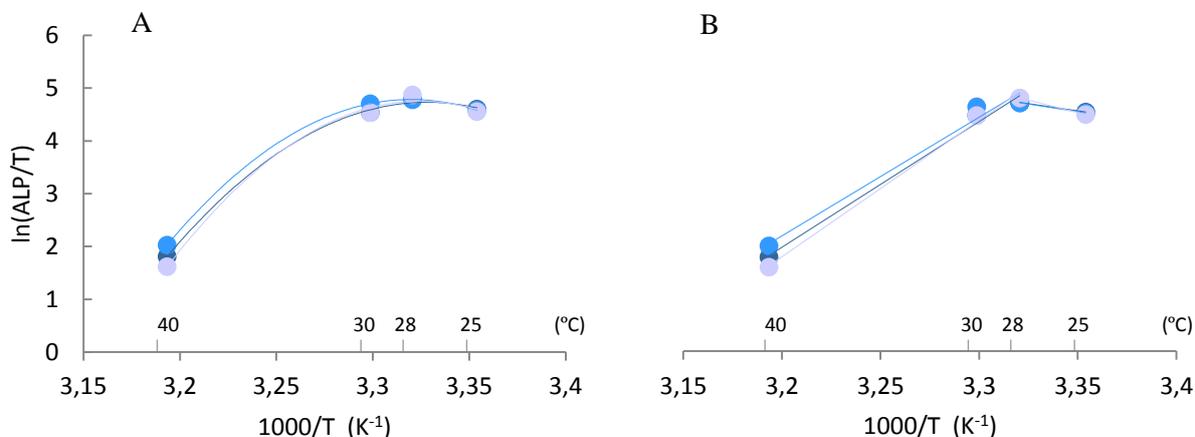


Figura 4.3- Dependência da temperatura da V_{max} de ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ 0,1 ■ ou 1 ■ μg/mL a 25, 28, 30, 40, °C. Representação de Arrhenius de acordo com a equação (6), (A) representa o ajuste dos pontos experimentais a uma parábola, (B) representa o ajuste dos pontos experimentais a duas rectas desenhadas para os intervalos 25-28 °C e 28-40 °C.

Os organismos vivos regulam as suas actividades enzimáticas e modelam as suas interacções com o ambiente para atingir a homeostase. Flutuações mínimas nas condições de crescimento que caem nos limites de tolerância dos sistemas vivos são tamponadas pelos componentes neles existentes. No entanto, eventos em que ocorram alterações ambientais citotóxicas, activam na célula um programa de resposta apropriado á sua adaptação e sobrevivência que inclui a expressão de novas proteínas. O fenómeno de choque térmico é descrito como um factor de *stress* em que ocorre uma variação brusca da temperatura em células previamente adaptadas ao seu óptimo de crescimento. A resposta ao choque térmico é multifacetada incluindo reorganização metabólica, paragem transitória do crescimento e alterações globais na transcrição. Este último componente da resposta é o que tem recebido maior atenção ao longo dos anos, atribuindo-lhe alguns autores o papel de via primária pela qual adquire termo tolerância, ultrapassando o impacte do *stress* térmico. No entanto, não se encontram frequentemente descritos estudos do efeito do choque térmico em termos metabólicos, razão pela qual se optou pela estratégia descrita na secção 2.

Os resultados obtidos sugerem que a estirpe UE-ME₃, com débil crescimento a 40 °C, mostrou em condições de choque térmico 28/40 °C, durante 200 min, capacidade para manter o nível de proliferação celular próximo daquele que foi observado a 30 °C, detectados em termos de proteína total e do sobrenadante, peso seco, conteúdo em tióis totais não-proteicos e

actividade enzimática ALP. A presença de NP-TiO₂, em particular na concentração de 1 µg/mL no meio de cultura, mostrou uma diminuição significativa nos parâmetros de crescimento anteriormente referidos e um aumento no conteúdo em proteínas do sedimento. Pelo que, os resultados mostram que as NP-TiO₂ associadas ao choque térmico 28/40 °C em células proliferativas, fase exponencial média, causam morte celular na população.

4.1.2 - Capacidade antioxidante não enzimática

O tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina gerado pelo ciclo do γ -glutamato, regulado pelo enzima glutathione sintetase, é descrito na literatura como sendo um contribuinte eficaz contra ROS, via reacção entre grupos sulfidriilo de duas moléculas do tripéptido que originam dissulfureto de glutathione, contribuindo assim, para a estabilização do ambiente redutor intracelular. Deste modo, a razão GSH/GSSG constitui um bom indicador da evolução do ambiente redox na célula em condições de *stress*, cujo aumento é considerado por diversos autores como indicador de *stress* oxidativo. No entanto, outros constituintes moleculares como anéis aromáticos dos polifenóis, podem exibir elevado poder antioxidante devido à deslocalização de electrões dessas estruturas químicas poderem capturar espécies radiculares. No seguimento do exposto a quantificação da razão GSH/GSSG e da capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH constituem ferramentas úteis para avaliar a resposta celular a diversas condições de *stress*, razão pela qual foram escolhidas neste estudo (Elskens, 1995; Penninckx, 2000).

A Fig. 4.4A revela que a temperatura igual ou superior a 28 °C, incluindo o choque térmico 28/40 °C, ocorreu uma queda abrupta do conteúdo em GSH (49 %, $p < 0.01$), relativamente ao detectado em células crescidas a 25 °C, a qual poderá eventualmente ser explicada por uma inibição do enzima glutathione sintetase, um parâmetro a estudar futuramente. Por outro lado, a exposição a NP-TiO₂ causou um aumento significativo deste conteúdo em células crescidas a 25 e 28 °C, situação que se repetiu a 40 °C apenas em células crescidas na presença da concentração mais baixa de NP-TiO₂ (0,1 µg/mL). O choque térmico não provocou alterações significativas neste parâmetro em *S.cerevisiae* UE-ME₃ expostas às nanopartículas. Estudos a realizar no futuro deverão ter ainda em consideração novas situações de choque térmico. Por outro lado, o nível de GSSG (Fig. 4.4B) decresceu de forma linear com a temperatura ($r = 0,95241$; $p < 0,01$), enquanto que o choque térmico 28/40 °C o manteve na ordem de grandeza dos valores determinados para as leveduras crescidas a 30 °C.

Os resultados obtidos na quantificação de GSH e GSSG estão de acordo com o descrito, para células de levedura, na literatura consultada (Izawa, 1995; Jones, 2002; Song, 2006).

A resposta à presença de NP-TiO₂ mostrou-se segregada a cada temperatura de cultura. Assim, as nanopartículas provocaram um aumento significativo do nível citoplasmático de GSSG em células crescidas a 25, 28, 30 e 40 °C, no primeiro caso apenas para a concentração mais elevada, no segundo caso em qualquer nível de exposição e nas células crescidas à temperatura mais elevada observou-se apenas para a menor concentração (0,1 µg/mL). A capacidade antioxidante pela estabilização do ambiente redutor intra-celular em *S.cerevisiae* UE-ME₃ pode ser avaliada na Fig. 4.4C onde detectamos valores significativamente mais baixos a 28 e 30 °C do que aqueles que foram detectados a 25 °C. No entanto, em células crescidas a 40 °C observou-se um aumento altamente significativo (67 %; p <0,001) da razão GSH/GSSG, comparativamente com as células crescidas a temperatura mais baixa. O choque térmico 28/40 °C manteve o estado redox das leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ mais uma vez, próximo do que foi detectado em leveduras crescidas a 30 °C. No que diz respeito à exposição às NP-TiO₂ observou-se um aumento significativo desta razão para as células crescidas a 25 °C, na presença de nanopartículas (0,1 µg/mL), embora a 28 e 40 °C tenha ocorrido um decréscimo (p <0,01) desta razão para a concentração mais baixa do agente de *stress*. Quanto ao choque térmico 28/40 °C a razão GSH/GSSG não sofreu qualquer alteração com significado estatístico, tal como foi observado a 30 °C.

Apesar da razão GSH/GSSG ter sofrido, nas culturas a 40 °C, um aumento altamente significativo relativamente a todas as outras situações de temperatura em estudo, não parece indicador de protecção elevada antioxidante devido ao facto de o conteúdo em tióis totais ser o mais baixo de qualquer dos ensaios e o conteúdo em GSSG seguir o mesmo perfil (Figs. 4.3C e 4.4B). Provavelmente esta situação ocorreu devido a um decréscimo acentuado da actividade G6PD, apresentado na Fig. 4.5A que eventualmente contribuiu para a indisponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, necessários ao bom funcionamento do ciclo de oxidação-redução do glutatono. Quando avaliamos a poder antioxidante em termos de capacidade para capturar radicais livres, medida pelo radical DPPH[•] (Fig. 4.4D), constatamos um valor significativamente muito baixo dessa propriedade em células crescidas a 40 °C, facto que suporta a discussão do período anterior. A mesma figura revela que a temperatura também provocou um decréscimo, com significado estatístico, do poder antioxidante, usualmente correlacionado com os níveis de ascorbato e de polifenóis endógenos. O choque térmico manteve esta propriedade em níveis significativamente superiores aos detectados nos estudos a 30 e 40 °C. A exposição a NP-TiO₂ revelou também

que a 25, 28 e 30 °C ocorreu um aumento ($p < 0,01$) desta capacidade antioxidante em leveduras crescidas a 25 °C na presença de 1 $\mu\text{g/mL}$ e em qualquer das situações de exposição a 28 e 30 °C. No entanto quer a 40 °C, quer em condições de choque térmico 28/40 °C não foram detectadas alterações significativas pela exposição às nanopartículas. Este não incremento da capacidade antioxidante pode, em parte, justificar a morte celular discutida na secção 4.1.1.

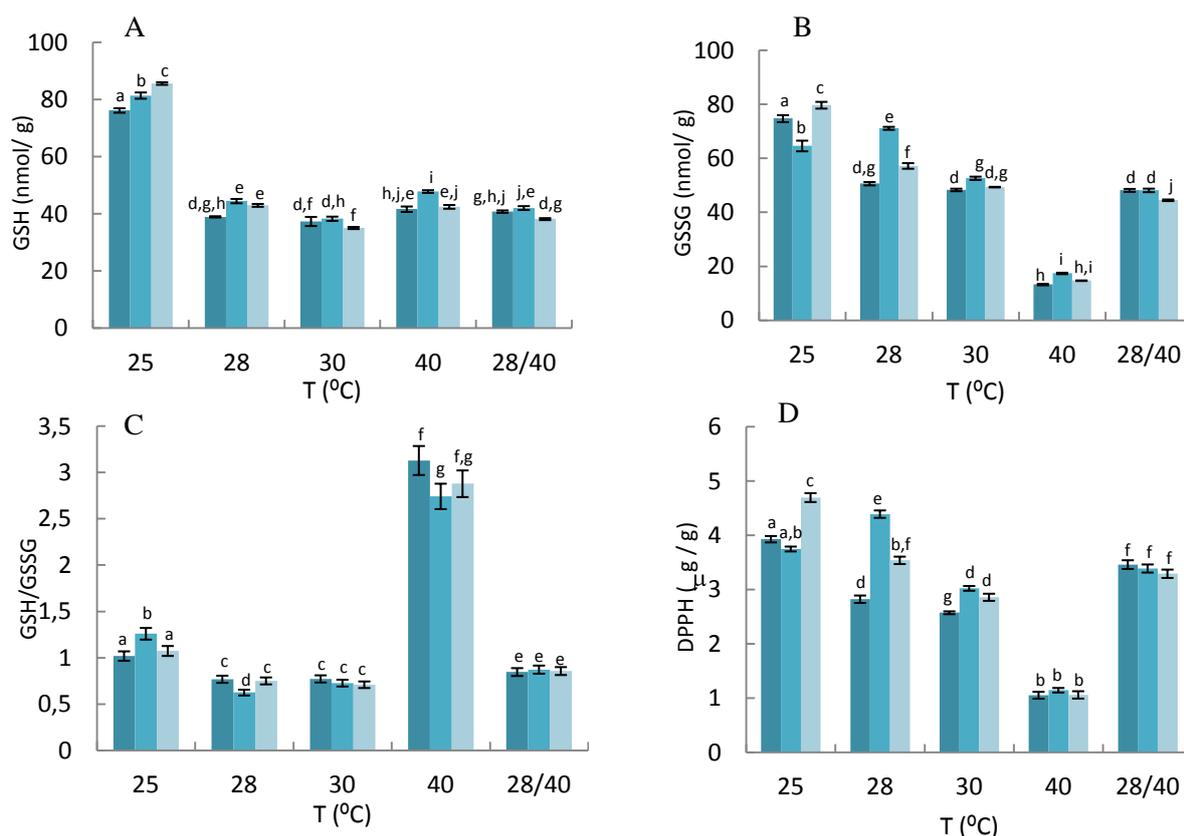


Figura 4.4- Conteúdo em glutatióno (A) dissulfureto de glutatióno (B) razão GSH/GSSG (C) e capacidade antioxidante pelo DPPH (D) de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ em concentrações de 0,1 ■ e 1 ■ $\mu\text{g/mL}$, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

4.1.3 – Capacidade antioxidante enzimática

O ciclo de oxidação-redução do glutatióno é constituído por dois enzimas, glutatióno redutase que repõe os equivalentes redutores sob a forma de GSH e o glutatióno peroxidase dependente do selénio que metaboliza peróxidos e lipoperóxidos acoplado à conversão do GSH em GSSG. A importância deste ciclo prende-se com o facto de contribuir acentuadamente para a estabilização do ambiente redutor da célula ou de alguns organelos. O

seu funcionamento é assistido pela via das pentoses fosfato e em particular pela glucose 6-fosfato desidrogenase que fornece os equivalentes redutores sob a forma de NADPH que constituem co-substratos do enzima glutationo redutase. A Fig. 4.5A mostra que a actividade G6PD é significativamente maior em células crescidas a 28 e 30 °C do que a 25 °C. No entanto observou-se uma diminuição significativa desta actividade catalítica quando as células foram cultivadas a 40 °C em qualquer dos tratamentos. O valor de actividade enzimática de leveduras em choque térmico é próximo dos que foram obtidos em culturas com temperatura estabilizada a 30 °C. No que diz respeito à presença de NP-TiO₂ no meio de cultura não se observou qualquer interferência com significado estatístico em células crescidas a 25 °C, no entanto a 28 e 30 °C ocorreu um aumento significativo da G6PD em leveduras crescidas a 28 °C e expostas a 1µg/mL de NP-TiO₂, efeito semelhante ao observado em células crescidas a 30°C mas expostas à concentração de 0,1 µg/mL. Em *S. cerevisiae* UE-ME₃ sujeitas a choque térmico 28/40 °C detectou-se ainda um decréscimo significativo da G6PD em leveduras crescidas na presença de 1µg/mL. Como já foi referido a baixa actividade G6PD a 40 °C pode também ter contribuído para a diminuição da concentração de estado estacionário de GSH detectada na Fig. 4.4. Os valores da actividade glutationo redutase (Fig. 4.5B) mostraram-se mais elevados em células crescidas a 25 e 28 °C (11-21 nmol.min⁻¹.mg⁻¹), apresentando valores menores (p <0,01) em células crescidas a 30 e 40 °C (4-6 nmol.min⁻¹.mg⁻¹). A exposição a 0,1 µg/mL de nanopartículas causou um aumento altamente significativo desta actividade catalítica, a 25 e 28 °C, e um decréscimo altamente significativo nas que cresceram expostas a 1 µg/mL. No que diz respeito aos resultados obtidos com células crescidas a 30 e 40 °C a presença de NP-TiO₂ no meio de cultura não provocou alterações significativas. Os resultados que mais se destacam relativamente ao glutationo reductase, prende-se com o decréscimo significativo e dependente do nível de exposição (r = 0,98132) desta actividade enzimática em células de choque térmico expostas ao agente de *stress*. A actividade GPx (fig 4.5C), outra marcadora do ciclo do glutationo manifestou-se significativamente mais elevada em células crescidas a 28 °C e em choque térmico 28/40 °C, detectando-se os valores mais baixos em células cultivadas a 30 °C. A presença de NP-TiO₂ no meio de cultura não afectou esta actividade catalitica em células crescidas a 25 e 30 °C, no entanto, células cultivadas a 28, 40 °C e em choque térmico 28/40 °C mostraram um decréscimo significativo quando expostas a NP-TiO₂ na concentração de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. Os resultados obtidos para a actividade enzimática G6PD (Cordier, 2007) estão de acordo com o que é descrito na literatura consultada, assim como, os resultados para o GR (Lushchak, 2004) e para a actividade enzimática GPx (Tanaka, 2005).

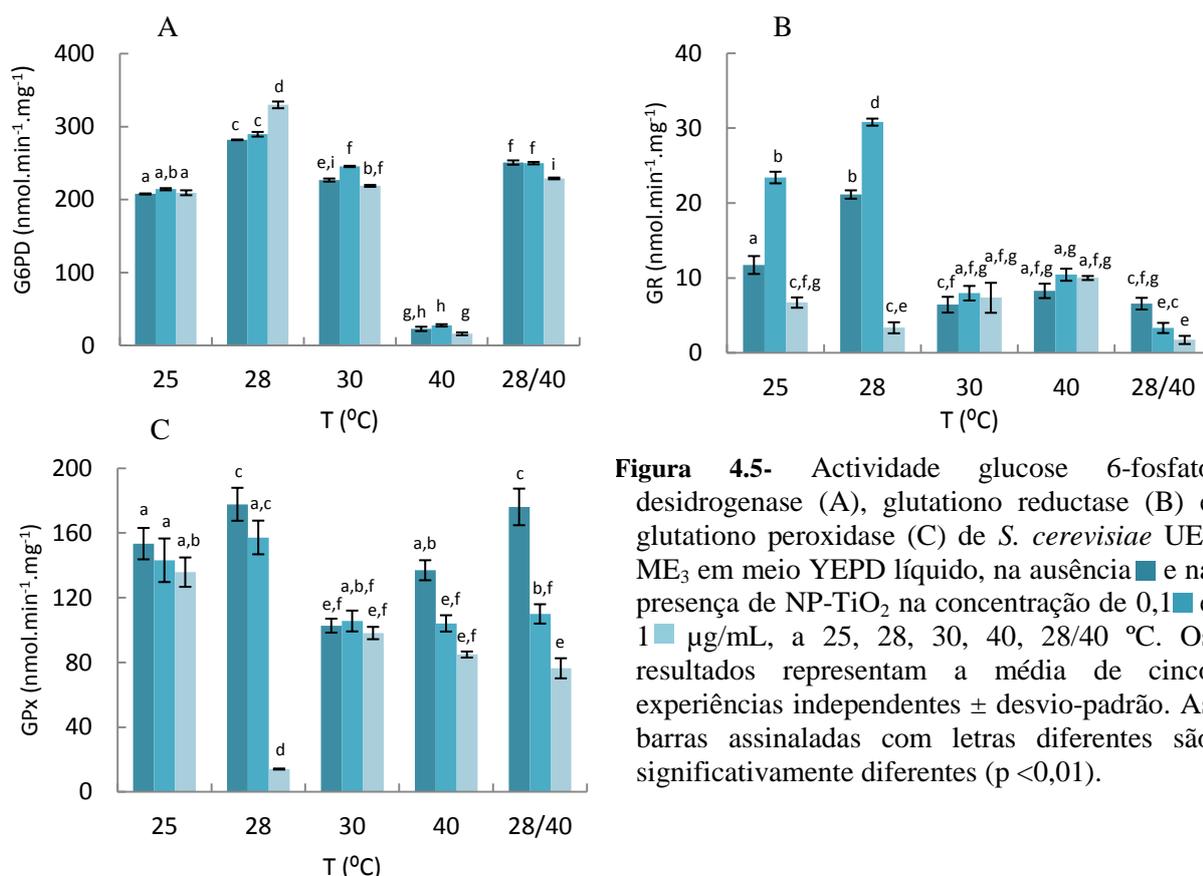


Figura 4.5- Actividade glucose 6-fosfato desidrogenase (A), glutationo reductase (B) e glutationo peroxidase (C) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 ■ e 1 ■ µg/mL, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A decomposição do peróxido de hidrogénio, subproduto da dismutação do radical anião superóxido, em água e dióxigénio pelos enzimas catalases citoplasmática e peroxissomal, oxidorredutases antioxidantes é vital para desintoxicação enzimática de ROS pela célula viva.

A actividade CAT T (Fig. 4.6A) apresenta valores mais elevados em células crescidas a 28 °C e em choque térmico 28/40 °C (14-17 µmol.min⁻¹.mg⁻¹), exibindo valores significativamente inferiores a 25, 30 e 40 °C. A exposição a NP-TiO₂ causou um aumento desta actividade enzimática em células crescidas a 25 e 30 °C em presença de 1 µg/mL, não tendo sido detectada qualquer alteração com significado estatístico, entre células tratadas com nanopartículas e o respectivo controlo, crescidas a 28 e 40 °C. Contudo as células sujeitas a choque térmico foram aquelas que apresentaram valor de actividade CAT T mais elevado, observando-se apenas um decréscimo significativo em células expostas à concentração de 1 µg/mL de NP-TiO₂, mantendo-se no entanto esse nível de actividade superior à maior parte das situações estudadas. Este tipo de resposta sugere morte por processo activo, devido ao efeito conjugado do choque térmico com a exposição a nanopartículas. A Fig. 4.6B mostramos que a catalase peroxissomal, CAT A, apresenta um máximo de actividade específica a 28 °C que decresce significativamente com a temperatura, até aos 40 °C. A resposta à presença

de NP-TiO₂ no meio de cultura provocou um decréscimo significativo, para 62 % desta actividade catalítica em *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas a 28 °C. Resposta inversa foi no entanto observada em células cultivadas a 30 °C. O choque térmico 28/40 °C levou a que a CAT A assumisse valores intermédios entre os determinados a 28 e 40 °C, ocorrendo um decréscimo significativo desta actividade catalítica na presença de NP-TiO₂ ($r = 0,98979$; $p < 0,01$). O valor de actividade CAT A determinado em células sujeitas a choque térmico 28/40 °C, superior ao detectado em qualquer situação estudada excepto em leveduras crescidas a 28°C, pode ser devido, em parte, ao eventual aumento da oxidação de lípidos no peroxissoma que, em geral, despoleta esta actividade enzimática. Os resultados obtidos para as actividades enzimáticas CAT T e CAT A estão de acordo com o que se encontrou descrito na literatura consultada (Lushchak, 2005; Todorova, 2006).

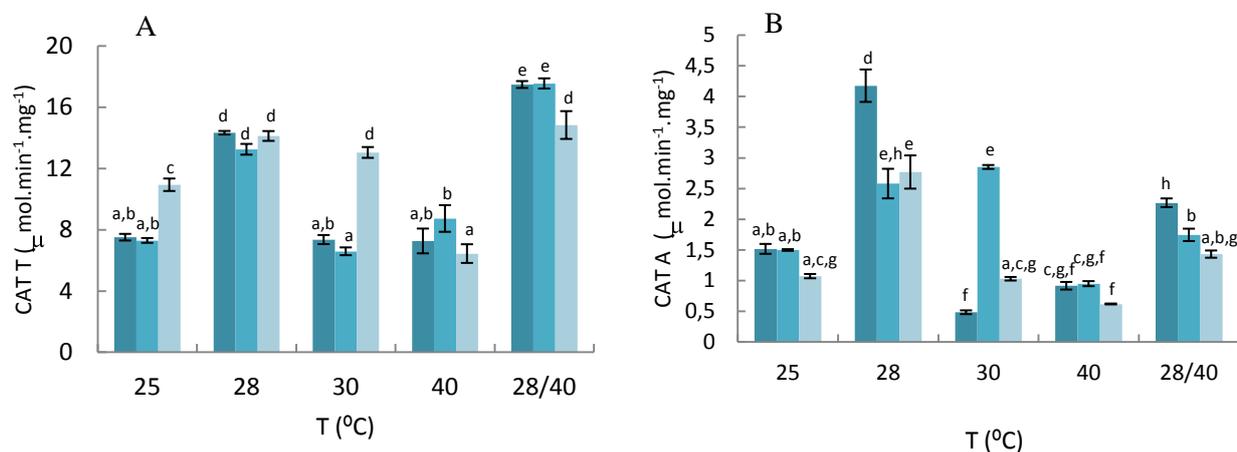


Figura 4.6- Actividade catalase T (A), catalase A (B) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 ■ e 1 ■ μg/mL, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

4.1.4 – Resposta pró-oxidante

A oxidação de resíduos acilo polinsaturados por lipoxigenases pode ser responsável pela degradação sequencial dos componentes lipídicos dos sistemas membranares, levando à formação de lipoperóxidos. A exposição a metais de transição pode também constituir uma fonte de ROS geradas por reacções de Fenton (Siedow, 1991; Croft, 1993; Farmer e Ryan, 1992; Chen, 2000; Berlett, 1997), pelo que, a determinação da actividade LOX e a quantificação de ROS e de MDA constituem bons indicadores de alterações pró-oxidantes e de danos na célula.

Pela representação gráfica da Fig. 4.7A pode-se observar que a actividade específica LOX atinge um máximo em células crescidas a 30 °C e mínimos a 25 e 40 °C, sendo o valor a 28 °C significativamente superior ao registado em células crescidas a 25 °C. Por outro lado, a presença de NP-TiO₂ causou um aumento significativo desta actividade catalítica em células crescidas a 25 °C e expostas a 0,1 µg/mL, assim como em células crescidas a 28 °C mas exposta à concentração de 1 µg/mL. Contudo, a 30 °C observou-se um decréscimo significativo da LOX na presença de NP-TiO₂ na concentração de 1 µg/mL, não sendo detectadas diferenças significativas desta actividade em culturas a 40 °C. As células em choque térmico exibiram valores de actividade LOX idênticos aos determinados a 30 °C, ocorrendo um aumento desta actividade que variou de forma linear com a concentração de NP-TiO₂ ($r = 0,95042$). Este facto aponta para um aumento da peroxidação lipídica em leveduras crescidas na presença de NP-TiO₂ e submetidas a choque térmico 28/40 °C. A quantificação de ROS intra-celular (Fig. 4.7B) revelou um máximo em células crescidas a 28 °C na ausência de NP-TiO₂ com valores significativamente superiores em células crescidas na sua presença, assumindo no entanto, um valor mínimo em células crescidas a 40 °C, em qualquer das situações testadas. A quantidade de ROS determinada a 25 e a 30 °C é da mesma ordem de grandeza e apresenta um perfil de resposta idêntico à presença de NP-TiO₂ que aumentou linearmente com a concentração deste agente de *stress*. No entanto, os valores de ROS determinados em células submetidas a choque térmico 28/40 °C, apresentam surpreendentemente um nível baixo de ROS, ainda que um pouco superior ao determinado em células cultivadas a 40 °C. Os resultados obtidos para a quantificação de ROS estão de acordo como o que vem descrito na literatura (Doudican, 2005).

A Fig. 4.7C mostra que os níveis de MDA, marcador de danos celulares eram significativamente superiores em células crescidas a 25 e 40 °C relativamente aos determinados em culturas crescidas a 28 e 30 °C. A presença de NP-TiO₂ (0,1 µg/mL) em células cultivadas a 25 e 28 °C levou ao aumento da concentração citoplasmática de MDA, resposta idêntica também foi observada a 28 e 30 °C para a exposição a 1 µg/mL. Convém, no entanto, destacar o nível de MDA 100 vezes superior ao controlo, detectado em células expostas a 1 µg/mL à temperatura de 28 °C. Aparentemente esta resposta poderá ser correlacionada com o decréscimo significativo e acentuado das actividades enzimáticas GR (84 %) e GPx (92 %) e conseqüente abrandamento metabólico do ciclo de oxidação-redução do glutatono. No entanto, células em choque térmico 28/40 °C exibiram valores de MDA superiores aos determinados a 28 °C e inferiores aos quantificados a 40 °C, com decréscimo

significativo para valores vestigiais em leveduras expostas a qualquer dos níveis de NP-TiO₂ testados.

Apesar de se esperar um aumento de ROS e de danos celulares, estimados pelo MDA, em células submetidas a choque térmico 28/40 °C, tal resposta não foi confirmada pelos resultados apresentados nas Fig. 4.7B e C, podendo este facto ser justificado pelos níveis elevados de CAT T e moderados de CAT A, correlacionados positivamente com a actividade LOX, já descrito anteriormente e que parecem compensar a resposta pró-oxidante da LOX, apontando como principal causa da perda de viabilidade celular por processo activo.

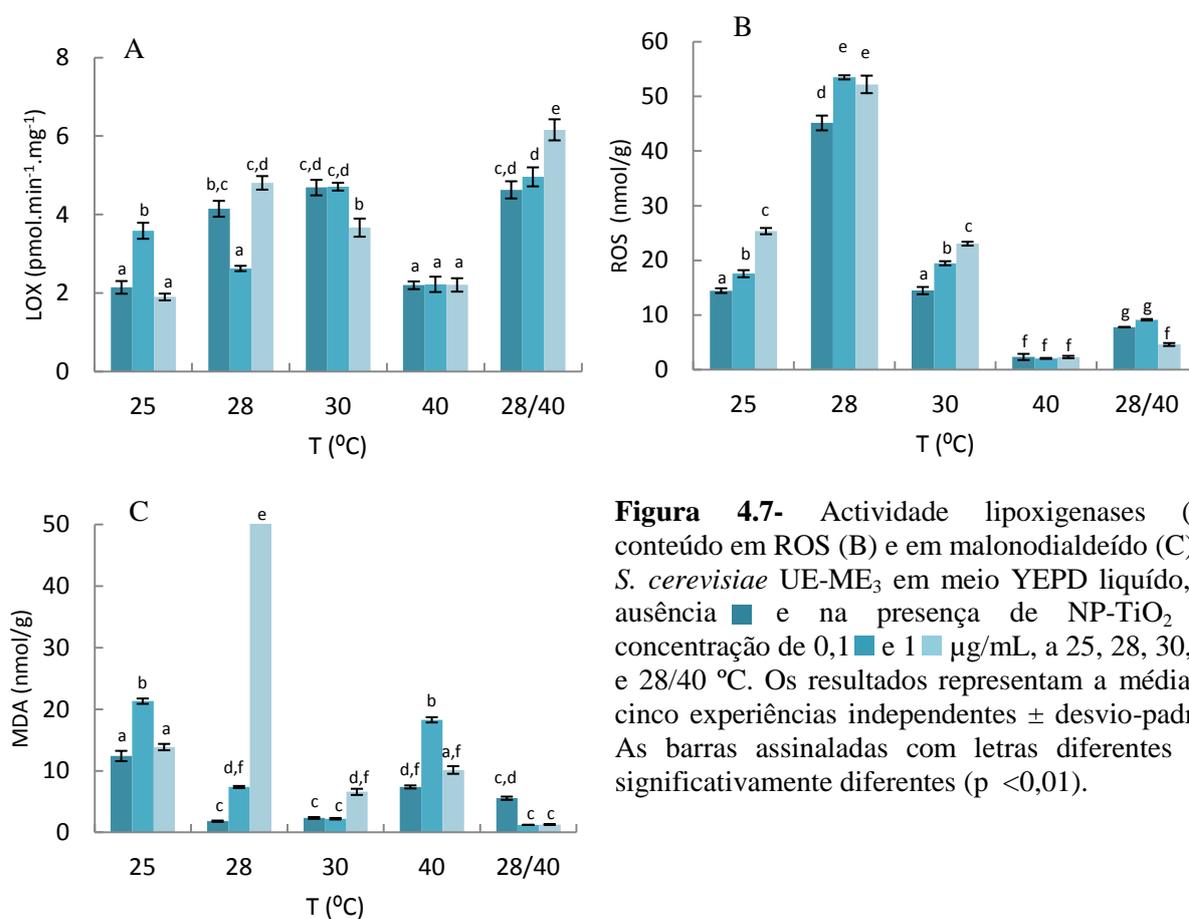


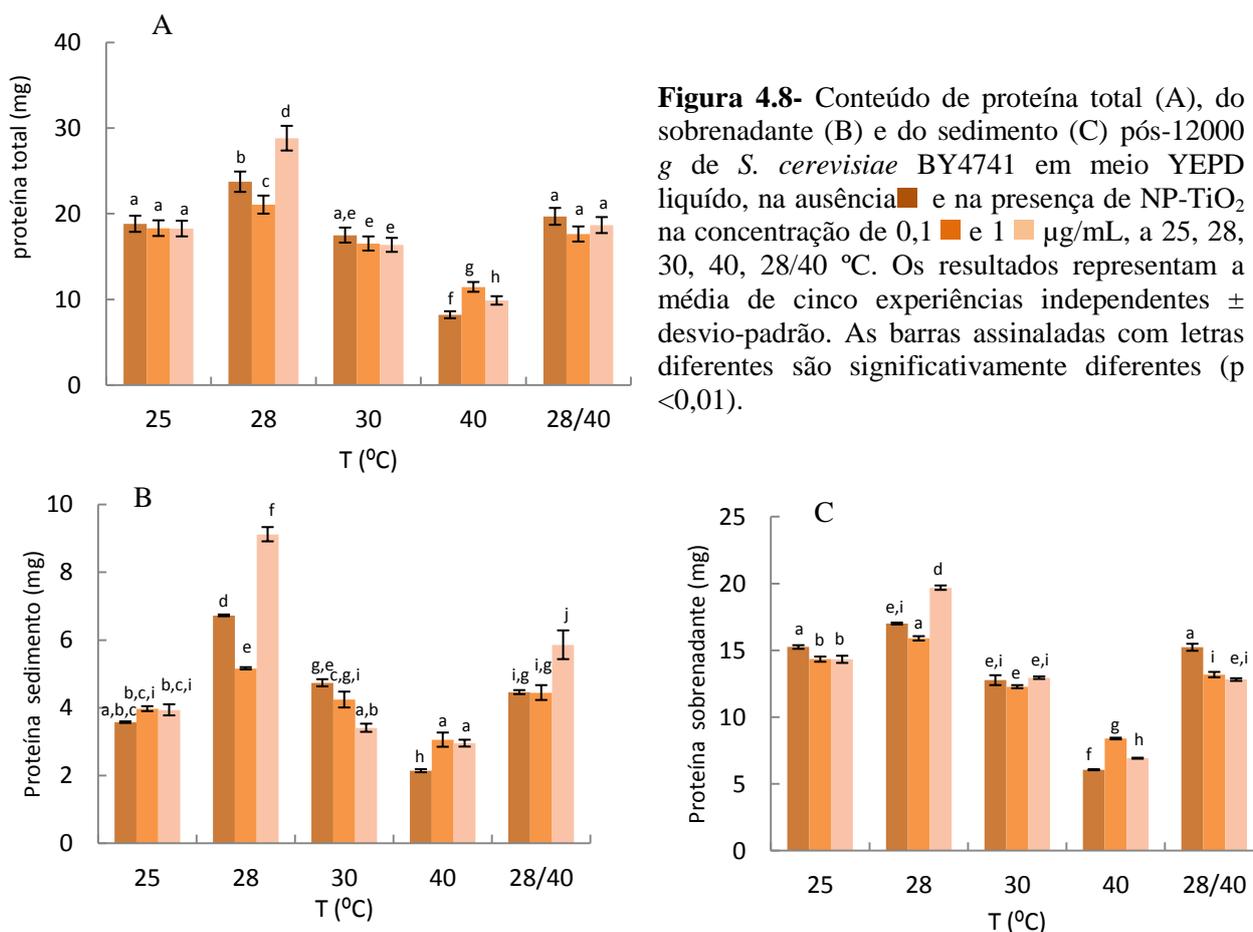
Figura 4.7- Actividade lipoxigenases (A), conteúdo em ROS (B) e em malondialdeído (C) de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 ■ e 1 ■ μg/mL, a 25, 28, 30, 40 e 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

4.2 - *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

4.2.1 - Crescimento celular

O crescimento celular da *S. cerevisiae* BY4741 foi igualmente estimado pelo conteúdo em proteína, tióis não-proteicos, peso seco, actividade ALP e cfu, pelos motivos invocados na secção 4.1.1.

Os resultados apresentados na Fig. 4.8A revelam um máximo no conteúdo em proteínas de *S. cerevisiae* BY4741 crescidas a 28 °C, observando-se ainda um decréscimo significativo ($p < 0,01$) deste parâmetro em leveduras crescidas a 30 e 40 °C. A presença de NP-TiO₂ não alterou significativamente o conteúdo em proteínas de células crescidas a 25 °C e 30 °C. No entanto, a 28 °C observou-se um aumento significativo do conteúdo proteico em células expostas a 1 µg/mL de NP-TiO₂, resposta semelhante à determinada em células crescidas a 40 °C, mas com significado estatístico para qualquer dos níveis de nanopartículas testados. O choque térmico 28/40 °C, não afectou o conteúdo proteico em qualquer das situações em estudo, resposta distinta da que foi observada com *S.cerevisiae* UE-ME₃.



No que diz respeito ao conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g (Fig. 4.8B) observou-se um perfil de resposta idêntico ao do conteúdo total em proteínas, excepto na situação de choque térmico 28/40 °C onde as células expostas a NP-TiO₂ exibem um decréscimo com significado estatístico desse conteúdo ($p < 0,01$). Porém, o nível proteico determinado no sedimento (Fig. 4.8C) revelou um máximo a 28 °C com valores significativamente menores em células crescidas a 25, 30, 40 e expostas ao choque térmico 28/40 °C. Um aumento significativo das proteínas do sedimento pós-12000 g (Fig. 4.8C) foi detectado em células crescidas a 40 °C para os dois níveis de exposição e apenas para o nível de 1 µg/mL de NP-TiO₂ em células crescidas a 28 °C e em choque térmico. A resposta observada no sedimento, rico em mitocôndrios e peroxissomas, de *S. cerevisiae* BY4741 expostas a choque térmico e 1 µg/mL de NP-TiO₂ é comum ao que foi descrito para a estirpe nativa UE-ME₃.

Quando se avalia a produção de biomassa, em termos de peso seco (Fig. 4.9A), em função da temperatura constata-se um decréscimo significativo deste parâmetro nas leveduras da estirpe BY4741 crescidas entre 25 e 40 °C, resposta que foi acentuada em células sujeitas a choque térmico. A presença de NP-TiO₂ no meio de cultura contribuiu para aumentar significativamente o peso seco (Fig. 4.9A) de células crescidas a 28, 30 e choque térmico 28/40 °C, significativo a 28 °C para os dois níveis de nanopartículas testados e apenas para NP-TiO₂ (1 µg/ml) para os outros casos, sem contudo atingir o valor máximo registado para as leveduras crescidas a 25 °C. A resposta às NP-TiO₂ por *S. cerevisiae* BY4741 em condições de choque térmico 28/40 °C não indicam morte celular como observado em *S. cerevisiae* UE-ME₃, provavelmente porque a temperatura óptima de crescimento da estirpe BY4741 será próxima dos 25 °C e a 40 °C mostra melhor adaptabilidade ambiental. A Fig. 4.9B revela um óptimo de actividade ALP a 25 °C, valor que diminuiu significativamente ($p < 0,01$) em células crescidas entre 25 e 40 °C. Contudo, na presença de NP-TiO₂ observou-se um aumento com significado estatístico desta actividade enzimática de células crescidas a 28 (1 µg/mL), 30 e 40 °C (0,1 e 1 µg/mL), para valores próximos do óptimo, indicador de uma melhor sobrevivência da estirpe BY4741, às nanopartículas. No entanto, células expostas ao choque térmico 28/40 °C e NP-TiO₂ (1 µg/mL) revelaram um decréscimo com significado estatístico deste parâmetro, marcador de proliferação celular. Quanto ao conteúdo em tióis não-protéicos (Fig. 4.9C), o óptimo de actividade manifestou-se a 28 °C, detectando-se valores menores a 25, 30 e 40 °C ($p < 0,01$). A presença de NP-TiO₂ provocou um decréscimo, com significado estatístico, deste conteúdo em células crescidas a 25 e 28 °C e expostas a 0,1

$\mu\text{g/mL}$ de NP-TiO₂ no primeiro caso e em qualquer das situações de exposição no segundo. Contudo, a 30 e 40 °C as nanopartículas exerceram um efeito contrário, levando a um aumento da disponibilidade celular em tióis não-proteicos ($p < 0,01$). O choque térmico 28/40 °C induziu também um aumento deste conteúdo para níveis idênticos ao óptimo, embora a presença de NP-TiO₂ no meio de cultura tenha causado um decréscimo significativo do parâmetro, que também foi revelado em termos de cfu (fig 4.9D). Esta resposta também detectada na actividade ALP é comum ao que foi descrito para a estirpe nativa UE-ME₃.

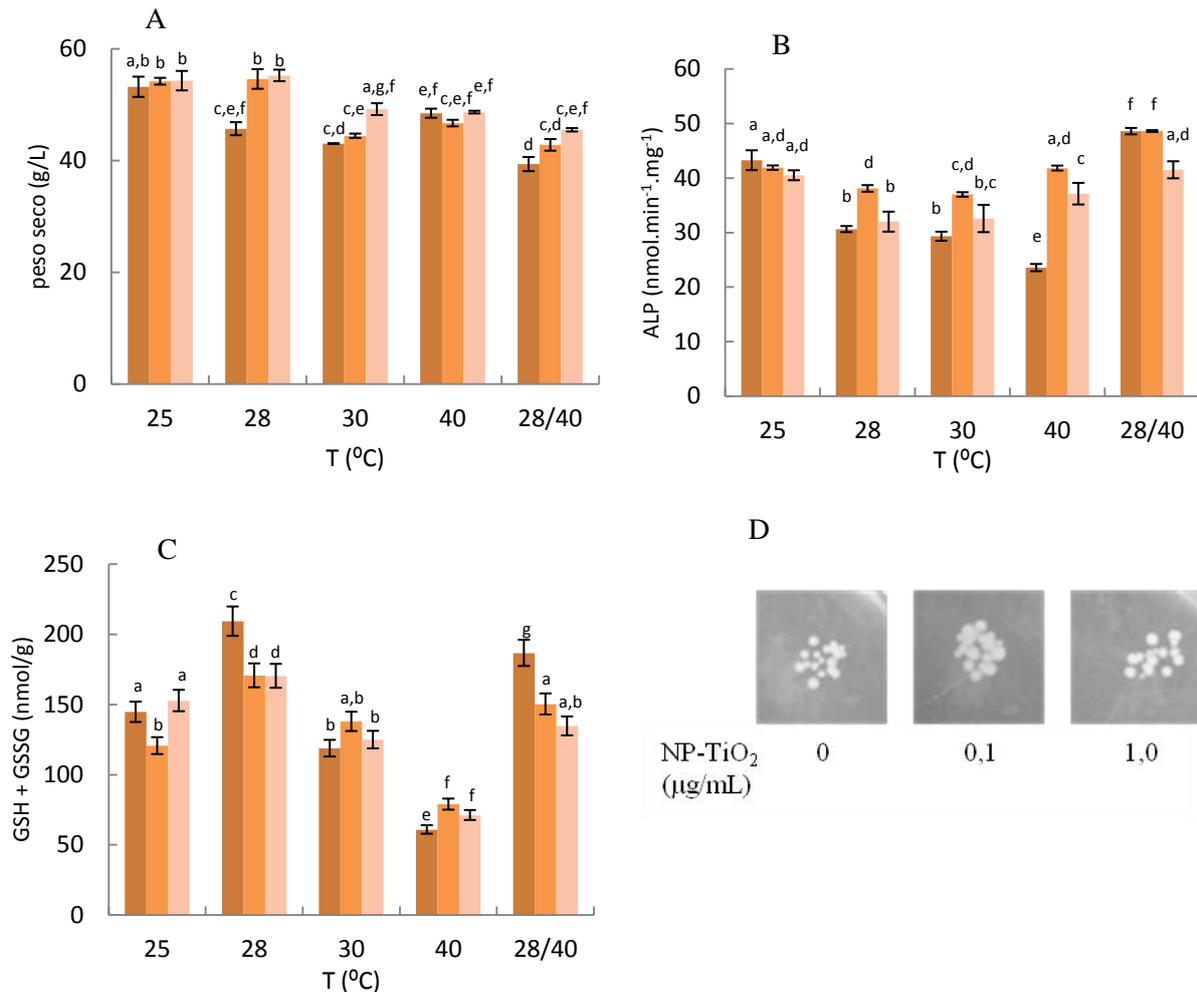


Figura 4.9- Peso seco (A), actividade enzimática fosfatase alcalina (B), conteúdo em tióis não-proteicos (C) de *S. cerevisiae* BY4741 crescidas em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ 0,1 ■ ou 1 ■ $\mu\text{g/mL}$ a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C; cfu de *S. cerevisiae* BY4741 em choque térmico 28/40 °C diluição 10⁻⁵ (D). 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 representação gráfica de Arrhenius (Fig. 4.10) expressa a dependência com a temperatura da V_{max} de ALP de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em YEPD líquido, na ausência e na presença de NP-TiO₂ 0,1 ou 1 $\mu\text{g/mL}$ entre 25 e 40 °C, de acordo com a

equação (6). À semelhança da opção descrita na secção 4.1.1 escolheu-se a hidrolase ALP por ser descrita na literatura como um bom marcador da proliferação celular e de aplicação da equação de Arrhenius (Cornish-Bowden, 2001). O referido gráfico, construído com valores de temperatura de crescimento da levedura a 25, 28, 30 e 40 °C, apresentou em todas as condições de exposição estudadas um comportamento diferente do que foi observado com a estirpe UE-ME₃ e do ajuste linear dos pontos com declive negativo, como se prevê pela equação teórica. A figura 4.10 revela que o ajuste linear dos pontos experimentais entre 25 e 28 °C, apresenta declive positivo ($\Delta H^\ddagger/R$) para qualquer das situações estudadas (10,6; 3,2 e 7,4 na ausência e na presença de nanopartículas). Contudo, entre 28 e 40 °C observou-se comportamento linear ($0,7127 < r < 1$; Fig. 4.10) com alteração do declive positivo para 2,4 na ausência de nanopartículas, e declive negativo (-0,5 e -0,9) na presença de NP-TiO₂, pelo que, o cálculo da variação da entalpia (ΔH^\ddagger), assumiu valores negativos entre 25 e 28 °C (-88,4 kJmol⁻¹ na ausência de nanopartículas; -26,3 e -61,2 kJmol⁻¹ na presença de NP-TiO₂ 0,1 ou 1 µg/mL) e entre 28 e 40 °C (-19,4 kJmol⁻¹) na ausência de nanopartículas. Contudo, em presença de NP-TiO₂ (0,1 ou 1 µg/mL) os valores de ΔH^\ddagger tornaram-se positivos (4,7 e 7,4 kJmol⁻¹) como espectável pelo modelo de Arrhenius.

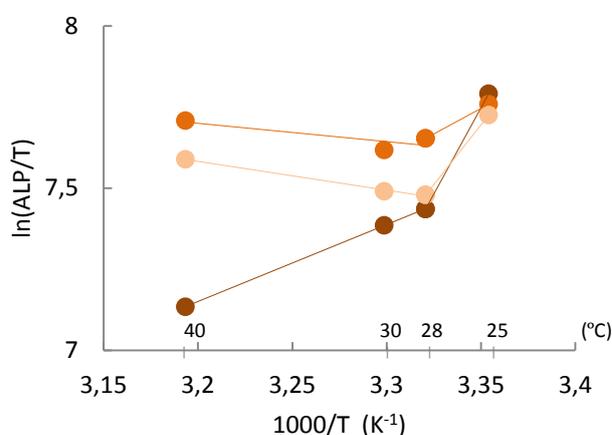


Figura 4.10- Dependência da temperatura da Vmax de ALP de *S. cerevisiae* BY4741 crescidas em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ 0,1 ■ ou 1 ■ µg/mL a 25, 28, 30, 40 °C. Representação de Arrhenius de acordo com a equação (6).

A literatura atribui a alteração do valor do declive detectado na ausência de nanopartículas, ao facto de para temperatura superior a 28 °C, factores do meio poderem levar a resposta a ser controlada por outro(s) passo(s) limitante(s) (Sugiyama, 2000; Jamieson, 1995). Tal como discutido na secção 4.1.1 a variação de entalpia negativa pode ser relacionada com eventos químicos pouco usuais sendo associada a distinta origem de ROS (Olson, 2002; Oracz, 2007; Cheney, 1996). A ΔH^\ddagger negativa na ausência de NP-TiO₂ em ambos os intervalos de temperatura pode ser explicada por origem de ROS

predominantemente não enzimática. Por outro lado, ΔH^\ddagger positiva observada em células crescidas entre 28 e 40 °C na presença de NP-TiO₂, 0,1 e 1 µg/mL, ainda que com valores inferiores a 10 kJmol⁻¹, parece ser determinada pelo controlo enzimático de ROS, em particular pelo enzima G6PD que modela a disponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do ciclo do glutationo (Fig. 4.12A). Este facto parece ser corroborado pelo aumento da capacidade antioxidante medida pela razão GSH/GSSG, embora essa capacidade tamponante não seja suficiente para reverter a sobrevivência para valores idênticos aos detectados em *S. cerevisiae* BY4741 crescidas a 25 °C, devido ao decréscimo do conteúdo em tióis não-proteicos (Fig 4.9).

4.2.2 – Capacidade antioxidante não enzimática

O poder antioxidante na célula pode ser estimado pela razão GSH/GSSG bem como pela capacidade para capturar o radical sintético estável DPPH[•]. Assim, estas duas abordagens foram eleitas para avaliar a resposta de *S. cerevisiae* BY4741 a alterações de temperatura e ao stress induzido por NP-TiO₂, à semelhança do que foi realizado com a estirpe UE-ME₃.

A figura 4.11A revela que o conteúdo em GSH diminuiu linearmente com a temperatura entre 25 e 40 °C ($r = 0,98346$). A exposição a NP-TiO₂ de células crescidas a 25 °C causou um decréscimo significativo deste conteúdo para os dois níveis testados (0,1 e 1 µg/mL), ocorrendo apenas resposta idêntica para a concentração mais baixa em células crescidas a 28 °C. Porém, a 30 e 40 °C observou-se um aumento do conteúdo em GSH para a menor concentração de exposição e no caso das culturas mantidas a 40 °C para os dois níveis testados. No entanto, células em choque térmico apresentaram conteúdo em GSH superior ao óptimo de 25 °C. Para além disso, os níveis de GSH permaneceram iguais ou superiores aos determinados a 28 °C, apesar de terem diminuído, com significado estatístico, em células tratadas com NP-TiO₂. O perfil de resposta na estirpe BY4741 mostrou-se significativamente distinto do que foi detectado para a estirpe UE-ME₃, onde não encontramos uma relação linear entre o conteúdo em GSH e a temperatura. A figura 4.11B revela um máximo de concentração em dissulfureto de glutationo a 28 °C e um mínimo a 40 °C. Esta resposta sugere que ocorreu um aumento do nível intra-celular de peróxidos e lipoperóxidos à temperatura de 28 °C o qual diminuiu em células crescidas a 40 °C. A exposição a NP-TiO₂ provocou em células crescidas a 25 °C um decréscimo do conteúdo em GSSG para o nível de 0,1 µg/mL e um aumento para o nível mais elevado ($p < 0,01$). Em células crescidas a 30 e 40 °C a presença de NP-TiO₂ induziu um aumento significativo para qualquer nível de exposição,

enquanto que a 40 °C esse aumento apenas ocorreu para o nível de exposição mais baixo. As células em choque térmico apresentam um teor em GSSG superior ao que foi detectado em todas as situações em estudo, excepto para a temperatura de 28 °C que é inferior ($p < 0.01$). A resposta à presença de NP-TiO₂ no meio de cultura traduziu-se por um decréscimo linear com o nível de exposição, tal como foi observado em células crescidas a 28 °C. O perfil de resposta à temperatura e às NP-TiO₂ mostrou-se parcialmente sobreponível com o descrito para a estirpe UE-ME₃ excepto na resposta às nanopartículas em células crescidas a 28 °C. A avaliação da estabilização do ambiente redutor celular pelo glutatióno (Fig. 4.11C) apresentou um óptimo a 25 °C e um mínimo em células crescidas a 28 °C, ocorrendo a 30 °C e 40 °C valores intermédios, significativamente diferentes entre si e dos valores detectados a 25 e 28 °C. A presença de NP-TiO₂ induziu um aumento do poder redutor em células crescidas a 25 °C e expostas à concentração de 0,1 µg/mL e em células crescidas a 28 e 40 °C expostas à concentração de NP-TiO₂ mais elevada.

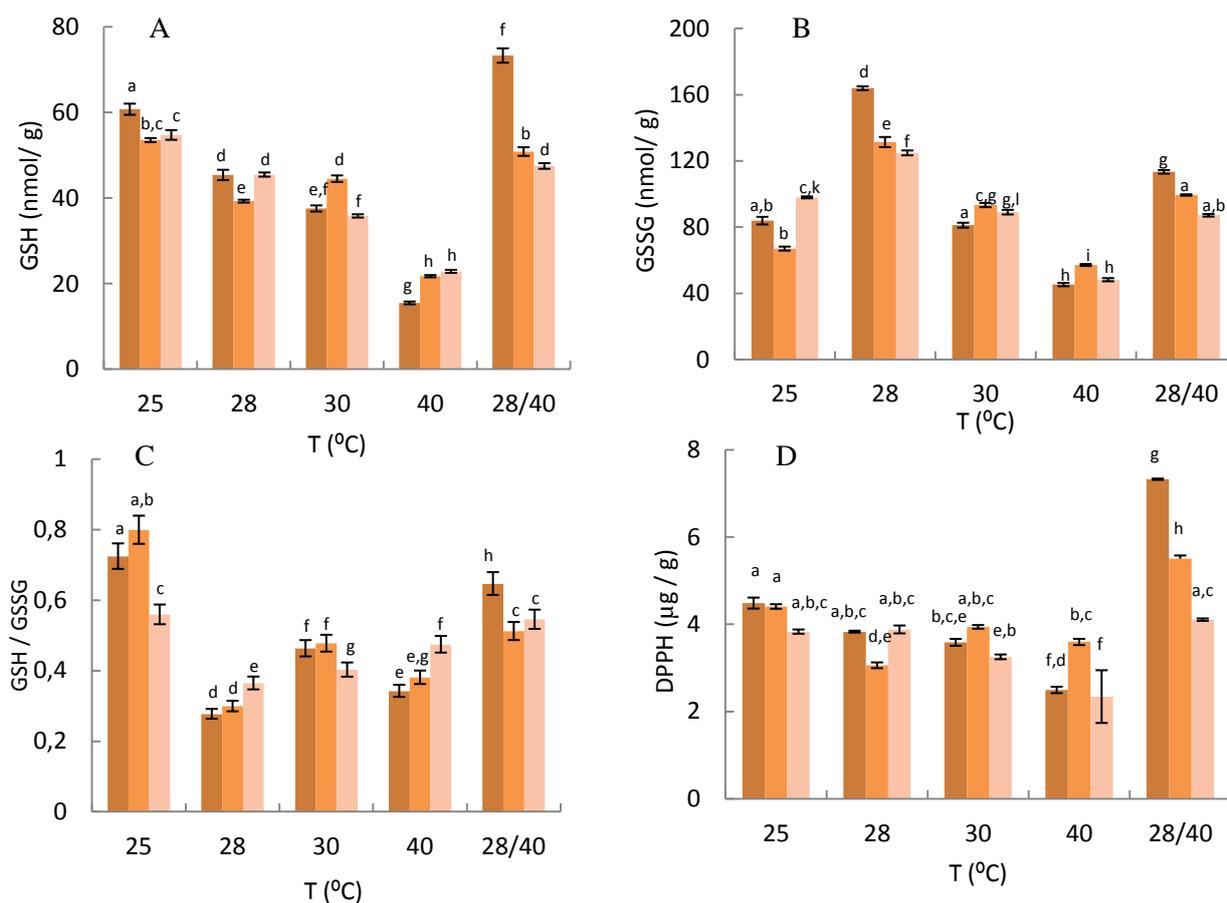


Figura 4.11- Conteúdo em glutatióno (A) dissulfureto de glutatióno (B) razão GSH/GSSG (C) e DPPH (D) de *S. cerevisiae* BY4741 em meio YEPD líquido, na ausência e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 e 1 µg/mL, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

O choque térmico levou os valores da razão GSH/GSSG para próximos dos que foram determinados a 25 °C, embora significativamente inferiores aos detectados a essa temperatura. A presença de NP-TiO₂ causou no entanto um decréscimo significativo da razão GSH/GSSG, resposta que não foi observada na estirpe UE-ME₃.

A capacidade antioxidante estimada pelo DPPH diminuiu linearmente com a temperatura de exposição, tal como foi observado para a estirpe UE-ME₃. Contudo, a presença de NP-TiO₂ provocou um decréscimo desta resposta antioxidante em células cultivadas a 28 °C e expostas à concentração de NP-TiO₂ 0,1 µg/mL, comportamento significativamente contrariado a 40 °C. As células em choque térmico apresentaram, no entanto, um valor da capacidade para capturar radicais livres muito superiores a qualquer das situações estudadas. Porém, a exposição a NP-TiO₂ levou a um decréscimo significativo e correlacionável com o nível de exposição deste parâmetro, um perfil distinto do que foi observado em *S.cerevisiae* UE-ME₃. Apesar da capacidade antioxidante, medida pela razão GSH/GSSG e pelo DPPH, diminuir na presença de NP-TiO₂ em células sujeitas a choque térmico, a sua ordem de grandeza permaneceu superior à observada em células crescidas entre 28 e 40 °C, pelo que a estirpe BY4741 parece exibir melhor capacidade adaptativa à presença de NP-TiO₂ em condições de choque térmico do que a que foi detectada na estirpe UE-ME₃.

4.2.3 – Capacidade antioxidante enzimática

A resposta antioxidante garantida pelo funcionamento do ciclo de oxidação-redução do glutathione assistido pelo enzima glucose 6-fosfato desidrogenase, regulador da via das pentoses fosfato, foi também avaliada em *S. cerevisiae* BY4741 crescidas em diferentes condições de temperatura e de exposição a NP-TiO₂.

A figura 4.12A revela um óptimo de actividade G6PD em células crescidas a 28 °C e um mínimo a 40 °C. A presença de NP-TiO₂ não afectou esta actividade enzimática a 25 e 28 °C. Contudo, a 30 °C observou-se um aumento em células expostas a 1 µg/mL e a 40 °C um aumento em qualquer das situações de exposição ($p < 0,01$). Células em choque térmico apresentaram valores de actividade iguais ao óptimo, mas diminuíram na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL). Quando avaliamos a influência da temperatura sobre a actividade glutathione redutase (Fig. 4.12B) encontramos valores mais elevados a 25 e 28 °C que não foram perturbados significativamente pela presença de NP-TiO₂. Contudo, os valores de actividade GR determinados a 30 e 40 °C foram significativamente inferiores aos estimados para células cultivadas a temperatura mais baixa ($p < 0,01$). A 30 °C observou-se ainda um decréscimo

significativo em células expostas à concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a 40 °C se observou a resposta inversa. Em condições de choque térmico 28/40 °C observou-se um valor de actividade sem diferenças significativas dos observados a 25 e 28 °C, mas um aumento linear ($r = 0.98132$) desta actividade cata lítica com o nível de exposição a nanopartículas. A resposta observada em choque térmico por estes enzimas pode ter condicionado a reposição de GSH devido à pouca disponibilidade em equivalentes redutores produzidos pelo G6PD sendo distinta daquela que foi observado em UE-ME₃, facto que pode de algum modo explicar a melhor adaptação ao choque térmico 28/40 °C exibido pela *S.cerevisiae* BY4741. A observação da figura 4.12C mostra um máximo de actividade catalítica GPx em células crescidas a 28 °C que parece explicar os níveis de GSSG elevados que foram detectados a essa temperatura. A actividade GPx desceu, com significado estatístico ($p < 0,01$), para aproximadamente metade do máximo a 28 °C em células crescidas a 30, 40 °C e choque térmico 28/40 °C, não se tendo também detectado, nestas condições de temperatura, alterações significativas pela exposição a NP-TiO₂, excepto no nível de 1 $\mu\text{g/mL}$ em choque térmico.

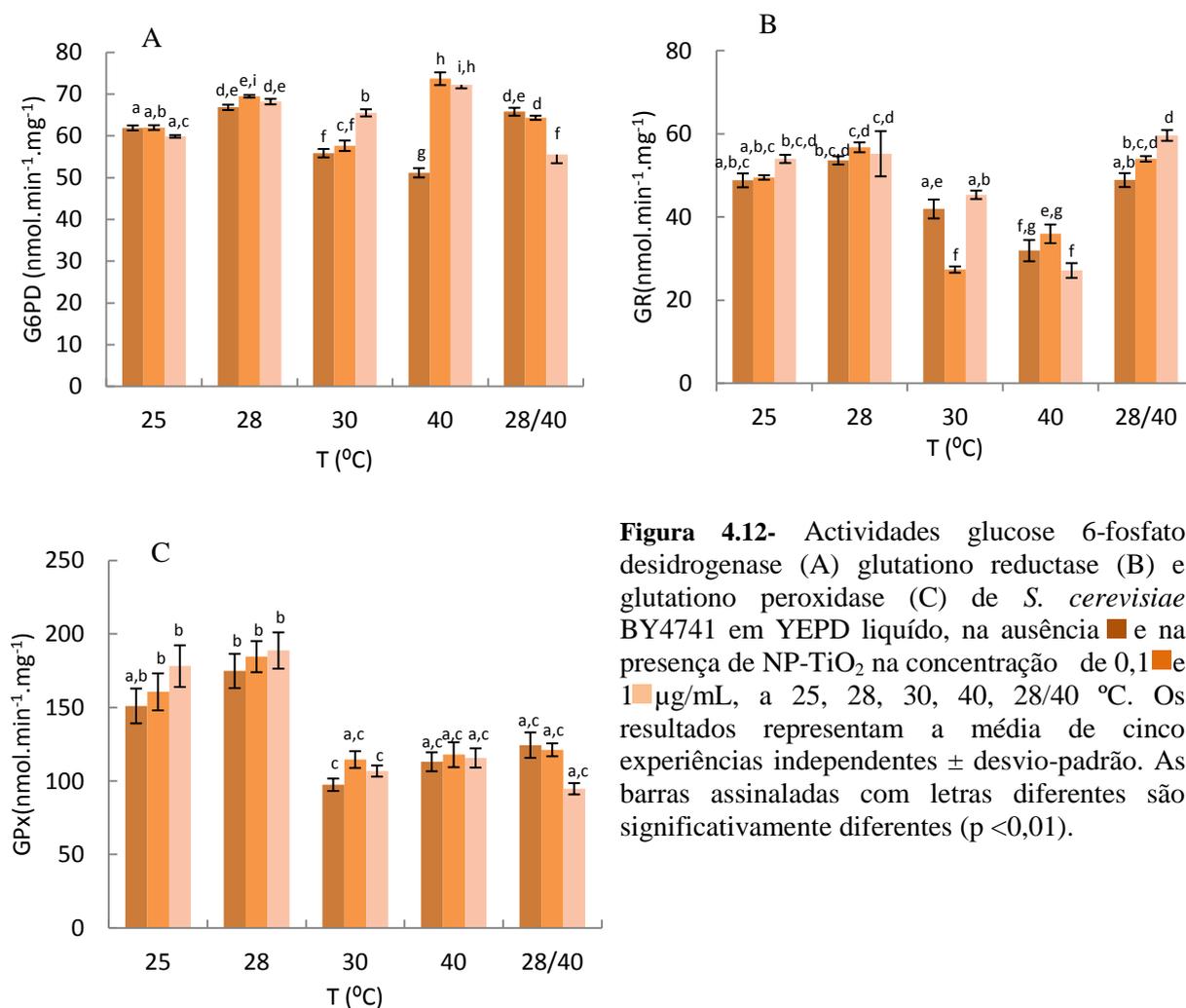


Figura 4.12- Actividades glucose 6-fosfato desidrogenase (A) glutationo reductase (B) e glutationo peroxidase (C) de *S. cerevisiae* BY4741 em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 ■ e 1 ■ $\mu\text{g/mL}$, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A desintoxicação de ROS pela célula viva por via enzimática envolve oxidoredutases citoplasmáticas e peroxissomais, designadas por catalases T e A que reconhecem o peróxido de hidrogénio como substrato e o decompõem em água e dióxigénio. Uma caracterização complementar da resposta antioxidante enzimática à assumida pelo ciclo de oxidação-redução do glutatono, envolve também a determinação do perfil de resposta dessas hemoproteínas que merece ser avaliado em conjunto com a GPx. Por esse motivo também se optou nesta secção por avaliar e caracterizar a resposta das catalases a alterações de temperatura e à presença de nanopartículas no meio de cultura.

A análise da figura 4.13A revela um máximo de actividade CAT T em células crescidas a 28 °C e um mínimo em leveduras cultivadas a 40 °C. A presença de NP-TiO₂ (0,1 µg/mL) causou a 25 °C um aumento da catalase citoplasmática. No entanto, foi detectada resposta inversa em células crescidas a 25 e 30 °C na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL). Por outro lado, a 28 °C ocorreu um decréscimo com significado estatístico em células crescidas na concentração menor de NP-TiO₂ e a 40 °C a presença das nanopartículas no meio de cultura, não causou alterações com significado estatístico ($p < 0,01$). Em condições de choque térmico, o valor de actividade mostrou-se semelhante aos controlos a 28 e 30 °C, não ocorrendo alterações significativas desta actividade em células que cresceram na presença de NP-TiO₂. Neste caso, o perfil de resposta à temperatura mostrou-se semelhante ao determinado em *S. cerevisiae* UE-ME₃, todavia a resposta às NP-TiO₂ foi distinta em BY4741. A figura 4.13B, mostra um máximo de actividade CAT A a 25, 28 e 40 °C e um mínimo em leveduras crescidas a 30 °C. A exposição a NP-TiO₂ provocou para qualquer dos níveis testados um decréscimo com significado estatístico desta actividade enzimática a 25, 28 e 40 °C, contrariado apenas em células crescidas a 30 °C e expostas a NP-TiO₂ (1 µg/mL) onde se observou um acréscimo significativo ($p < 0,01$). O choque térmico levou a que os valores de controlo ficassem próximos dos que foram determinados a 30 °C, mas com queda significativa desta actividade enzimática em leveduras crescidas na presença de NP-TiO₂ (1µg/mL), perfil de resposta idêntico ao que foi observado na estirpe UE-ME₃ e que traduz perda de capacidade antioxidante, eventualmente responsável por morte celular. Convém ainda destacar que os valores da actividade catalase detectados nesta estirpe foram muito inferiores aos detectados na estirpe UE-ME₃, pelo que flutuações destas actividades catalíticas na resposta à temperatura e ao *stress* pelas NP-TiO₂ poderão não reflectir um efeito tão relevante na sobrevivência celular como o que foi observado na estirpe UE-ME₃.

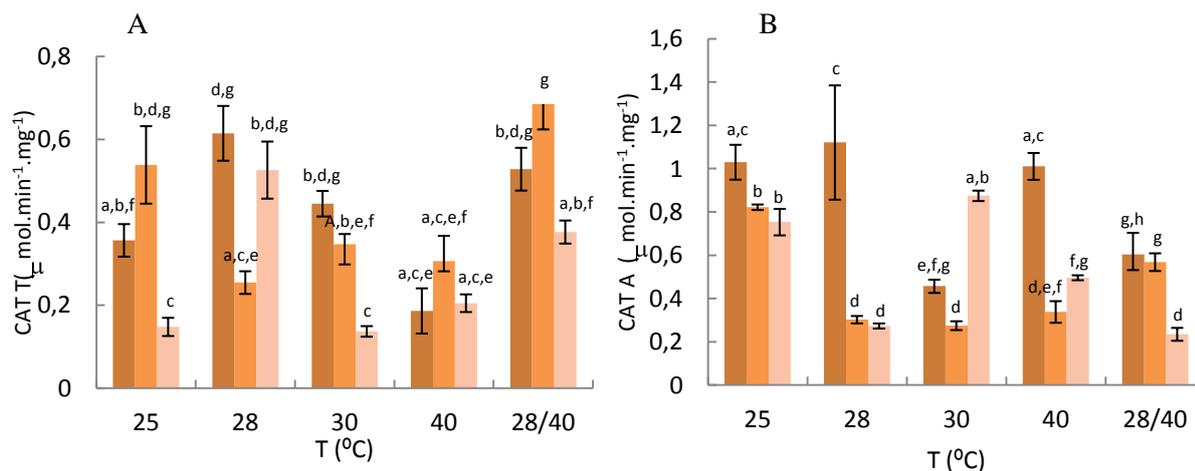


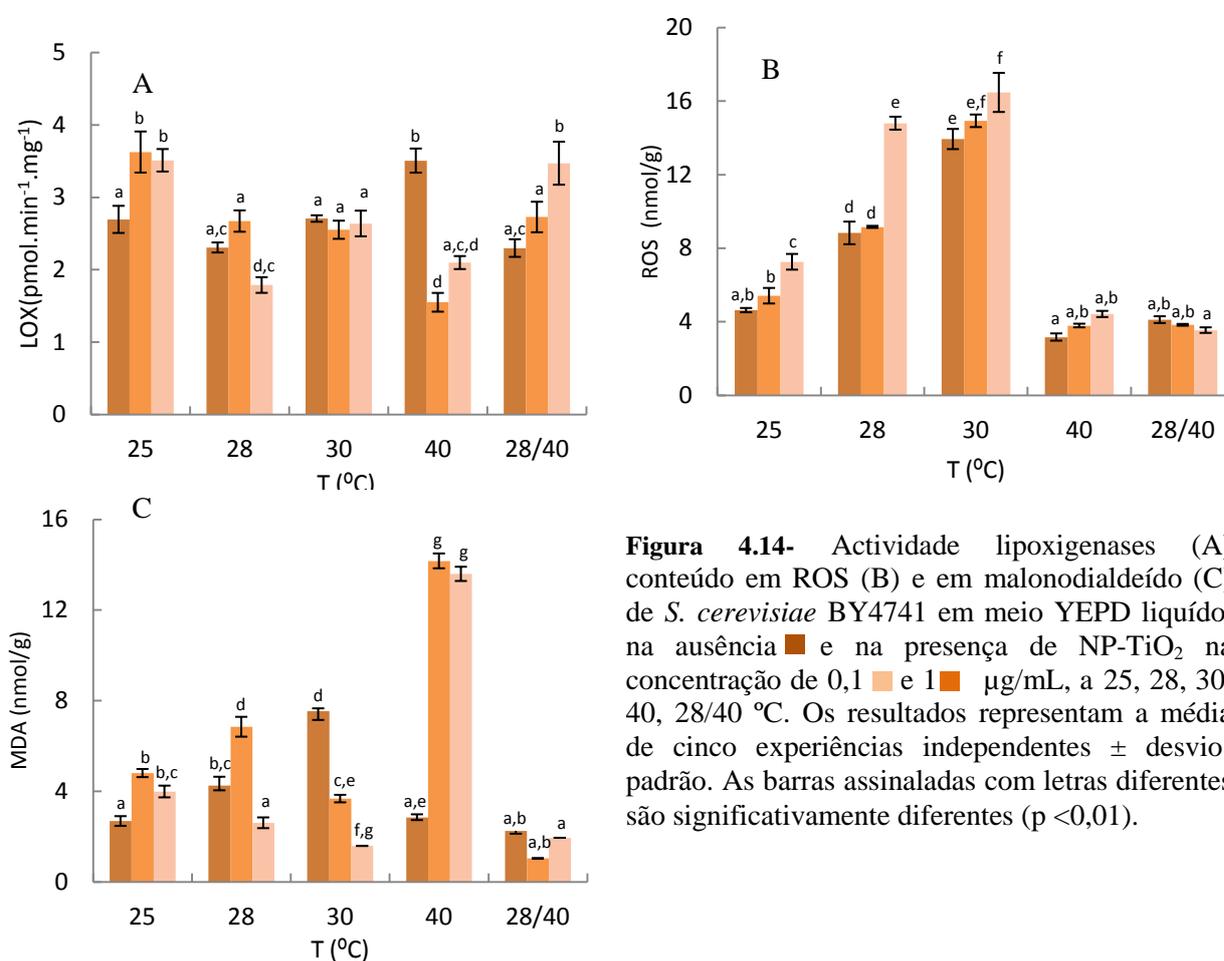
Figura 4.13- Atividades catalase T (A) e catalase A (B) de *S. cerevisiae* BY4741 em YEPD líquido, na ausência ■ e na presença de NP-TiO₂ na concentração de 0,1 ■ e 1 ■ µg/mL, a 25, 28, 30, 40, 28/40 °C. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

4.2.4 - Resposta pró-oxidante

As lipoxigenases ao reconhecerem resíduos acilo polinsaturados como substrato, convertendo-os em lipoperóxidos, contribuem, como referido na secção 4.1.1, para a degradação de componentes lipídicos membranares, comprometendo o papel da compartimentação celular na regulação metabólica da célula eucariota, podendo ainda contribuir para aumentar os níveis intracelulares de ROS. Assim, a quantificação da actividade LOX, dos níveis de MDA e de ROS para caracterizar a resposta da *S. cerevisiae* BY4741 ao *stress* pela temperatura e nanopartículas, como marcadores de alterações pró-oxidantes e de danos celulares, é indispensável pelos motivos invocados na secção 4.1.1 para a estirpe UE-ME₃.

Pela Fig. 4.14A pode detectar-se um máximo de actividade LOX em leveduras crescidas a 40 °C, facto que poderia estar correlacionado com um aumento da peroxidação lipídica, não confirmado pelos níveis de MDA detectados para esta situação e representados na Fig. 4.14B. Os valores de actividade LOX detectados em células crescidas nas outras condições de temperatura não diferem significativamente entre si (p < 0,01). Contudo, em células crescidas a 25 °C, na presença de qualquer nível de NP-TiO₂, observou-se um aumento desta actividade catalítica, resposta que se repetiu a 28 °C mas apenas para o nível de exposição de NP-TiO₂ (0,1 µg/mL). Em leveduras crescidas a 28 °C e expostas a NP-TiO₂ (1 µg/mL), assim como a 40 °C mas para qualquer dos níveis de exposição às nanopartículas, observou-se um decréscimo significativo da actividade LOX. Células em choque térmico na

presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL), apresentaram aumento significativo desta actividade catalítica, resposta que aparentemente não explica os baixos conteúdos de MDA detectados em choque térmico (Fig. 4.14C). A formação de outros aldeídos, produtos da peroxidação lipídica e não detectados pelo método utilizado neste estudo, que quantifica apenas o malonodialdeído, pelo que, deverá ser confirmada em estudos posteriores. Na mesma figura (4.14C) pode-se no entanto observar um aumento significativo do conteúdo intra-celular de MDA, marcador de danos celulares, 28 e 30 °C com quebra significativa em células crescidas a 40 °C. A presença de NP-TiO₂ conduziu a um aumento significativo do conteúdo intra-celular em MDA de células crescidas a 25, 28 e 40 °C, sendo no segundo caso apenas significativa ($p < 0,01$) para o nível de exposição de 0,1 µg/mL.



O nível de ROS (Fig. 4.14B) quantificado em *S. cerevisiae* BY4741 aumentou significativamente entre 25 e 30 °C, tendo ocorrido uma queda acentuada em células crescidas a 40 °C. A presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL) aumentou significativamente a quantidade de ROS em células crescidas a 25, 28 e 30 °C. *S. cerevisiae* BY4741 submetidas a choque térmico 28/40 °C apresentaram nível de ROS significativamente inferior ao detectado em leveduras crescidas a 25, 28 e 30 °C, mas significativamente próximos dos valores obtidos a

40 °C, não ocorrendo resposta com significado estatístico à presença de NP-TiO₂. Ainda que os níveis baixos de ROS detectados a 40 °C e em choque térmico, bem como, de MDA em choque térmico possam ser justificados pelo acréscimo significativo ($p < 0,01$) de CAT T, o baixo nível desta actividade não justifica por si só esta protecção como foi inferido para *S. cerevisiae* UE-ME₃. Provavelmente a capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH poderá vir de outra contribuição complementar endógena.

5. Conclusões

O crescimento biológico é um processo extremamente complexo influenciado pelos mesmos factores que regulam qualquer reacção orgânica em meio aquoso. Embora seja impossível equacionar de forma precisa todas as reacções que se dão na célula em crescimento é possível descrever o processo em termos do estado inicial de substâncias que fazem parte da composição das células em formação e do seu estado final que engloba células e outros produtos do crescimento. Apesar de o ambiente interno dos organismos unicelulares garantir a estabilidade necessária para um crescimento o mais ordenado possível, alterações drásticas no meio circundante podem romper a estabilidade do ambiente celular interno, afectando funções críticas e assim perturbar o seu crescimento normal. A *S. cerevisiae*, tem sido considerada um bom modelo eucarionte para a investigação de mecanismos específicos de resposta ao *stress* ambiental. No entanto, a influência da temperatura, em particular do choque térmico e do efeito conjugado com a exposição a nanopartículas não se encontra descrita na literatura numa perspectiva integrada do metabolismo pró e anti-oxidativo. Assim, espera-se que as conclusões inovadoras expostas neste capítulo, possam contribuir para ampliar os conhecimentos sobre o controlo da proliferação celular de eucariotas pela temperatura e nanopartículas.

Os resultados discutidos na secção 4.1 indicam que o aumento da temperatura acima de 28 °C induziu morte celular de *S. cerevisiae* UE-ME₃, tendo as células atingido o seu óptimo de crescimento a 28 °C e a menor sobrevivência a 40 °C, acentuada na presença de NP-TiO₂ na concentração de 1 µg/mL, comportamento reflectido pelo decréscimo no conteúdo em proteínas total e do sobrenadante pós-12000 g, peso seco, tíóis não-proteicos e actividades enzimáticas ALP, G6PD, GR, GPx, CAT T e CAT A.

A representação de Arrhenius mostrou que a ΔH^\ddagger associada a proliferação celular, em termos de actividade ALP, assumiu valores positivos entre 25 e 28 °C, enquanto que entre 28 e 40 °C tomou valores negativos. Estes resultados evidenciam um óptimo de crescimento da estirpe UE-ME₃ a 28 °C, assegurado por pulsos de *stress* oxidativo, regulados por vias enzimáticas, pró e antioxidantes. No entanto, leveduras crescidas acima dos 28 °C, em particular a 40 °C, poderão ter perdido essa capacidade de gerar pulsos de *stress* oxidativo, devido a desnaturação proteica. Nessas condições o ROS formado poderá ter sido de origem não enzimática e conduzir a condições de *stress* oxidativo crónico responsável pelo aumento de danos e conseqüente morte celular.

O nível de ROS intra-celular apresentou um máximo em células crescidas a 28 °C na ausência de NP-TiO₂ com aumento significativo desse valor em células crescidas na sua presença, em qualquer temperatura testada, excepto a 40 °C onde assumiu valores residuais. Níveis elevados de ROS de origem enzimática parecem, mais uma vez, indispensáveis para *S.cerevisiae* UE-ME₃ alcançar o seu óptimo de crescimento. No entanto, o nível de ROS determinado em células submetidas a choque térmico 28/40 °C, apresentam surpreendentemente um valor baixo, ainda que um pouco superior ao determinado em células cultivadas a 40 °C.

S.cerevisiae UE-ME₃, proliferativas, sujeitas a choque térmico 28/40 °C, durante 200 min, responderam à exposição a NP-TiO₂ (1µg/mL) com aumento da morte celular expressa no decréscimo do conteúdo em proteínas total e do sobrenadante pós-12000 g, peso seco, tióis não-proteicos, ou das actividades enzimáticas ALP, G6PD, GR, GPx, CAT T e CAT A.

O choque térmico 28/40 °C conjugado com a exposição de *S.cerevisiae* UE-ME₃ a NP-TiO₂ conduziu ao aumento do conteúdo em proteínas do sedimento pós-12000 g, um indicador de síntese *de novo* de proteínas, provavelmente ao nível do mitocôndrio e do peroxissoma, facto que em conjunto com os níveis elevados de CAT T, sugere um processo activo de morte nestas condições de ensaio.

O choque térmico 28/40 °C e a exposição de *S.cerevisiae* UE-ME₃ a NP-TiO₂ parecem não influenciar a capacidade tamponante redox mediada pelo glutatono, uma vez que não causaram alterações na razão GSH/GSSG.

S.cerevisiae UE-ME₃ em choque térmico 28/40 °C exibiram valores de actividade LOX idênticos aos determinados a 30 °C, bem como um aumento linear desta actividade catalítica com o nível de exposição a NP-TiO₂, facto que aponta para um aumento da peroxidação lipídica. No entanto, as células em choque térmico 28/40 °C exibiram valores de MDA superiores aos determinados a 28 °C e inferiores aos quantificados a 40 °C, com decréscimo significativo para valores vestigiais nas leveduras expostas a qualquer dos níveis de NP-TiO₂. Apesar de se esperar um aumento de ROS e de danos celulares, estimados pelo MDA, em células submetidas a choque térmico 28/40 °C, tal resposta não foi confirmada, podendo este facto ser justificado pelos níveis elevados de CAT T e moderados de CAT A, correlacionados positivamente com a actividade LOX e que parecem compensar a resposta pró-oxidante deste enzima.

Os resultados discutidos na secção 4.2 mostram que o aumento da temperatura acima do intervalo 25-28 °C induziu morte celular, razão pela qual se pode inferir que as células de *S.cerevisiae* BY4741 exibem o seu óptimo de crescimento algures nesse intervalo de

temperatura e menor sobrevivência a 40 °C, comportamento que se reflectiu no decréscimo do conteúdo em proteínas total, do sobrenadante e sedimento pós-12000 g, peso seco, tióis não-proteicos e actividades enzimáticas, ALP, G6PD, GR, GPx e CAT T. Convém, no entanto, referir que alterações significativas dos marcadores de morte celular detectadas a 40 °C assumiram valores mais próximos dos detectados no intervalo óptimo de crescimento, 25-28 °C, revelando deste modo uma melhor sobrevivência a 40 °C do que a estirpe UE-ME₃.

Contudo, na presença de NP-TiO₂ observou-se um aumento com significado estatístico da actividade ALP de células crescidas a 28 (1 µg/mL), 30 e 40 °C (0,1 e 1 µg/mL), para valores próximos do óptimo, indicador de uma melhor sobrevivência da estirpe BY4741, às nanopartículas.

A representação de Arrhenius apresentou em todas as condições de exposição estudadas um comportamento divergente do observado com a estirpe UE-ME₃ e do ajuste linear dos pontos com declive negativo, como se prevê pela equação teórica. Nesse contexto a ΔH^\ddagger negativa na ausência e na presença de nanopartículas entre 25 e 28 °C evidencia ausência de pulsos de ROS despoletados por processos enzimáticos. Contudo, entre 28 e 40 °C, a alteração no declive detectado na ausência de nanopartículas, ainda que continue a conduzir a ΔH^\ddagger negativa, pode ser interpretada como o crescimento de células BY4741 poder ser controlado por outro(s) passo(s) limitante(s). Porém, no intervalo entre 28 e 40 °C, mas em presença de NP-TiO₂ (0,1 ou 1 µg/mL) os valores de ΔH^\ddagger tornaram-se positivos, como espectável pelo modelo de Arrhenius. A ΔH^\ddagger positiva, ainda que com valores inferiores a 10 kJmol⁻¹, parece ser determinada pelo controlo enzimático de ROS, em particular pelo enzima G6PD que modela a disponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do ciclo do glutathione. Este facto parece ser corroborado pelo aumento da capacidade antioxidante medida pela razão GSH/GSSG, embora insuficiente para reverter a sobrevivência para valores idênticos aos detectados a 25 °C, provavelmente devido ao decréscimo do conteúdo em tióis não-proteicos.

A estabilização do ambiente redutor celular pelo glutathione apresentou um óptimo a 25 °C e um mínimo a 28 °C. A presença de NP-TiO₂ induziu um aumento da razão GSH/GSSG em células crescidas a 25 °C e expostas à concentração de 0,1 µg/mL e em células crescidas a 28 e 40 °C expostas à concentração de NP-TiO₂ mais elevada. No entanto, em qualquer dos casos a capacidade antioxidante do glutathione assumiu valores significativamente inferiores aos detectados na estirpe UE-ME₃. A capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH parece ser significativamente superior na estirpe BY4741 onde, a estabilização do

ambiente redutor celular poderá ser regulada por via química em que estejam envolvidos, por exemplo, compostos fenólicos. Esta resposta adaptativa poderá justificar em parte a maior tolerância ao aumento da temperatura revelado pela estirpe BY4741.

Convém destacar que os valores da actividade catalase (T e A) detectados na estirpe BY4741 foram muito inferiores aos determinados na estirpe UE-ME₃, pelo que flutuações destas actividades catalíticas na resposta à temperatura e ao *stress* pelas NP-TiO₂ poderão não reflectir um efeito tão relevante na sobrevivência celular como o que foi observado na estirpe UE-ME₃.

O máximo de actividade LOX determinado em leveduras crescidas a 40 °C, não correlacionável com os níveis de MDA, corresponde no entanto ao mínimo de sobrevivência, enquanto a actividade LOX detectada nas outras condições de temperatura não difere significativamente entre si. A presença de NP-TiO₂ provocou um aumento da LOX a 25 e 28 °C, significativo para qualquer nível de exposição e a 25 °C apenas para 0,1 µg/mL. Por outro lado, observou-se um decréscimo desta actividade enzimática em leveduras crescidas a 28 °C e expostas a NP-TiO₂ (1 µg/mL), assim como a 40 °C mas para qualquer dos níveis de exposição. Neste último caso o decréscimo da actividade parece contribuir para um aumento da sobrevivência celular detectado em termos de proteína total, do sobrenadante e actividade ALP.

A presença de NP-TiO₂ conduziu a um aumento significativo do conteúdo intra-celular em MDA de células crescidas a 25, 28 e 40 °C, sendo no segundo caso apenas significativa para o nível de exposição de 0,1 µg/mL, enquanto que o nível de ROS em BY4741 aumentou significativamente entre 25 e 30 °C, com queda acentuada em células crescidas a 40 °C. A presença de NP-TiO₂ aumentou significativamente a quantidade de ROS em células crescidas a 25, 28, 30 e 40 °C para qualquer nível de exposição, excepto a 28 °C onde nas células crescidas na presença de NP-TiO₂ (0,1 µg/mL) não se observaram diferenças significativas do seu controlo.

O conteúdo total em proteínas de células BY4741 sujeitas a choque térmico 28/40 °C, não foi afectado em qualquer das situações em estudo, resposta distinta da que foi observada com *S.cerevisiae* UE-ME₃. Porém, o choque térmico 28/40 °C associado a qualquer dos níveis de exposição a NP-TiO₂ causou um decréscimo significativo do conteúdo proteico do sobrenadante pós-12000 g. O aumento significativo do conteúdo proteico do sedimento pós-12000 g em células crescidas em choque térmico e expostas a NP-TiO₂ (1 µg/mL) foi comum ao detectado em *S.cerevisiae* UE-ME₃, nas mesmas condições de cultura e sugerindo igualmente síntese *de novo* de proteínas. No entanto, a presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL) no

meio de cultura contribuiu para aumentar significativamente o peso seco de células crescidas em choque térmico 28/40 °C, não indiciando morte celular como em *S. cerevisiae* UE-ME₃, provavelmente porque a temperatura ótima de crescimento da estirpe BY4741 será entre 25 e 28 °C e mostra melhor adaptabilidade à temperatura a 40 °C.

Células BY4741 expostas ao choque térmico 28/40 °C e NP-TiO₂ (1 µg/mL) revelaram um decréscimo com significado estatístico do conteúdo em tióis não-proteicos e da actividade ALP, resposta às nanopartículas associada ao choque térmico durante 200 min, comum ao que foi observado na estirpe UE-ME₃ e que sugere diminuição da capacidade proliferativa.

Células expostas ao choque térmico 28/40 °C e NP-TiO₂ revelaram um decréscimo com significado estatístico da razão GSH/GSSG, um indiciador de *stress* oxidativo.

Apesar da capacidade antioxidante, medida pelo DPPH, diminuir na presença de NP-TiO₂ em células BY4741 sujeitas a choque térmico 28/40 °C, a sua ordem de grandeza permaneceu superior a qualquer dos controlos das temperaturas testadas, pelo que esta estirpe parece exibir melhor capacidade adaptativa à presença de NP-TiO₂ em condições de choque térmico do que a que foi detectada na estirpe UE-ME₃.

Células BY4741 em choque térmico apresentaram ainda valores de actividade G6PD e GPx próximos do ótimo, mas diminuíram na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL), resposta que pode ter condicionado a reposição de GSH via GR, uma vez que, se observou um aumento linear da actividade GR com o nível de exposição a NP-TiO₂. Esta resposta ao choque térmico por BY4741 é distinto daquele que foi detectado na estirpe UE-ME₃ e pode também explicar a melhor adaptação ao choque térmico 28/40 °C exibido pela *S.cerevisiae* BY4741.

O choque térmico levou a que na estirpe BY4741 os valores de CAT A ficassem próximos dos que foram determinados a 30 °C, mas com queda significativa desta actividade enzimática em leveduras crescidas na presença de NP-TiO₂ (1µg/mL), perfil de resposta idêntico ao que foi observado na estirpe UE-ME₃ e que traduz perda de capacidade antioxidante, eventualmente responsável por morte celular.

O choque térmico acoplado à presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL) em BY4741, despoletou um aumento significativo da LOX, resposta que aparentemente não explica os baixos conteúdos de MDA detectados em choque térmico. A formação de outros aldeídos, produtos da peroxidação lipídica e não detectados pelo método utilizado neste estudo, que quantifica apenas o malonodialdeído, deverá ser confirmada em estudos posteriores.

S. cerevisiae BY4741 em choque térmico 28/40 °C apresentaram nível de ROS significativamente menor do que foi detectado em células crescidas a 25, 28 e 30 °C, mas

próximos dos valores obtidos a 40 °C, situação em que não ocorreu resposta com significado estatístico à presença de nanopartículas. Ainda que os níveis baixos de ROS detectados a 40 °C e em choque térmico, bem como, de MDA em choque térmico possam ser justificados pelo acréscimo significativo de CAT T, o baixo nível desta actividade não justifica por si só esta protecção como foi inferido para *S. cerevisiae* UE-ME₃. Provavelmente a capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH poderá ter dado uma contribuição complementar relevante.

A exposição a NP-TiO₂ (1µg/mL) e o choque térmico 28/40 °C durante 200 min diminuem a capacidade proliferativa das células, uma resposta comum às duas estirpes de *S. cerevisiae* estudadas, embora mais evidente na estirpe UE-ME₃. A resposta a este tipo de estratégia a outros eucariotas envolverá a aferição do choque térmico aplicável a cada tipo de células, que maximize o decréscimo da proliferação celular. O choque térmico deve ser delineado partindo da temperatura óptima de crescimento, máxima proliferação, e elevando a temperatura para um valor ao qual as células apresentam um mínimo de sobrevivência, condição melhor ajustada em *S. cerevisiae* UE-ME₃ com óptimo de crescimento a 28 °C e baixa sobrevivência a 40 °C, enquanto que a estirpe BY4741, manifesta um óptimo de crescimento entre 25 e 28 °C e nível de sobrevivência mais elevado a 40 °C.

6. Referências bibliográficas

- Abegg M, Alabarse P, Casanova A. (2010) Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathology*. 170, 11–20.
- Anderson M. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111–112, 1–14.
- Babusikova E, Jesenak M, Dobrotal D. (2008) Age-dependent effect of oxidative stress on cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *Physiol. Res.* 57, S49-S54.
- Batista R, Oliveira M, Pires C, Piovesan N, Rezende S, Moreira M. (2002) Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenase de plantas de soja submetidas á aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesq. Agropec. Brasil*. Brasília. 37,1517-1524.
- Belinha I, Amorim M, Rodrigues P, Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N and Costa V. (2007) Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 2446–2451.
- Brash A. (1999) Lipoxigenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679- 23682,
- Brachman C, Davies A, Cost G. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14, 115–132.
- Bauer F, Pretorius J. (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *J. Afr. J. Enol.* 21, 27-51.
- Beers R, Sizer I (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- Berlett B, Stadtman E. (1997) Protein oxidation in aging disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Bergmeyer H, Bergmeyer J, Grassl M. (1983) Methods of enzymatic analyses. *Weinheim: VCH Verlag.* 1, 233-260.
- Bermudez E, Mangum J, Wong B, Asgharian B, Hext P, Warheit D. (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 77, 347–357.
- Brand-William W, Cuvelier M, Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Academic. Press.* 28, 25-30.
- Brash A. (1999) Lipoxigenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679–23682.
- Bretaudiere J, Spillman T. (1984) Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol. II, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- Candeias M. (2010) Stress por fenilureias Efeitos do isotruturão sobre o metabolismo energético de eucariotas, Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora.
- Carrasco P, Querol A, del Olmo M. (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.* 175, 450-457.
- Carru C, Zinellu A, Sotgia S, Marongiu G, Farina M, Usai M, Pes G, Tadolini B, Deiana L. (2003) Optimization of the principal parameters for the ultrarapid electrophoretic separation of reduced and oxidized glutathione by capillary electrophoresis. *J. Chrom. A.* 1017, 233–238.

Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. (2000) Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Molec. Cell Biochem.* 222, 183-188.

Cheney M, Sposito G, Mac Grath A, Criddle R. (1996) Abiotic degradation of 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) on synthetic birnessite: a calorimetric method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin. Aspects.* 107, 131-140.

Cohen R, Engelberg D. (2007) Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 239-243.

Cornish-Bowden A. (2001) Fundamentals of enzyme kinetics. 3rd ed Portland Press, London.

Cornish-Bowden A, Cardenas M. (2001) Information transfer in metabolic pathways effects of irreversible steps in computer models. *Eur. J. Biochem.* 268, 6616-6624.

Cordier H, Mendes F, Vasconcelos I, François J. (2007) A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metab. Eng.* 9, 364-378.

Costa V, Moradas-Ferreira P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molec. Aspect. Medic.* 22, 217-246.

Craft N, Brown E, Smith J. (1988) Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids. retinol and tocopherol in plasma. *Clin. Chem.* 34, 44-48.

Curtis J, Greenberg M, Kester J, Scott P, Krieger G. (2006) Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol. Rev.* 125, 245-260.

Dick C, Brown D, Donaldson K, Stone V. (2003) The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal. Toxicol.* 15, 39-52.

Doudican N, Song B, Shadel G, Doetsch P. (2005) Oxidative DNA Damage Causes Mitochondrial Genomic Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biol.* 25, 5196-5204.

Douglas K, Dirk V, Timothy M, Bruce J. (2000) Titanium nanoparticles move to the marketplace. *Chem. Innov.* 30, 30-35.

Donaldson K, Stone V, Gilmour P, Brown D, MacNee W. (2000) Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358, 2741-2749.

Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Durfinova M, Brechtlová M, Líška B, Barošková Z. (2007) Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues. *Chemic. Papers.* 61, 321-325.

Ďurfinová M, Brechtlová M, Kuračka I, Zálešáková J. (2010) Effect of Mineral Water from Trenčianske Teplice (Drinkable Source, Drill SB-3) on Lipid Peroxidation *in Vitro*. *Prague Medic. Report.* 111, 257-262.

EPA (2007) Nanotechnology white paper. U.S. environmental protection agency report EPA 100/B-07/001, Washington DC 20460, USA.

Elskens M, Penninckx M. (1995) In vitro inactivation of yeast glutathione reductase by tetramethylthiuram disulphide. *Eur. J. Biochem.* 231, 667-672.

Espindola A, Gomes D, Panek A, Eleutherio E. (2003) The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiol.* 47, 236-241.

- Eyring H. (1935) The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* 3, 107.
- Farmer E, Ryan C. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant. Cell.* 4, 129-134.
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. (2007) Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Canc.* 121, 2381–2386.
- Ferin J, Oberdörster G. (1985) Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 46, 69–72.
- Ferin J, Oberdörster G, Soderholm S, Gelein R. (1991) Pulmonary tissue access of ultrafine particles. *J. Aerosol. Med.* 4, 57–68.
- Ferreira R, Alves-Pereira I, Magriço S, Ferraz-Franco C. (2006) Comparative effects of NH_4VO_3 on detoxication enzymes and redox state of wine *Saccharomyces*. In: Collery P (ed) Metal ions in biology and medicine. *John Libbey Eurotext.* 9, 169–174.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo M. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1057–1064.
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. (2008) Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med. Gen.* 9, 30.
- Flohé L, Gunzler W. (1984) Assay of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 105, 114-121.
- Fox C, Keith A. (1972) Membrane assembly, in: Membrane molecular biology, eds Sinauer.
- Fubini B, Hubbard A. (2003) Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol. Med.* 34, 1507-1516.
- Federici G, Shaw B, Handy R. (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aq. Toxicol.* 84, 415-430.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessman H, Ryalis J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 261, 754–756.
- Gata J, Pinto M, Macías P. (1996) Lipoxygenase Activity in Pig Muscle: Purification and Partial Characterization. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2573–2577.
- Gasch A, Werner-Washburne M. (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genom.* 2, 181–192.
- Goffeau A, Barrell B, Bussey H, Davis R, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J, Jacq C, Johnston M, Louis E, Mewes H, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver S, (1996) Life with 6000 genes. *Science.* 274, 563–567.
- Goldberg D, Spooner R. (1987) Glutathione reductase, in: Bergmeyer - *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., 258-265, Bergmeyer, VCH, New York.
- González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Argüelles J. (2008) Stress responses in yeasts: what rules apply?. *Arch. Microbiol.* 189, 293-296.
- Gasch A, Werner-Washburne M. (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genom.* 2, 181–192.
- Guan W, Verma S, Gaol Y, Andersson C, Zhail Q, Liu J. (2006) Characterization of Nanoparticles of Lead Free Solder Alloys. *Electr. System Integr Technol. Conf.* Germany. Dresden. 7-12.

Guzman K, Taylor M, Banfield J. (2006) Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000 and 2004. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1401-1407.

Hall C, Husson F, Kermasha S. (2004) Characterization of an enriched lipoxygenase extract from *Aspergillus niger* in terms of specificity and nature of flavor precursors production. *J. Mol. Catal, B: Enz.* 29, 201–209.

Halliwell B, Gutteridge J. (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford.

Halliwell B.(2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant. Physiol.* 141, 312–322.

Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Hildebrand D, Hamilton-Kemp T, Legg C, Bookjans G.(1988). Plant Lipoxygenases: Occurrence, properties, and possible functions. *Curr. Top. Plant. Biochem. Physiol.* 7, 201-219.

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

Huang Y, Aronstam C. (2010) Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from *in vitro* studies. *Mater.* 3, 4842-4859.

Hu T, Qv X, Hu Z, Chen G, Chen Z. (2011) Expression, molecular characterization and detection of lipoxygenase activity of *tomlox D* from tomato. *African J. Biotechnol.* 10, 490-498.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A. (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 320, 61–67.

Jamieson D. (1995) The effect of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox. Rep.* 1, 89–95.

Jani P, McCarthy D, Florence A. (1994) Titanium dioxide (rutile) particles uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int. J. Pharm.* 105, 157–168.

Jiang J, Oberdorster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P. (2008) Nanoparticle activity depend upon size and crystal phase?. *Nanotoxicol.* 2, 33-42.

Jones C, Zhu C, Martin S, Han Z, Li Y, Alevriadou R . (2007) Regulation of Antioxidants and Phase 2 Enzymes by Shear-Induced Reactive Oxygen Species in Endothelial Cells. *Ann Biomed Engin.* 35, 683–693.

Kaplan P, Jurkovicova D, Babusikova E, Hudecova S, Racay P, Sirová M, Lehotsky J, Drgová A, Dobrota D, Krizanová O. (2007) Effect of aging on the expression of intracellular Ca²⁺ transport proteins in a rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 301, 219-226

Kim R, Emi M, Tanabe K. (2006) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Canc. Chem. Pharm.* 57, 545–553.

Kim H, Jung K, Yu B. (2002) Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mech. Ageing. Dev.* 123, 1589-1595.

Kon K, Kim J, Jaeschke H, Lemasters J. (2004) Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology.* 40, 1170-1179.

Kono Y, Fridovich I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.

- Könönen M, Kivilahti J. (2001) Fusing of dental ceramics to titanium. *Dent. Res.* 80, 848-854.
- Lake B. (1987) Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 183–215.
- Lebel P, Ischiropoulos H, Bondys C. (1990) Evaluation of the probe 2,7 dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res.* 5, 227-231.
- Lide D. (2001) *Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of hemical and Physical Data*, CRC Press, Boca Raton.
- Long T, Saleh N, Tilton R, Lowry G, Veronesi B. (2006) Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci.Technol.* 40, 4346–4352.
- Lovern S, Klaper R. (2006) *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles, *Envir. Toxicol. Chem.* 25, 1132–1137.
- Low P, Bada J, Somero G. (1973) Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 430.
- Lowry O, Rosebrough G, Farr A. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193, 265-275.
- Lushchak V, Bagnyukova T, Husak V, Luzhna L, Lushchak O, Storey K. (2005) Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J.Biochem. Cell Biol.* 37, 1670–1680.
- Mathews-Roth M (2000) Erythropoietic protoporphyria: treatment with antioxidants and potential cure with gene therapy. *Methods Enzymol.* 319, 479–484.
- Madigan, Martinko, Parker (2004) *Microbiologia de Brock*, 10^a ed., Editora, São Paulo.
- Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup. Environ Med.* 64, 609–615.
- Mossman, Churg. (1998) A Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1666-1680.
- Nowack B, Bucheli T. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Env. Poll.* 150, 5-22.
- Oberdorster G. (2000) Toxicology of ultrafine particles: In vivo studies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 358, 2719–2740.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 7.
- Oberdörster G. Oberdörster E, Oberdörster J. (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particl. Fibre. Toxicol.* 2, 8.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358
- Olson L, Kuwata K, Bartberger M, Houk k. (2002) Conformation-Dependent State Selectivity in O-O Cleavage of ONOONO: An “Inorganic Cope Rearrangement” Helps Explain the Observed Negative Activation Energy in the Oxidation of Nitric Oxide by Dioxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9469 - 9475.

Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant J, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C. (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant. J.* 50, 452–465.

Paciello L (2009) Performance of the auxotrophic *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 as host for the production of IL-1 β in aerated fed-batch reactor: role of ACA supplementation, strain viability, and maintenance energy. *Microb. Cell. Factor.* 70, 1-13.

Packard T e Gómez M. (2008) Exploring a first-principles-based model for zooplankton respiration. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 371-378.

Pelczar M, Krieg N. (1993) *Microbiologia: Conceitos e Aplicações – V. I-II*, McGraw-Hill Companies, New York.

Penninckx M. (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental and oxidative stresses. *Enzym. Microb. Technol.* 26, 737-742.

Penninckx M. (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts, *FEM Yeast Res.* 2, 295–305.

Perrone G, Tan S, Dawes I. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783, 1354–1368.

Pias E, Ekshyyan O, Rhoads C, Fuseler J. (2003) Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 13294-13301.

Pinto I, Cardoso H, Leao C, van Uden N. (1989) High Enthalpy and Low Enthalpy Death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by Acetic Acid. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1350.

Postma E, Verduyn C, Scheffers W, van Dijken J (1989) Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 468-477.

Postmus J, Canelas A, Bouwman B, Bakker B, van Gulik W, Teixeira de Mattos M, Brul S, Smits G. (2008) Quantitative analysis of the high temperature-induced glycolytic flux increase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals dominant metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* 283, 23524

Poulsen H. (2005) Oxidative DNA modifications. *Exp.and Tox. Pathol.* 57, 1161-169.

Quapp W, Zech A. (2010) Transition state theory with tsallis statistics. *J. Comp. Chem.* 31, 573.

Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. (2003) Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 84–95.

Renwick L, Brown D, Clouter A, Donaldson K. (2004) Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 6, 442–7.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activityrelationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933–956.

Rodriguez- Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens M. (2003) Effects on In Vitro Embryo Development and Intracellular Glutathione Content of the Presence of Thiol Compounds During Maturation of Prepubertal Goat Oocytes. *Mol. Reprod. and Develop.* 65, 446–453.

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

Ruis H, Köller F. (1997) Biochemistry, molecular and cell biology of yeast and fungal catalases. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences. Scandalios JG, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Santos T, Mitchell D, Krieger N, Moure V, Zanoelo É. (2010) Experimental and modelling study of enzymatic oxidation of 5-*o*-caffeoylquinic acid by polyphenol oxidases. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 548.

Schafer, Buettner. (2001) Redox environment of cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* 30,1191–1212.

Scherer P, Fischer S. (2010) Calculation of reaction rates, *in*: Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, part V, 159. Springer Heidelberg, London.

Schins R. (2002) Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal. Toxicol.* 14, 57-78.

Scruton N, Berry A, Perham R. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature.* 343, 38–43.

Sen C. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* 36, 1–30.

Sheu S, Nauduri D, Anders M. (2006) Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762, 256–265.

Siedow J. (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 145–188

Sohal R, Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science.* 273, 59–63.

Stone V, Donaldson K. (2006) Nanotoxicology, Signs of stress. *Nat. Nanotechnol.* 1, 23-24.

Song J, Cha J, Lee J, Roe J. (2006) Glutathione Reductase and a Mitochondrial Thioredoxin Play Overlapping Roles in Maintaining Iron-Sulfur Enzymes in Fission Yeas. *Eukaryotic cell*, 5, 1857–1865.

Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y. (2000) The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 15535–15540.

Taira J, Mimura K, Yoneya T, Hagi A, Murakami A, Makino K. (1992) Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells. *J. Biochem.* 111, 693–695.

Talsky G. (1971) The anomalous temperature dependence of enzyme-catalyzed reactions. *Angew. Chem. Internatl.* 10, 548-554.

Tanaka K, Watanabe T, Sharyo S, Ohashi Y, Takaoka M. and Manabe S. (2005) Acquired resistance to bromobenzene hepatotoxicity by repeated treatment of rats with bromobenzene. *J. Toxicol. Pathol.* 18, 189-198.

Thomas C, Navid S, Robert D. (2006) Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4346–4352.

Todorova D, Nedeva D, Abrashev R, Tsekova K (2006) Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger*. *J. App. Microbiol. B.* 77, 1364-5072.

Turton H, Dawes I, Grant C. (1997) - *Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a yAP-1-Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde. *J. Bacteriol.* 179, 1096–1101.

Tyrrell R. (1995) Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 47–53.

Walsh R. (2008) Thermochemical kinetics: does it still give insights?. *Chem. Soc. Rev.* 37, 686-698.

Wang Z, Petroski J, Green T, El-Sayed M. (1998) Shape transformation and melting of cubic and tetrahedral platinum nanocrystals. *Phys.Chem. B*, 102, 6145-6151.

Wang J, Zhou G, Chen C, Yu C, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Let.* 168, 176-185.

Warheit D, Webba T, Reeda K, Frerichsb S, Sayes C. (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicol.* 230, 90–104.

Warheit D. (2004) Nanoparticles: health impacts?. *Mater. Today.* 7, 32–35.

Watanabe D, Wu H, Noguchi C, Zhou Y, Akao T, Shimoi H. (2010) Dysfunction of Yeast Stress Response Components Msn2/4p Enhances the Initial Rate of Ethanol Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 934-941.

Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Muller M. (2008) Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J. Exp. Bot.* 59, 4017–4027.

ANEXOS

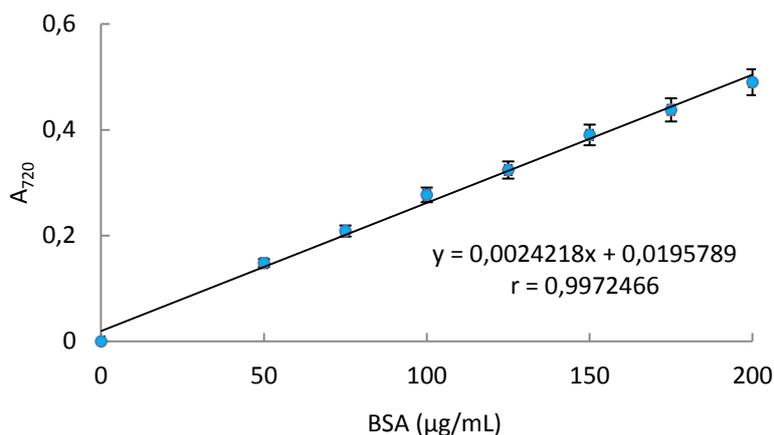


Figura A1- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, pelo método de Lowry, construída a partir da leitura de absorvência de solução padrão de BSA (0-200 µg/mL).

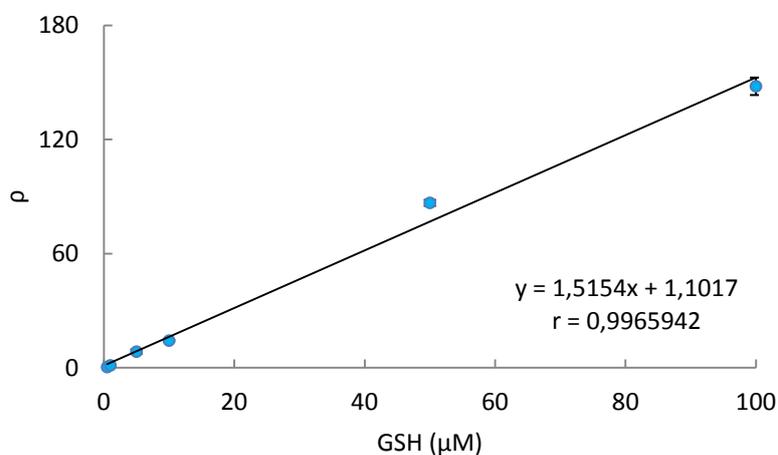


Figura A2- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-100 µM).

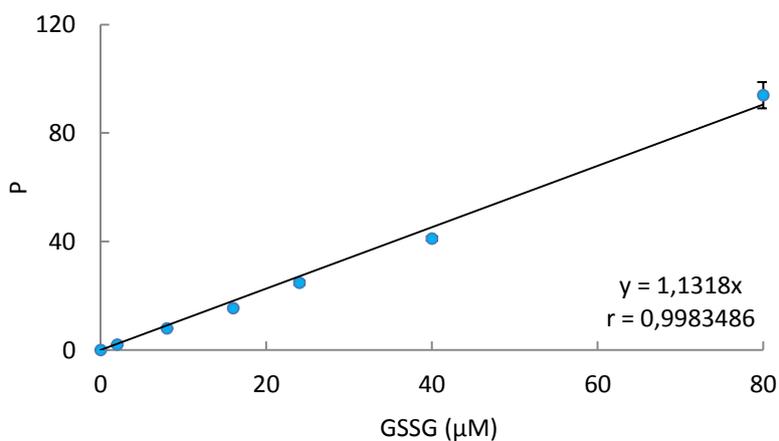


Figura A3- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de solução padrão (0-80 µM).

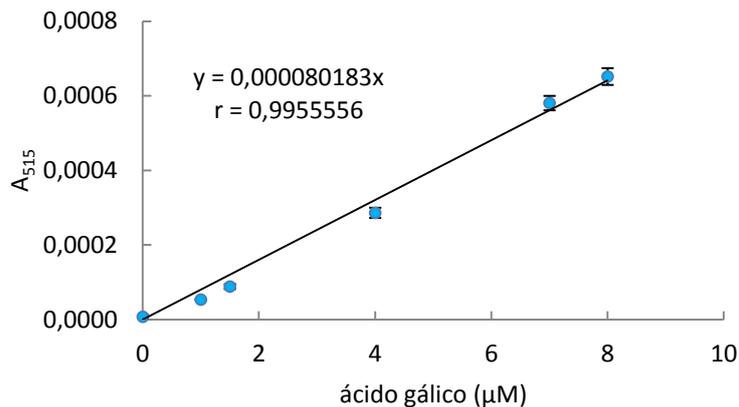


Figura A4- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de DPPH, construída a partir da leitura de absorvência de solução padrão (0-8 μM).

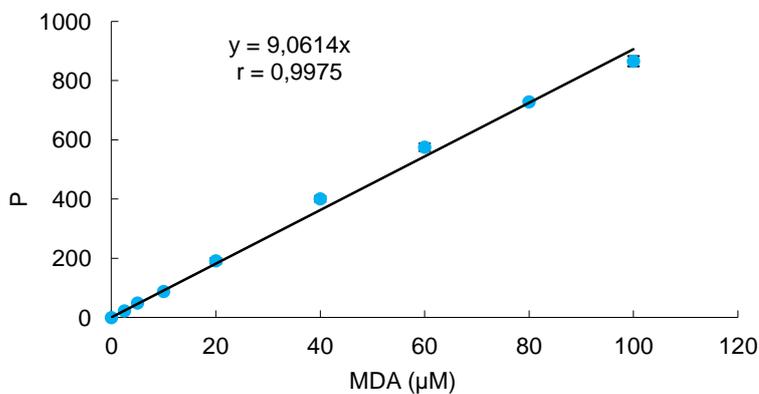


Figura A5- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura da potência de fluorescência (0-100 μM).

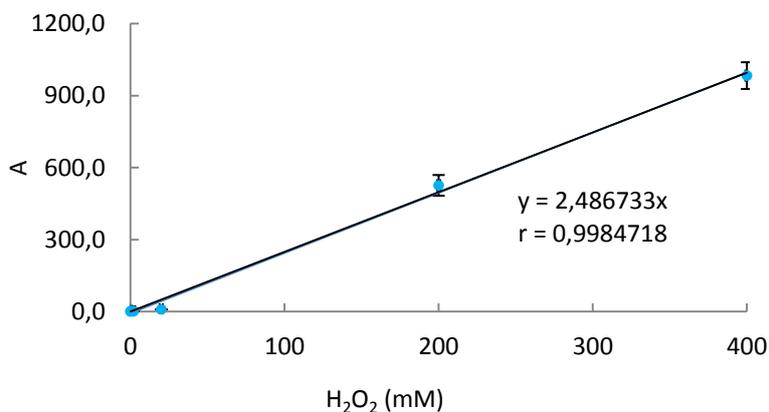


Figura A6- Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura por absorção molecular de solução padrão (0-400 mM).

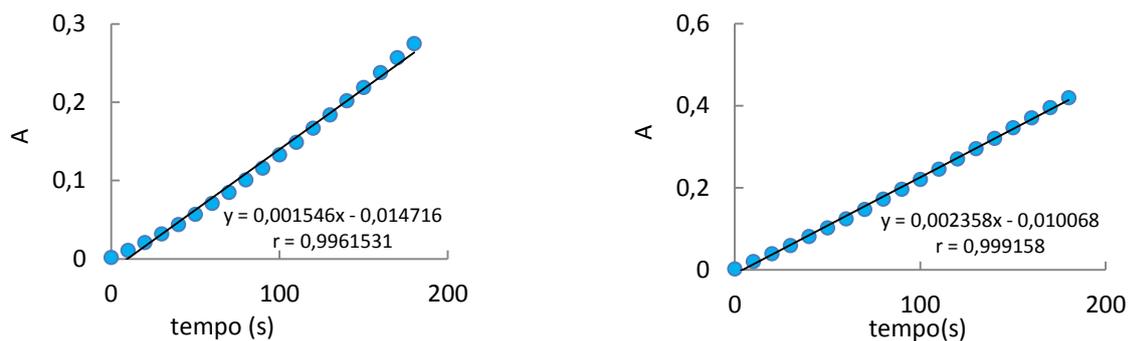


Figura A7– Representação gráfica da curva de reacção ALP no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

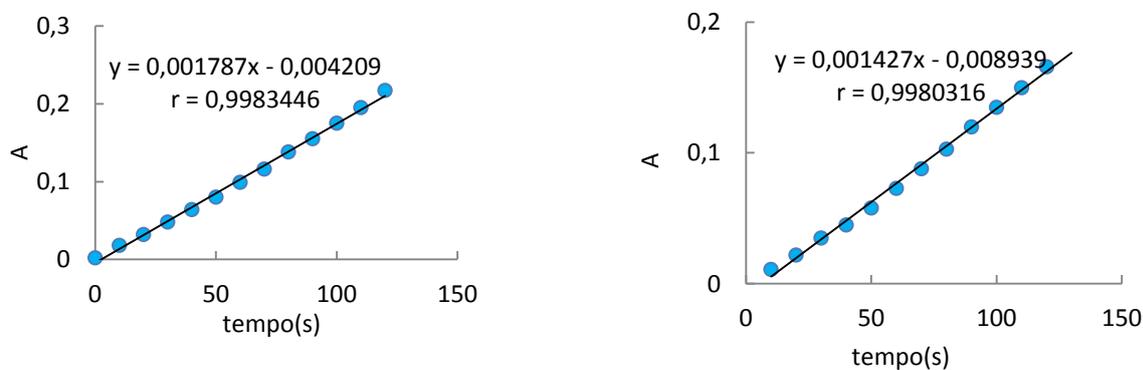


Figura A8– Representação gráfica da curva de reacção G6PD no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

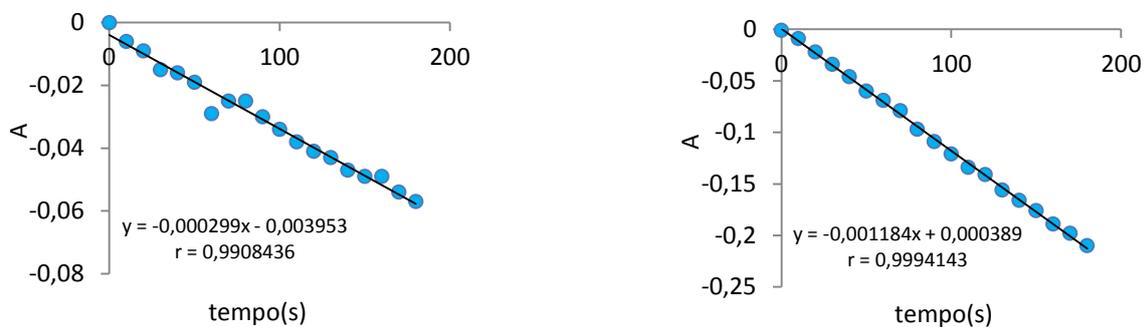


Figura A9– Representação gráfica da curva de reacção GR no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

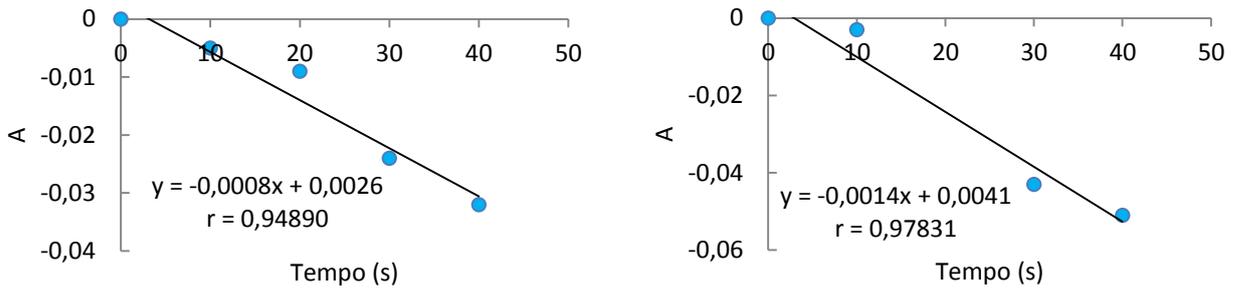


Figura A10– Representação gráfica da curva de reacção GPx no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

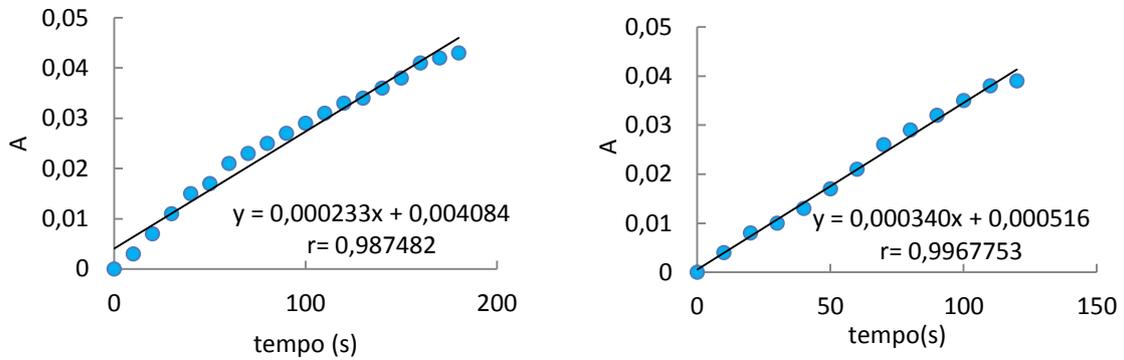


Figura A11– Representação gráfica da curva de reacção CAT T no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

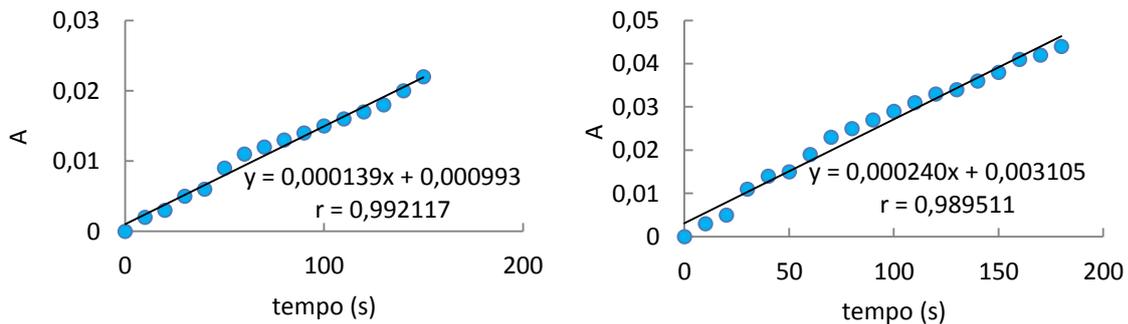


Figura A12– Representação gráfica da curva de reacção LOX no sobrenadante da fracção pós-12000 g de *S. cerevisiae* UE-ME₃ e BY4741, respectivamente, na presença de NP-TiO₂ (1 µg/mL).

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, a diferentes temperaturas na ausência e na presença de NP-TiO₂ (0,1 e 1 µg/mL).

conc. ou activ. enzimática	origem de variância	soma dos quadrados	graus de liberdade	variância	F	Sig.
prot.total	entre grupos	1046,570	14	74,755	5,832	,000
	no interior dos grupos	15,024	60	,345		
	total	1046,570	74			
prot.sobre	entre grupos	1046,443	14	74,746	321,482	,000
	no interior dos grupos	13,950	60	,233		
	total	1060,394	74			
prot.sed	entre grupos	22,977	14	1,641	53,464	,000
	no interior dos grupos	1,842	60	,031		
	total	24,819	74			
peso seco	entre grupos	2056,600	14	146,900	15,455	,000
	no interior dos grupos	570,300	60	9,505		
	total	2626,900	74			
ALP	entre grupos	13161,722	14	940,123	202,615	,000
	no interior dos grupos	278,398	60	4,640		
	total	13440,119	74			
GSH+GSSG	entre grupos	76859,142	14	5489,939	677,897	,000
	no interior dos grupos	406,365	60	3,899		
	total	76859,142	74			
GSH	entre grupos	20311,908	14	1450,851	515,570	,000
	no interior dos grupos	168,844	60	2,814		
	total	20480,752	74			
GSSG	entre grupos	29433,670	14	2102,405	605,973	,000
	no interior dos grupos	208,168	60	3,469		
	total	29641,838	74			
GSH/GSSG	entre grupos	53,113	14	3,794	1,467	,000
	no interior dos grupos	2,897	60	,000		
	total	53,113	74			
DPPH	entre grupos	90,890	14	6,492	317,047	,000
	no interior dos grupos	1,229	60	,020		
	total	92,119	74			
G6PD	entre grupos	679913,521	14	48565,252	1817,006	,000
	no interior dos grupos	1603,690	60	26,728		
	total	681517,212	74			
GR	entre grupos	4703,515	14	335,965	79,728	,000
	no interior dos grupos	252,834	60	4,214		
	total	4956,349	74			
GPx	entre grupos	128486,298	14	9177,593	30,167	,000
	no interior dos grupos	18253,497	60	304,225		
	total	146739,795	74			
CAT T	entre grupos	1140,401	14	81,457	69,352	,000
	no interior dos grupos	70,472	60	1,175		
	total	1210,873	74			
CAT A	entre grupos	72,520	14	5,180	65,829	,000
	no interior dos grupos	4,721	60	,079		
	total	77,242	74			
LOX	entre grupos	126,917	14	9,066	53,437	,000
	no interior dos grupos	10,179	60	,170		
	total	137,096	74			
ROS	entre grupos	21733,286	14	1552,378	700,115	,000
	no interior dos grupos	133,039	60	2,217		
	total	21866,325	74			
MDA	entre grupos	182930,864	14	13066,490	2370,601	,000
	no interior dos grupos	330,713	60	5,512		
	total	183261,577	74			

Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, a diferentes temperaturas na ausência e na presença de NP-TiO₂ (0,1 e 1 µg/mL).

conc. ou activ. enzimática	origem de variância	soma dos quadrados	graus de liberdade	variância	F	Sig.
prot.sobre	entre grupos	946,977	14	67,641	430,965	,000
	no interior dos grupos	9,417	60	,157		
	total	956,394	74			
prot.sed	entre grupos	207,212	14	14,801	99,059	,000
	no interior dos grupos	8,965	60	,149		
	total	216,177	74			
peso seco	entre grupos	1767,013	14	126,215	21,834	,000
	no interior dos grupos	346,840	60	5,781		
	total	2113,853	74			
ALP	entre grupos	3530,223	14	252,159	33,074	,000
	no interior dos grupos	457,449	60	7,624		
	total	3987,672	74			
GSH+GSSG	entre grupos	123356,767	14	8811,198	1456,007	,000
	no interior dos grupos	812,763	60	8,345		
	total	123356,767	74			
GSH	entre grupos	16430,420	14	1173,601	325,003	,000
	no interior dos grupos	216,663	60	3,611		
	total	16647,083	74			
GSSG	entre grupos	72497,705	14	5178,407	543,985	,000
	no interior dos grupos	571,163	60	9,519		
	total	73068,868	74			
GSH/GSSG	entre grupos	1,614	14	,115	97,563	,000
	no interior dos grupos	756,935	60	5,782		
	total	1,614	74			
DPPH	Inter-grupos	103,003	14	7,357	51,641	,000
	Intra-grupos	8,548	60	,142		
	Total	111,552	74			
G6PD	Inter-grupos	2924,793	14	208,914	42,379	,000
	Intra-grupos	295,778	60	4,930		
	Total	3220,571	74			
GR	Inter-grupos	8094,613	14	578,187	27,718	,000
	Intra-grupos	1251,599	60	20,860		
	Total	9346,212	74			
GPx	Inter-grupos	76987,159	14	5499,083	13,400	,000
	Intra-grupos	24622,282	60	410,371		
	Total	101609,441	74			
CAT T	Inter-grupos	2,122	14	,152	12,884	,000
	Intra-grupos	,706	60	,012		
	Total	2,827	74			
CAT A	Inter-grupos	6,530	14	,466	50,683	,000
	Intra-grupos	,552	60	,009		
	Total	7,082	74			
LOX	Inter-grupos	28,021	14	2,002	14,071	,000
	Intra-grupos	8,535	60	,142		
	Total	36,556	74			
ROS	Inter-grupos	1639,121	14	117,080	137,175	,000
	Intra-grupos	51,210	60	,854		
	Total	1690,332	74			
MDA	Inter-grupos	1155,153	14	82,511	288,803	,000
	Intra-grupos	17,142	60	,286		
	Total	1172,295	74			