



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Stress por fenilureias
Efeitos do isoproturão sobre o metabolismo energético de eucariotas

Realizado por:

Marta Sofia Garcia Candeias

Orientadores:

Professor Doutor Rui Ferreira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Professora Doutora Isabel Alves-Pereira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Évora

2010

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Stress por fenilureias
Efeitos do isoproterurão sobre o metabolismo energético de eucariotas

Realizado por:

Marta Sofia Garcia Candeias

Orientadores:

Professor Doutor Rui Ferreira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Professora Doutora Isabel Alves-Pereira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

“O que sabemos é uma gota de água, o que ignoramos é um oceano.”

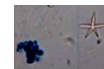
Isaac Newton

“Os conceitos e os princípios fundamentais da ciência são invenções livres do espírito humano.”

Albert Einstein

“A ciência será sempre uma busca e jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada.”

Karl Popper



Agradecimentos

Esta dissertação não representa apenas o resultado de extensas horas de estudo, reflexão e trabalho durante as diversas etapas que a constituem. É igualmente o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda, directa ou indirectamente, de um número considerável de pessoas. Razão pela qual, não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento:

- aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Alves-Pereira, pela sua hábil direcção, total disponibilidade, extrema dedicação e apoio incondicional na superação dos diversos obstáculos, bem como, pela sua vasta perspicácia na transmissão de sábios conselhos e sugestões acompanhados por uma valiosa paciência e contagioso entusiasmo ao longo da elaboração da dissertação;
- ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas ICAAM, pelo apoio financeiro, facilidades e utilização do espectrofotómetro de fluorescência que contribuiu em muito para o desenrolar deste trabalho;
- à Professora Doutora Manuela Côrte-Real do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, Portugal, pela sua gentileza e amabilidade em ceder estirpes de *S. cerevisiae*;
- à Engenheira Mónica Lima do Departamento de Biologia, Universidade de Évora, pela sua simpatia e disponibilidade em possibilitar a utilização do microscópio *Leitz Dialux 20* associado com o programa *Leica DC Software Moduls*;
- ao Departamento de Química, Universidade de Évora, pelas facilidades proporcionadas à concretização deste estudo;
- à D. Aida, Anabela e D. Jesuína, técnicas auxiliares do laboratório da Fase III, pela sua simpatia e disponibilidade em ajudar;
- aos meus amigos mais próximos pelo seu apoio e estímulo, em especial, à minha amiga Joana, que sem a sua amizade e companhia, a realização desta investigação, não teria sido tão divertida;
- aos meus pais, irmã e SX, por me inculcaram amor ao estudo e à realização profissional, bem como, pela sua tolerância, compreensão e carinho quando estava a escrever em vez de atender às suas necessidades.

Obrigada =)



Índice

Índice de Figuras	VIII
Índice de Quadros	IX
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
1. Fundamento Teórico	1
1.1. Metabolismo celular	1
1.2. Biorremediação	5
1.3. Isoproturão	9
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2. Problema e objectivos	15
2.1. Problema	15
2.2. Objectivo geral	16
2.3. Objectivos específicos	16
3. Metodologia	19
3.1. Estratégia	19
3.2. Diagrama do trabalho	23
3.3. Procedimento experimental	24
3.3.1. Material biológico	24
3.3.2. Condições de cultura	24
3.3.3. Avaliação do crescimento da levedura	25
3.3.3.1. Turbidez e cfu	25
3.3.3.2. Análise microscópica	25
3.3.3.3. Determinação da biomassa	26
3.3.4. Fraccionamento celular	26
3.3.5. Doseamentos nas fracções subcelulares	26
3.3.5.1. Proteína	26
3.3.5.2. GSH e GSSG	27
3.3.5.3. Capacidade antioxidante	28
3.3.5.4. Malonaldeído	29
3.3.6. Determinações de actividade enzimática nas fracções subcelulares	29
3.3.6.1. Catalases T e A	29
3.3.6.2. Glutathione redutase	30
3.3.6.3. Glutathione peroxidase	31
3.3.6.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase	31
3.3.6.5. Álcool desidrogenase	32
3.3.6.7. Lactato desidrogenase	33
3.3.6.8. Malato desidrogenase	33
3.3.7. Análise estatística dos resultados	34
3.4. Material	34
3.5. Equipamento	35
3.6. Reagentes	35
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Cultura de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ em YEPD e MB	37
4.2. Exposição de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ ao isoproturão em YEPD	40
4.2.1. Sobrevivência celular	40
4.2.2. Resposta antioxidante e danos celulares	42
4.2.3. Resposta bioenergética	48
4.3. Exposição de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507 ao IPU em meio MB	50



4.3.1. Sobrevivência celular	50
4.3.2. Resposta antioxidante e danos celulares	54
4.3.3. Resposta bioenergética	58
5. Conclusões	59
6. Referências bibliográficas	65
ANEXO	71

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Participação do NADP-ME na formação de etanol a partir do malato.....	2
Figura 1.2 – Permeabilidade da membrana mitocondrial ao citrato, evidenciando a transferência de citrato e piruvato entre o mitocôndrio e o citoplasma.....	3
Figura 1.3 – Comparação dos custos associados aos processos tradicionais de remediação de resíduos com os custos de biorremediação.....	8
Figura 1.4 – Representação estrutural do isoprotrurão.....	10
Figura 3.1 – Redução do DPPH por antioxidantes	28
Figura 3.2 - Reacção entre o TBA e o malonaldeído.....	29
Figura 3.3 – Redução do etanol a acetaldeído.	32
Figura 3.4 – Redução do <i>L</i> -lactato a piruvato.	33
Figura 3.5 – Redução do malato a piruvato.	33
Figura 4.1 – Imagem fotográfica de cultura de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	38
Figura 4.2 – Curvas de crescimento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	38
Figura 4.3 – Razão MB/YEPD.....	39
Figura 4.4 – Imagem fotográfica das culturas de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	40
Figura 4.5 – Curvas de crescimento e biomassa da levedura <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	41
Figura 4.6 – Curvas de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	41
Figura 4.7 – Unidades formadoras de colónias de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	42
Figura 4.8 – Conteúdo em GSH, GSSG e em tióis não-proteicos, GSH+GSSG citoplasmático de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	43
Figura 4.9 – Razão GSH/GSSG, capacidade de capturar radicais livres medida pelo DPPH e conteúdo intracelular de MDA de células <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	44
Figura 4.10 – Actividade enzimática CAT T e CAT A de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	46
Figura 4.11 – Actividade enzimática GR, GPx e G6PD do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	47
Figura 4.12 – Actividade enzimática ADH, LDH e NADP-ME do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	49
Figura 4.13 – Imagem fotográfica das culturas de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507...	50
Figura 4.14 – Curvas de crescimento e biomassa da levedura <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507.	51
Figura 4.15 – Imagens de preparações de células coradas com azul de metileno de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507.	52
Figura 4.16 – Unidades formadoras de colónias de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507	53

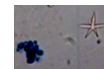


Figura 4.17 – Curvas de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ IGC-4072 e IGC-3507. ..	53
Figura 4.18 – Conteúdo em GSH e GSSG citoplasmático de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507	54
Figura 4.19 – Razão GSH/GSSG e actividade antioxidante expressa em unidades de ácido gálico, DPPH em células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507	55
Figura 4.20 – Actividade enzimática CAT T de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507.....	56
Figura 4.21 – Actividade enzimática GR, GPx e G6PD do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507	57
Figura 4.22 – Actividade enzimática ADH de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507.....	58
Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas.	72
Figura A2 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do glutationo.....	72
Figura A3 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do dissulfureto de glutationo	72
Figura A4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do DPPH.	72
Figura A5 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do malonaldeído. ..	73
Figura A6 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática CAT T de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	73
Figura A7 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática CAT A do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	73
Figura A8 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática GR na fracção pós 12000 g de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	74
Figura A9 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática GPx do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	74
Figura A10 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática G6PD do citoplasma de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	75
Figura A11 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática ADH de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	75
Figura A12 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática LDH de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	76
Figura A13 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática NADP-ME de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	76

Índice de Quadros

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	77
Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , IGC-4072 e IGC-3507	78



Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

ADH	Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CA	do inglês <i>chemicals abstract</i>
CAT A	Catalase A
CAT T	Catalase T
cfu	Unidades formadoras de colónias, do inglês <i>colony forming units</i>
DDIPU	3-(4-isopropilfenil)-ureia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DPPH*	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GP _x	Glutationo peroxidase dependente do selénio (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.6.4.2)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>generally recognized as safe</i>
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutatióno
IPU	Isoproturão (3-(4-isopropil) fenil-1,1-dimetilureia)
IUPAC	do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LDH	Lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27)
MB	Meio de cultura mineral basal
MB-IPU	Meio de cultura MB com IPU
MDA	Malonaldeído
MDIPU	<i>N</i> -(4-isopropilfenil)- <i>N'</i> -metilureia
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (forma reduzida)
NADP-ME	Malato desidrogenase (EC 1.1.1.40)
NEM	<i>N-metilmaleida</i>
OPT	<i>o</i> -fetaldeído
ORF	Sequência de DNA que pode ser traduzida, do inglês <i>open reading frame</i>
ROS	Espécies reactivas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SDS	Duodecilssulfato de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BHP	<i>ter</i> -butil hidroperóxido
YED	Meio de cultura do inglês <i>Yeast Extract Dextrose</i>
YED-IPU	Meio de cultura YED com IPU
YEP	Meio de cultura do inglês <i>Yeast Extract Peptone</i>
YEPD	Meio de cultura do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
YEPD-IPU	Meio de cultura YEPD com IPU
YEP-IPU	Meio de cultura YEP com IPU

Stress por fenilureias - Efeitos do isoprocurão sobre o metabolismo energético de eucariotas

Resumo

Marta Sofia Garcia Candeias (2010). **Stress por fenilureias - Efeitos do isoprocurão sobre o metabolismo energético de eucariotas**. Tese de mestrado (R. Ferreira e I. Alves-Pereira, orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Este estudo teve como principal objectivo avaliar o efeito do isoprocurão sobre a capacidade antioxidante e metabolismo energético da levedura vínica nativa *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados revelaram um aumento de células viáveis ao fim de 72 h de cultura, da capacidade antioxidante mediada pelo glutatióno e pela actividade glutatióno redutase. A fenilureia provocou ainda um acréscimo significativo das actividades álcool desidrogenase e lactato desidrogenase, factos que levantam a hipótese do isoprocurão acentuar a fermentação alcoólica e/ou láctica, para reposição de NADP⁺ e activação da via glicolítica. Face ao exposto podemos concluir que a *S. cerevisiae* UE-ME₃ responde adaptativamente ao isoprocurão, protegida por uma resposta antioxidante maioritariamente mediada pelo glutatióno e pelo suprimento energético assegurado por via fermentativa. A resposta observada em *S. cerevisiae* UE-ME₃, manifestamente superior às estirpes *S. cerevisiae* IGC-4072 e IGC-3507, tornam plausível a sua aplicação na biorremediação de fenilureias.

Stress by phenylurea - Effects of isoproturon on energy metabolism in eukaryotes.

Abstract

Marta Sofia Garcia Candeias (2010). **Stress by phenylurea - Effects of isoproturon on energy metabolism in eukaryotes.** Master's thesis (R. Ferreira and I. Alves-Pereira, advisers), Sciences and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal

The main purpose of this study was to evaluate the effect of isoproturon on the antioxidant capacity and energy metabolism of the wine-wild *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. The results revealed an increase of viable cells, after 72 h of culture, antioxidant power mediated by glutathione and glutathione reductase activity. The phenylurea also caused a significant increase of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities, facts which raise the possibility of isoproturon enhance alcoholic and/or lactic fermentation, for NADP⁺ replacement and glycolysis activation. Given above we presume an adaptively answer of *S. cerevisiae* UE-ME₃ to isoproturon, supported by an antioxidant response predominantly mediated by glutathione and energy supply provided through fermentation. The responses given by *S. cerevisiae* UE-ME₃ are clearly highest than observed with *S. cerevisiae* IGC-4072 and IGC-3507 strains, make plausible its application in bioremediation of phenylurea.



1. Fundamento Teórico

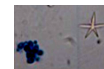
1.1. Metabolismo celular

Alguns eucariotas como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* manifestam elevada sobrevivência em diferentes condições de *stress*, podendo tornar-se resistentes a doses letais de determinado agente, após exposição a doses ligeiras desse composto ou outro quimicamente semelhante (Mitchel, 1982; Blomberg, 1988; Wieser, 1991; Flattery-O'Brien, 1993, Lewis, 1995). Alguns autores até defendem que células de levedura em situações de *stress*, como o choque térmico, exposição ao etanol, iões metálicos e compostos pró-oxidantes, activam um mecanismo geral de protecção celular que envolve sistemas antioxidantes e do metabolismo energético (Mager, 1995; Ruis, 1995; Boy-Marcott, 1998; Susek, 1990; Kurtz, 1986).

Em leveduras, as vias catabólicas mais importantes incluem a glicólise, cujo produto final é o ATP, equivalentes redutores sob a forma de NADH e piruvato. O piruvato pode seguir três prováveis destinos metabólicos: oxidação do acetil-CoA gerado pela descarboxilação oxidativa do piruvato, *via* ciclo dos ácidos tricarbóxicos, que gera equivalentes redutores sob a forma de NADH, metabolizados pela cadeia respiratória; fermentação alcoólica onde o enzima álcool desidrogenase converte o etanal, derivado do piruvato, em etanol, e por vezes, fermentação láctica onde o enzima lactato desidrogenase reduz o piruvato a lactato (Quintas, 2008).

Em condições aeróbias, a produção de etanol por *S. cerevisiae* depende da capacidade relativa das vias fermentativa e respiratória. Níveis de glucose superiores a 5 % resultam numa taxa glicolítica superior à do piruvato desidrogenase da reacção fermentativa, gerando um acréscimo de actividade sobre a piruvato descarboxilase. Nessas condições, esta levedura muda para um metabolismo misto respiro-fermentativo que resulta na produção de etanol pela fermentação alcoólica, onde o enzima ADH tem um papel regulador, de modo a produzir energia de forma rápida para além de seguir glicólise. Porém, quando os níveis de glucose no meio estão baixos e na presença de dioxigénio, a *S. cerevisiae* não produz etanol, e sim lactato (Otterstedt, 2004).

A via fermentativa de redução do piruvato a lactato ocorre na ausência de dioxigénio ou em pequena extensão em condições aeróbias. Concentração elevada de lactato pode inibir por *feedback* a LDH, gerando assim, um decréscimo da taxa de conversão do piruvato a lactato. Em *S. cerevisiae*, um dos possíveis passos para regenerar o piruvato corresponde à descarboxilação oxidativa do malato, por acção do enzima malato desidrogenase, que desempenha um papel fundamental na produção de NADPH essencial para a acumulação de lípidos de reserva na célula (Wynn, 1997).



Deste modo, o piruvato formado devido ao malato desidrogenase, pode ser degradado em etanal devido à piruvato desidrogenase e libertar dióxido de carbono, sendo de seguida, reduzido a etanol por acção da ADH, produzindo NAD^+ para o meio (fig. 1.1). Este processo característico da *S. cerevisiae* é aplicado a nível industrial na produção de vinhos, onde o mosto da uva contém aproximadamente 5 g.L^{-1} de malato devido à acção deste enzima que durante a fermentação alcoólica, degrada o malato, numa proporção de 10 a 15 % (Wynn, 1997).

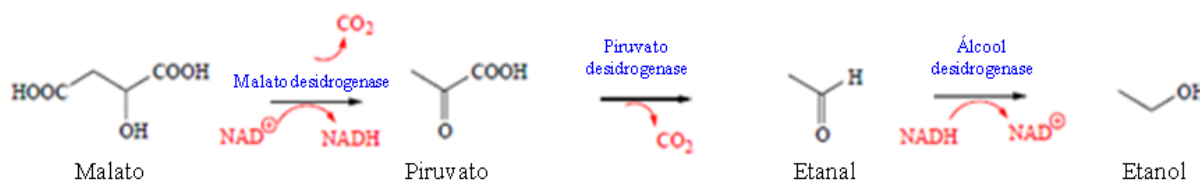
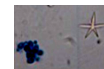


Figura 1.1 – Participação do NADP-ME na formação de etanol a partir do malato (adaptado de Wynn, 1997).

Por outro lado, a via das pentoses-fosfato, regulada pelo enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase, está implicada na geração de intermediários que assistem à biossíntese de pentoses, bem como, de equivalentes redutores sob a forma de NADPH indispensáveis a vias anabólicas, como a biossíntese *de novo* de resíduos acilo, e ao sistema antioxidante regulado pelo glutatióno (Quintas, 2008).

Ao admitir-se que no citoplasma a biossíntese *de novo* de um resíduo acilo, como o palmitato requer 8 moléculas de acetil-CoA derivadas do piruvato mitocondrial, bem como, 14 de NADPH e 7 ATP, sintetizadas no citoplasma, a transferência do acetil-CoA mitocondrial para o citoplasma constitui um obstáculo a ultrapassar. Como os mitocôndrios não são permeáveis ao acetil-CoA e o transportador carnitina apenas se liga a resíduos acilo de cadeia longa, a barreira ao acetil-CoA só pode ser ultrapassada com recurso ao transportador citrato que exerce a sua acção através da membrana interna mitocondrial. O citrato formado em níveis elevados na matriz mitocondrial pela condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato é transportado para o citoplasma, à custa de ATP, onde é clivado pelo citrato liase. O oxaloacetato formado na transferência dos grupos acetilo para o citoplasma tende a regressar ao mitocôndrio. No entanto, a membrana interna é impermeável ao oxaloacetato. Para tal acontecer são necessárias reacções tipo *by-pass* cuja mais importante gera grande parte dos equivalentes redutores necessários à biossíntese de resíduos acilo que é catalisada pelo NADP-ME citoplasmático. Posteriormente, o produto da reacção, o piruvato, difunde para o mitocôndrio onde é carboxilado a oxaloacetato pelo piruvato carboxilase (fig. 1.2). O balanço desta reacção mostra que uma molécula de NADPH é gerada por cada acetil-CoA transferido do mitocôndrio. Equivalentes redutores adicionais são em geral fornecidos pela via das pentoses fosfato, regulada pelo enzima G6PD, modelado pela disponibilidade intracelular de NADP^+ , mas que também pode gerar



como produto ribose-5-P, precursor metabólico dos ácidos nucleicos e conseqüentemente indispensável ao crescimento celular. Por outro lado, os equivalentes redutores gerados pela G6PD podem ser mobilizados para a resposta antioxidante modelada pelo glutatióno (Quintas, 2008; Stryer, 1988).

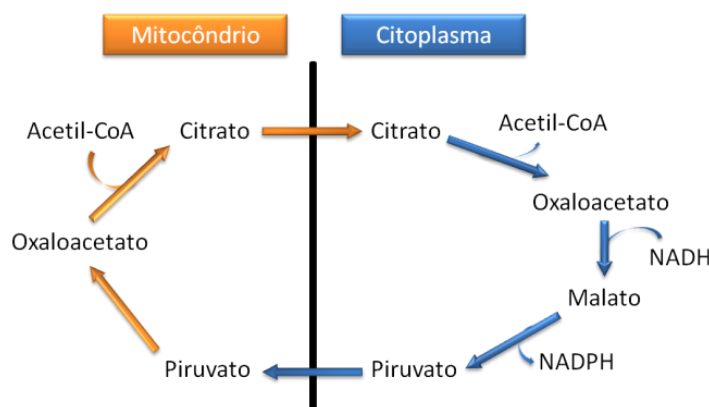
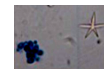


Figura 1.2 – Permeabilidade da membrana mitocondrial ao citrato, evidenciando a transferência de citrato e piruvato entre o mitocôndrio e o citoplasma (adaptado de Stryer, 1988).

O GSH é o tiol não-proteico mais abundante em fungos, animais e plantas, cuja concentração intracelular pode variar desde 0,1 até 10 mM, fazendo parte de um sistema tampão de oxirredução, mantido por grupos sulfidrílo. Geralmente, este tripéptido de baixo peso molecular é considerado como um dos mais importantes componentes moleculares de defesa antioxidante, pois está envolvido na captura do radical hidroxilo, na redução do peróxido de hidrogénio, na transferência de potencial redutor para as reacções catalisadas pelo glutatióno peroxidase, como co-substrato dos enzimas glutatióno S-transferase, envolvidos na metabolização de xenobióticos, cujos derivados são excretados para o vacúolo e em outras funções celulares, como a síntese de DNA e proteínas (Storey, 1996; Hasspieler, 1994). Devido à sua elevada concentração intracelular existe uma probabilidade elevada de uma espécie reactiva de oxigénio ser capturada pelo GSH, antes de iniciar reacções oxidativas com outras biomoléculas. Em condições de *stress* oxidativo, as ROS que se formam em quantidade elevada, reagem com o GSH convertendo-o na forma dimérica de dissulfureto de glutatióno, situação que pode ser detectada pela diminuição da razão. Alterações no valor da razão GSH/GSSG são muitas vezes utilizadas como indicadores da extensão do *stress* oxidativo. Por esse motivo, a manutenção de níveis intracelulares elevados de GSH é indispensável em organismos que periodicamente entram em *stress* oxidativo por crescerem em ambiente hostis como acontece com as leveduras nos mostos (Davis, 2001; Arrigo, 1999; Sies, 1999; Cotgreave, 1998; Schroeder, 1996; Vina, 1990; Larsson, 1983).



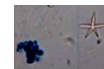
Moléculas de baixo peso molecular como o ascorbato, o β -caroteno e o α -tocoferol, bem como, os enzimas GR, GPx, G6PD e CAT, desempenham papel relevante na estabilização do ambiente redutor intracelular, estando alguns destes enzimas integrados no ciclo de oxidação-redução do GSH. Alterações de actividade enzimática antioxidativas são também consideradas excelentes indicadores da susceptibilidade celular ao *stress* oxidativo (Palace, 1993; Lehninger, 1993; Voet, 1976).

O enzima GR desempenha um papel importante na manutenção da capacidade antioxidante celular, reciclando o GSSG à sua forma reduzida GSH, utilizando o poder redutor do NADPH gerado pela G6PD. Geralmente, a sua actividade enzimática é analisada em conjunto com outras actividades antioxidantes, como GPx e CAT, de modo a obter uma informação completa sobre o perfil antioxidante celular em diferentes condições de *stress*. Alterações na actividade GR podem afectar a capacidade da célula para resistir ao *stress* oxidativo. Por exemplo, células onde a actividade GR foi inibida pelo agente alquilante carmustina tornaram-se extremamente sensíveis ao *stress* oxidativo induzido pelo paraquato, zinco ou peróxidos (Williams, 2004; Walther, 2003; Starke, 1985). Diversos estudos têm revelado que a GR pode sofrer inactivação/activação na presença de vários agentes redutores ou oxidantes. Um desses exemplos é o NADPH, o seu co-substrato que ao ser incubado com a GR, antes da adição de GSSG causa inactivação reversível (Pinto, 1985 e 1984). Apesar de o fenómeno ter sido detectado nos anos 70 do século XX, o mecanismo de inactivação ainda não foi esclarecido (Cardoso, 2007).

O enzima GPx, conhecido por ser uma seleno-proteína possui elevada eficiência catalítica para vários peróxidos. A reacção catalisada pelo GPx envolve a redução do peróxido de hidrogénio e de outros peróxidos utilizando o GSH como doador de equivalentes redutores, respondendo em alternativa ou em complementaridade com as catalases (Flohé, 1997; Ahmad, 1995).

Os enzimas CAT são homotetrâmeros com distribuição ubíqua na natureza onde o núcleo de protoporfirina IX com um átomo de ferro, vulgarmente designado por hemo constitui o seu grupo prostético. Podem ser detectados no citoplasma, enzimas designados por CAT T e nos peroxissomas, por CAT A que desempenham um papel importante na desintoxicação do peróxido de hidrogénio, catalisando a sua redução a água, fazendo assim parte do conjunto de enzimas que desempenham resposta antioxidante primária (Ahmad, 1995; Livingstone, 1992).

Os antioxidantes não-enzimáticos são em geral compostos com baixo peso molecular que bloqueiam e/ou minimizam os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos pró-oxidantes. Ensaio microbianos *in vivo* com células eucariotas de *S. cerevisiae* têm-se mostrado adequados para avaliar a resposta antioxidante a diferentes compostos por células eucariotas, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis



de serem correlacionados com o Homem e outros eucariotas superiores (Marxen, 2007; Soares, 2005; Costa, 2001).

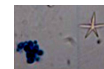
A capacidade antioxidante não dependente do glutatióno pode ser determinada utilizando o radical DPPH[•] e provocando a captura do radical livre por adição de antioxidantes. O método do DPPH é simples, rápido e não dependente da polaridade da amostra em análise, sendo estas vantagens razões suficientes para aplicá-lo em testes de microrganismos como fonte natural para sequestrar radicais. O DPPH[•] é um radical livre estável em metanol, e na sua forma oxidada, apresenta um máximo de absorção a 520 nm. Quando uma solução de DPPH é combinada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogénio, converte-se na sua forma reduzida com perda da coloração violeta. Quanto mais intensa for esta resposta, maior é a capacidade do material celular para capturar radicais livres (Szabo, 2007; Thaipong, 2006; Brand-Williams, 1995).

1.2. Biorremediação

A Biorremediação é um processo no qual se utilizam microrganismos para remover ou eliminar poluentes no ambiente de modo a restaurar os *habitats* naturais. Este processo tem sido intensamente estudado e recomendado pela comunidade científica actual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou em áreas de contenção (Gaylarde, 2005).

A aplicação isolada ou combinada de microrganismos, bem como, o estímulo da sua actividade pela adição de receptores/doadores de electrões ou nutrientes, e ainda a adição dos mesmos, pertencentes ou não à comunidade nativa, crescidos em laboratório, geneticamente modificados e com capacidade para degradar o contaminante a remover, funcionam como estratégias de biorremediação que conduzem a uma rápida e completa degradação de poluentes (Vogel, 1996; Widada, 2002). Este estratagemas possibilitará a transferência para a comunidade autóctone da informação genética presente na estirpe degradadora necessária à biodegradação dos contaminantes presentes no meio (Top, 2003).

As moléculas xenobióticas (do grego, *xenos* = estranho) introduzidas no ambiente desde o início do século XX pela sua aplicação na indústria química e de materiais como agrotóxicos, herbicidas, corantes, fármacos, polímeros e plásticos, por não fazerem parte do conjunto de moléculas produzidas pelo metabolismo evolutivo, podem ser tóxicas para os sistemas biológicos. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação causam efeitos nocivos e/ou mutagénicos nos organismos vivos, podendo levar ao desaparecimento



selectivo de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica, ao provocar danos em diversos componentes celulares como lípidos, proteínas e DNA (Gaylarde, 2005; Apel, 2004; Madigan, 2004).

Os herbicidas são conhecidos como os agroquímicos utilizados no controlo de plantas daninhas das culturas, representando a grande parte dos fitofármacos utilizados anualmente, devido à sua grande variedade de aplicações na agricultura. O conhecimento do seu comportamento no solo é de extrema importância, para compreender o seu destino e o seu transporte no ambiente. A persistência limitada dos herbicidas no solo está relacionada com a sua aplicação, esperando-se uma persistência na escala de meses. Contudo, os herbicidas permanecem muitas vezes no solo ou são lixiviados para as águas subterrâneas. Dados conhecidos sobre a qualidade da água mostram que os herbicidas são os fitofármacos que se encontram com maior frequência no solo e nas águas subterrâneas (Sharma, 2008; Yin, 2008; Pieuchot, 1999).

O sistema metabólico que se tem mostrado mais apto para biodegradar xenobióticos nos processos de biorremediação é o microbiano, uma vez que os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando activamente nos principais ciclos biogeoquímicos e, representando assim, o suporte de manutenção da vida na Terra. Esta extraordinária diversidade metabólica deve-se à combinação do potencial genético individual de diferentes espécies microbianas num sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de biliões de anos, e a capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto, pois produtos do metabolismo de um microrganismo podem ser substratos para outros. Este intenso sinergismo metabólico, praticamente ausente nos organismos complexos, é de fundamental importância na biodegradação de xenobióticos. Muitos factores ambientais de natureza física, como a essência da matriz onde o composto é encontrado, a temperatura e a luz; de carácter químico, que inclui a capacidade nutritiva, o pH, a humidade, o teor em oxigénio, o potencial redox do meio e a composição e estrutura química do poluente; e de carácter biológico, associada à capacidade do microrganismo em biodegradar uma molécula xenobiótica, intervêm na biorremediação de contaminantes presentes no meio (Gaylarde, 2005; Vidali, 2001).

Os microrganismos ao degradarem os xenobióticos por processos de biorremediação podem gerar derivados com estrutura menos agressiva do que a molécula original, ou levar à mineralização do xenobiótico, produzindo moléculas simples, como CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{2-} , PO_4^{2-} (Gaylarde, 2005; Vidali, 2001).

Por outro lado, se os microrganismos não conseguem degradar os xenobióticos, o factível *stress* oxidativo gerado pela presença desses compostos pode despoletar uma resposta adaptativa, envolvendo a activação de alguns genes durante o período em que



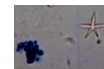
ocorre divisão celular. Devido ao *stress* oxidativo induzido pela presença do xenobiótico no meio celular, os genes induzidos e/ou activados codificam proteínas que funcionam como *chaperones* moleculares, enzimas antioxidantes, bem como proteínas presentes na membrana plasmática que desempenham um papel activo como doadores de electrões de modo a formar ácidos lipófilos (Gounalaki, 1994; Lehninger, 1993; Voet, 1976). Deste modo, ocorre uma coordenação de estímulos do tonoplasto, nomeadamente de ATPases, para contrariar a dissipação fisiológica de gradientes de iões H_3O^+ , através das membranas do vacúolo, provocando um acréscimo de proteínas de choque térmico e de enzimas envolvidos na biossíntese de aminoácidos, assim como, uma indução da função do vacúolo (Viegas, 2005; Alarco, 1998).

A introdução de um herbicida no meio ambiente de uma célula eucariota, pode traduzir-se pela activação adaptativa de processos antioxidativos que permitam a redução do excesso de ROS e acompanhem a transformação e/ou eliminação do próprio agente indutor de *stress* oxidativo. (Belo, 2005; Apel, 2004; Madigan, 2004; Dröge, 2002).

Os mecanismos celulares envolvidos na resposta a súbitas e adversas condições ambientais assumem importância particular na sobrevivência celular. Estes mecanismos não só dão início à reparação de danos macromoleculares, como também ajudam a estabelecer um estado de tolerância, evitando que a célula sofra novos danos celulares. No centro destas respostas estão as vias de detecção e de sinalização que comunicam com o núcleo e possibilitam a indução da expressão genética. Quando esses mecanismos são fortemente conservados podem utilizar-se pequenos eucariotas como modelo para a realização de estudos sobre a regulação e a função dos percursos activados pelo *stress* (Estève, 2009; Costa, 2001; Toone, 1998; Lehninger, 1993; Voet, 1976).

Os microrganismos que são encontrados naturalmente em ambientes contaminados estão geralmente bem adaptados para sobreviver à presença de contaminantes e a condições anómalas de temperatura e pH. Esses microrganismos nativos apresentam elevado potencial na remediação de poluentes, pois se um grupo de microrganismos consegue proliferar num ambiente contaminado, existe uma elevada probabilidade de possuir uma resposta metabólica que lhe permita interagir com os poluentes aí existentes (Gaylarde, 2005).

A atrazina é um herbicida mundialmente usado no controlo de infestantes de diversas culturas agrícolas, sendo também considerado um agente potencialmente cancerígeno para o Homem e um desregulador hormonal. Como consequência da sua intensiva utilização nos últimos trinta anos, a atrazina e os seus metabolitos têm sido frequentemente detectados em solos, águas superficiais e subterrâneas. As técnicas tradicionais para o tratamento de solos contaminados com s-triazinas envolvem a incineração, a remoção de solo contaminado e a sua transferência para zonas não



contaminadas, estas são estratégias economicamente dispendiosas, em particular para o tratamento de grandes áreas, uma vez que requerem a remoção e transporte das zonas contaminadas. A persistência da atrazina no ambiente, associado à crescente preocupação no que se refere aos seus efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos, tem motivado o estudo e desenvolvimento de estratégias de biorremediação cada vez mais eficientes na remoção do herbicida de regiões contaminadas. Para tal, têm sido isolados e identificados diversos microrganismos não patogénicos capazes de degradar de forma eficiente a atrazina (Gaylarde, 2005).

A natureza perigosa dos resíduos pode ser atenuada pela aplicação de métodos convencionais de descontaminação, como é o caso da incineração e do *landfilling*, transferência da contaminação do seu local original para outro considerado mais apropriado. No entanto, a aplicação destas técnicas (fig. 1.3), que envolve a remoção e transporte das zonas contaminadas, é economicamente dispendiosa, aumenta a exposição dos trabalhadores aos contaminantes, nem sempre conduz à destruição e diminuição da toxicidade dos compostos e/ou gera produtos mais tóxicos (Gaylarde, 2005). A biorremediação, que se refere à utilização de processos biológicos conducentes à redução ou eliminação da concentração e toxicidade de poluentes químicos no ambiente, tem surgido como alternativa, mesmo de índole económico, aos métodos tradicionais de descontaminação (Vidali, 2001).

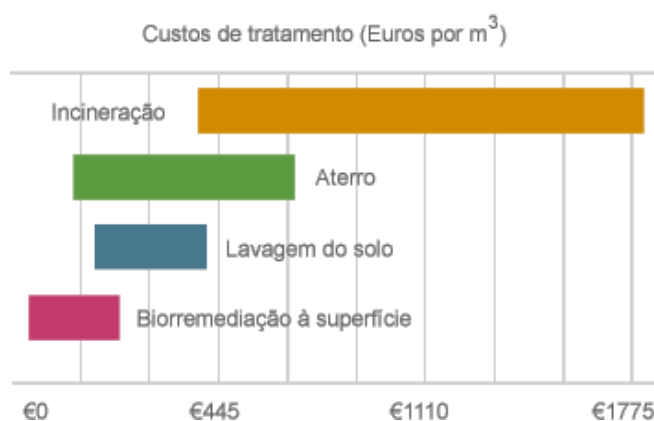
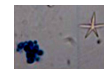


Figura 1.3 – Comparação dos custos associados aos processos tradicionais de remediação de resíduos com os custos de biorremediação (adaptado de Gaylarde, 2005).

Os benefícios associados ao uso da biorremediação, resultantes da destruição ou diminuição da toxicidade de compostos tóxicos no ambiente, e a boa proporção custo-eficiência, têm levado ao seu desenvolvimento. Nas últimas décadas, a biorremediação evoluiu muito, passando da fase de tecnologia praticamente desconhecida para a fase de tecnologia aplicável a um largo espectro de contaminações (Gaylarde, 2005).



1.3. Isoproturão

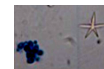
O isoproturão é uma fenilureia muito utilizada como princípio activo em diversos herbicidas, sendo absorvido pelas raízes e folhas, onde actua ao nível da cadeia respiratória e da cadeia de transporte de electrões do cloroplasto, comportando-se como inibidor da fotossíntese. Nas plantas exerce maioritariamente a sua acção tóxica, competindo com a plastoquinona na ligação desta com a proteína D1 do fotossistema II, presente na membrana tilacoidal. Como outras fenilureias, o aumento da concentração de IPU nas células vegetais favorece a inibição do processo fotossintético característico e essencial à vida da planta (Knauert, 2007; Arnaud, 1994; Trebst, 1987).

A presença do isoproturão na célula viva pode provocar *stress* oxidativo, uma vez que ao ser degradado pelos sistemas de biotransformação residentes no retículo endoplasmático, como o citocromo P450, ou citoplasmáticos, como os enzimas de conjugação com substratos endógenos, pode activar cadeias de transporte de electrões do retículo endoplasmático, geradoras de ROS que podem desencadear processos celulares de resposta ao *stress* conduzindo ao aumento da tolerância a tóxicos ou causando a morte celular (Lalit, 2007; Singh, 1997).

Herbicidas contendo isoproturão, como o *Isopec*, *Arelon*, *Herbor*, *Marcus*, *Tanther*, *Diflufenição+Isoproturão*, são amplamente utilizados na agricultura convencional na Europa contra gramíneas e ervas daninhas de folhas larga em culturas de Primavera, bem como, de Outono-Inverno como trigo, centeio e cevada, em pré e pós-emergência, facilitando a sua disseminação pelo ambiente (Sharma, 2008; Sørensen, 2003).

O isoproturão, por apresentar baixos níveis de solubilidade em água e de degradação química e biológica, acumula-se nos solos como resíduo e, conseqüentemente, aparece nos sistemas biológicos e em toda a biosfera por períodos de tempo mais ou menos longos, encontrando-se por isso entre as 33 substâncias prioritárias pela sua ameaça à superfície terrestre, de acordo com a directiva do Quadro da Água da União Europeia. Esta fenilureia é passível de ser detectada em águas superficiais e subterrâneas, plantas e efluentes de lavagens. Porém, a sua concentração não pode ultrapassar o valor de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ em água potável, sendo essa concentração o limite máximo admissível estabelecido pela normalização da União Europeia. A contaminação em alimentos é habitualmente baixa, inferior a $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$, valor máximo aceitável (Sharma, 2008; Yin, 2008; Monarrez, 2007; Sørensen, 2001; Decreto-Lei nº300/2003).

A exposição excessiva ao isoproturão pode afectar propriedades sanguíneas, e mesmo iniciar processos de cancerigénese, pelo que a Agência Europeia do Ambiente procura garantir que a exposição ambiental seja suficientemente baixa para não prejudicar a saúde humana. Alguns sintomas de intoxicação por ingestão de grandes quantidades de



compostos com ureia são irritação nos olhos, pele e nas membranas das mucosas, tosse e falta de ar, náuseas, vômitos, diarreia, dor de cabeça e confusão mental, e ainda, distúrbios do metabolismo proteico, enfisema moderado, e perda de peso devido a exposição crónica (European Commission Health, 2002).

O isoproturão também é conhecido por 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetilureia (IUPAC), ou *N,N*-dimetil-*N*'-[4-(1-metiletil)fenil]ureia (CA). Trata-se de um composto que, por não existirem fontes naturais do mesmo, só se encontra após aplicação no campo de herbicidas que o contenham, ou então, nos processos de fabrico, transporte ou armazenamento (Sørensen, 2001; O'Neil, 1996).

Esta fenilureia apresenta uma solubilidade em água de 70,2 mg.L⁻¹ (pureza 1000 g/kg), fórmula molecular C₁₂H₁₈N₂O, massa molar 206,28 g.L⁻¹ e densidade 1,161, podendo ser representado pela fórmula de estrutura apresentada na fig. 1.4 (European Commission, 2002; O'Neil, 1996).

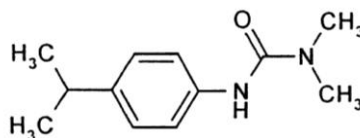
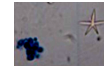


Figura 1.4 – Representação estrutural do isoproturão (adaptado de O'Neil, 1996).

O IPU pode sofrer fototransformação gerando vários fotoprodutos, muitos deles ainda não identificados, podendo por vezes, incrementar a toxicidade do composto no meio ambiente (Sharma, 2008; Yin, 2008; Khadrani, 1999).

Alguns estudos revelam que o IPU, bem como, os seus derivados metabólicos, são substâncias potencialmente tóxicas não só para as plantas daninhas mas também, muitas vezes para outros sistemas biológicos. Em ecossistemas aquáticos o isoproturão altera significativamente as suas propriedades biológicas, podendo ser fitotóxico para algas de água doce, *fitoplancton*, actividade microbiana, invertebrados aquáticos e sistemas radiculares de macrófitas. Em eucariotas superiores o IPU pode ser cancerígeno. Porém, pouco é conhecido sobre o seu comportamento químico em sistemas agrícolas, particularmente sobre o aspecto associado às respostas biológicas em culturas e plantas superiores. A importância dos estudos da interferência de herbicidas nas culturas resulta de alterações que podem ocorrer de forma diferenciada no metabolismo e fisiologia das plantas. Alguns testes de toxicidade sobre químicos sintéticos demonstraram que as plantas superiores são mais sensíveis aos herbicidas do que o *fitoplancton*. O trigo (*Triticum aestivum*) quando cultivado em solos contaminados com IPU evidencia uma resposta biológica não só ao nível da inibição da fotossíntese, mas também mostra indícios, não-enzimáticos e enzimáticos, de aumento do *stress* oxidativo (Cao, 2008; Dewez, 2008; Yin, 2008; Ma, 2002; Khadrani, 1999; Thierry, 1997; Thomas, 1986; Ponce, 1982).

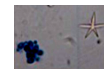


No solo, a degradação do IPU ocorre principalmente por processos microbianos, que podem levar à completa mineralização do isoproturão, de modo a atenuar a libertação do herbicida para o ambiente, para além de poder resultar em metabolitos com possíveis propriedades mais nefastas (Sørensen, 2003 e 2001).

A detecção do IPU como um poluente ambiental e o seu potencial de mineralização aparentemente baixo tem estimulado a pesquisa que visa isolar e caracterizar culturas microbianas capazes de mineralizar esta fenilureia. Algumas técnicas de cultura de enriquecimento têm sido utilizadas com sucesso em diversas tentativas para isolar microrganismos degradantes de IPU (Sørensen, 2003).

Estudos anteriores mostram que meios de cultura minerais e solos de diferentes campos agrícolas não degradaram IPU (Bolte, 2004; Thorn, 1996; Morganjones, 1988). Porém, o enriquecimento no solo com o metabolito em *N*-(4-isopropilfenil)-*N'*-metilureia como a única fonte de carbono e energia, proporcionou condições necessárias para produzir uma cultura bacteriana mista capaz de realizar a mineralização e crescimento ligadas a esse metabolito e a 4-isopropilanilina, mas sem qualquer actividade de degradação para IPU (Sørensen, 2003; Turnbull, 2001; Fournier, 1980). Várias bactérias e fungos do solo são conhecidas por serem capazes de catalisar a transformação da cadeia lateral da dimetilureia do IPU, mas não há relatos de microrganismos em cultura pura capazes de mineralizar a estrutura do IPU ou de quaisquer outras fenilureias (Berger, 1998; Spliid, 1998; Domsch, 1980).

Alguns investigadores têm sugerido que a falta de sucesso no isolamento de culturas puras de bactérias capazes de mineralizar fenilureias poderia ser atribuída à participação de consórcios, em vez de bactérias isoladas na degradação completa (Fournier, 1980). As vias microbianas têm sido estudadas principalmente em culturas de bactérias, e quatro linhagens capazes de mineralizar o isoproturão foram isoladas por enriquecimento dos solos previamente tratados com IPU (Sebai, 2004; Bending, 2003; Sørensen, 2001; Turnbull, 2001). A *Sphingomonas sp.* isolada de um solo britânico parece degradar isoproturão por *N*-desmetilação inicial via MDIPU para DDIPU, seguida pela hidrólise a 4-isopropilanilina antes da mineralização, enquanto que um *Arthrobacter sp.* isolado no mesmo campo mineraliza a cadeia lateral da fenilureia directamente e acumula 4-isopropilanilina. Em solos tratados com isoproturão, têm sido detectados, vários metabolitos hidroxilados (Sørensen, 2003; Sørensen, 2001; Turnbull, 2001). Os fungos, por outro lado, parecem ter uma capacidade generalizada para transformar e/ou remover IPU do meio em que são cultivadas em cultura líquida. Os produtos não têm sido caracterizados e quantificados em pormenor, no entanto, a maioria dos fungos estudados até agora não eram originados a partir de solos agrícolas, onde o herbicida foi usado (Sørensen, 2001; Berger, 1998; Fournier, 1980).



1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

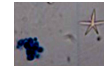
As leveduras são organismos eucariotas unicelulares pertencentes ao reino *Fungi*, podendo ser encontradas no ar, solo, plantas e alimentos. A espécie de leveduras mais abundante é a *Saccharomyces cerevisiae* caracterizada por ser unicelular, frequentemente arredondada, oval, ou elíptica, apresentando um comprimento entre 5–16 μ e largura de 3-5 μ , ou seja, cerca de 5 vezes maior que as bactérias permitindo a sua contagem directa (Madigan, 2004).

Apesar de hieróglifos egípcios sugerirem a utilização de *S. cerevisiae* em processos fermentativos, há mais de 5000 anos, só em 1857 Louis Pasteur provou que a fermentação resulta da acção de organismos vivos. Esta levedura, vulgarmente conhecida como levedura do padeiro ou da cerveja, ainda hoje é utilizada na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade para produzir etanol, usado em bebidas fermentadas, e dióxido de carbono, indispensável à expansão da massa do pão, onde utiliza glúcidos como substratos alimentares (Carvalho, 2006; Ludwig, 2001; Sgarbieri, 1999).

Além de desempenhar um papel importante ao nível de processos biotecnológicos relevantes, a *S. cerevisiae* é ainda amplamente utilizada como modelo experimental eucariota em estudos de biologia fundamental e aplicada, permitindo avaliar e caracterizar fenómenos biológicos com interesse, clínico-terapêutico ou ambiental, para o Homem. Trata-se de um organismo do tipo GRAS por ser não-patogénica, facilmente cultivada em laboratório em condições pré-determinadas e passíveis de serem controladas pelo manipulador, com curto tempo de geração (Scherens, 2004; Padua, 2000; Sgarbieri, 1999).

A utilização da levedura como modelo de estudo eucariota com correlação com eucariotas superiores tem aumentado com o conhecimento da ocorrência nestes microrganismos de proteínas homólogas a proteínas humanas, envolvidas em doenças hereditárias ou nos mecanismos de resposta ao *stress*, bem como proteínas homólogas às de organismos patogénicos implicados na resistência cruzada a antibióticos e antifúngicos, vindo cada vez mais a justificar, potenciar e valorizar o impacto dos estudos clínico-terapêuticos e ambientais em *S. cerevisiae* (Moraes, 2007; Lushchak, 2006; Costa, 2001; Alberghina, 1991).

Os extratos proteicos ou proteínas específicas de *S. cerevisiae* podem ser utilizados como constituintes de rações para animais, probióticos para animais e humanos, biocatalisadores em síntese química de produtos orgânicos, agentes sequestrantes de iões metálicos e como fonte de oligoelementos como o crómio e o selénio. Para além disso, extractos celulares desta levedura podem ser utilizados como meios de cultura para outros microrganismos, como aromatizantes de produtos farmacêuticos em suplementos alimentares e dietéticos, ou ainda como bioemulsionantes (Alberghina, 1991).

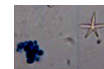


A *S. cerevisiae*, sendo um organismo aeróbio facultativo, consegue usufruir da via fermentativa para produzir energia de forma rápida. Para além de realizar a glicólise, processo metabólico onde produz ATP, NADH e piruvato, a *S. cerevisiae* em condições aeróbias produz lactato a partir da glucose pela fermentação láctica, em pequena extensão. Na ausência de oxigénio, a produção de etanol por *S. cerevisiae* poderá resultar da respiração e da fermentação alcoólica, uma vez que níveis elevados de glucose resultam numa taxa glicolítica superior à do piruvato desidrogenase, gerando uma sobrecarga para a piruvato descarboxilase, que resulta na produção de etanol (Otterstedt, 2004).

A presença de glucose, utilizada preferencialmente como fonte de carbono e de energia, medeia um grande número de alterações em leveduras e outros organismos estudados até o momento. Células de levedura quando inoculadas num meio com glucose, proliferam rapidamente pela via fermentativa, acompanhada pelo aumento da densidade da cultura (fase exponencial). À medida que a glucose vai sendo consumida pelas células, ocorre a mudança de condições normóxica-anóxica, normalmente, após 1 dia de crescimento, as células terminam rapidamente a proliferação celular e reajustam o seu metabolismo da via fermentativa para a respiração, de modo a usufruir de outras fontes de carbono presentes no meio. Como resultado desta mudança pós-normóxica da cultura, as células continuam a proliferar lentamente. Apenas quando se esgota a fonte de carbono no meio é que a cultura quebra a sua saturação e os constituintes celulares cessam a proliferação por completo e entram na fase estacionária (Gray, 2004; Otterstedt, 2004).

O aumento dos níveis de ROS em células de leveduras, e na presença de baixa concentração de dioxigénio, implica que um ou vários enzimas da cadeia respiratória mitocondrial sofram alterações funcionais durante a transição das condições normóxicas para anóxicas. No entanto, o mitocôndrio mantém a sua capacidade para realizar a respiração, embora em níveis reduzidos, em células anóxicas, indicando que as células de levedura conseguem manter a cadeia respiratória funcional na ausência de dioxigénio, facto que levanta a possibilidade intrigante de que a cadeia respiratória mitocondrial desempenha um papel nunca antes explorado em células anóxicas e que pode funcionar com um receptor de electrões alternativos quando o dioxigénio não está disponível (David, 2005).

As estirpes IGC-4072 e IGC-3507 de *S. cerevisiae* tem vindo a ser utilizadas como modelos de estudo e/ou estirpe controlo em diversas áreas de investigação, sendo os temas mais recorrentes a fermentação e toxicidade a compostos orgânicos, pela sua elevada sobrevivência em presença de fungicidas, etanol, glicerol, ácido acético e mesmo em estudos de halotolerância (Ochoa-Estopier, 2010; Ludovico, 2001; Aguiar, 2000; Quintas, 2000; Ribeiro, 2000; Casal, 1998; Lages, 1997; van Uden, 1967).



2. Problema e objectivos

2.1. Problema

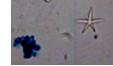
O isoproturão, uma fenilureia utilizada como princípio activo de herbicidas em culturas de Outono-Inverno, aplicados predominantemente no Sul da Europa, persiste por vezes nos solos e aquíferos, podendo ser detectado nos seres vivos em níveis considerados tóxicos pela legislação europeia. Considerando que pode estar envolvido no despoletar de patologias graves como o cancro, urge encontrar microrganismos e metodologias passíveis de contribuir para a eliminação desta fenilureia em locais de concentração elevada.

A *Saccharomyces cerevisiae*, um microrganismo eucariota do tipo GRAS, facilmente manipulável em laboratório tem sido muito utilizada em estudos de biologia aplicada, por possuir *ORF's* homólogas às dos seres humanos implicadas em doenças hereditárias ou nos mecanismos de resposta ao *stress*, sendo resistente a diversos agentes químicos e ambientes hostis como as condições adversas dos processos de vinificação.

Em situações de *stress*, como choque térmico, exposição ao etanol, iões metálicos e compostos pró-oxidantes, as células de *S. cerevisiae* activam um mecanismo geral de protecção celular que envolve sistemas antioxidantes e do metabolismo energético celular.

A estrutura organizada e funcional da célula viva é mantida à custa da respiração celular que ocorre nos mitocôndrios e de vias catabólicas de materiais de reserva, sendo a principal, a glicólise cujo produto final é o ATP, equivalentes redutores sob a forma de NADH e piruvato, podendo este último produto seguir a oxidação do acetil-CoA gerado pela descarboxilação oxidativa *via* ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia respiratória, ou seguir a *via* fermentativa alcoólica ou láctica dependente da concentração de glucose do meio.

Face ao exposto escolheu-se a estirpe nativa vínica UE-ME₃ de levedura *S. cerevisiae* para avaliar a resposta ao IPU, em diferentes meios de cultura, em termos fisiológicos e moleculares, como sistemas antioxidativos, e bioenergéticos de leveduras. Procurou-se ainda comparar a resposta ao IPU da estirpe UE-ME₃ com a das estirpes IGC-4072 e IGC-3507 descritas na literatura como menos sensíveis à presença de fitofármacos.



2.2. Objectivo geral

O objectivo geral deste estudo consistiu na identificação e compreensão do efeito do isotruturão no metabolismo energético e antioxidante do eucariota *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Objectivos específicos

Conhecer:

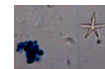
- ✓ importância biológica em eucariotas
 - do tripéptido GSH e do seu dímero GSSG,
 - dos enzimas antioxidantes GR, GPx, G6PD, CAT T, CAT A, e NADP-ME,
 - da determinação da capacidade antioxidante pelo DPPH,
 - da determinação danos celulares pelo MDA,
 - dos enzimas fermentativos ADH e LDH;
- ✓ interferência do isotruturão na célula eucariota em diferentes meios;
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico eucariota.

Compreender:

- ✓ diferenças funcionais em eucariotas
 - do tripéptido GSH e do seu dímero GSSG como indicadores de *stress*,
 - dos enzimas antioxidantes GR, GPx, G6PD, CAT T, CAT A, e NADP-ME,
 - da capacidade antioxidante determinada pelo DPPH,
 - da detecção de danos celulares pelo MDA,
 - dos enzimas ADH e LDH como marcadores de fermentação;
- ✓ consequências metabólicas do isotruturão na célula eucariota em diferentes meios;
- ✓ sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de isotruturão.

Valorizar:

- ✓ alteração intracelular
 - GSH/GSSG como marcador de estado de oxidação-redução citoplasmático,
 - dos enzimas antioxidantes GR, GPx, G6PD, CAT T, CAT A, e NADP-ME,
 - da capacidade antioxidante determinada pelo DPPH,
 - do nível de MDA intracelular como índice de peroxidação lipídica,
 - da actividade ADH e LDH como marcadores de fermentação,
 - das actividades fermentativas na regeneração de NAD⁺;
- ✓ actividade biológica do isotruturão em célula eucariota;
- ✓ sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de isotruturão.



Aplicar:

- ✓ as actividades enzimáticas GR, GPx, G6PD, CAT T, CAT A, e NADP-ME, como marcadores da resposta antioxidante ao isoprofurão e outras fenilureias por *S. cerevisiae*;
- ✓ as actividades ADH, LDH, como marcadores metabólicos da fermentação e sua importância na sobrevivência ao isoprofurão e outras fenilureias por *S. cerevisiae*;
- ✓ na identificação de microrganismos de utilização passível na biorremediação de compostos orgânicos utilizados na agricultura.



3. Metodologia

3.1. Estratégia

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

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

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

Duração: 1 ano lectivo

Modelo Biológico: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Estirpes:

- UE-ME₃, isolada em vinhos regionais do Alentejo e depositada na colecção do laboratório de enologia da Universidade de Évora, gentilmente cedida pelo Engenheiro Paulo Laureano, enólogo;
- IGC-4072 e IGC-3507, depositadas na *Portuguese Yeast Culture Collection* (PYCC), Universidade Nova de Lisboa, Portugal, gentilmente cedidas pela Professora Doutora Manuela Côrte-Real, Departamento de Biologia da Universidade do Minho, Portugal.

Agente de stress: Isoproturão

Ensaio:

Leveduras crescidas em diferentes meios de cultura durante 72h

- Controlo, sem isoproturão
- Teste, presença de isoproturão, 100 μ M

Resultados obtidos ao longo da cultura:

Acompanhamento da cultura pela turbidez a 640 nm, determinação das cfu e imagens obtidas por microscopia.

Resultados obtidos no final da cultura:

Determinação do peso seco



Fracções subcelulares seleccionadas:

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

Parâmetros a analisar:

- Curva de crescimento;
- Sobrevivência;
- Conteúdo em proteínas no sobrenadante pós-12000 g e sedimento pós-12000 g;
- Marcador de peroxidação lipídica:
 - Malonaldeído
- Marcadores não-enzimáticos de *stress* e da disponibilidade intracelular de enxofre:
 - Glutathione
 - Dissulfureto do glutathione
- Marcadores enzimáticos de *stress*:
 - Glutathione redutase
 - Glutathione peroxidase
 - Glucose-6-fosfato-desidrogenase
 - Catalase citoplasmática
 - Catalase peroxissomal
 - Malato desidrogenase
- Marcadores enzimáticos de fermentação alcoólica e láctica:
 - Álcool desidrogenase
 - Lactato desidrogenase
- Capacidade antioxidante:
 - Método do DPPH utilizando a curva de calibração com ácido gálico

Técnicas utilizadas:

Cultura de microrganismos

Análise de imagens, por analisador de imagens BioRad

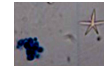
Microscopia óptica, pelo microscópio Leitz Dialux 20 com câmara Leica DC 300, programa Leica DC Software Moduls

Desintegração celular, por homogeneizador de sonda de ultra-sons

Fracionamento celular, por centrifugação diferencial

Conteúdos - proteínas, por espectrometria de absorção molecular

- MDA, GSH e GSSG, por espectrometria de fluorescência



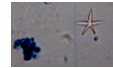
Actividades enzimáticas - CAT T, CAT A, GR, GPx, G6PD, ADH, LDH e NADP-ME,
por espectrometria de absorção molecular

Capacidade antioxidante – DPPH, captura de radicais livres, por espectrometria de
absorção molecular

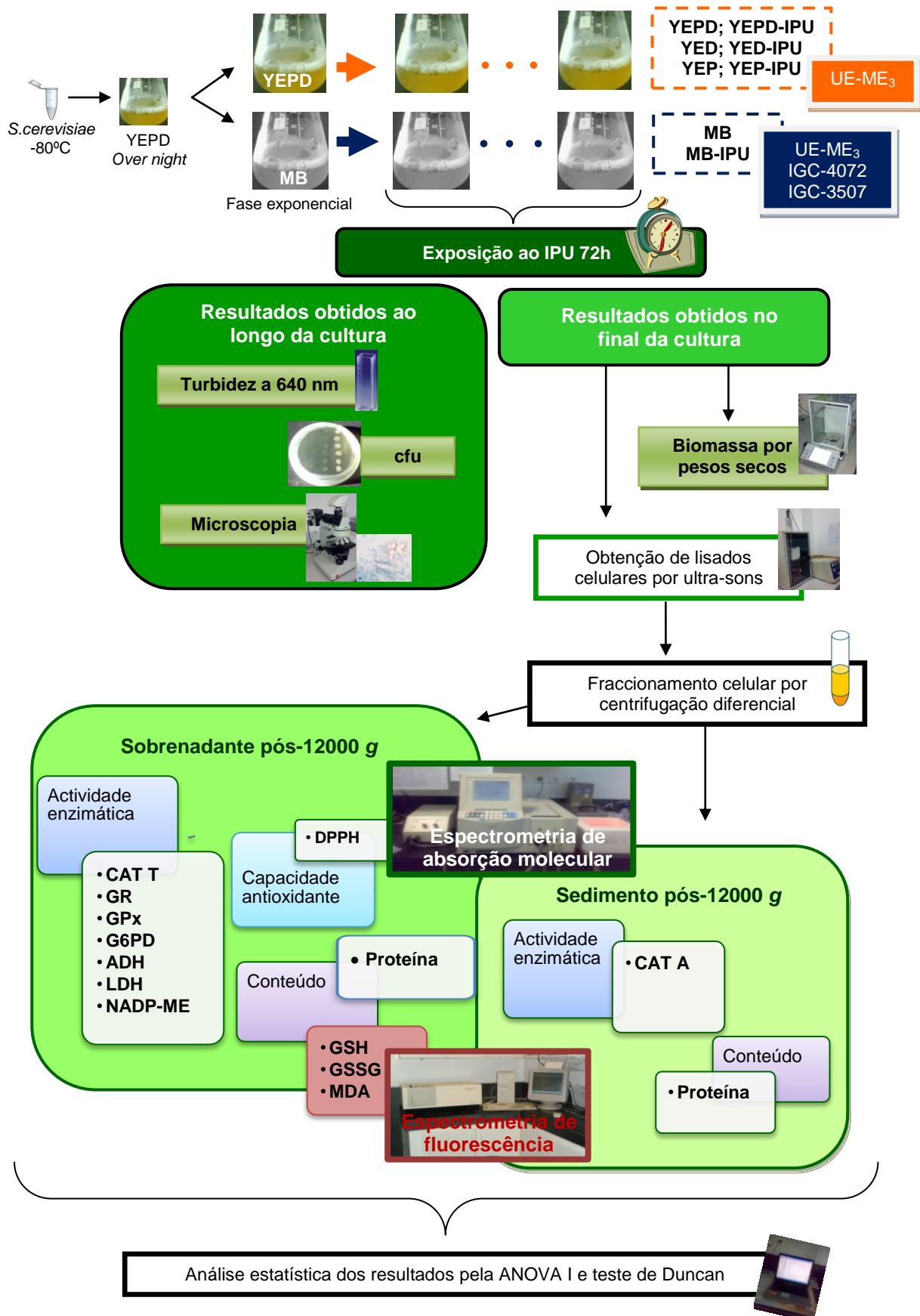
Ferramentas informáticas - folha de cálculo e *software* para análise estatística

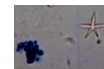
Análise estatística dos resultados:

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



3.2. Diagrama do trabalho





3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Material biológico

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

Para termo de comparação foram utilizadas as estirpes IGC-4072, isolada a partir de uma levedura comercial, e a IGC-3507, isolada de populações presentes em vaginite humana, que se encontram depositadas na *Portuguese Yeast Culture Collection* (PYCC), Universidade Nova de Lisboa, Portugal. Estas estirpes são recorrentemente utilizadas em estudos dedicados à fermentação e à toxicidade com etanol, ácido acético ou pesticidas (Ochoa-Estopier, 2010; Ribeiro, 2000; Viegas, 1989; van Uden, 1967).

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

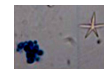
3.3.2. Condições de cultura

Geralmente, para uma cultura de leveduras utiliza-se o meio YEPD, cuja composição complexa não permite conhecer com precisão a sua composição qualitativa e quantitativa, como é o caso do extracto de levedura que consiste numa mistura de diversas espécies químicas em proporções desconhecidas. Porém, é possível escolher o meio MB, composto por quantidades exactas de oligoelementos, vitaminas e minerais definidos, que incluem as fontes de carbono, glucose ou glicerol, e azoto, sais de amónio ou de nitrato, na sua composição.

Na realização deste trabalho foram preparados meios YEPD e MB na ausência e na presença de isoproturão, de acordo com a formulação clássica dos mesmos descritos por Atlas (2006) e van Uden (1967), respectivamente.

O meio YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) utilizado era constituído por extracto de levedura (10 g.L⁻¹) e peptona (20 g.L⁻¹) dissolvidos em água ultra-pura e esterilizado pelo calor húmido, ao qual posteriormente foi adicionada glucose (20 g.L⁻¹) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µ). A preparação de meio YEPD sólido incluiu a adição de agar (20 g.L⁻¹) antes da esterilização em autoclave.

Os meios restritivos YED e YEP foram obtidos a partir do meio YEPD por supressão de peptona ou glucose, respectivamente.



A preparação do meio MB (1/3 de líquido para 2/3 de ar), iniciou-se pela obtenção, em água ultra-pura, de uma solução basal composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,013 \text{ g.L}^{-1}$), a qual foi esterilizado pelo calor húmido. Posteriormente, esterilizadas por filtração (filtro $0,2 \mu$), adicionou-se glucose (20 g.L^{-1}) e $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ da solução previamente preparada de vitaminas constituída por biotina ($0,001 \text{ g.L}^{-1}$), pantotenato de cálcio ($0,08 \text{ g.L}^{-1}$), mioinositol (4 g.L^{-1}), niacina ($0,16 \text{ g.L}^{-1}$), piridoxina em HCl ($0,16 \text{ g.L}^{-1}$) e tiamina em HCl ($0,16 \text{ g.L}^{-1}$); da solução elementar A constituída por H_3BO_3 ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), KI ($0,02 \text{ g.L}^{-1}$) e $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$); e da solução elementar B composta pelos sais $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,008 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,08 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,08 \text{ g.L}^{-1}$) e HCl ($0,001 \text{ N}$) (van Uden, 1967).

Os meios YEPD-IPU, YED-IPU, YEP-IPU e MB-IPU (1/3 de líquido para 2/3 de ar) foram preparados por adição de volume adequado de solução aquosa de isoprotrurão, esterilizada por filtração (filtro $0,2 \mu$), ao seu meio base de forma a obter a concentração desejada de $100 \mu\text{M}$, eleita para este estudo de acordo com trabalhos anteriormente desenvolvidos no mesmo laboratório (Candeias, 2010).

As células presentes numa colónia e conservada a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ foram inoculadas em 10 mL de meio YEPD líquido e crescidas *overnight*, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação orbital constante de 150 rpm . Esta cultura fresca foi utilizada para inocular meio YEPD ou MB acompanhando-se o seu crescimento, por leitura da turbidez a 640 nm , até à fase exponencial média de forma a permitir a sua utilização como inóculo nos ensaios de exposição ao IPU ($100 \mu\text{M}$) e respectivo controlo, iniciados com turbidez $0,1$ (640 nm) e incubados, nas condições de agitação e temperatura referidas anteriormente, durante 72 h (Atlas 2006).

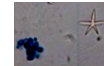
3.3.3. Avaliação do crescimento da levedura

3.3.3.1. Turbidez e cfu

O crescimento das culturas controlo e de exposição ao isoprotrurão em todas as condições, foi acompanhado por leituras de turbidez a 640 nm durante 72 h , tomando amostras no início da cultura, às 24 , 48 e 72 h de crescimento. A determinação de cfu foi realizada nos mesmos intervalos de tempo, sobre amostras das culturas que após diluição adequada foram inoculadas em meio YEPD sólido e incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ até deixar de se observar o aparecimento de novas colónias (Madigan, 2004; Pelczar, 1993).

3.3.3.2. Análise microscópica

A viabilidade celular foi também analisada ao longo do tempo de cultura, 72 h , em intervalos de 24 h , de modo a possibilitar a observação das alterações morfológicas que as



células de *S. cerevisiae* iam revelando. Diariamente, recolheram-se para cada situação amostras de células, tendo sido coradas previamente com azul-de-metileno (1 %) em álcool etílico com hidróxido de potássio (0,01 %). As observações foram realizadas recorrendo ao programa Leica DC *software* Moduls adaptado para a leitura microscópica das amostras no microscópio Leitz Dialux 20 com câmara Leica DC 300, gentilmente disponibilizado pelo Departamento de Biologia da Universidade de Évora (Ren, 2008).

3.3.3.3. Determinação da biomassa

A quantidade de biomassa formada no final do tempo de cultura, 72 h, foi estimada pela quantificação do peso seco das culturas controlo e de exposição ao isoprotrurão nos diferentes meios de cultura utilizados. Recolheram-se para cada situação amostras independentes, as quais foram lavadas 3 vezes com água estéril e secas em estufa a 80 °C até atingir peso constante (Öhgren, 2006).

3.3.4. Fraccionamento celular

- Obtenção de lisados celulares

Células de culturas controlo e de exposição ao isoprotrurão, crescidas durante 72 h foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 10 min. As células foram lavadas por 3 vezes com água ultra-pura estéril. Posteriormente as células foram ressuspensas em 5,0 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, mantidas a 4 °C e lisadas em homogeneizador de ultra-sons (3 vezes 5 min; 0,1; 1).

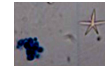
- Preparação de fracções pós 12000 g e peroxissomal

O procedimento de Sugimoto (1990) foi seguido para preparar as fracções pós 12000 g e peroxissomal, tendo os homogeneizados sido centrifugados a 12000 g, 20 min a 4 °C. Aliquotas do sobrenadante obtido, fracção pós 12000 g, e da fracção peroxissomal, o sedimento ressuspensado em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, foram guardadas a -20 °C para utilização posterior.

3.3.5. Doseamentos nas fracções subcelulares

3.3.5.1. Proteína

A determinação da concentração de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (1951), que se fundamenta na reacção entre o reagente de Folin-Ciocalteu ou ácido fosfomolibdicofosfotúngstico com os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e



triptofano das proteínas. O facto de ser uma reacção que pode ser catalisada pelo cobre em meio alcalino induz à formação de um complexo de heteromolibdénio de cor azul intensa.

A resposta do método pode ser influenciada pela composição em aminoácidos da proteína, apesar do seu maior problema estar relacionado com o elevado número de interferentes, como aminoácidos e seus derivados, constituintes de soluções tampão, detergentes, drogas, glúcidos, ácidos nucleicos, sais e reagentes sulfidrílicos, que podem interferir na reacção. Porém, a sua elevada sensibilidade sobrepõem-se a essas possíveis interferências, bem como, devido ao facto das substâncias interferentes se encontrarem muito diluídas, o que faz com que os seus efeitos sejam minimizados.

O reagente de Lowry foi preparado com 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). A solução comercial de ácido fosfomolibdicofosfotúngstico, conhecida por reagente de Folin Ciocalteu, foi diluída 1/2 com água ultra-pura.

Tomou-se uma alíquota de 0,2 mL do sedimento pós-12000 g ou do sobrenadante pós-12000 g que foi diluída com NaOH (0,5 M) para um volume total de 1,0 mL.

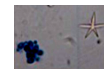
A cada solução-padrão ou das amostras diluídas adicionou-se a 1,0 mL a 5,0 mL de reagente de Lowry, previamente preparado. Após agitação no vortex, adicionou-se 0,5 mL de reagente de Folin e voltou-se a agitar. Aguardaram-se 30 min. Após nova agitação no vortex, leu-se a absorvência a 720 nm.

Construiu-se a curva de calibração a partir de uma solução-mãe de albumina do soro bovino, BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para o intervalo de concentrações 50-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ (fig. A1) e calculou-se, por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

3.3.5.2. GSH e GSSG

Seguiu-se o método fluorimétrico descrito por Hissin (1976) para proceder à determinação da concentração de GSH e de GSSG, recorrendo ao OPT para desenvolver um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência e a NEM para sequestrar o GSH endógeno. A quantificação de GSH e GSSG do sobrenadante pós 12000 g foi calculada recorrendo a curva de calibração construída para o intervalo entre 0,5 e 100 μM e 0,08 e 24 μM , respectivamente (fig. A2 e A3).

Para diferentes tubos de ensaio pipetaram-se alíquotas de 60 μL de amostra na diluição adequada ou de padrão (GSH), 1840 μL de tampão fosfato sódio (0,1 M) pH 8,0, com EDTA (0,005M) e 100 μL de OPT contendo 100 μg de o-fetaldeído. Agitaram-se os tubos de ensaio e deixou-se reagir durante 15 min, à temperatura ambiente. Transferiu-se a solução para células de sílica fundida com as quatro faces polidas e leu-se a fluorescência



ao λ_{exc} 350 nm e ao λ_{em} 420 nm. O branco foi preparado substituindo a amostra por tampão fosfato sódio (0,1 M) pH 8,0, com EDTA (0,005 M).

Na quantificação do GSSG fez-se reagir alíquotas da amostra ou padrão, com alíquotas de NEM, numa concentração final de 20 μ M, durante 30 min. Pipetou-se 100 μ L da mistura reaccional para igual volume de solução OPT contendo 100 μ g de *o*-fetaldeído e 1800 μ L de NaOH (0,1 M). Aguardou-se 15 min e leu-se a fluorescência ao λ_{exc} 350 nm e ao λ_{em} 420 nm.

3.3.5.3. Capacidade antioxidante

O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com o método de espectrometria descrito por Thaipong (2006), que se baseia no uso do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, DPPH, cuja absorvência diminui quando o radical é reduzido por antioxidantes, passando de coloração púrpura a amarela, ou seja, tornando-se em 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo, DPPH-H (fig. 3.1).

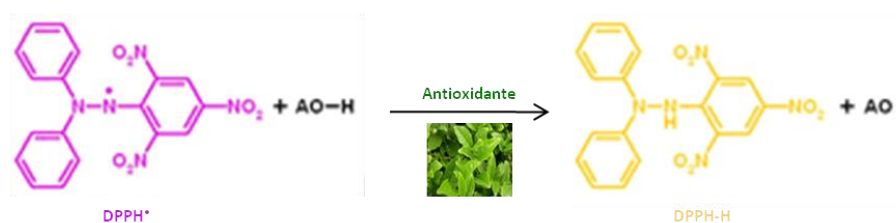
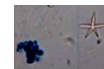


Figura 3.1 – Redução do DPPH por antioxidantes, ocorrendo mudança de cor púrpura a amarelo.

Na determinação da capacidade antioxidante utilizou-se uma solução de DPPH (0,03 g.L⁻¹ em metanol) à qual se adicionou uma alíquota de volume conhecido de amostra ou padrão em células de absorção molecular de forma a permitir acompanhar a redução do DPPH a DPPH-H a 520 nm durante 180 s, a 25 °C. O uso do metanol como solvente no extracto funciona para restringir a interferência de compostos não fenólicos capazes de alterar o estado redox do radical DPPH, como é o caso dos carotenóides e dos ácidos gordos, também conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes. Esta solução foi preparada diariamente, nas quantidades necessárias para as medições, e mantidas no escuro à temperatura ambiente, quando não utilizados (Brand-Williams, 1995; Soares, 2005).

A construção da curva de calibração, utilizando como antioxidante uma solução de ácido gálico no intervalo de concentração ente 10 e 100 mgL⁻¹ (fig. A4-A e B), que permitiu a determinação da capacidade antioxidante das amostras por interpolação gráfica.



3.3.5.4. Malonaldeído

A concentração de MDA presente no sobrenadante pós 12000 *g* das células em estudo foi determinada por espectrometria de fluorescência de acordo com a metodologia de Ohkawa (1979), que se baseia na oxidação do TBA pelo malonaldeído em meio aquoso, originando um fluoróforo (fig. 3.2).

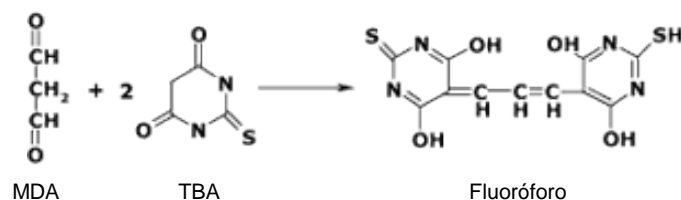


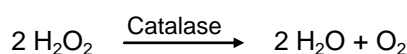
Figura 3.2 - Reacção entre o TBA e o malonaldeído, formando o fluoróforo, quantificável por espectrometria de fluorescência.

A mistura de ensaio composta por uma alíquota de amostra, sobrenadante 12000 *g*, ou padrão SDS (8,1 %) TBA 0,4 %, em ácido acético 10 % pH 3,5 na proporção 1:2:30 foi colocada em banho a 95 °C com agitação constante durante 60 min. O branco foi preparado substituindo a amostra por 0,1 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. A reacção foi interrompida colocando os tubos a 4 °C durante 15 min, após estabilização à temperatura ambiente, durante 15 min, adicionando-se 2,5 mL de *n*-butanol e aguardando 60 min para atingir o equilíbrio de fases. Os tubos foram a centrifugar a 1600 *g*, durante 10 min, e destes recolheram-se 2,0 mL do sobrenadante para leitura de fluorescência ao λ_{exc} 515 nm e λ_{em} 553 nm. A curva de calibração para o malonaldeído, no intervalo de 5 a 100 μ M (fig. A5), foi construída utilizando o MDA gerado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano pela sua hidrólise em meio ácido (Turton, 1997).

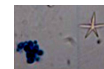
3.3.6. Determinações de actividade enzimática nas fracções subcelulares

3.3.6.1. Catalases T e A

Pelo método descrito por Beers (1952) procedeu-se à determinação da actividade enzimática catalase nas fracções pós 12000 *g*, CAT T, e peroxissomal, CAT A por espectrometria da absorção molecular, acompanhando o consumo de peróxido de hidrogénio de acordo com a equação:



Em cada caso, incubou-se uma alíquota de amostra contendo aproximadamente 0,01-0,03 mg.mL⁻¹ de proteínas, em meio de reacção constituído por tampão fosfato (50 mM)



pH 7,0 e H₂O₂ (30 mM). Acompanhou-se o consumo de peróxido de hidrogénio registando a variação de absorvência a 240 nm, a 25^oC, durante 120 s, contra um branco composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H₂O₂ (30 mM), substituindo a amostra pelo tampão de lise.

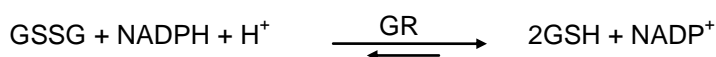
No cálculo da actividade enzimática CAT T, utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reacção, A vs t, associado ao sobrenadante pós 12000 g de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, revelou valores de r abrangidos entre 0,995000–0,998205 na ausência de IPU, e entre 0,997615–0,995826 na presença IPU. Em relação às células *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, procedeu-se de igual modo, obtendo-se valores de r que variaram entre 0,92853–0,992878 na ausência de IPU (fig. A6–A e B), e para a estirpe nativa e IGC-3507, na presença de IPU, o r variou entre 0,868958–0,984814, respectivamente (fig. A6–C e D).

O coeficiente angular das curvas de reacção A vs t relativo à fracção peroxissomal de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD para o cálculo da actividade enzimática CAT A apresentou valores de r compreendidos entre 0,998754-0,999216 na ausência de IPU (fig. A7–A), e entre 0,988975–0,999379 na presença de IPU (fig. A7–B).

No cálculo da actividade enzimática utilizou-se o coeficiente de absorvência molar de 0,0435 mM⁻¹.cm⁻¹, o correspondente ao H₂O₂.

3.3.6.2. Glutathione redutase

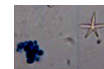
O método proposto por Goldberg (1987) para a determinação por espectrometria de absorção molecular da actividade enzimática da GR baseia-se no acompanhamento do decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH segundo a reacção:



Embora a reacção seja reversível, dá-se em maior extensão no sentido que conduz à formação da forma reduzida do glutathione. A actividade catalítica foi determinada na fracção pós-12000 g das células das leveduras em estudo.

Em cada caso, incubaram-se alíquotas de 0,1 mL de amostra, com a concentração aproximada de proteínas de 0,2 mg.mL⁻¹, em células de absorção molecular que continham o meio de reacção composto por GSSG (2,2 mM), EDTA (0,5 mM), NADPH (0,17 mM) dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2.

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional, durante 5 min, a 37 °C e sob agitação constante. Iniciou-se a reacção com a adição de 0,050 mL de NADPH e registou-se a variação de absorvência durante 120 s, nas mesmas condições de agitação e temperatura. As leituras foram efectuadas contra um branco, previamente preparado, no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão.

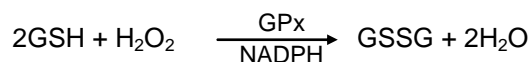


Para cada cultura, calculou-se a actividade enzimática GR presente no sobrenadante pós 12000 g a partir do coeficiente angular das curvas de reacção A vs t com coeficientes de correlação que variaram entre 0,974294-0,996301 e 0,997270-0,999886, para células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD na ausência e na presença IPU, respectivamente (fig. A8–A e B). Repetiu-se o mesmo procedimento para células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB e MB-IPU, cujo r variou entre 0,994442–0,999174, e 0,941180–0,999681, respectivamente (fig. A8–C e D).

Deste modo, determinou-se a actividade enzimática a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas, utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.6.3. Glutathione peroxidase

A determinação da actividade enzimática da GPx, por espectrometria de absorção molecular, foi realizada de acordo com o método proposto por Flohé (1984), no qual a leitura de absorvência, a 340 nm, de modo a poder seguir a seguinte reacção:

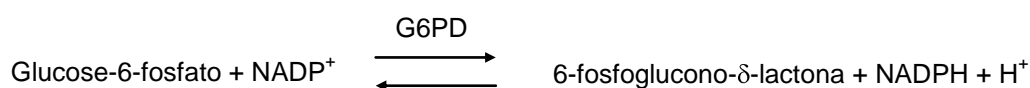


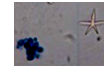
A mistura de reacção constituída por tampão fosfato (70 mM) pH 7,2, GSH (500 μM), GR (12 mU), NADPH (160 mM) e volume adequado de amostra (0,2 mg.mL⁻¹) foi pré-incubada durante 10 min, a 37 °C. Iniciou-se a reacção pela adição de t-BHP (100 μM) registando-se a absorvência a 340 nm, a 37°C, descontando um branco com igual composição, mas onde o t-BHP foi substituído por tampão.

No cálculo da actividade enzimática GPx presente no sobrenadante pós 12000 g utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reacção A vs t, cujos valores de r variaram entre 0,992471-0,998251 e 0,971505-0,993818, para células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD na ausência e na presença IPU, respectivamente (fig. A9–A e B). O mesmo protocolo foi aplicado a células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB e MB-IPU, em que r obtido variou entre 0,9470725–0,995871, e 0,944911–1,000000, respectivamente (fig. A9–C e D). O cálculo da actividade foi realizado utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.6.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase

O método proposto por Postma (1989) e Bergmeyer (1983) para determinação da actividade enzimática G6PD baseia-se na reacção





Em células de espectrofotómetro de absorção molecular incubaram-se, para cada caso, amostras de fracção pós 12000 g (proteína 0,2 mg.mL⁻¹) em meio de reacção constituído por tris-HCl (50 mM) pH 8,0, NADP⁺ (dissódico) (400 µM), MgCl₂.6H₂O (5 mM). Iniciou-se a reacção com a adição de G6P (5 mM) na mistura de ensaio após estabilização a 37 °C durante 1 min. Acompanhou-se a formação de NADPH, lendo a absorvência a 340 nm, durante 180 s, a 37 °C contra um branco de igual composição, onde a amostra foi substituída por água desionizada.

No sobrenadante pós 12000 g de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD na ausência e na presença IPU, foi calculada a actividade enzimática G6PD tendo como base o coeficiente angular das curvas de reacção A vs t, em que os valores de r variaram entre 0,998518-0,999583 e 0,999286-0,999480, respectivamente (fig. A10–A e B). De igual modo se procedeu ao cálculo da mesma actividade enzimática em células *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB e MB-IPU, onde o r variou entre 0,861020–0,998586, e 0,942549–0,999420, respectivamente (fig. A10–C e D). O valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ foi o utilizado para realizar o cálculo desta actividade enzimática.

3.3.6.5. Álcool desidrogenase

Na determinação da actividade enzimática ADH, aplicou-se o método proposto por Moss (1955), Hatanaka (1975), e Romano (1969) que se fundamenta na reacção:

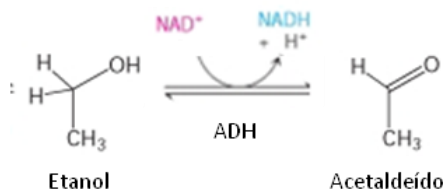
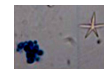


Figura 3.3 – Redução do etanol a acetaldeído, catalisada pela ADH, com a formação de NADH.

Neste método, acompanhou-se a produção de NADH pelo registo da variação de absorvência a 339 nm, a 25°C, durante 180 s. Para cada caso, incubou-se uma alíquota de fracção pós-12000 g (proteína 0,1 mg.mL⁻¹) em meio de reacção composto por tampão pirofosfato (0,1M) pH 7, com glicina (1,67 mg.mL⁻¹), cloreto de semicarbazida (250 mg.mL⁻¹), pH 4,5, etanol (96 %), NAD (20 mg.mL⁻¹) e GSH (90 mg.mL⁻¹), lida contra um branco, sem amostra.

A actividade ADH determinada no sobrenadante pós-12000 g de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, teve em consideração o coeficiente angular das curvas de reacção A vs t, onde o r variou entre 0,997062–0,998436 na ausência de IPU, e entre 0,999449–0,999956 na presença IPU. De igual modo se calculou esta actividade



enzimática no sobrenadante pós-12000 g de células *S. cerevisiae* crescidas em meio MB. Os valores de r nas estirpes IGC-4072 e IGC 3507 na ausência de IPU compreenderam entre 0,999734–0,999907 (fig. A11–C). O valor de r da estirpe IGC-4072 na presença de IPU foi de 0,998095 (fig. A11–D). O valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADH de $6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi usado para o cálculo da actividade enzimática.

3.3.6.7. Lactato desidrogenase

A determinação por espectrometria de absorção molecular da actividade enzimática LDH fundamentou-se na reacção (Romano, 1969; Moss, 1955; Meister, 1950) representada na fig. 3.4.

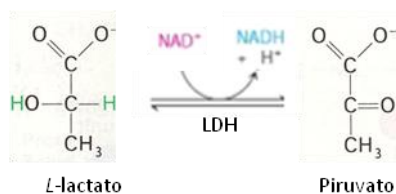


Figura 3.4 – Redução do L-lactato a piruvato, catalisada pela LDH, com a formação de NADH.

Durante 180 s, registou-se a formação de NADH através do registo da variação de absorvência a 339 nm, a 25°C. Incubou-se para cada caso alíquotas de fracção pós-12000 g (proteína $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em meio de reacção composto por tampão fosfato (0,1 M) pH 7, piruvato ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), NADH ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), as leituras foram efectuadas contra um branco, sem amostra.

A actividade enzimática LDH determinada no sobrenadante pós-12000 g de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, na ausência e na presença de IPU, foi efectuada recorrendo ao coeficiente angular das curvas de reacção A vs t, onde os valores de r variaram entre 0,992111–0,998272 (fig. A12–A), e entre 0,998562–0,999246 (fig. A12–B), respectivamente. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADH de $6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o cálculo da actividade enzimática.

3.3.6.8. Malato desidrogenase

O método escolhido (Wynn, 1997) para determinar a actividade enzimática NADP-ME foi descrito por Hsu e Lardy, em 1969, e tem como reacção base a seguinte:

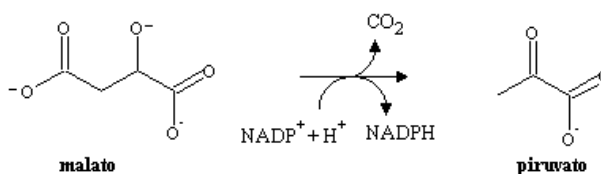
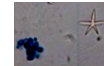


Figura 3.5 – Redução do malato a piruvato, catalisada pelo NADP-ME, com a formação de NADPH.



Por espectrometria de absorção molecular, acompanhou-se a formação de NADPH pela leitura de absorvências a 340 nm, a 30 °C.

Previamente, fez-se a solução tampão com MgCl₂ (0,1 M), NH₃ (80 mM), KCl (2 M) e malato (200 mM), em tampão tris-HCl (0,5 M) pH 7. Para cada caso incubou-se uma alíquota de fracção pós-12000 g (0,4 mg.mL⁻¹) em meio de reacção contendo NADP⁺ (40 mM), água desionizada e solução tampão.

A leitura da absorvência foi realizada contra um branco, onde a amostra foi substituída por tampão lise. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ para o cálculo da actividade enzimática.

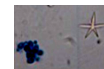
No sobrenadante pós 12000 g de leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, na ausência e na presença de IPU, a actividade do NADP-ME foi calculada a partir do coeficiente angular das curvas de reacção A vs t com valores de r que variaram entre 0,969515–0,999440 na ausência de IPU (fig. A13–A), e entre 0,981939–0,999130 na presença de IPU (fig. A13–B).

3.3.7. Análise estatística dos resultados

Os parâmetros bioquímicos determinados em cinco experiências independentes de cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 nas diferentes condições de ensaio, foram submetidos à análise de variância simples, ANOVA I, e ao teste de significância Duncan, utilizando o programa SPSS para Windows, versão 18, licenciado para a Universidade de Évora.

3.4. Material

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

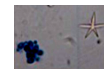


3.5. Equipamento

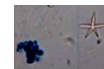
- Analisador de imagens BioRad Gel Doc EQ BioRad com *software Quantity-one*
- Autoclave da marca Selecta, modelo microclave
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Espectrofluorímetro de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espectrofotómetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450
- Microcentrifuga da marca Beckman, modelo Microfuge E™
- Microscópio Leitz Dialux 20 com câmara Leica DC 300, programa Leica DC *software Moduls*
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34
- Potenciómetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

3.6. Reagentes

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano, Sigma, St. Louis
- 1-Butanol, 99,5 %, Panreac, Barcelona
- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, Sigma, St. Louis
- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil, Sigma, St. Louis
- Ácido bórico, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37,0 %, Merck, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St. Louis
- Ácido gálico, Merck, Darmstadt
- Ácido pantoténico, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Agar, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Albumina do soro bovino, Sigma, St. Louis
- Amónia, 25,0 %, pró-análise, Panreac, Barcelona
- Biotina, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt
- Cloreto de cálcio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Cloreto de ferro (II) hexahidratado, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Cloreto de magnésio hidratado, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Cloreto de potássio, 99,5 %, Merck, Darmstadt
- Cloreto de semicarbazida, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Cloreto de sódio, 99,5 %, Panreac, Barcelona
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Dinucleótico de nicotinamida e adenina fosfato oxidado (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis
- Dinucleótico de nicotinamida e adenina fosfato reduzido (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis



- Duodecilsulfato de sódio, Sigma, St. Louis
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8 %, Merck, Darmstadt
- Extracto de levedura, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Glicina ou ácido aminoacético, 99,0 %, Riedel-de Haën
- Glucose, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Glucose-6-fosfato desidrogenase, Sigma, St. Louis
- Glutationo dissulfureto, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St. Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Inositol, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Iodeto de potássio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Isoproturão, pestanal, Riedel de Haën, Seelze
- Malato (di-sódio DL – malato), 98,0 %, Merck, Darmstadt
- Metanol, pró-análise, Merck, Darmstadt
- Molibdato de sódio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- *N-metilmaleida*, Sigma, St. Louis
- Niacina, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- *o*-fetaldeído, Sigma, St. Louis
- Peptona, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30,0 %, Sigma, St. Louis
- Piridoxina, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Piruvato de sódio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Sulfato de amónio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5-102,9 %, Panreac, Barcelona
- Sulfato de magnésio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Sulfato de manganês, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Sulfato de zinco, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- *ter*-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis
- Tiamina, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt



4. Resultados e Discussão

O principal objectivo deste trabalho foi identificar e compreender o efeito do isoproturão, uma fenilureia amplamente utilizada nas culturas de Outono-Inverno, sobre a capacidade antioxidante e metabolismo energético da levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, nativa do Alentejo, Portugal. Para o efeito avaliou-se o comportamento desta levedura em meios YEPD e MB com alterações como, por exemplo, o suprimento da fonte de carbono, glucose, ou da fonte de azoto, peptona, no caso do meio YEPD, e/ou a presença de IPU nos dois tipos de meios. Para além destas aproximações experimentais, procurou-se responder à evolução dos resultados, comparando as respostas da estirpe nativa *S. cerevisiae* UE-ME₃ com as de outras estirpes, *S. cerevisiae* IGC-4072 e IGC-3507, conhecidas pela sua presença em ambientes hostis (Ferreira, 2007; Rønhede, 2005; Carrasco, 2001; Costa, 2001)

Embora na literatura se encontre descrito que o isoproturão é capaz de causar perturbações enzimáticas características da patologia do fígado gordo, bem como, de incrementar a probabilidade de ocorrência de tumores no tecido hepático, poucos estudos tem sido realizados em eucariotas que permitam esclarecer esses efeitos. Por outro lado, tendo em consideração a persistência deste princípio activo de fitofármacos aplicados no sul de Portugal, devido à menor lixiviação dos solos e aquíferos, torna-se cada vez mais pertinente descobrir microrganismos resistentes à presença de isoproturão que possam no futuro serem utilizados na biorremediação de situações de contaminação ambiental sistemática e/ou acidental por fenilureias (Sharma, 2008; Monarrez, 2007; Rønhede, 2005; Agrawal, 1998).

4.1. Cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em YEPD e MB

A partir do procedimento experimental, descrito na secção 3.3, pode-se observar que a principal diferença entre o meio rico e o meio mineral mínimo, diz respeito ao conhecimento bem definido da composição química do meio MB.

A fig. 4.1 ilustra o aspecto final da cultura em meio YEPD e MB após 72h de crescimento, onde pode ser observada a densidade celular elevada em ambas as condições, indiciador de crescimento elevado da levedura confirmada pelas leituras de turbidez do meio de cultura e contagem de cfu em placa.

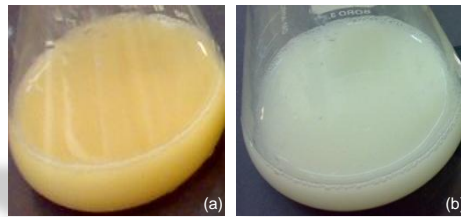
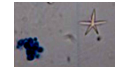


Figura 4.1 – Imagem fotográfica de cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ após 72 h de crescimento em YEPD (a) e em MB (b).

O perfil de crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD e MB, obtido por leituras de turbidez, fig. 4.2-A, mostrou-se semelhante nas duas situações, porém, em meio MB observa-se um crescimento menos acentuado. No entanto, pela contagem de cfu ao longo da cultura, fig. 4.2-B, observou-se às 48 e 72 h uma maior quantidade de células viáveis em meio MB, provavelmente associada a maior disponibilidade de fonte de carbono na fase final da cultura.

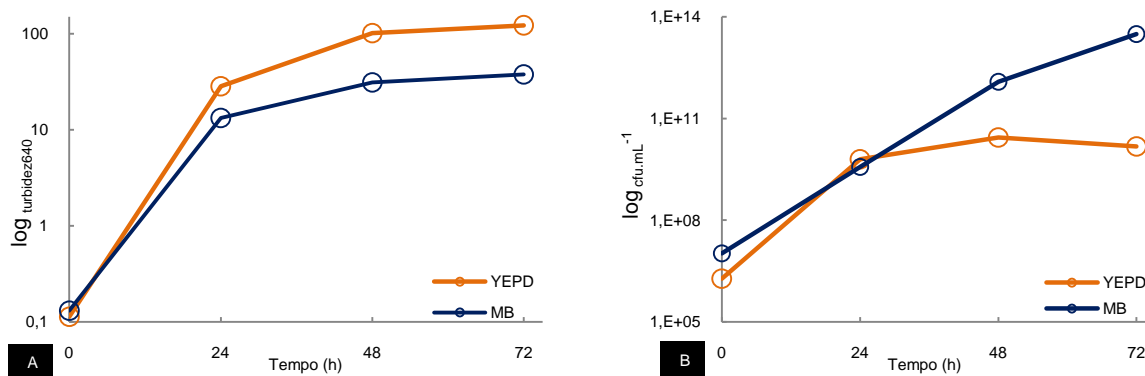
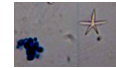


Figura 4.2 – Curvas de crescimento de leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em YEPD e em MB, sobre a turbidez (A) e o número de células viáveis (B). Os pontos assinalados representam a média dos resultados obtidos de 5 experiências independentes ± desvio-padrão.

A fig. 4.3 compara a capacidade antioxidante não-enzimática e enzimática, bem como, alguns enzimas do metabolismo energético de levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD e MB. Como se pode observar em meio MB, ocorre um aumento de células viáveis no final de 72 h de cultura (MB/YEPD=2,067) que parece depender do aumento da capacidade antioxidante mantida pelo enzima GR (MB/YEPD=1,336), pelo tripéptido glutationo estimado pela razão GSH/GSSG (MB/YEPD=2,256), e também, pela capacidade para capturar radicais livres expressa em unidades de ácido gálico e determinada pelo método do DPPH (MB/YEPD=1,972). Podemos observar ainda um decréscimo das actividades enzimáticas antioxidantes GPx (MB/YEPD=0,328), G6PD (MB/YEPD=0,011) e CAT T (MB/YEPD=0,020), assim como, a ausência de expressão funcional dos enzimas energéticos ADH, LDH, NADP-ME e antioxidante CAT A, envolvida na eliminação de H₂O₂ peroxissomal, de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio



MB (MB/YEPD=0). Estes resultados sugerem um desvio metabólico anaeróbio-aeróbio que garante a sobrevivência celular em termos energéticos (Oschoa-Estopier, 2010; Otterstedt, 2004) e parecem confirmar um crescimento mais débil da estirpe UE-ME₃ em meio mínimo, como referido nas fig. 4.2, o que também permitiu uma maior disponibilidade de nutrientes e menor concentração de toxinas no final da cultura, factores que promoveram a presença de maior número de células viáveis (fig. 4.3, barra superior). Apesar de a actividade GPx ser significativamente inferior em meio mínimo (MB/YEPD=0,328), o ciclo de oxidação-redução do glutationo garantiu um nível elevado de GSH nesse meio, facto que contribuiu para a estabilização do ambiente redutor e preservação das estruturas lipídicas das células sobreviventes, indiciado pelo decréscimo do seu conteúdo em malonaldeído (MB/YEPD=0).

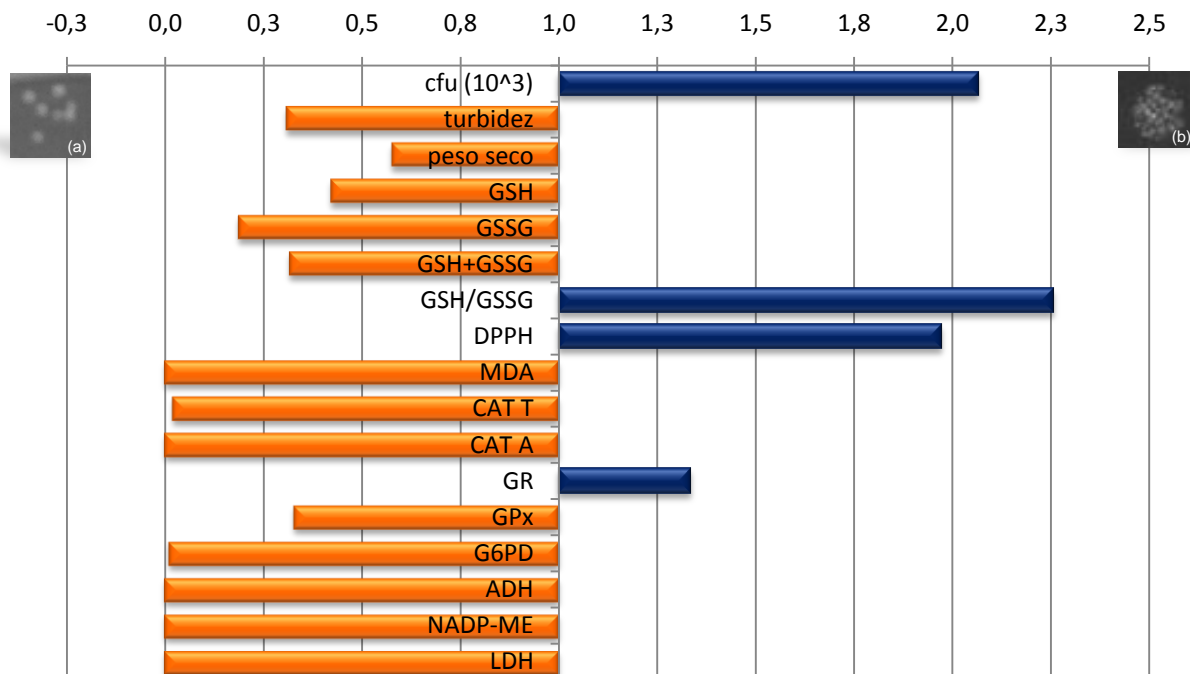
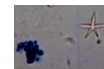


Figura 4.3 – Razão MB/YEPD. Valor calculado para os parâmetros turbidez, peso seco, GSH, GSSG, GSH+GSSG, GSH/GSSG, DPPH, MDA, CAT T, CAT A, GR, GPx, G6PD, ADH, NADP-ME e LDH sobre as culturas de leveduras de *S. cerevisiae* UE-ME₃ após 72 h de crescimento em YEPD com 2 % de glucose, e em MB, com 2 % de glucose. Valores MB/YEPD>1 predominância do factor analisado em meio mínimo. Valores 0≤MB/YEPD<1 predominância do factor analisado em YEPD. Imagem de placa para contagem de cfu de *S. cerevisiae* UE-ME₃ após 72 h de crescimento, amostra em YEPD diluição 10⁷ (a), amostra em meio MB diluição 10⁹ (b).



4.2. Exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao isoproturão em YEPD

4.2.1. Sobrevivência celular

Acompanhou-se o crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meios YEPD, e restritivos YED e YEP, na presença e na ausência de isoproturão, ao longo de 72 h, lendo a turbidez _{640nm}, determinando o peso seco e contando as cfu.

A fig. 4.4 ilustra o aspecto final dos meios de cultura YEPD, YED e YEP, na presença e na ausência de IPU, onde pode ser observada densidade celular elevada em todas as condições de cultura referidas no parágrafo anterior, indiciador de crescimento elevado da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃, confirmada pelas leituras de turbidez do meio de cultura.



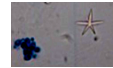
Figura 4.4 – Imagem fotográfica das culturas de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em diferentes meios após 72 h de cultura na presença de IPU (100 µM).

- Turbidez, peso seco

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método indirecto de estimar a concentração celular. Este método não permite distinguir entre células viáveis e células mortas e obter directamente valores absolutos da concentração de células, sendo especialmente utilizado para acompanhar o crescimento microbiano ao longo do tempo a um comprimento de onda particular. Por outro lado, a determinação do peso seco permite avaliar a quantidade de biomassa produzida em cada ensaio (Madigan, 2004; Pelczar, 1993).

O perfil de crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ na ausência ou na presença do isoproturão, obtido por leituras de turbidez, fig. 4.5-A, mostrou-se semelhante nos três meios de cultura, conseguindo-se identificar as fases exponencial, até às 24 h, e estacionária, até ao final do período pré-estabelecido para o seu crescimento.

A fig. 4.5-B representa a biomassa produzida em cada cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃, onde se observa que a quantidade produzida na ausência de peptona é significativamente ($p < 0,01$) superior à gerada em YEPD (7,5 %), ocorrendo uma resposta inversa, com significado estatístico ($p < 0,01$), em células crescidas em carência de glucose (13,7 %), ilustrando a importância da fonte de carbono glucídica no crescimento celular. Contudo, presença de IPU no meio de cultura não afectou, significativamente ($p < 0,01$), este parâmetro em células crescidas em meio YEPD (1,8 %) mas, em condições de carência de



peptona ou de glucose a produção de biomassa foi significativamente inferior ($p < 0,01$), 34,1% e 8,4 %, respectivamente.

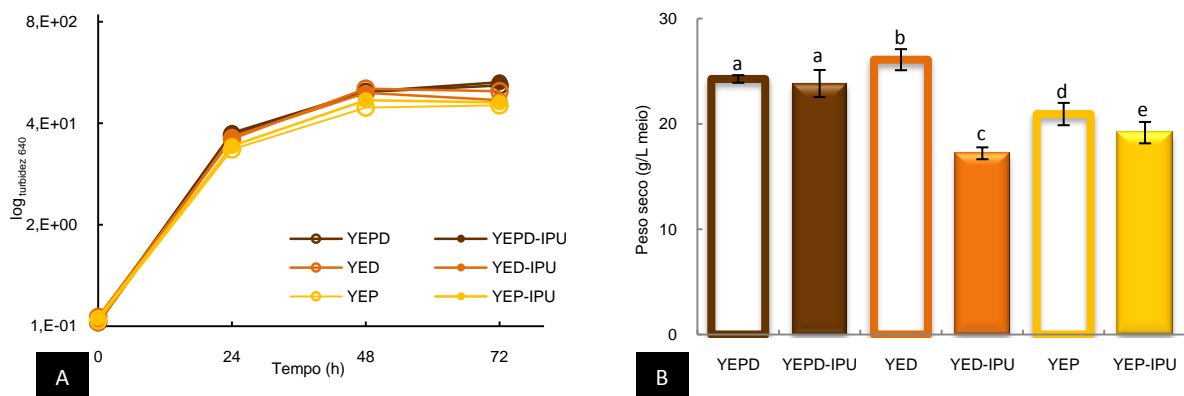


Figura 4.5 – Curvas de crescimento (A) e biomassa (B) da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ obtidas em meio YEPD na ausência e na presença de IPU. Os pontos assinalados representam a média de 5 experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

- cfu

Numa suspensão de células de levedura, cada mililitro contém milhões de células., mas nem todas estão viáveis. A quantificação de cfu, que corresponde ao número de células viáveis, inclui uma preparação, com aplicação de técnicas de assepsia, de uma suspensão de células bacterianas, que sofre uma série de diluições e uma alíquota de cada diluição é semeada em placa. Após a incubação, conta-se o número de colónias, assumindo-se sempre ser cada colónia originária de uma única célula (Öhgren, 2006).

A fig. 4.6 representa o acompanhamento das culturas em estudo, crescidas em meio YEPD, YED e YEP, na ausência e na presença de IPU, aquando da inoculação e a diferentes intervalos de tempo ao longo de 72 h.

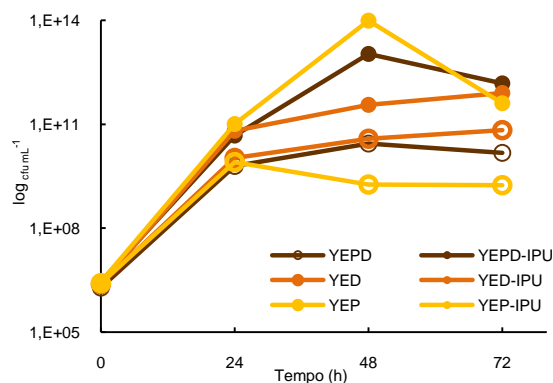
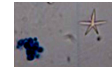


Figura 4.6 – Curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ obtidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência e na presença de IPU. Os pontos assinalados representam a média dos resultados obtidos de 5 experiências independentes \pm desvio-padrão.

A representação gráfica da fig. 4.6 permitiu observar que no início do ensaio, a quantidade de células viáveis presentes na situação controlo e nas culturas crescidas na



presença de isoproturão era idêntica. No entanto, ao longo do tempo, ocorre um aumento do número de células viáveis nas culturas em presença de isoproturão, independentemente da ausência de peptona ou de glucose. Este facto evidencia-se logo às 24 h de cultura, o que pode estar relacionado com a ocorrência de fenómenos adaptativos da população de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao meio com IPU, que se torna cada vez mais evidente até às 72 h.

Ao comparar as curvas de crescimento da *S. cerevisiae* UE-ME₃ obtidas em meio YEPD e YED, observa-se que tem um comportamento idêntico, enquanto que, em meio sem glucose, YEP, a levedura apresenta um perfil de crescimento mais lento que se reflecte num menor número de células viáveis.

A presença de IPU no meio de cultura YEPD-IPU, YED-IPU e YEP-IPU conduziu ao aumento de células viáveis em todas as amostragens até às 72 h. No entanto, a carência de fonte de azoto, meio YED-IPU, atenua a sobrevivência da estirpe UE-ME₃ à fenilureia (fig. 4.7).

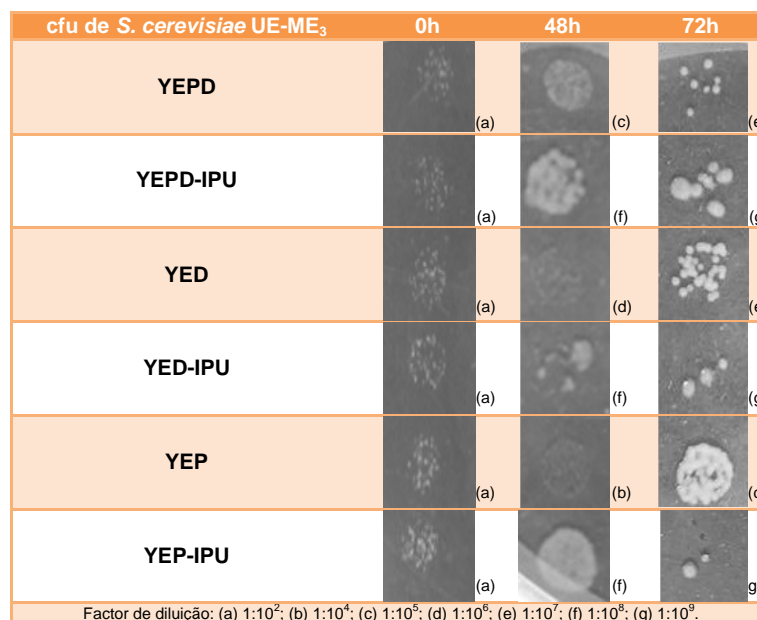
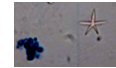


Figura 4.7 – Unidades formadoras de colónias de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em diferentes meios na ausência ou na presença de IPU (100 µM) ao longo de 72 h de cultura.

4.1.2. Resposta antioxidante e danos celulares

- GSH, GSSG, GSH+GSSG

As determinações da concentração citoplasmática de GSH e GSSG mostraram que as células controlo apresentavam valores semelhantes aos descritos na literatura para culturas de *S. cerevisiae* crescidas em meio YEPD, quando expressas por unidade de massa celular (Penninckx, 2000; Elskens, 1997). A fig. 4.8 mostra como o conteúdo citoplasmático em glutathione e dissulfureto de glutathione, bem como, o conteúdo em tióis



não-proteicos (GSH+GSSG) variou em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YED ou YEP, na ausência ou na presença de IPU.

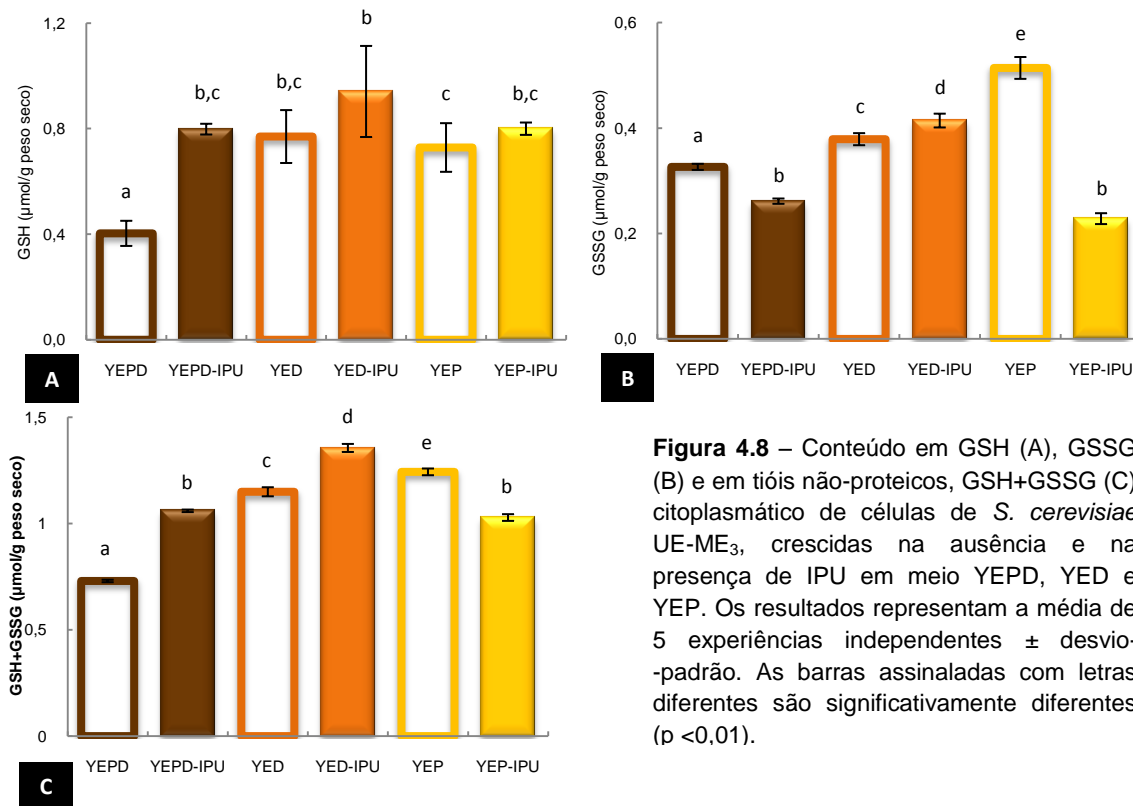
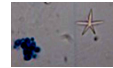


Figura 4.8 – Conteúdo em GSH (A), GSSG (B) e em tióis não-proteicos, GSH+GSSG (C) citoplasmático de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas na ausência e na presença de IPU em meio YEPD, YED e YEP. Os resultados representam a média de 5 experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Na ausência de IPU, o conteúdo em GSH, GSSG e tióis não-proteicos (fig. 4.8) de células crescidas em meios restritivos YED e YEP mostrou-se superior ao de células crescidas em meio YEPD. Deste modo, pode-se especular que a carência em fonte azoto ou de carbono induz a biossíntese endógena de tióis não-proteicos em *S. cerevisiae* UE-ME₃. Para além disso, a presença de IPU aumentou significativamente ($p < 0,01$) o conteúdo citoplasmático de GSH em células crescidas em YEPD-IPU, YED-IPU e YEP-IPU relativamente aos seus controlos (97,9 %; 22,2 %; 9,8 %). Por outro lado, a fig. 4.8-B mostra um decréscimo significativo ($p < 0,01$) do nível citoplasmático de GSSG apenas em células crescidas nos meios YEPD-IPU (19,9 %) e YEP-IPU (55,6 %), e um aumento significativo ($p < 0,01$) em células crescidas em presença de glucose (9,3 %). A resposta observada nos meios YEPD-IPU e YEP-IPU dever-se-á, provavelmente, à reposição de GSH citoplasmático a taxa elevada, *via* GR, e a produção endógena lenta de GSSG, *via* GPx. Por outro lado, os resultados sugerem ainda que o crescimento celular na presença de peptona e na ausência de glucose, mobiliza o consumo de GSH.



- GSH/GSSG, DPPH, MDA

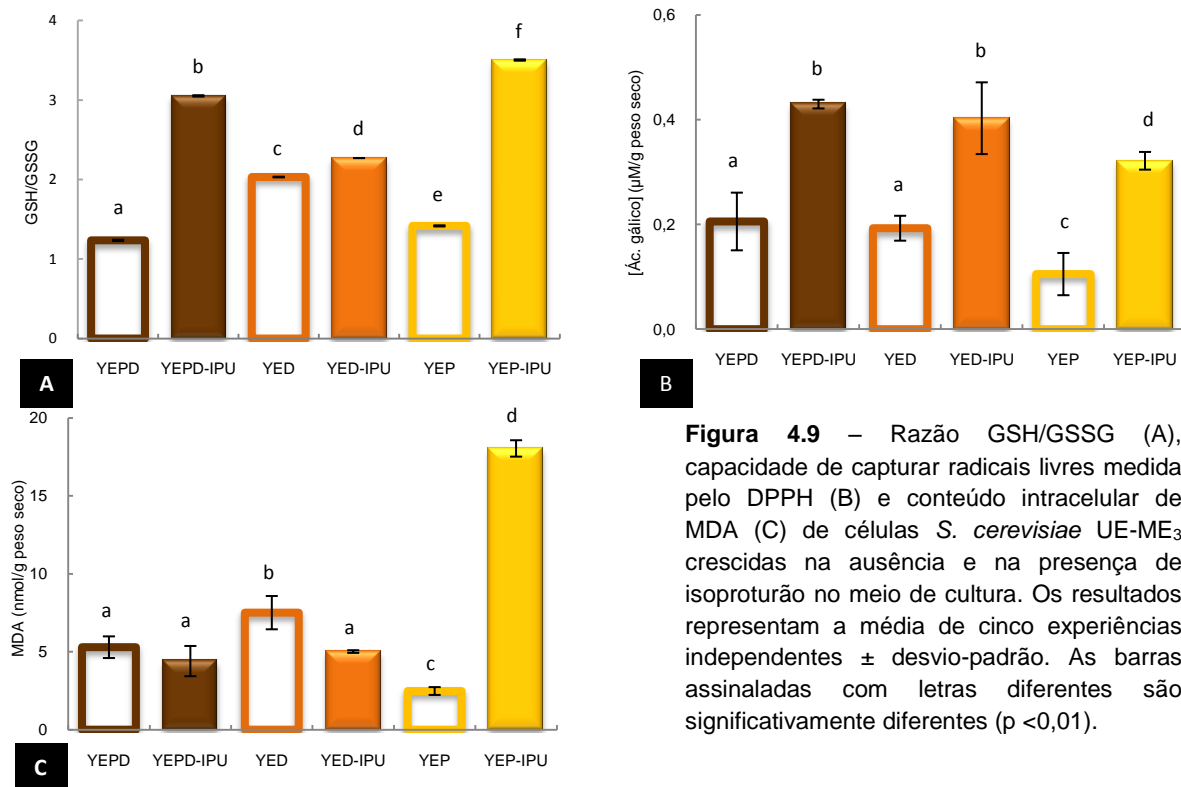
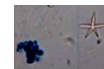


Figura 4.9 – Razão GSH/GSSG (A), capacidade de capturar radicais livres medida pelo DPPH (B) e conteúdo intracelular de MDA (C) de células *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de isoprotrurão no meio de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

Os valores da razão GSH/GSSG apresentados na fig. 4.9-A mostram que ocorreu um aumento significativo (p < 0,01) da capacidade antioxidante mediada pelo glutatióno em células crescidas nos meios restritivos YED (64,5 %) e YEP (14,7 %). Por outro lado, a exposição ao IPU induziu um aumento significativo (p < 0,01) do ambiente redutor intracelular em células crescidas em YEPD-IPU (147,2 %), YED-IPU (11,8 %) e YEP-IPU (147,3 %), relativamente aos seus controlos. Este facto leva-nos a considerar a hipótese de que a exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao fitofármaco contribui para potenciar a sua resposta antioxidante mediada pelo glutatióno (Dröge, 2002; Jones, 2002; Davis, 2001; Thannickal, 2000; Storey, 1996; Stohs, 1995; Hasspieler, 1994).

A partir da fig. 4.9-B pode-se constatar que a capacidade para capturar radicais livres, estimada pelo método do DPPH (Thaipong, 2006), não foi afectada em células crescidas na ausência de peptona mas diminuiu significativamente (p < 0,01) na ausência de glucose (48,8 %), meio restritivo sem IPU. No que diz respeito à resposta ao IPU observou-se um aumento significativo desta capacidade antioxidante em todos os meios testados, YEPD-IPU (2x), YED-IPU (2x) e YEP-IPU (3x).

A fig. 4.9-C que representa graficamente a variação do conteúdo intracelular de MDA em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD, YEP e YED, permite constatar, significativamente (p < 0,01), uma menor produção de danos celulares (Bonnes, 1992) quando crescem na ausência de glucose, meio YEP (53,1 %). Porém, na presença de



IPU observa-se um incremento significativo ($p < 0,01$) dos danos celulares quantificado pela presença de MDA em células crescidas em YEP-IPU (7x). Por outro lado, o seu decréscimo em células crescidas na ausência de peptona aponta para uma resposta adaptativa das *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao IPU em YED (33,2 %). É de notar que, na ausência de glucose observamos um aumento significativo, aparentemente inexplicável deste marcador de danos celulares, tendo em conta o aumento da capacidade antioxidante mediada pelo GSH e medida pelo DPPH. Uma interpretação para o facto pode estar relacionada com alterações metabólicas de produção de energia celular discutida na fig. 4.12. Apesar de resultados sobre o conteúdo em MDA serem escassos em *S. cerevisiae* em estado estacionário, os que são apresentados na fig. 4.12 corroboram com os descritos por Espindola (2003).

- C A T T e A

As catalases do tipo T e A apresentam uma distribuição ubíqua na natureza e desempenham papéis antioxidativos, eliminando o peróxido de hidrogénio ao convertê-lo em água e dióxigénio. Estes enzimas, sob o ponto de vista estrutural, são homotetrâmeros que possuem como grupo prostético o hemo, um núcleo protoporfirínico IX, capaz de estabelecer quatro ligações de coordenação com um átomo de ferro, uma estrutura que encontramos com alguma frequência na natureza. O local onde as catalases se podem encontrar em maior quantidade é no citoplasma e nos peroxissomas (Ahmad, 1995; Livingstone, 1992).

Os resultados obtidos com esses cálculos encontram-se representados graficamente na fig. 4.10-A, e como se pode observar, a resposta enzimática citoplasmática ao consumo de peróxido de hidrogénio diminuiu ($p < 0,01$) em células crescidas em meio YED (11,2 %) e aumentou ($p < 0,01$) em meio YEP (47,8 %), comparativamente ao seu controlo. Apesar de uma primeira apreciação destes resultados sugerir que a inibição do crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas na ausência de glucose, discutida na fig. 4.5 estaria a morrer por apoptose. No entanto, a estabilização do ambiente redutor intracelular, não confirma esta hipótese. A mesma figura mostra-nos que a presença de IPU no meio de cultura provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) na actividade enzimática CAT T, sendo o mais acentuado no meio YEP-IPU (95,6 %), seguido do meio YED-IPU (56,5 %) e do meio YEPD-IPU (55,9 %), em relação aos respectivos controlos. Este facto leva-nos a considerar a hipótese de que a CAT T que desempenha um papel crucial na resposta adaptativa de leveduras *S. cerevisiae* ao IPU, parece perder capacidade de resposta. (Lushchak, 2005; Skoneczny, 1988).

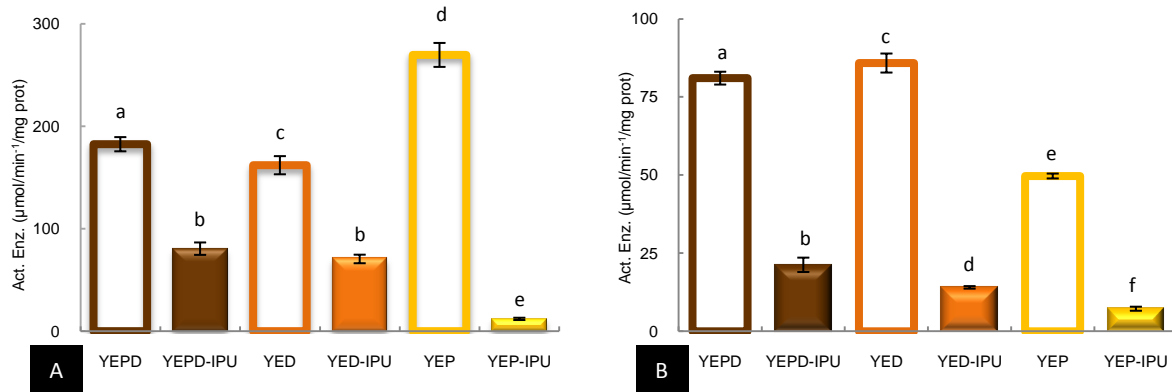
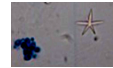


Figura 4.10 – Actividade enzimática CAT T (A) e CAT A (B) de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas na ausência e na presença de isotruturão no meio de cultura YEPD, YED e YEP. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Considerando a resposta peroxissomal em termos de eliminação de peróxido de hidrogénio, observamos na fig. 4.10-B um aumento significativo ($p < 0,01$) da CAT A em leveduras crescidas em meio YED (6,0 %), e um decréscimo quando crescidas em meio YEP (38,7 %). Porém, a presença de IPU em qualquer dos meios provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da CAT A em leveduras crescidas em meio YEPD (73,8 %), na ausência de peptona (83,7 %), e sem glucose (85,5 %), provavelmente, por ocorrer um decréscimo na formação de peróxidos ao nível do peroxissoma, devido ao abrandamento do metabolismo energético peroxissomal que assiste à β -oxidação mitocondrial (Todorova, 2007; Skoneczny, 1988) ou por inibição do grupo hemo da catalase pela fenilureia (Hartig, 1986).

- GR, GPx, G6PD

Alterações em actividades enzimáticas antioxidativas participantes, ou directamente ligadas ao ciclo de oxidação-redução constituem por vezes excelentes indicadores precoces da susceptibilidade celular ao *stress* oxidativo. Esta foi a razão pela qual, alguns enzimas, como GR, GPx, e G6PD, importantes na estabilização do ambiente redutor intracelular, foram escolhidos para analisar neste trabalho (Palace, 1993).

Geralmente, o enzima antioxidante GR é considerado como um dos melhores indicadores precoces da sensibilidade celular ao *stress* oxidativo, uma vez que, uma das suas principais funções é a reposição dos níveis de GSH (Cardoso, 2007; Song, 2006; Pinto, 1984 e 1985).

Os resultados obtidos para as actividades catalíticas GR, GPx e G6PD estão de acordo com os que encontramos referidos na literatura (Lushchak, 2005; Ohmori, 1999; Elskens, 1997).

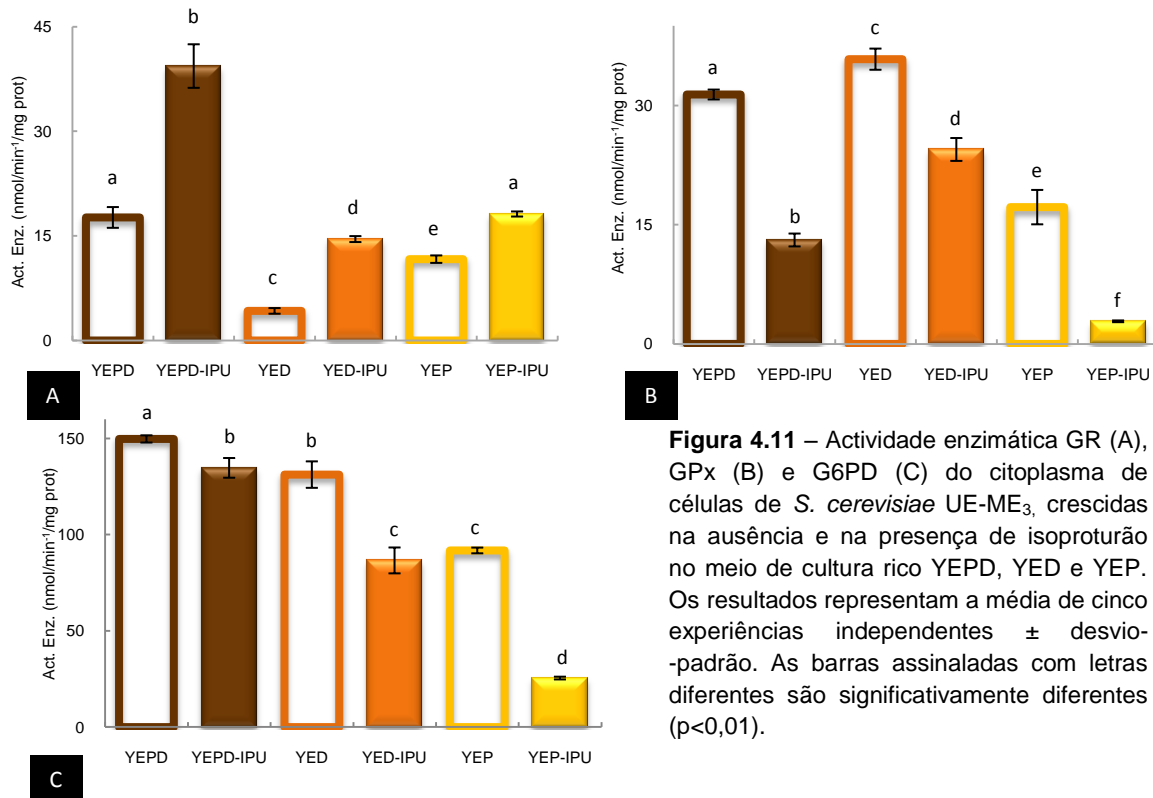
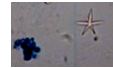
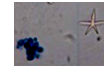


Figura 4.11 – Actividade enzimática GR (A), GPx (B) e G6PD (C) do citoplasma de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas na ausência e na presença de isoproturão no meio de cultura rico YEPD, YED e YEP. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01).

Ao analisar a fig. 4.11 (A), observa-se que a carência de fonte de azoto ou de carbono no meio de cultura provocou um decréscimo significativo (p<0,01) da actividade catalítica GR, YED (75,9 %) e YEP (33,9 %). Porém, a presença de IPU nos meios de cultura causou um efeito contrário, observando-se um aumento significativo (p<0,01) desta actividade enzimática, correlacionável com a estabilização do ambiente celular observada e discutida na fig. 4.10-A, ocorrendo um efeito mais acentuado na ausência de peptona (3x), uma resposta adaptativa ao xenobiótico.

Outro enzima antioxidante que funciona como indicador precoce da sensibilidade celular ao *stress* oxidativo é a GPx, uma seleno-proteína que participa na eliminação de peróxidos e lipoperóxidos do meio celular. A reacção catalisada pelo GPx envolve a redução do peróxido de hidrogénio e de outros peróxidos, utilizando o GSH como doador de equivalentes redutores (Flohé, 1997; Ahmad, 1995). *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência de peptona manifestaram um aumento significativo (p<0,01) da actividade GPx (14,2 %), contrariamente ao que foi observado em células crescidas com carência de glucose onde se determinou um decréscimo de 83,5 % (p<0,01), relativamente ao meio YEPD. Estes resultados são de ordem de grandeza semelhante à que encontramos descrita na literatura (Ohmori, 1999; Flohé, 1984). A presença de IPU em qualquer dos meios, YEPD-IPU, YED-IPU e YEP-IPU, provocou um decréscimo com significado estatístico (p<0,01) na actividade enzimática GPx, factor que pode ter contribuído para a perda de viabilidade celular (fig. 4.6) e de produção de biomassa (fig. 4.5-B) por células crescidas em



carência de glucose. A diminuição desta actividade catalítica foi mais acentuada em meio YEP-IPU (83,5 %) do que em meio YED-IPU onde ocorreu um decréscimo de 31,7 % ($p < 0,01$).

O enzima G6PD, descoberto por Warburg (1931) catalisa o primeiro passo da via das pentoses-fosfato, convertendo a glucose-6-fosfato em 6-fosfoglucono- δ -lactona, acoplada à produção de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, assistindo ao funcionamento do enzima GR (Lehninger, 1993; Voet, 1976).

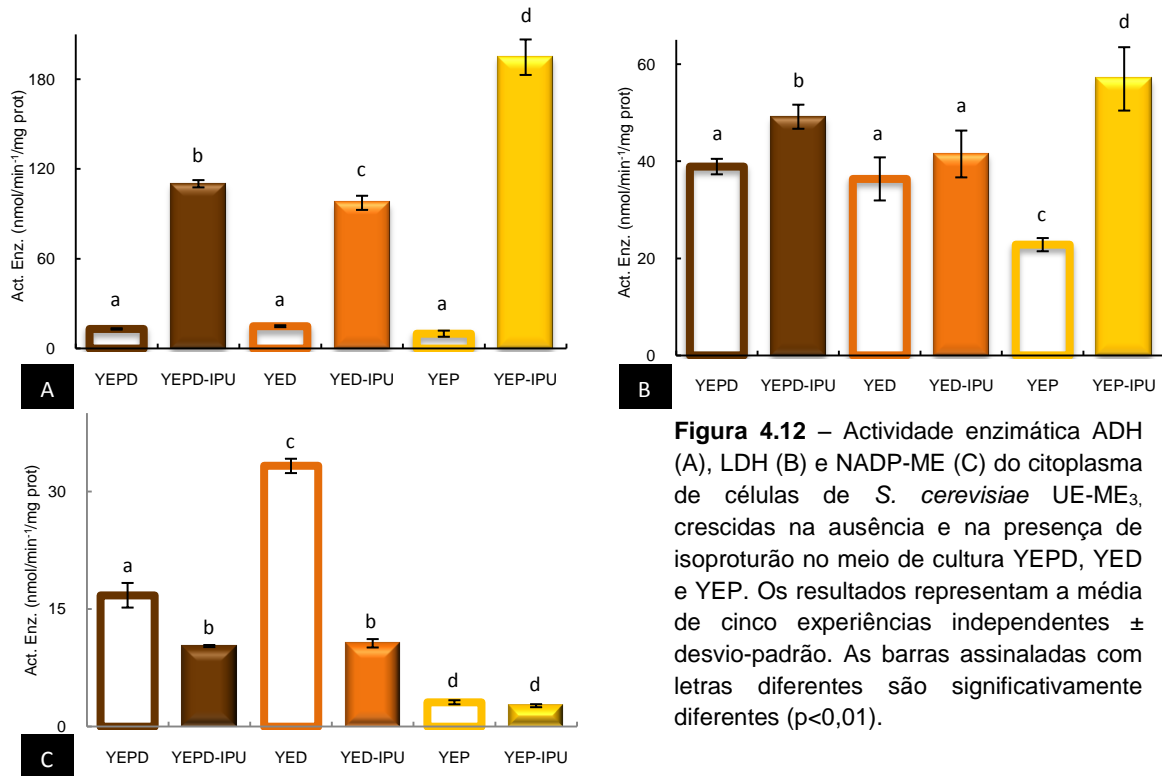
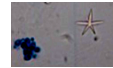
Os resultados apresentados na fig. 4.11-C revelam diagramaticamente um decréscimo significativo ($p < 0,01$) desta actividade enzimática em meios restritos em peptona (12,4 %) ou glucose (38,7 %). Embora a diminuição do conteúdo intracelular de NADPH por agentes físico-químicos exógenos possa deslocar o ambiente redutor intracelular para um estado mais oxidativo (Madigan, 2004), a variação observada não parece ser suficiente para bloquear as respostas antioxidativas mediadas pelo ciclo de oxidação-redução do glutathione, como referimos na leitura e discussão dos resultados da fig. 4.8. Mais uma vez, os valores de actividade enzimática obtidos estão de acordo com o que vem descrito na literatura (Cordier, 2007). De um modo geral, a presença de IPU em qualquer dos meios de cultura causou um decréscimo desta actividade catalítica, atingindo valores percentuais de 10,0 % no meio YEPD, de 34,0 % em meio restritivo sem peptona, e de 72,2 % em meio YEP.

4.1.3. Resposta bioenergética

- ADH, LDH, NADP-ME

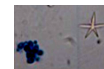
No seguimento da via glicolítica, o piruvato pode ser convertido em etanol por dois passos reaccionais, um que implica a sua descarboxilação com formação de acetaldeído pelo piruvato descarboxilase, seguido da redução do acetaldeído a etanol, numa reacção mediada pela álcool desidrogenase, um processo designado por fermentação alcoólica. Para além desse papel também contribui para a regeneração de NAD^+ utilizável a partir da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase que assegura os passos de formação de ATP da via glicolítica em condições anaeróbias (Stryer, 1988).

A fig. 4.12-A mostra que a actividade ADH de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meios restritivos YED e YEP é idêntica à determinada no meio completo YEPD. Contudo, a presença IPU em qualquer dos meios de cultura induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) desta actividade catalítica em qualquer dos meios aqui descritos, tendo ocorrido uma variação mais acentuada na ausência de glucose (19x), o que nos faz supor que o IPU acentua as condições metabólicas de fermentação alcoólica.



A actividade enzimática LDH (fig. 4.12-B) não sofreu alteração significativa ($p < 0,01$) quando *S. cerevisiae* cresceu em meio YE e meio restritivo com privação de peptona. No entanto, observou-se um decréscimo significativo desta actividade enzimática em meio restritivo sem glucose (41,3 %). A presença de IPU em meio completo YE e restrito em glucose reverteu a tendência para aerobiose, acentuando a fermentação láctica (26,4 % e 149,7 %, respectivamente).

Como se pode observar pela fig. 4.12-C, a actividade do NADP-ME em meio YED é superior à detectada em meio YE (98,6 %), enquanto que em meio YEP é inferior à do meio controle (81,5 %) ($p < 0,01$). Podemos especular que a resposta em meio carente de fonte de azoto está associada à metabolização de compostos azotados presentes no meio rico para a obtenção de aminoácidos. A presença de IPU contribuiu para um decréscimo significativo ($p < 0,01$) desta actividade enzimática, 38,7 % em meio YE, 68,1 % em meio YED e de 14,2 % em meio YEP, não sendo neste caso diferentes a nível significativo. Se admitir-se que o papel relevante do NADP-ME é gerar equivalentes redutores para a biossíntese *de novo* de resíduos acilo, o decréscimo desta actividade catalítica pode significar bloqueio da biossíntese de lípidos necessária à duplicação celular e consequentemente, inibição do crescimento celular. De facto, onde observamos a inibição de 68,1 % do NADP-ME de células crescidas no meio YED-IPU detectou-se menor produção de biomassa (fig. 4.5). Estes resultados apontam para a importância do NADP-ME na sobrevivência de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio restritivo sem glucose (Quintas, 2008; Stryer, 1988).



4.3. Exposição de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 ao IPU em meio MB

Para comparar o comportamento e efeito que o IPU provoca no crescimento da cultura de leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃, foram seleccionadas as estirpes IGC-4072 e IGC-3507 para realizar tal estudo comparativo, onde foram inoculadas duas culturas de leveduras *S. cerevisiae* de cada estirpe, na presença e na ausência de IPU, em meio MB, característico de ser constituído pelos nutrientes mínimos essenciais para que os microrganismos cresçam de modo nativo. Este meio também contém uma fonte de carbono, de glucose e outra de azoto, para além de diversos sais com elementos essenciais para o seu desenvolvimento, como magnésio, azoto, fósforo e enxofre (Tibayrenc, 2010; van Uden, 1967).

Assim, para acompanhar o crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 nos meios MB e MB-IPU, foram analisados vários parâmetros associados à sobrevivência celular, à resposta antioxidante, enzimática e não-enzimática, e à resposta bioenergética.

4.3.1. Sobrevivência celular

De igual modo como se procedeu anteriormente, também se contou as unidades formadoras de colónias, se analisou a turbidez a 640nm, e se determinou o peso seco das leveduras *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência e na presença de IPU, ao longo de 72h.

A aparência do meio de cultura MB é muito diferente do meio YEPD, que apresenta uma coloração amarela. Inicialmente, o meio MB é transparente, incolor e inodor. Após inoculação dos microrganismos em estudo, torna-se turvo, branco e opaco, cuja intensidade aumenta de acordo com o número de células de levedura que cresce nessas condições (fig. 4.13).

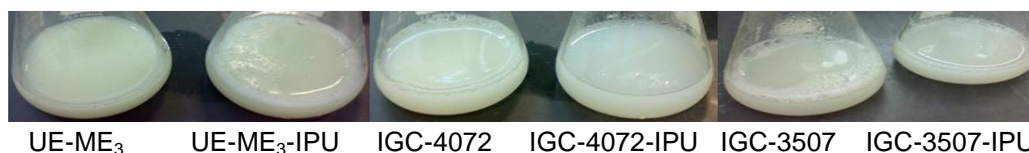
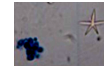


Figura 4.13 – Imagem fotográfica das culturas de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 após 72 h de cultura em meio MB, na presença de IPU (100 µM).

Como se pode observar pela fig. 4.13, existem diferenças evidentes entre o meio MB após inoculação. De um modo geral, parece que em todas as culturas inoculadas de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 em meio MB, cresceram na mesma proporção.



Porém, com o continuar da investigação, evidenciam-se diferenças no crescimento de cada estirpe de leveduras.

- Turbidez, peso seco

A avaliação da turbidez da cultura, um método indirecto de estimar a concentração celular, foi utilizada para acompanhar o crescimento da levedura ao longo do tempo a 640 nm. O perfil de crescimento em MB das estirpes de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507, fig. 4.14-A, mostrou-se semelhante, identificando-se as fases exponencial, até às 24 h, e estacionária, até ao final do período pré-estabelecido para o seu crescimento. Porém a estirpe IGC-3507 apresentou um crescimento mais débil. Na presença de isoproturão, a estirpe UE-ME₃ apresentou uma curva de crescimento sobreponível ao seu controlo, enquanto, as estirpes da colecção IGC mostraram um crescimento mais débil, o qual possibilitou o alargar da fase exponencial até às 48 h.

Por outro lado, a determinação do peso seco permitiu avaliar a quantidade de biomassa produzida em cada ensaio até final da cultura. Assim, na fig. 4.14-B representa-se a biomassa produzida pelas estirpes de *S. cerevisiae* em MB na ausência e na presença de IPU, observando-se que a quantidade produzida na ausência de IPU apenas é significativamente ($p < 0,01$) inferior na estirpe IGC-3507 (31,6 %). A presença de IPU no meio de cultura não afectou, significativamente ($p < 0,01$), este parâmetro na estirpe UE-ME₃, apesar de apresentar um incremento de 5,5 %. Contudo na estirpe IGC-4072 observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,01$) do peso, cerca de 41,3 %. Estes resultados alertaram para uma menor adaptação das estirpes IGC ao IPU comparativamente com a levedura UE-ME₃. Além do mais, seria de esperar que a IGC-3507 crescesse menos do que as outras leveduras pelo simples facto de ser mais sensível ao meio, mesmo quando cresce em meio pobre (Ribeiro, 2000).

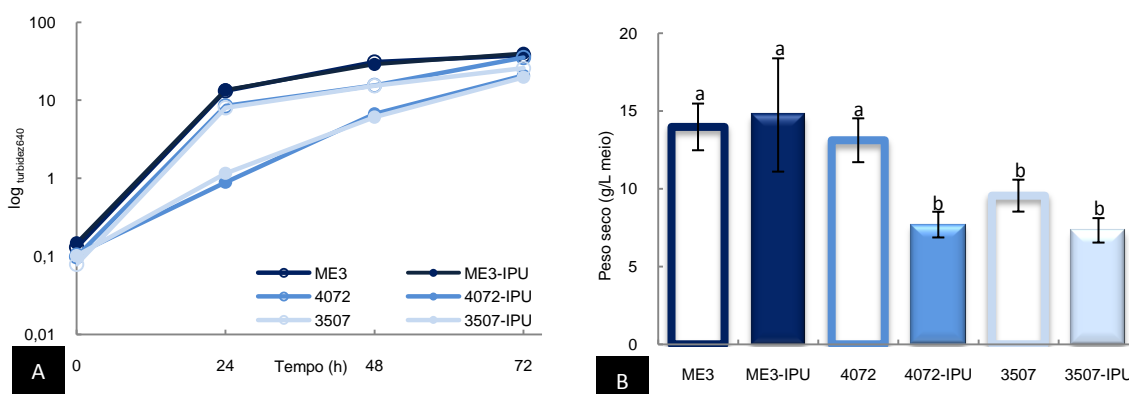
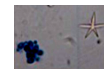


Figura 4.14 – Curvas de crescimento (A) e biomassa (B) da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 obtidas em meio MB na ausência e na presença de IPU. Os pontos assinalados representam a média de 5 experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).



- Viabilidade celular

A observação microscópica permitiu analisar a morfologia das células das estirpes de *S. cerevisiae*, UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 (fig. 4.15 (a)), revelando a preferência das pequenas células esféricas de UE-ME₃ para formar rosário, enquanto que, as células IGC-4072 apresentam maior dispersão e as células fusiformes de IGC-3507 formam pequenos aglomerados circulares. Em fase estacionária, 72 h de cultura, as células aparentam um maior volume e a formação de aglomerados circulares (fig. 4.15 (b)), a coloração de células inviáveis com azul de metileno (Ren, 2008) permitiu ainda observar o menor número de células viáveis presentes nas culturas das estirpes IGC-4072 e IGC-3507, bem como a sua perda de viabilidade em presença de IPU (fig. 4.15 (b)vs(c)). A fenilureia parece contribuir, nas três estirpes observadas, para uma desagregação das células em fase estacionária.

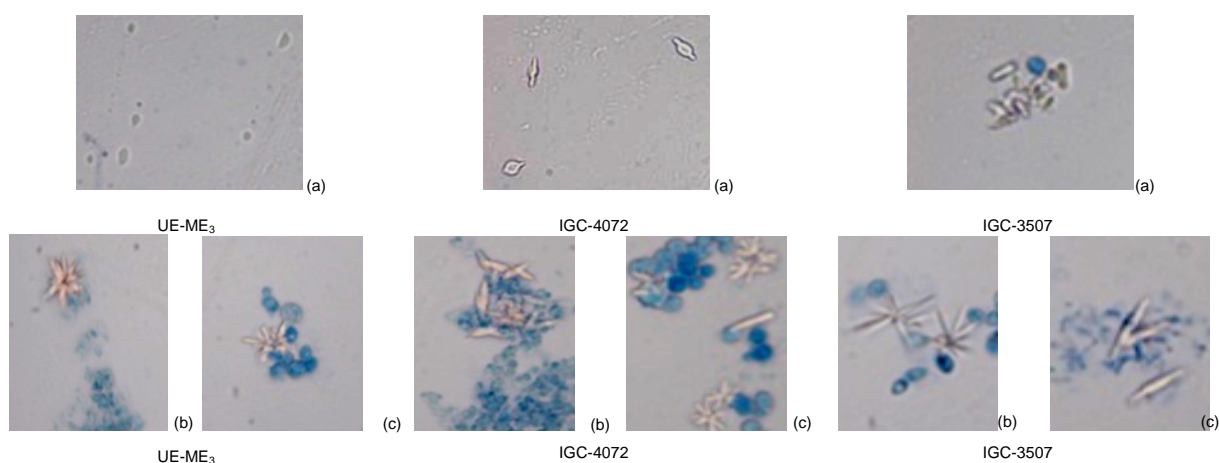
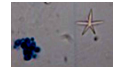


Figura 4.15 – Imagens de preparações de células coradas com azul de metileno, de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 em meio MB. No início da cultura (a) e após 72h na ausência (b) ou na presença de IPU (c). Digitalizadas por microscopia óptica, pelo programa Leica software Moduls, ampliação 40x.

- cfu

A quantificação de cfu (fig. 4.16), a diferentes intervalos de tempo ao longo de 72 h, da cultura de *S. cerevisiae*, UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507, em MB na ausência e na presença de IPU, fig. 4.17, permitiu observar que no início do ensaio, a quantidade de células viáveis presentes nas diferentes situações era idêntica. No entanto, ao longo do tempo, ocorre um aumento do número de células viáveis de UE-ME₃ na ausência e na presença de isoproturão. Este facto, observa-se logo às 24 h de cultura acentuando-se ao longo da cultura, porém, na presença desta fenilureia as estirpes IGC-4072 e IGC-3507 apresentam diminuição de viabilidade celular, o que pode estar relacionado com a adaptação de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao meio restritivo MB e à presença de IPU, já postulada anteriormente pela análise do número total de células, turbidez e peso seco.



cfu de <i>S. cerevisiae</i>	0h	48h	72h
UE-ME ₃			
UE-ME ₃ -IPU			
IGC-4072			
IGC-4072-IPU			
IGC-3507			
IGC-3507-IPU			

Factor de diluição: (a) 1:10¹; (b) 1:10⁴; (c) 1:10⁵; (d) 1:10⁷; (f) 1:10⁸.

Figura 4.16 – Unidades formadoras de colónias de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência ou na presença de IPU (100 µM) ao longo de 72h de cultura.

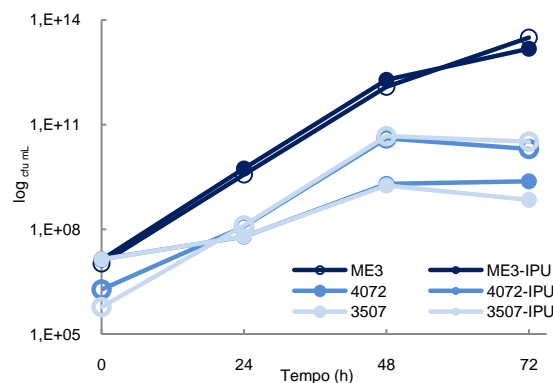
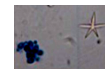


Figura 4.17 – Curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 obtidas em meio MB na ausência (situação controlo) e na presença de IPU. Os pontos assinalados representam a média dos resultados obtidos de 5 experiências independentes ± desvio-padrão.

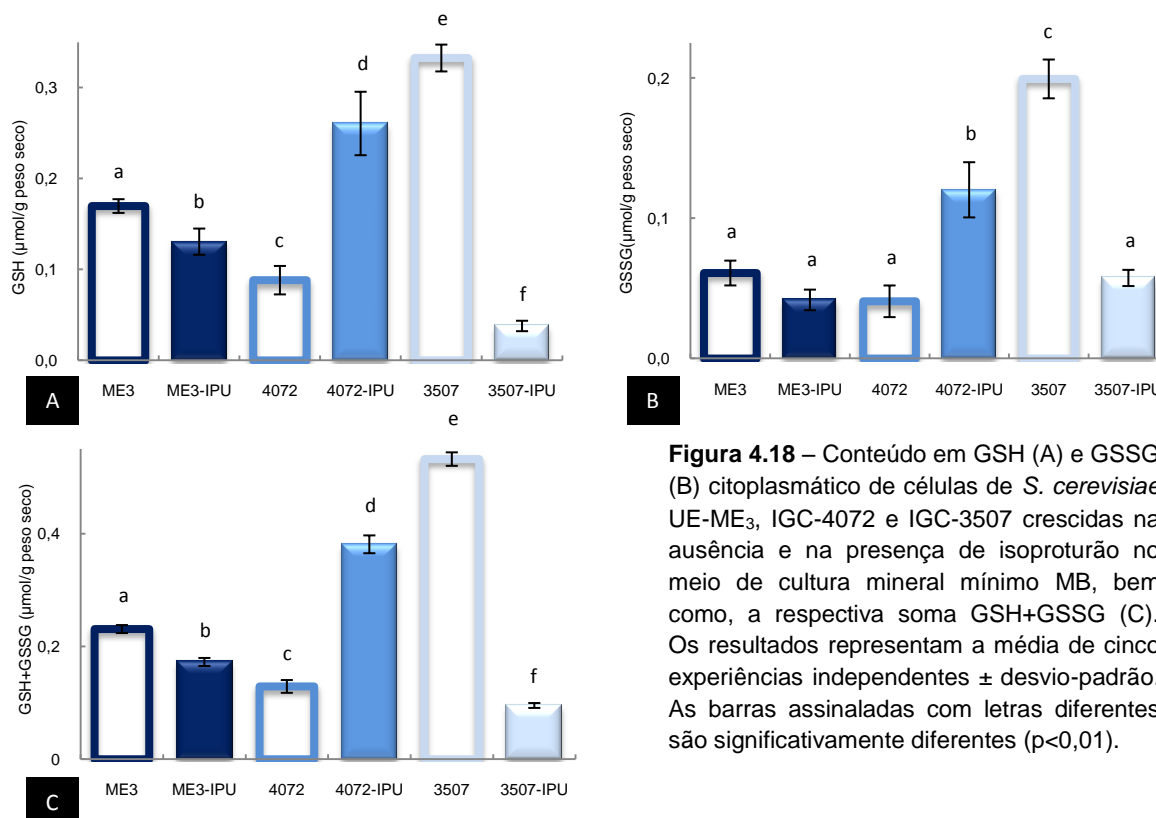
A sensibilidade de IGC-4072 e IGC-3507 a compostos orgânicos semelhante à determinada em peixes e outros modelos de toxicologia, tem vindo a apontar estas estirpes como uma alternativa ou, pelo menos, como modelo complementar em estudos de toxicidade (Estève, 2009; Ribeiro, 2000; Aguiar, 2000). Este facto realça a capacidade de UE-ME₃ de sobreviver em ambiente contendo IPU e a sua aplicabilidade em biorremediação.



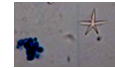
4.3.2. Resposta antioxidante e danos celulares

- GSH, GSSG, GSH+GSSG

No seguimento deste trabalho procurou-se comparar ao nível molecular a resposta ao IPU da estirpe nativa, vínica *S. cerevisiae* UE-ME₃ com outras duas estirpes descritas na literatura IGC-4072 e IGC-3507 (Ochoa-Estopier, 2010; Ribeiro, 2000; Aguiar, 2000). Como podemos observar na fig. 4.18-A, o conteúdo em glutatono da IGC-4072 não exposta ao IPU é inferior ao da UE-ME₃ (48 %), enquanto que, o da IGC-3507 é significativamente ($p < 0,01$) superior (95,9 %) ao da estirpe nativa. Todavia, o conteúdo em GSSG na ausência de IPU (fig. 4.18-B) da estirpe IGC-4072 não difere da UE-ME₃, embora o da IGC-3507 seja significativamente superior (3x). O padrão de concentração discutido anteriormente também se reflecte no conteúdo em tióis totais (fig. 4.18-C), onde o da IGC-4072 é significativamente inferior (44,1 %) ao da UE-ME₃ e o da IGC-3507 é significativamente superior (2x) ao da UE-ME₃. Face ao exposto pode-se esperar que a resposta antioxidante mediada pelo glutatono em *S. cerevisiae* UE-ME₃ seja superior ao da estirpe IGC-4072 e inferior à IGC-3507.



Contudo, a resposta ao IPU mostra um decréscimo significativo ($p < 0,01$) em GSH na UE-ME₃ (23,1 %), um aumento significativo na IGC-4072 (3x) e um decréscimo significativo na IGC-3507 (88,6 %), perfil acompanhado pelo conteúdo em tióis não-proteicos (fig.4.18, A e C). No entanto, o conteúdo em GSSG (fig.4.18, B) não varia na UE-ME₃ face ao controlo,



aumentou significativamente ($p < 0,01$) na IGC-4072 (3x) e no caso da IGC-3507 diminuiu significativamente ($p < 0,01$) para níveis próximos da UE-ME₃ (71,2 %), padrão de resposta que não influencia o conteúdo total de tióis não-proteicos.

- GSH/GSSG, DPPH

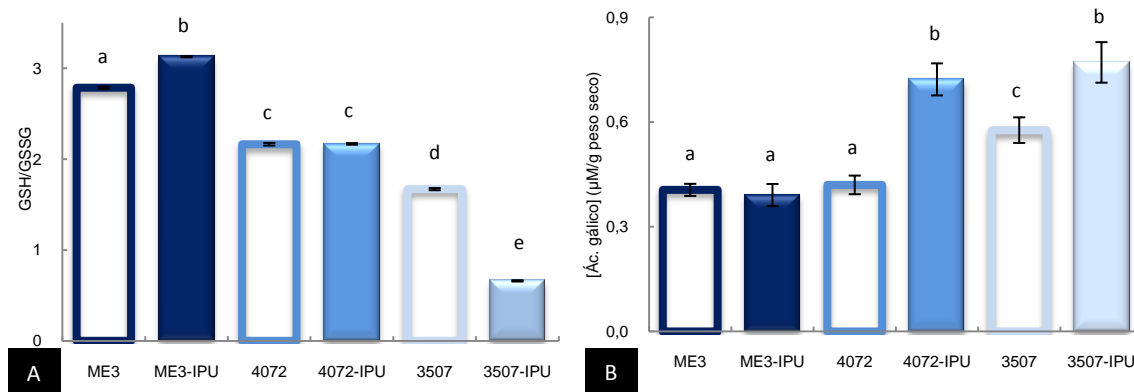
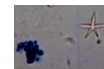


Figura 4.19 – Razão GSH/GSSG (A) e actividade antioxidante expressa em unidades de ácido gálico, DPPH (B) em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas na ausência e na presença de isoproturão em MB. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Uma observação mais pormenorizada mostrou que os valores da razão GSH/GSSG representados na fig. 4.19-A da estirpe UE-ME₃ são superiores ao da IGC-4072 (40,1 %) e ao da IGC-3507 (22,3 %), revelando que o ambiente redutor da UE-ME₃ foi melhor estabilizado pelo glutathione do que o das outras estirpes, condição que parece ser independente do conteúdo total de tióis não-proteicos da célula. Por outro lado, a resposta ao IPU em termos de conservação do ambiente redutor foi mais eficaz na estirpe UE-ME₃ que aumentou com significado estatístico ($p < 0,01$), relativamente ao seu controlo (12,2 %), enquanto que na estirpe IGC-3507 não se observou qualquer variação significativa e na IGC-4072 ocorreu um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da razão GSH/GSSG (60,5 %).

Por outro lado, a capacidade antioxidante determinada pelo método do DPPH (fig. 4.19-B) apresenta um valor superior na estirpe IGC-3507. Além do mais, a presença de IPU nos meios MB das estirpes IGC-4072 e IGC-3507 sofreu um incremento significativo ($p < 0,01$) desta resposta: 72,0 % e 33,6 %, respectivamente. Facto que sugere que as leveduras IGC mobilizam um mecanismo antioxidante alternativo, não dependente do glutathione, mas que não se mostrou suficientemente robusto para assegurar a sua sobrevivência ao IPU.

Em *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507, crescidas em meio MB não foi detectada a presença de MDA, o que nos leva a crer que a protecção antioxidante e a quantidade de células não permitiram gerar MDA detectável por este método (Ohkawa, 1979).



- CAT T

No meio MB, a actividade enzimática CAT T detectada em *S. cerevisiae* UE-ME₃ é significativamente ($p < 0,01$) superior (73,7-70,8 %) à detectada nas estirpes IGC-4072 e IGC-3507 (fig. 4.20). Em presença de IPU observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,01$) desta actividade enzimática, UE-ME₃ (73,0 %), IGC-4072 (100 %) e IGC-3507 (34,7 %). Um decréscimo tão acentuado da expressão funcional CAT T em presença de IPU, permite especular que o isoproturão poderá inibir este enzima ligando-se irreversivelmente ao seu centro catalítico, o grupo hemo, da mesma forma que o faz quando metabolizado por hemo-proteínas citocromo P450.

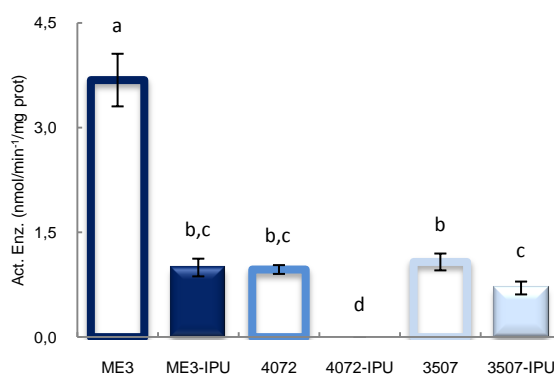


Figura 4.20 – Actividade enzimática CAT T de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas na ausência e na presença de isoproturão no meio de cultura MB. Os resultados representam a média de seis experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Acrescenta-se ainda que a actividade CAT A não foi detectada em qualquer das estirpes estudadas e crescidas em meio MB, provavelmente por as células não estarem a mobilizar componentes lipídicos do meio que necessitassem de serem encurtados no peroxissoma para sofrerem posteriormente β -oxidação mitocondrial e assim não ocorrer geração de ROS ao nível do peroxissoma que despoletasse esta actividade catalítica.

- GR, GPx, G6PD

No que diz respeito aos enzimas que asseguram o funcionamento do ciclo de oxidação do GSH, a fig. 4.21-A permite constatar que a actividade antioxidante GR da estirpe UE-ME₃ mostrou-se significativamente ($p < 0,01$) inferior (41,5-41,7 %) à actividade GR das outras duas estirpes. Contudo, em presença de IPU observou-se um aumento desta actividade catalítica na estirpe UE-ME₃ (2x), um decréscimo significativo nas IGC-3507 (14,5 %) e IGC-4072 (82,7 %), que atingiu valores muito baixos no último caso. O aumento de actividade enzimática GR na estirpe nativa pode estar associado com a estabilização do ambiente redutor, que acompanhado com o decréscimo de actividade CAT T em meio MB (fig. 4.20), indicia uma resposta adaptativa ao IPU.

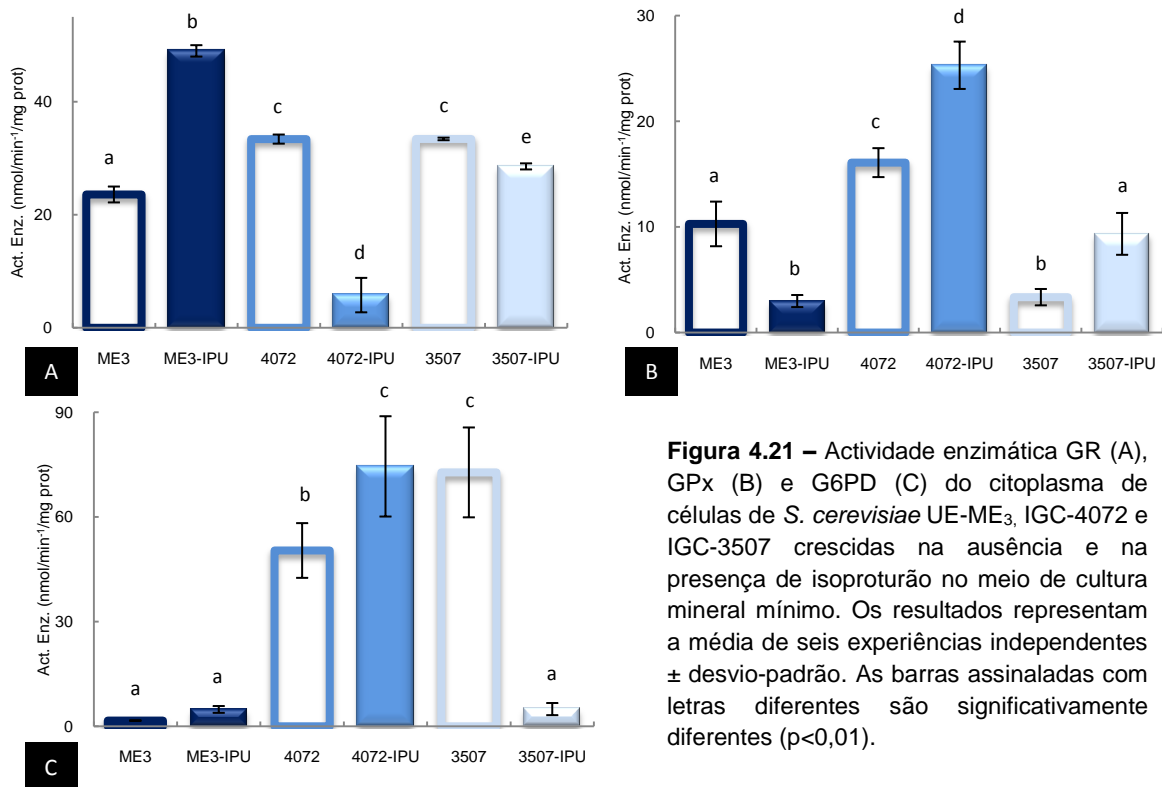
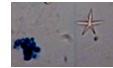
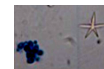


Figura 4.21 – Actividade enzimática GR (A), GPx (B) e G6PD (C) do citoplasma de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas na ausência e na presença de isoproturão no meio de cultura mineral mínimo. Os resultados representam a média de seis experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No que diz respeito à GPx de *S. cerevisiae* crescidas em meio MB (fig. 4.21-B), a estirpe UE-ME₃ revelou níveis de actividade significativamente ($p < 0,01$) superior na estirpe IGC-3507 e inferior ($p < 0,01$) na estirpe IGC-4072. Contudo, na presença de IPU a estirpe UE-ME₃ sofreu um decréscimo desta actividade enzimática, facto que se ajusta a alguma dificuldade na resposta ao *stress* oxidativo. Porém, as estirpes IGC-4072 e IGC-3507 na presença de IPU, apresentaram actividades enzimáticas significativamente superiores às obtidas na ausência da fenilureia, facto que pode relacionar-se com uma tentativa de resposta ao *stress* oxidativo que não foi alcançada pela GR, pois a actividade GPx é estatisticamente semelhante nas estirpes UE-ME₃-IPU e IGC-3507.

Por outro lado, *S. cerevisiae* UE-ME₃ quando crescidas em meio MB revelaram actividade G6PD muito baixa, sendo que na presença de IPU não ocorrem alterações estatisticamente significativas deste enzima nesta estirpe. Nas outras duas estirpes, os valores são significativamente ($p < 0,01$) superiores: cerca de 30x e 44x, respectivamente, em relação à estirpe nativa. A fig. 4.21-C mostra ainda que na presença de IPU ocorre um aumento desta actividade catalítica em células da estirpe IGC-4072 (93,2 %), contrariamente ao que aconteceu em células da estirpe IGC-3507 (47,9 %) onde ocorreu um decréscimo muito acentuado, contribuindo para o bloqueio do efeito tampão redox mediado pelo glutatióno.



4.3.3. Resposta bioenergética

- ADH e LDH

Quanto ao metabolismo energético, determinaram-se as actividades enzimáticas ADH, NADP-ME e LDH de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas na ausência e na presença de isoproturão em meio MB (fig. 4.22), e notou-se que nem todas elas expressavam funcionalmente estas enzimas activos. Apenas detectou-se actividade ADH em células de *S. cerevisiae* IGC-4072 e IGC-3507 em meio MB. Quanto à resposta ao IPU ocorreu um decréscimo da expressão funcional da ADH nessas estirpes, de 67,5 % na IGC-4072 e de 100 % na IGC-3507, resposta que sugere a inibição da reciclagem de NAD⁺ que assiste à via glicolítica e que pode justificar em parte a menor sobrevivência destas estirpes ao IPU em MB.

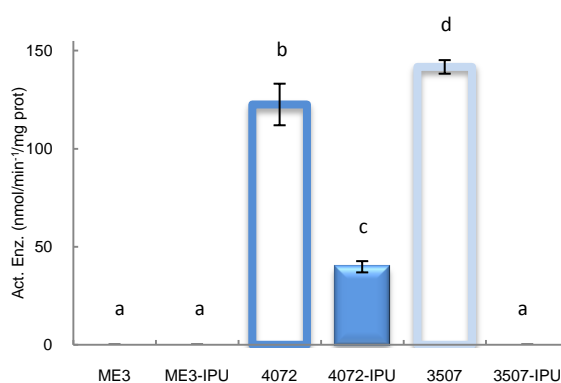
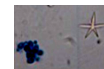


Figura 4.22 – Actividade enzimática ADH de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas na ausência e na presença de isoproturão no meio de cultura MB. Os resultados representam a média de seis experiências independentes \pm desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Surpreendentemente, não conseguimos determinar a actividade da LDH e da NADP-ME em qualquer das estirpes estudadas e crescidas em MB, facto que parece ser justificado pelos elevados níveis de tiamina no meio de cultura e que é descrito na literatura como inibidor desta actividade catalítica (Bataillon, 1996).

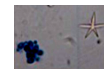


5. Conclusões

Este estudo teve como principal objectivo avaliar o efeito do IPU sobre a capacidade antioxidante e metabolismo energético da levedura vínica nativa *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ justificado pela necessidade que existe em encontrar microrganismos resistentes a fenilureias para ser utilizados em grande escala em processos de biorremediação.

Deste modo, no início deste trabalho, acompanhou-se o crescimento da *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD e MB. Os resultados mostram que o perfil de crescimento nos dois meios de cultura, medido pela turbidez, foi semelhante, enquanto que, o número de células viáveis mostrou-se superior em meio MB às 48 h e 72 h, momento em que terminou o ensaio. O aumento da viabilidade celular em meio MB na parte final da cultura pode em parte ser justificado por uma maior disponibilidade de fonte de carbono e menor concentração de toxinas devido ao menor número de células presentes na fase exponencial. Um desvio metabólico anaeróbio-aeróbio em MB sugerido pelo aumento da capacidade antioxidante expressa em termos de actividade GR, razão GSH/GSSG e capacidade para capturar radicais livres medida pelo método do DPPH, parece garantir a sobrevivência celular a nível energético, hipótese também apoiada pela ausência da expressão funcional de ADH, LDH, NADP-ME, CAT A e diminuição de danos celulares expresso pelo nível de MDA.

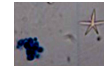
Na segunda parte do trabalho avaliou-se o crescimento da levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meios YEPD e restritivos YED e YEP ao longo de 72h. Os resultados obtidos mostram que o perfil de crescimento em meio YED foi idêntico ao observado em meio YEPD, enquanto que em meio YEP, ocorreu um perfil de crescimento mais ténue do que em YEPD, confirmado pela quantidade de biomassa produzida em cada meio. O conteúdo em GSH, GSSG e tióis não proteicos expresso pelo somatório GSH+GSSG em células crescidas nos meios restritivos YED e YEP apresentaram níveis superiores ao do meio YEPD, sugerindo que a carência de fonte de azoto ou de carbono induzem a biossíntese endógena de tióis não proteicos totais. Contudo, observou-se ainda um valor superior da GSH/GSSG em meio restritivos YED e YEP que potenciam a capacidade antioxidante mediada pelo glutathione. No entanto, a capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH não foi afectada na ausência de peptona mas decresceu na ausência de glucose. A extensão de danos celulares medida pelo nível de MDA citoplasmático também diminui em meio YEP, enquanto que a actividade enzimática CAT T decresceu em YEPD e aumentou em YEP. A ausência de peptona no meio de cultura potenciou a resposta pela CAT A, enquanto que essa actividade catalítica decresceu na ausência de glucose. Face ao exposto podemos colocar a hipótese de no meio YEP algumas células estarem a morrer por



apoptose, motivo pelo qual não se detectam danos celulares. O decréscimo da CAT A em meio YEP pode também ser justificado por um abrandamento do metabolismo lipídico no peroxissoma. A actividade antioxidante GR diminuiu quer em meio YED, quer em meio YEP, efeito diferente foi exercido sobre o GPx, outro enzima do ciclo do glutationo que aumentou em carência de peptona e diminuiu em carência de glucose. No que diz respeito ao enzima G6PD ocorreu um decréscimo de actividade nos dois meios restritivos. O abrandamento da resposta antioxidante pode estar relacionado com um desvio fermentativo-respiratório que as células crescidas em meios restritivos sofreram.

A actividade enzimática ADH mostrou-se idêntica em qualquer dos meios testados, enquanto que a actividade LDH foi idêntica nos meios YEPD e YED, mas diminuiu no meio YEP. Por outro lado, a actividade NADP-ME foi detectada num nível mais elevado em meio YED do que em YEPD, enquanto que em meio YEP observou-se o fenómeno inverso. Este conjunto de resultados sugere que na ausência de peptona ocorre uma indução da biossíntese de compostos azotados em YED a partir de outros precursores disponíveis no extracto de levedura.

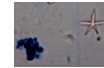
Na presença de IPU observou-se um surpreendente aumento do número de células viáveis em todos os meios testados, porém, a biomassa em YEPD não sofreu variação, mas decresceu em meio restritivo de peptona ou glucose, sendo mais acentuado nas células *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YED-IPU, facto que revela a importância da fonte de azoto para a sobrevivência desta estirpe em presença da fenilureia. As células *S. cerevisiae* UE-ME₃ expostas ao IPU revelaram um aumento da capacidade antioxidante mediada pelo glutationo e da capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH em qualquer dos meios testados. Determinou-se ainda um aumento do nível do MDA em células crescidas em meio YEP-IPU e um decréscimo deste parâmetro em meio YED-IPU, sugerindo que na ausência de glucose ocorreu um aumento de danos celulares induzido pelo IPU, enquanto que na ausência de peptona parece manifestar-se uma resposta adaptativa. No entanto a actividade CAT T diminuiu em qualquer dos meios onde o IPU esteve presente, permitindo inferir que as células *S. cerevisiae* UE-ME₃ deixam de morrer por apoptose como resposta à fenilureia. A expressão funcional do enzima CAT A diminuiu em qualquer dos meios estudados, provavelmente, devido a abrandamento do metabolismo lipídico peroxissomal que assiste à β -oxidação mitocondrial ou por efeito inibitório da fenilureia ou seus derivados sobre o grupo hemo do enzima. A actividade GR aumentou em todas as condições de ensaio sugerindo que este enzima desempenha um papel importante na resposta ao IPU em termo de estabilização do ambiente redutor mediado pelo glutationo, sendo o efeito mais acentuado na ausência de peptona. Todavia, a actividade GPx e G6PD diminuiram em qualquer dos meios testados, pelo que pode-se admitir que o GSH poderá estar a ser



consumido numa via de desintoxicação celular distinta da que leva à estabilização do ambiente redutor intracelular, e ainda, que o fornecimento de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assiste ao seu funcionamento pode ter uma origem metabólica distinta da via das pentoses fosfato. Finalmente, a actividade ADH e LDH sofreram um acréscimo significativo em qualquer dos meios testados na presença de IPU, enquanto que, a NADP-ME sofreu um decréscimo significativo. Este conjunto de resultados permite levantar a hipótese de que o IPU acentua a fermentação alcoólica e láctica, tendo em vista a reposição de NAD^+ que permite a activação glicolítica com formação de ATP. Ainda deve-se considerar o decréscimo do enzima NADP-ME como um bloqueio à biossíntese *de novo* de lípidos necessária à duplicação celular quando a fonte de azoto não está presente no meio de cultura. A activação da via glicolítica e o aumento da capacidade antioxidante discutidas anteriormente constituem a chave da sobrevivência ao IPU de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD, e com restrição de peptona ou de glucose destacando-se um papel relevante da peptona no meio de cultura.

Estes resultados destacam o papel da peptona no meio de cultura na resposta adaptativa de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao IPU.

No seguimento do trabalho procurou-se comparar a resposta de três estirpes de levedura ao IPU em meio MB. Os resultados experimentais mostram que as estirpes *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 apresentaram um perfil de crescimento idêntico, embora no último caso, um pouco mais débil que também produziu quantidade de biomassa inferior ao das outras duas estirpes às 72h de ensaio. Estes resultados coincidiram em parte com o número de células viáveis determinadas ao longo do tempo de cultura que se mostrou superior na cultura com UE-ME₃, não ocorrendo diferenças significativas no meio em que cresceram as outras duas estirpes. Análises morfológicas ao microscópio no início da cultura mostram que a estirpe UE-ME₃ exhibe forma esférica com preferência para formar rosário, enquanto que a IGC-4072 apresentou maior dispersão e a IGC-3507 exibiu uma forma fusiforme com tendência para formar agregados circulares. No final da cultura, 72 h, as células de qualquer das estirpes apresentaram maior volume e tendência para formar aglomerados circulares. A coloração com azul de metileno permitiu detectar menor número de células viáveis em leveduras da estirpe IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio mínimo. No que diz respeito ao conteúdo em GSH e tióis totais não proteicos, determinou-se nível mais elevado na estirpe IGC-3507 e inferior na estirpe IGC-4072 ao quantificado na estirpe UE-ME₃. No que diz respeito ao GSSG, o seu nível citoplasmático foi semelhante nas estirpes IGC-4072 e UE-ME₃, e superior na estirpe IGC-3507 ao detectado na nativa. Factos que podem levar a supor que a resposta mediada pelo glutatióno em UE-ME₃ a agentes de *stress* poderá ser superior à de IGC-4072 e inferior à IGC-3507. Contudo, a GSH/GSSG em UE-ME₃ mostrou-se superior às detectadas na IGC-4072 e IGC-3507, facto

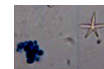


que sugere uma maior capacidade da estirpe nativa para estabilizar o ambiente redutor celular. Todavia, a capacidade para capturar radicais livres medida pelo DPPH apresentou-se superior na estirpe IGC-3507, facto que sugere a adopção por parte desta estirpe de um mecanismo antioxidante complementar de resposta às ROS. Em qualquer das estirpes crescidas em meio mínimo não foi possível detectar níveis mensuráveis de MDA, facto que indicia baixa ocorrência de danos celulares em qualquer das estirpes crescidas em MB. Em termos de resposta enzimática antioxidante observamos que a CAT T na estirpe UE-ME₃ é muito superior à detectada nas estirpes do IGC. No entanto a CAT A não foi detectada em qualquer das estirpes crescidas em meio mínimo, provavelmente, por ausência de substratos lipídicos no meio de cultura para sofrer modificação e seguir pela β-oxidação, facto que terá contribuído para um decréscimo do ROS peroxissomal. No que diz respeito à resposta enzimática que envolve o ciclo de oxidação-redução do glutathione observou-se que a actividade GR da estirpe UE-ME₃ em meio MB foi muito inferior ao das outras duas estirpes, o mesmo acontecendo com a actividade G6PD que assiste ao funcionamento do enzima GR. No entanto, a actividade GPx na estirpe UE-ME₃ mostrou-se superior à da estirpe IGC-3507 e inferior à da estirpe IGC-4072.

Em termos de metabolismo energético fermentativo as actividades LDH e NADP-ME não foram detectadas em qualquer das estirpes crescidas em meio MB, enquanto que ADH apenas se detectou nas estirpes IGC-4072 e IGC-3507. Estes factos sugerem uma inibição da capacidade de reciclagem de NAD⁺ que assiste à via glicolítica, com indução de um desvio metabólico para a via respiratória.

O facto de a actividade enzimática NADP-ME não ter sido detectada em qualquer das estirpes *S. cerevisiae* poderá dever-se à presença de níveis elevados de tiamina no meio de cultura, uma vez que é descrito na bibliografia consultada como inibidor desta actividade catalítica. Meios complementares de detecção *western-blotting* ou RT-PCR deverão ser utilizados no futuro para confirmar esta suposição.

Nos estudos com IPU observou-se uma sobreposição do perfil de crescimento das células UE-ME₃ com o seu controlo. Todavia, as estirpes do IGC apresentaram um crescimento mais débil com alargamento da fase exponencial até às 48h, resposta coerente com a quantidade de biomassa e de células viáveis produzidas às 72h de ensaio, onde não variaram na estirpe UE-ME₃ e decresceram nas estirpes do IGC. A análise morfológica ao microscópio mostrou também elevada perda de viabilidade pelas células IGC-4072 e IGC-3507, e aumento da desagregação celular em todas as estirpes testadas. No que diz respeito ao conteúdo em glutathione e tióis totais não-proteicos ocorreu um decréscimo nas estirpes UE-ME₃ e IGC-3507, mas um aumento na estirpe IGC-4072. Enquanto que, o conteúdo em GSSG não se alterou na estirpe nativa, e diminuiu na IGC-3507 e aumentou

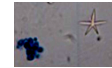


na IGC-4072. Contudo, apesar da disponibilidade em tióis totais terem diminuído na estirpe UE-ME₃ esta foi aquela que mostrou maior capacidade para estabilizar o ambiente redutor citoplasmático, uma vez que ocorreu um aumento da GSH/GSSG. Considerando a capacidade de sequestrar radicais livres medida pelo DPPH, foram as estirpes IGC que exibiram um aumento desta capacidade antioxidante, levando a supor-se que conseguem adoptar um mecanismo de resposta antioxidante complementar ao do glutatióno, mas que não pareceu ser suficientemente robusto por si só, para garantir a sobrevivência celular igual ou superior ao da UE-ME₃, mas que confere a protecção adequada para não aumentar os níveis de MDA citoplasmáticos.

Quanto à resposta enzimática antioxidante, podemos concluir que a expressão funcional do enzima CAT T decresceu nas leveduras testadas, facto que nos permite inferir o isoproturão como inibidor destes enzimas, por ser eventualmente capaz de ligar-se ao grupo hemo do centro activo, como poderá acontecer ao ser metabolizado por enzimas da família citocromo P450.

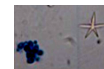
Relativamente aos enzimas envolvidos no ciclo do glutatióno, o enzima GR mostra um aumento de actividade na estirpe UE-ME₃ enquanto que nas estirpes do IGC ocorreu um decréscimo. Por outro lado, os níveis de actividade G6PD não variaram na estirpe UE-ME₃, embora tenham aumentado na estirpe IGC-4072 e diminuído na estirpe IGC-3507, neste último caso, esta resposta poderá bloquear a transferência de electrões ou a produção de equivalentes redutores que assistem ao funcionamento do ciclo. Contudo, podemos no entanto concluir que a actividade GR é o principal responsável pela estabilização do ambiente redutor e pela resposta adaptativa ao IPU em células UE-ME₃. Muito provavelmente, parte dos equivalentes redutores sob a forma GSH gerados poderá estar a ser consumida por reacções de conjugação, tendo em vista a eliminação ou metabolização do xenobiótico. Uma vez que no caso da estirpe nativa o decréscimo da actividade GPx aponta para a não ocorrência adicional de ROS durante a resposta ao IPU. A inibição da actividade ADH nas células IGC-4072 e IGC-3507 confirmam de novo uma inibição da reciclagem de NAD⁺ e da via glicolítica, cujo deslocamento fermentativo-respiratório pode justificar menor sobrevivência das estirpes IGC-4072 e IGC-3507 ao IPU em MB.

Face ao exposto podemos concluir que a *S. cerevisiae* UE-ME₃ responde adaptativamente ao isoproturão, protegida por uma resposta antioxidante maioritariamente mediada pelo glutatióno e pelo adequado suprimento energético assegurado pela via fermentativa. A resposta observada, manifestamente superior à de outras leveduras descritas na literatura como menos sensíveis a fitofármacos, torna recomendável a sua aplicação em biorremediação.

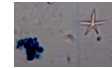


6. Referências bibliográficas

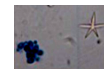
- AGRAWAL, O.; DAS, J.; GUPTA, V. (1998) - Spectrophotometric determination of isoproturon using *p*-aminoacetophenone and its application in environmental and biological samples, 46:501-505.
- AGUIAR, C.; LUCAS, C. (2000) – Yeasts Killer/Sensitivity Phenotypes and Halotolerance, *Food Technol. Biotechnol.*, 31(1):39-46.
- AHMAD, S. (1995) - Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. *in*: "Oxidative stress and antioxidant defenses in biology" (S.Ahmad, ed), Chapman & Hall, U.S.A., 238-265.
- ALARCO, A.; RAYMOND, M. (1998) - The bZip Transcription Factor Cap1p Is Involved in Multidrug Resistance and Oxidative Stress Response in *Candida albicans*, *Journal of Bacteriology*, 700–708.
- ALBERGHINA, L.; PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B. M. (1991) - Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 14:82-92.
- APEL, K.; HIRT, H. (2004) - REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373–99.
- ARNAUD, L.; TAILLANDIER, G.; KAOUADJI, M.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. (1994) - Photosynthesis inhibition by phenylureas: A QSAR approach, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 28:121–133.
- ARRIGO, A. (1999) - Gene expression and thiol redox state, *Free Radica. Biol. Med.*, 27, 936-944.
- ATLAS RM (2006) - Handbook of microbiological media for the examination of food, 2nd edn. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, 403.
- BATAILLON, M.; RICO, A.; SABLAYROLLES, J.; SALMON, J.; BARRE, P. (1996) - Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82:145-150.
- BEERS, R.; JR., SIZER, I. (1952) - A Spectrophotometric Method For Measuring The Breakdown Of Hydrogen Peroxide By Catalase, *J Biol Chem*, 195:133-140.
- BELO, I.; PINHEIRO, R.; MOTA, M. (2005) - Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air, *Journal of Biotechnology*, 115:397–404.
- BENDING, G.; LINCOLN, S.; SØRENSEN, S.; MORGAN, J.; AAMAND, J.; WALKER, A. (2003) - In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:827-834.
- BERGER, B. (1998) - Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms, *Pestic. Biochem. Phys.*, 60:71-82.
- BERGMEYER, H.; GRABL, M. (1983) – Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- BLOMBERG, A.; LARSSON, C.; GUSTAFSSON, L. (1988) - Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state. *J Bacteriol*, 170:4562-4568.
- BOLTE, M. (2004) - Environmental fate of pollutants: example of phenylurea pesticides, *Actual. Chim.*, 277-278:33-39.
- BONNES, T., GUÉRIN, T. (1992) - Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? *Biochemical Pharmacology*, Oxford, 44(5):985-988.
- BOY-MARCOTT, E.; PERROT, M.; BUSSEREAU, F.; BOUCHERIE, H.; JACQUET, M. (1998) - Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 180:1044-1052.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. (1995) - Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28:25–30.
- CANDEIAS, M.; ALVES-PEREIRA, I.; FERREIRA, R. (2010) – “*Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ is a good strain for isoproturon biorremediation?”, *Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products*, 199-203, Antonio Mendez-Vilas edition, World Scientific Publishing Co. Pte, Ltd, Singapore. (ISBN-13: 978-981-4322-10-2).
- CAO, J.; GUO, H.; ZHU, H.; JIANG, L.; YANG, H. (2008) - Effects of SOM, surfactant and pH on the sorption-desorption and mobility of prometryne in soils, *Chemosphere*, 70:2127–2134.
- CARDOSO, L.; FERREIRA, S.; HERMES-LIMA, M. (2007) - Reductive inactivation of yeast glutathione reductase by Fe(II) and NADPH, *Comparative Biochemistry and Physiology*.
- CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. (2001) - Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol.*, 175:450-457.
- CARVALHO, G.; BENTO, C.; SILVA, J. (2006) - Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1^o parte – As Leveduras, *Revista Analytica*, 25:36-45.



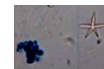
- CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEÃO, C. (1998) - Effects of Ethanol and Other Alkanols on Transport of Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 665–668.
- CORDIER, H.; MENDES, F.; VASCONCELOS, I.; FRANÇOIS, J. (2007) - A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production, *Metabolic Engineering*, 9:364–378.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. (2001) - Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 22:217-246.
- COTGREAVE, I.; GERDES, R. (1998) - Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242:1-9.
- DAVID, P.; POYTON, R. (2005) – Effects of transition from normoxia to anoxia on yeast cytochrome c oxidase and the mitochondrial respiratory chain Implications for hypoxic gene induction, *Biochimica et Biophysica*, 1709:169-180.
- DAVIS, W.; RONAI, Z.; TEW, K. (2001) - Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis, *Perspectives in Pharmacol.*, 296:1-6.
- Decreto de Lei nº300/2003 de 4 de Dezembro, Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, Diário da República 280, 8197-8200.
- DEWEZ, D.; DIDUR, O. (2008) - Vincent-He´roux, J.; Popovic, R. Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga, *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Pollut.*, 151:93–100.
- DOMSCH, K.; GAMS, W.; ANDERSON, T. (1980) - Compendium of soil fungi, vol. 1. Academic Press, London, United Kingdom.
- DRÖGE, W. (2002) - Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.*, 82:47-95.
- ELSKENS, M.; PENNINGCKX, M. (1997) - Thiram and Dimethyldithiocarbamic Acid Interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a Possible Metabolic Pathway under the Control of the Glutathione Redox Cycle, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7):2857–2862.
- ESPINDOLA, A.; GOMES, D.; PANEK, A.; ELEUTHERIO, E. (2003) - The role of glutathione in yeast dehydration tolerance, *Cryobiology*, 47:236–241.
- ESTÈVE, K.; POUPOT, C.; DABERT, P.; MIETTON-PEUCHOT, M.; MILISIC, V. (2009) – A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:1529-1534.
- EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL (2002) – Isoproturon, *Health & Consumer Protection Directorate-General*.
- FERREIRA, R.; ALVES-PEREIRA, I.; MAGRIÇO, S.; FERRAZ-FRANCO, C. (2007) - Different cellular behaviour and antioxidant response of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces chevalieri* growing in presence of ammonium metavanadate, *Rev. de Ciências Agrárias*, 30:1.
- 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*, vol 9. John Libbey Eurotext, Paris, 169–174.
- FLATTERY-O'BRIEN, J.; COLLINSON, L.; DAWES, I. (1993) - *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that of hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol*, 139:501-507.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. (1984) – Assay of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 105:114-121.
- FLOHÉ, L.; WINGENDER, E.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. (1997) - Regulation of glutathione peroxidases, *In: chapter 17*:415-439.
- FOURNIER, J.; CATROUX, G. (1980) - Use of strains of collected microorganisms for studies on pesticide biodegradability, *Chemosphere*, 9:33-38.
- GAYLARDE, C.; BELLINASSO, M.; MANFIO, G. (2005) - Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos, *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 34:36-43.
- GOLDBERG, D.; SPOONER, R. (1987) – Gluathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., 258-265, Bergmayer, VCH, New York.
- GOUNALAKI, N.; THIREOS, G. (1994) – Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response, *The EMBO Journal*, 13(17):4036-4041.
- GRAY, J.; PETSKO, G.; JOHNSTON, G.; RINGE, D.; SINGER, R.; WERNER-WASHBURNE, M. (2004) - “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 187–206.
- HARTIG, A.; RUIS, H. (1986) – Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T, *Eur. J. Biochem.*, 160:487-490.
- HASSPIELER, B.; BEHAR, J.; DI-GIULIO, R. (1994) - Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulous*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28:82-90.
- HATANAKA, A. (1975) – NADP-Dependent alcohol dehydrogenase from tea seeds, *Agr. Biol. Chem.*, 39(8):1677-1678.
- HISSIN; HILF (1976) - A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochemistry*, 74:214-226.



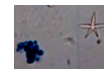
- HSU, R.; LARDY, H. (1969) - Malic enzyme, *Methods in Enzymology*, 13:230-235.
- JONES, D. (2002) - Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance, *Methods Enzymol.*, 348, 93-112.
- KHADRANI, A.; SEGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; VROUMSIA, T. (1999) – Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil, *Chemosphere*, 38(13):3041-3050.
- KNAUERT, S.; ESCHER, B.; SINGER, H.; HOLLENDER, J.; KNAUER, K. (2007) - Mixture Toxicity of Three Photosystem II Inhibitors (Atrazine, Isoproturon, and Diuron) Toward Photosynthesis of Freshwater Phytoplankton Studied in Outdoor Mesocosms *Environ. Sci. Technol.*, 15.
- KURTZ, S.; ROSSI, J.; PETKO, L.; LINDQUIST, S. (1986) - An ancient developmental induction: heat shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science*, 231:1154-1157.
- LAGES, F.; LUCAS, C. (1997) – Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica*, 1322:8-18.
- LALIT, C.; KUMAR, M.; BHOLA, P.; SUDHIR, G.; SHRAWAN, G. (2007) - Cytogenetic Effects of Commercial Formulations of Deltamethrin and/or Isoproturon on Human Peripheral Lymphocytes and Mouse Bone Marrow Cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48:636-643.
- LARSSON, A. (1983) - *Functions of glutathione*, Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. New York: Raven.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. (1993) – Principles of Biochemistry, 2ªEd, Worth Publishers, New York.
- LEWIS, J.; LEARMONTH, R.; WATSON, K. (1995) - Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 141:687-694.
- LIVINGSTONE, D.R.; LIPS, F.; GARCIA MARTINEZ, P.; PIPE, R.K. (1992) - Antioxidant enzymes in the digestive glands of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 112:265-276.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. (1951) – Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUDOVICO, P.; SOUSA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C.; CÔRTE-REAL, M. (2001) – *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid, *Microbiology*, 147:2409-2415.
- LUDWIG, K.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. (2001) - Quantificação da Flocculação, 21:1.
- LUSHCHAK, V. (2006) – Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes, *Acta Biochimica Polonica*, 4:679-684.
- LUSHCHAK, V.; GOSPODARYOV, D. (2005) - Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biology International*, 29:187-192.
- MA, J. (2002) - Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68:275–281.
- MADIGAN; MARTINKO; PARKER (2004) – Microbiologia de Brock, 10ª ed., EDITORA, São Paulo.
- MAGER, W.; DE KRUIFTT, A. (1995) - Stress induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*, 59:506-531.
- MARXEN, K.; VANSELOW, K.; LIPPMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. (2007) - Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements, *Sensors*, 7:2080-2095.
- MEISTER, A. (1950) – Reduction of α,γ -diketo and α -keto acids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 184:117.
- MITCHEL, R.; MORRISON, D. (1982) - Heat-shock induction of ionizing radiation resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, and correlation with stationary growth phase, *Radiat Res*, 90:284-291.
- MONARREZ, M.; BENOIT, P.; BARRIUSO, E.; REAL, B.; DUTERTRE, A.; M. MOQUET, M. (2007) - Retención de plaguicidas en zonas amortiguadoras. Caso del isoproturon, *Ing. invest. y tecnol.*, México, 8:1.
- MORAES, L.; TORRES, F. (2007) - Proteínas recombinantes produzidas em leveduras, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 20-23.
- MORGANJONES, G.; BURCH, K. (1988) - Studies in genus *Phoma*. 10. Concerning *Phoma eupyrena*, an ubiquitous, soil-borne species, *Mycotaxon*, 31:427-434.
- MOSS, R. (1955) – Methods in Enzymology, V.I-II, Academic Press, New York, 232,141.
- O’NEIL, M. (1996) – The Index Merck, Ed.12, Merck & Co. INC, White Station, New Jersey.
- OCHOA-ESTOPIER, A.; LESAGE, J.; GORRET, N.; GUILLOUET, S. (2010) – Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol, *Bioresource Technology*, xxx:xxx-xxx.
- ÖHGREN, K.; BENGSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. (2006) - Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400, *Journal of Biotechnology*, 126(4):448-498.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. (1979) - Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 95(2):351–358.



- OHMORI, S.; NAWATA, Y.; KIYONO, K.; MURATA, H.; TSUBOI, S.; IKEDA, M.; AKAGI, R.; MOROHASHI, K.; ONO, B. (1999) - *Saccharomyces cerevisiae* cultured under aerobic and anaerobic conditions: air-level oxygen stress and protection against stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472:587-594.
- OTTERSTEDT, K.; LARSSON, C.; BILL, R.; STAHLBERG, R.; BOLES, R.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. (2004) - Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO reports*, 5:5.
- PADUA, E.; OLIVEIRA, A.; SGARBIERI, V. (2000) - Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces* sp.) como fonte de fibra na alimentação. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20(2):233-239.
- PALACE, V.P.; KLAVERKAMP, J. (1993) - Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater from Precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C(1):147-154.
- 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, *Enzyme and Microbial Technology*, 26:737-742.
- PIEUCHOT, M.; PERRIN-GANIER, C.; PORTAL, J.-M.; SCHIAVON, M. (1999) - Study on the mineralization and degradation of isoproturon in three soils, *Chemosphere*, v 33, 3, 467-478.
- PINTO, M.C., MATA, A.M., LOPEZ-BAREA, J. (1984) - Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 228, 1-12.
- PINTO, M.C., MATA, A.M., LOPEZ-BAREA, J. (1985) - The redox interconversion mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase, *Eur. J. Biochem.*, 151, 275-281.
- PONCE, R.; SENAS, J. (1982) - Experiments with isoproturon for the control of weeds in winter cereal crops, *Weed Research*, V 23, 1, 39 - 43.
- POSTMA (1989) - Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol.*, 55, 468.
- QUINTAS, C.; LIMA-COSTA, E.; LOUREIRO-DIAS, M. (2000) - The Effect of Ethanol on the Plasma Membrane Permeability of Spoilage Yeasts, *Food technol. Biotechnol.*, 38(1):47-51.
- QUINTAS, A.; FREIRE, A.; HALPERN, M. (2008) - Matriz Estrutural dos Sistemas Biológicos, in *Bioquímica Organização molecular da vida*, LIDEL, 3, 121-138.
- REN, Y.; DONALD, A.; ZHANG, Z. (2008) - Investigation of the Morphology, Viability and Mechanical Properties of Yeast Cells in Environmental SEM, *Scannig*, 30:435-442.
- RIBEIRO, I.; VERÍSSIMO, I.; MONIZ, L.; CARDOSO, H.; SOUSA, M.; SOARES, A.; LEÃO, C. (2000) - Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid, *Chemosphere*, 41(1):1637-1642.
- ROMANO, M.; CERRA, M. (1969) - The action of crystalline lactate dehydrogenase from rabbit muscle on glyoxylate, *Biochim, Biophys. Acta* 177, 421.
- RØNHEDE, S.; JENSEN, B.; ROSENDAHL, S.; KRAGELUND, B.; JUHLER, R.; AAMAND, J. (2005) - Hydroxylation of the Herbicide Isoproturon by Fungi Isolated from Agricultural Soil, *Appl Environ Microbiol.*, 71(12): 7927-7932.
- 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.; HAMILTON, B. (1995) - *Regulation of yeast catalase genes*. In: *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. CSH Press: 153-172.
- SCHERENS, B.; GOFFEAU, A. (2004) - The uses of genome-wide yeast mutant collections, *Genome Biology*, 5(7):229.
- SCHROEDER, C. (1996) - Glutathione and drug resistance, *Cancer Invest.*, 14:158-168.
- SEBAI, T.; LAGACHERIE, B.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. (2004) - Isolation and characterisation of an isoproturon-mineralising *Methylophila* sp. TES from French agricultural soil, *FEMS Microbiol. Lett.*, 239:103-110
- SGARBIERI, V. (1999) - Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos, *Brazilian Journal of food technology*, 17.
- SHARMA, M.; KUMARI, V.; SUBRAHMANYAM, M. (2008) - Photocatalytic degradation of isoproturon herbicide over TiO₂/Al-MCM-41 composite systems using solar light, *Chemosphere*, 72(4):644-651.
- SIES, H. (1999) - Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radical Biology & Medicine*, 27:916-921.
- SINGH, S.; KIRKWOOD, R.C.; MARSHALL, G. (1997) - Effects of isoproturon on photosynthesis in susceptible and resistant biotypes of *Phalaris minor* and wheat, *Weed Research*, 37(5):315-324(10).
- SKONECZNY, M.; CHELSTOWSKA, A.; RYTKA, J. (1988) - Study of the coinduction by fatty acids of catalase A and acyl-CoA oxidase in standard and mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Eur. J. Biochem.*, 174:297-302.
- SOARES, D.; ANDREAZZA, A.; SALVADOR, M. (2005) - Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1):95-100.



- 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 Yeast, *EUKARYOTIC CELL*, 5(11):1857–1865.
- SØRENSEN, S.; BENDING, G.; JACOBSEN, C.; WALKER, A.; AAMAND, J. (2003) - Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45:1-11.
- SØRENSEN, S.; RONEN, Z.; AAMAND, J. (2001) - Isolation from Agricultural Soil and Characterization of a *Sphingomonas* sp. Able To Mineralize the Phenylurea Herbicide Isoproturon, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12):5403–5409.
- SPLIID, N.; KØPPEN, B. (1998) - Occurrence of pesticides in Danish shallow ground water, *Chemosphere*, 37:1307-1316.
- STARKE, P.E., FARBER, J.L. (1985) - Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, 260:86–92.
- STOHS, S.J. (1995) - The role of free radical in toxicity and disease, *Physiology and Pharmacology*, 6(3-4):205-228.
- STOREY, K.B. (1996) - Oxidative stress: animal adaptations in nature, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1715-1733.
- STRYER, L. (1988) – Biochemistry, Freeman, 3ªEd., International Student Edition, 488.
- SUGIMOTO, Y.; OTHA, Y.; MORIKAWA, T.; YAMASHITA, T.; YOSHIDA, M.; TAMAOKI, B. (1990) – *In vitro* metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*), *J. Steroid Biochem.*, 35:271-279.
- SUSEK, R.; LINDQUIST, S. (1990) - Transcriptional derepression of the *Saccharomyces cerevisiae* HSP26 gene during heat shock. *Mol Cell Biol*, 10:6362-6373.
- SZABO, M.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. (2007) - Improved DPPH Determination for Antioxidant Activity Spectrophotometric Assay. *Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences*, 61, 3:214–216.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. (2006) - Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675.
- THANNICKAL, V.; FANBURG, B. (2000) - Reactive oxygen species in cell signalling, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279:1005-1028.
- THIERRY, G.; FEURTET-MAZEL, A.; ALAIN, B.; FRANCIS, R. (1997) - Role of temperature on isoproturon bioaccumulation and effects on two freshwater rooted macrophytes: *Elodea densa* and *Ludwigia natans*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36:205–212.
- THOMAS, J.; SKALSKE, J.; CLINE, J. (1986) - Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays, *Environ. Toxicol. Chem.*, 5:487–501.
- THORN, R.; REDDY, C.; HARRIS, D.; PAUL, E. (1996) - Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4288-4292.
- TIBAYRENC, P.; PREZIOSI-BELLOY, L.; ROGER, J.; GHOMMIDH, C. (2010) – Assessing yeast viability from cell size measurements?, *Journal of Biotechnology*, 149:74-80.
- TODOROVA, D.; NEDEVA, D.; ABRASHEV, R.; TSEKOVA, K. (2007) - Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B 77, *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- TOONE, W.; JONES, N. (1998) - Stress-activated signalling pathways in yeast, *Genes to Cells*, 3:485–498.
- TOP, E.; SPRINGAEL, D. (2003) - The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds, *Curr Opin Biotechnol*, 14(3):262-9.
- TREBST, A. (1987) - The 3-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 42,742–750.
- TURNBULL, G.; CULLINGTON, J.; WALKER, A.; MORGAN, A. (2001) - Identification and characterisation of a diuron-degrading bacterium, *Biol. Fertil. Soils*, 33:472-476.
- TURTON, H.; DAWES, I.; GRANT, C. (1997) - *Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a yAP-1-Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde, *Journal of Bacteriology*, 1096–1101.
- VAN UDEN, N. (1967) – Transport-Limited Fermentation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and Its Competitive Inhibition, *Aechiv für Mikrobiologie*, 28:155-168.
- VIDALI, M. (2001) - Bioremediation. An overview, *Pure Appl. Chem.*, 73(7):1163–1172.
- VIEGAS, C.; CABRAL, G.; TEIXEIRA, M.; NEUMANN, G.; HEIPIEPER, H.; SÁ-CORREIA, I. (2005) - Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330:271–278.
- VIEGAS, C.; ROSA, M.; CORREIA, I.; NOVAIS, J. (1989) – Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1):21–28.
- VINA, J. (1990) - *Glutathione: metabolism and physiological functions*, Boca Raton: CRC Press.
- VOET, D.; VOET, J. (1976) – Biochemistry, 2ªEd, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- VOGEL, T. (1996) - Bioaugmentation as a soil bioremediation approach, *Curr Opin Biotechnol*, 7(3):311-6.



- WALTHER, U., CZERMAK, A., MUCKTER, H., WALTHER, S., FICHTL, B. (2003) - Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines, *Arch. Toxicol.*, 77:131–137.
- WIDADA, J.; NOJIRI, H.; OMORI, T. (2002) - Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(1-2):45-59.
- WIESER, R.; ADAM, G.; WAGNER, A.; SCHULLER, C.; MARCHLER, G.; RUIS, H.; KRAWIEC, Z.; BILINSKI, T. (1991) - Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 266: 132406-12411.
- WILLIAMS, A., FORD, W., (2004) - Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm, *Biol. Reprod.*, 71:1309–1316.
- WYNN, J.; RATLEDGE, C. (1997) – Malic enzyme is a major source of NADPH for lipid accumulation by *Aspergillus nidulans*, *Microbiology*, 143:253-257.
- YIN, X.; JIANG, L.; SONG, N.; YANG, H. (2008) - Toxic Reactivity of Wheat (*Triticum aestivum*) Plants to Herbicide Isoproturon, *J. Agric. Food Chem.*, 5:4825–4831.

ANEXO

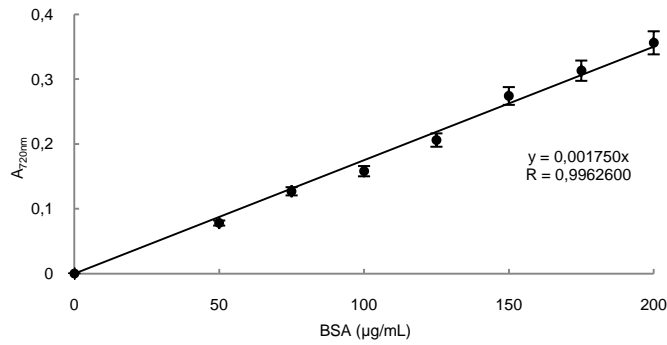


Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, pelo método de Lowry, construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (50-200 µg/mL).

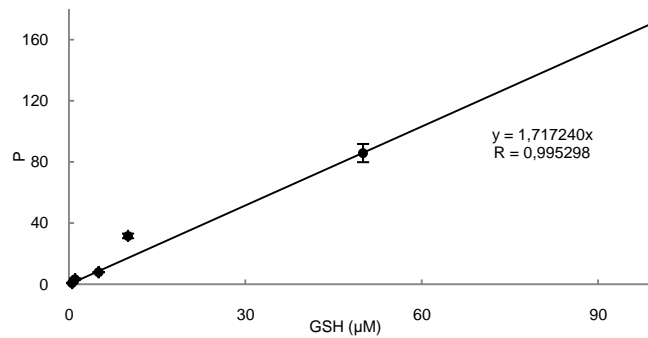


Figura A2 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do glutatono, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão GSH (0,5–100 µM).

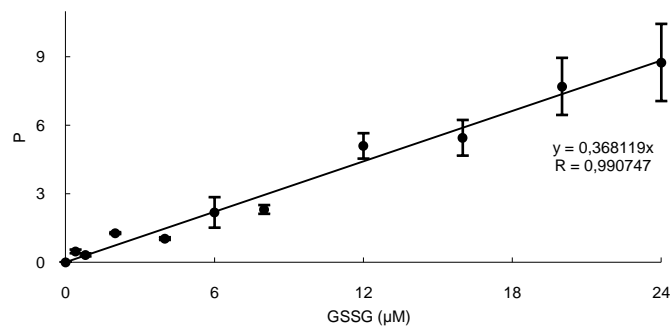


Figura A3 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do dissulfureto de glutatono, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão GSSG (0,08-24 µM).

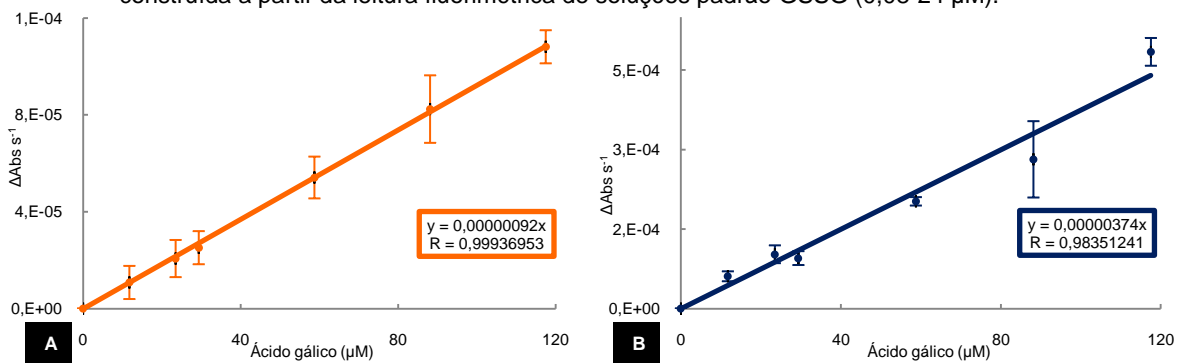


Figura A4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do DPPH, construída a partir da leitura espectrométrica de soluções padrão de ácido gálico (12-118 µM) para células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência e na presença de IPU (100 µM) no meio de cultura (A); e para células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência e na presença de IPU (100 µM) (B).

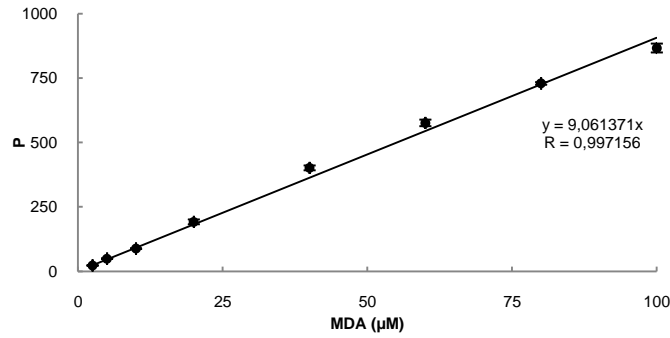


Figura A5 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do malonaldeído, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão MDA (2,5–100 µM).

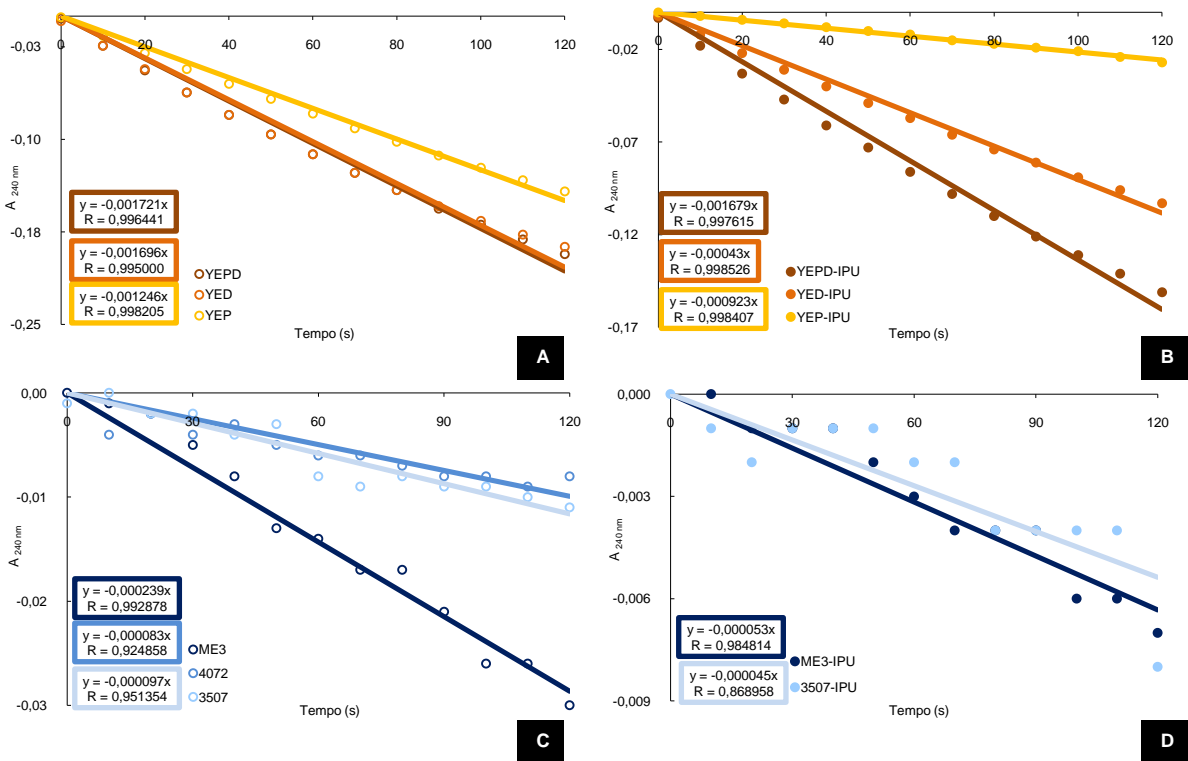


Figura A6 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática CAT T de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B); e de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência (C) e na presença de IPU (100 µM) (D).

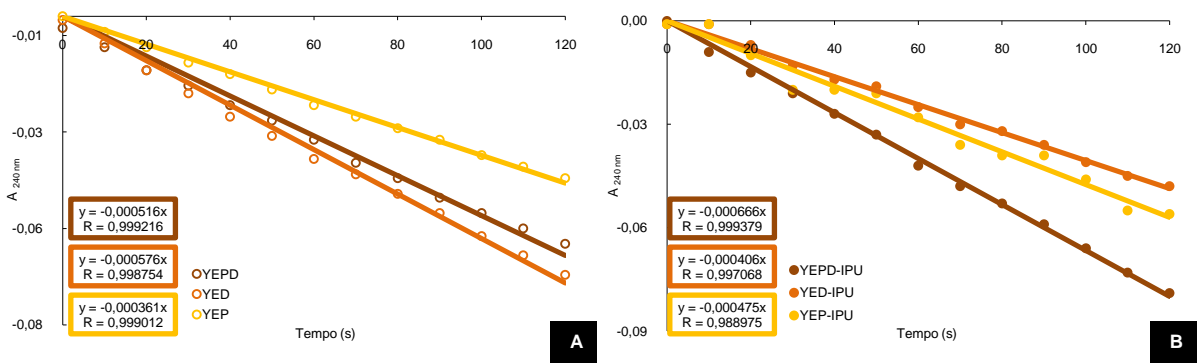


Figura A7 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática CAT A do citoplasma de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B).

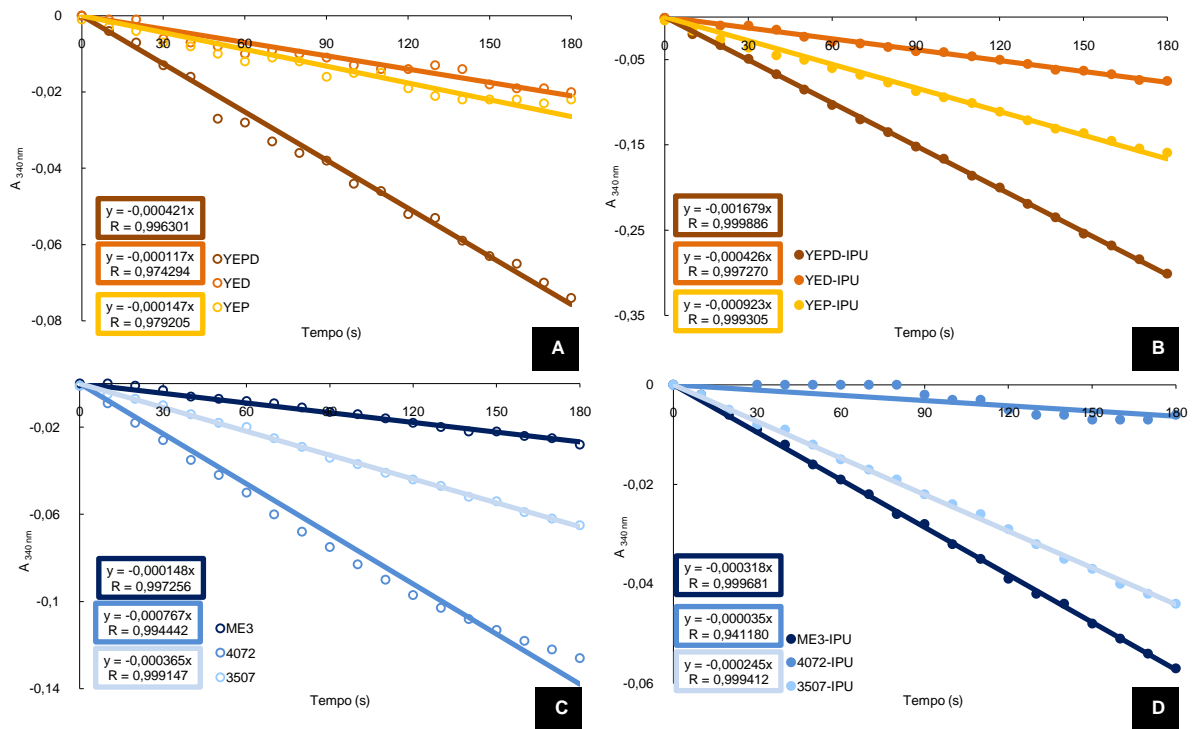


Figura A8 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática GR na fracção pós 12000 g de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B); e de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência (C) e na presença de IPU (100 µM) (D).

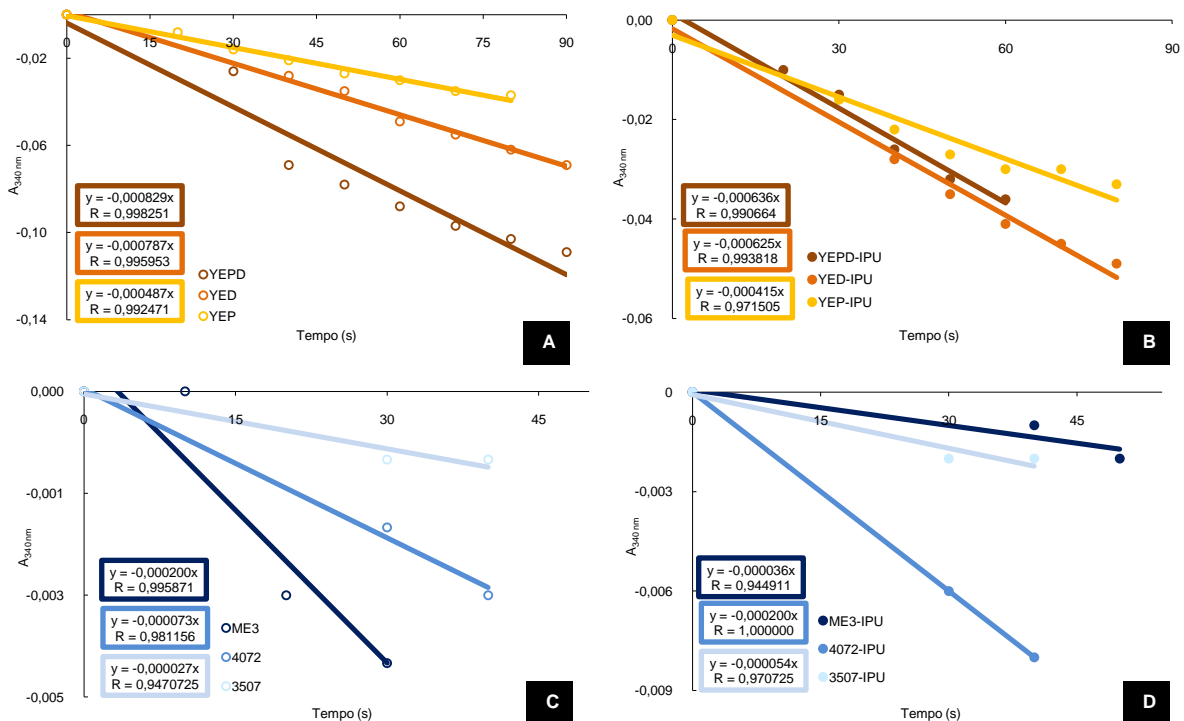


Figura A9 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática GPx do citoplasma de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B); e de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência (C) e na presença de IPU (100 µM) (D).

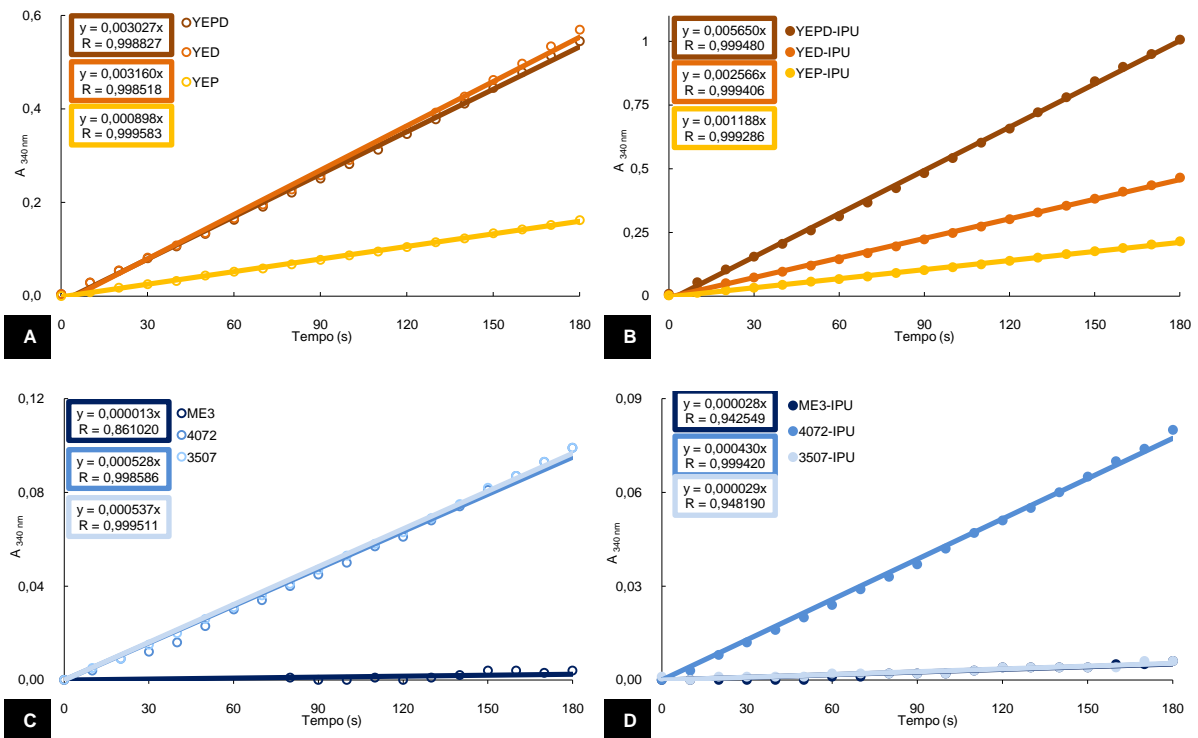
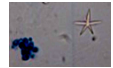


Figura A10 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática G6PD do citoplasma de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B); e de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência (C) e na presença de IPU (100 µM) (D).

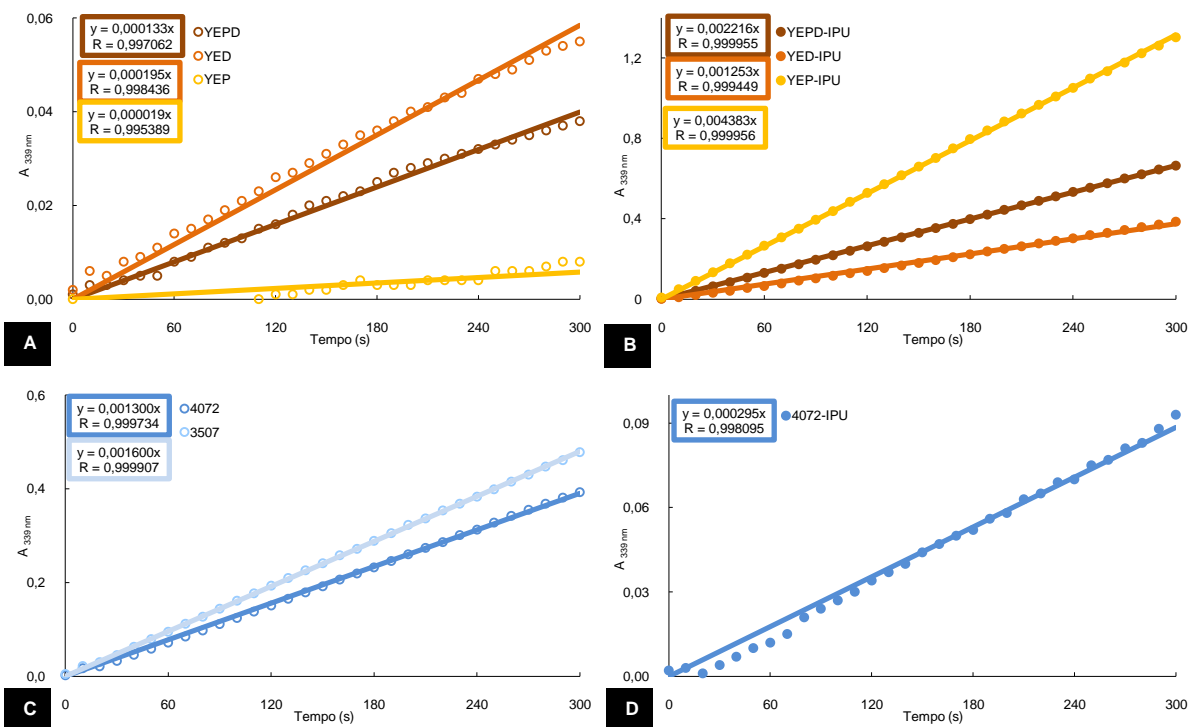


Figura A11 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática ADH de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B); de células de *S. cerevisiae* IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB na ausência (C); e células de *S. cerevisiae* IGC-4072 crescidas em meio MB na presença de IPU (100 µM) (D).

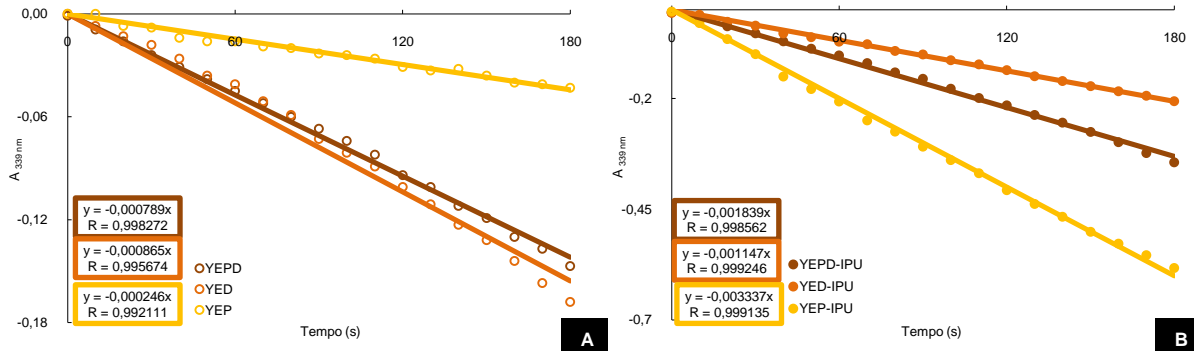


Figura A12 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática LDH de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEYPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B).

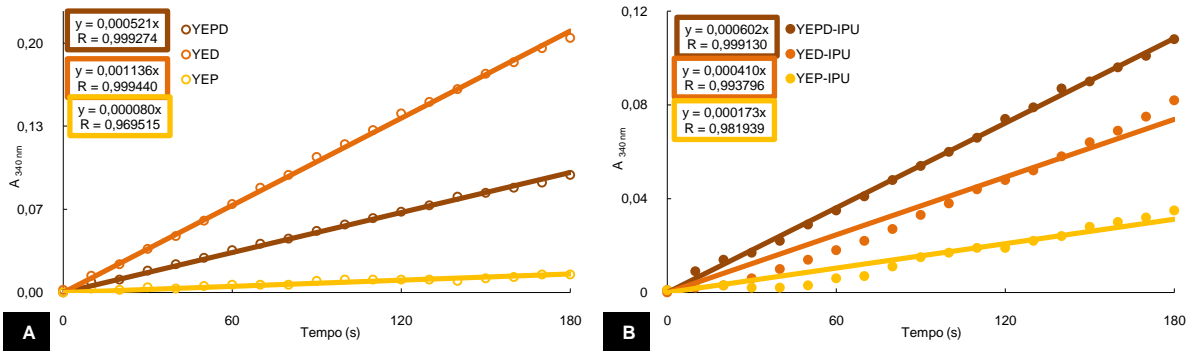


Figura A13 – Representação gráfica da curva de reacção da actividade enzimática NADP-ME de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEYPD, YED e YEP na ausência (A) e na presença de IPU (100 µM) (B).



Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas em meio YEPD, YED e YEP na ausência e na presença de IPU (100 µM).

Conc. ou activ. enzimática	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99 %)
Pesos secos	Entre grupos	286,757	5	57,351	87,292	0,000
	No interior dos grupos	15,768	24	0,657		
	Total	302,525	29			
GSH	Entre grupos	0,809	5	0,162	18,828	0,000
	No interior dos grupos	0,206	24	0,009		
	Total	1,015	29			
GSSG	Entre grupos	0,275	5	0,055	368,304	0,000
	No interior dos grupos	0,004	24	0,000		
	Total	0,279	29			
GSH+GSSG	Entre grupos	1,127	5	0,225	982,289	0,000
	No interior dos grupos	0,006	24	0,000		
	Total	1,132	29			
GSH/GSSG	Entre grupos	19,967	5	3,993	84725,735	0,000
	No interior dos grupos	0,001	24	0,000		
	Total	19,969	29			
DPPH	Entre grupos	0,414	5	0,083	48,386	0,000
	No interior dos grupos	0,041	24	0,002		
	Total	0,455	29			
MDA	Entre grupos	780,796	5	156,159	321,736	0,000
	No interior dos grupos	11,649	24	0,485		
	Total	792,445	29			
CAT T	Entre grupos	216150,148	5	43230,030	813,490	0,000
	No interior dos grupos	1275,394	24	53,141		
	Total	217425,542	29			
CAT A	Entre grupos	29603,683	5	5920,737	1778,532	0,000
	No interior dos grupos	79,896	24	3,329		
	Total	29683,579	29			
GR	Entre grupos	3481,862	5	696,372	327,921	0,000
	No interior dos grupos	50,966	24	2,124		
	Total	3532,828	29			
GPx	Entre grupos	3729,068	5	745,814	467,171	0,000
	No interior dos grupos	38,315	24	1,596		
	Total	3767,383	29			
G6PD	Entre grupos	51948,681	5	10389,736	499,153	0,000
	No interior dos grupos	499,554	24	20,815		
	Total	52448,235	29			
ADH	Entre grupos	138566,096	5	27713,219	957,631	0,000
	No interior dos grupos	694,545	24	28,939		
	Total	139260,640	29			
LDH	Entre grupos	3393,741	5	678,748	42,345	0,000
	No interior dos grupos	384,700	24	16,029		
	Total	3778,442	29			
NADP-ME	Entre grupos	3210,534	5	642,107	1037,851	0,000
	No interior dos grupos	14,849	24	0,619		
	Total	3225,383	29			



Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) sobre células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, IGC-4072 e IGC-3507 crescidas em meio MB, na ausência e na presença de IPU (100 µM).

Conc. ou activ. Enzimática	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99 %)
Pesos secos	Entre grupos	0,302	5	0,060	183,127	0,000
	No interior dos grupos	0,008	24	0,000		
	Total	0,310	29			
GSH	Entre grupos	0,097	5	0,019	134,003	0,000
	No interior dos grupos	0,003	24	0,000		
	Total	0,101	29			
GSSG	Entre grupos	0,716	5	0,143	1339,158	0,000
	No interior dos grupos	0,003	24	0,000		
	Total	0,718	29			
GSH+GSSG	Entre grupos	19,044	5	3,809	33702,080	0,000
	No interior dos grupos	0,003	24	0,000		
	Total	19,047	29			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,715	5	0,143	97,099	0,000
	No interior dos grupos	0,035	24	0,001		
	Total	0,750	29			
DPPH	Entre grupos	39,704	5	7,941	257,613	0,000
	No interior dos grupos	0,740	24	0,031		
	Total	40,443	29			
MDA	Entre grupos	3468,705	5	693,741	2094,107	0,000
	No interior dos grupos	7,951	24	0,331		
	Total	3476,656	29			
CAT T	Entre grupos	1780,822	5	356,164	131,769	0,000
	No interior dos grupos	64,871	24	2,703		
	Total	1845,693	29			
CAT A	Entre grupos	30792,306	5	6158,461	84,517	0,000
	No interior dos grupos	1748,806	24	72,867		
	Total	32541,112	29			
GR	Entre grupos	106180,716	5	21236,143	961,572	0,000
	No interior dos grupos	530,035	24	22,085		
	Total	106710,751	29			
GPx	Entre grupos	17,022	5	3,404	83,940	0,000
	No interior dos grupos	0,973	24	0,041		
	Total	17,995	29			
G6PD	Entre grupos	4,162E27	5	8,325E26	384,218	0,000
	No interior dos grupos	5,200E25	24	2,167E24		
	Total	4,214E27	29			
ADH	Entre grupos	273,863	5	54,773	21,197	0,000
	No interior dos grupos	62,016	24	2,584		
	Total	335,879	29			
LDH	Entre grupos	0,097	5	0,019	134,003	0,000
	No interior dos grupos	0,003	24	0,000		
	Total	0,101	29			
NADP-ME	Entre grupos	0,302	5	0,060	183,127	0,000
	No interior dos grupos	0,008	24	0,000		
	Total	0,310	29			