

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

***Stress por metais – Pentóxido de vanádio como pró-oxidante em
Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.***

Sara Isabel Santos Gonçalves

Orientador:

Prof. Doutor Rui Ferreira, Departamento de Química

Co-orientador:

Prof^a Doutora Isabel Alves-Pereira, Departamento de Química

"Os conceitos e princípios fundamentais da ciência são invenções livres do espírito humano."

Albert Einstein

"A ciência consiste em substituir o saber que parecia seguro por uma teoria, ou seja, por algo problemático." (José Ortega y Gasset)

"Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada."

(Immanuel Kant)

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos os que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Dr. Rui Manuel Alves Ferreira, bem como, à Professora Dr. Isabel Maria Simão Alves Pereira Ferreira, do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela forma como orientaram o meu trabalho e me acolheram prontamente no seu laboratório. Estou grata pelas notas dominantes da sua orientação e também pela liberdade de acção que me permitiram, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

Em segundo lugar, agradeço a todas as funcionárias do laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III, da Universidade de Évora, pela ajuda na manutenção do laboratório tornando possível a realização experimental do trabalho.

Ao Gaspar Manuel Rocha Brogueira pela incansável ajuda e paciência, bem como, tempo dispensados sempre que necessário.

O agradecimento maior é dirigido aos meus pais. São eles os meus alicerces e tudo o que sou é obra deles. Obrigado Mãe e Pai e Avós pelo vosso apoio e incentivo incondicional dispensados desde o início.

Agradeço também a todos os meus Amigos que sempre acreditaram em mim, estiveram ao meu lado e ajudaram a alcançar esta meta.

Ao Departamento de Química da Universidade de Évora, pelas facilidades em espaços, reagentes e equipamento concedidos que tornaram possíveis a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM) pela utilização do espectrómetro de fluorescência.

Índice geral

Índice de figuras	viii
Índice de quadros.....	ix
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	xi
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Fundamento teórico.....	1
1.1. Vanádio	1
1.2. As leveduras como modelo biológico.....	6
1.3. Espécies reactivas de oxigénio, stress oxidativo e danos celulares	10
2. Problema.....	29
3. Objectivos	31
3.1. Gerais	31
3.2. Específicos	31
4. Metodologia.....	33
4.1. Estratégia adoptada	33
4.2. Diagrama do trabalho	37
4.3. Protocolo experimental.....	38
4.3.1. Cultura de microrganismos.....	38
4.3.2. Monitorização do crescimento da levedura	39
4.3.3. Determinação do peso seco	39
4.3.4. Preparação das fracções pós-12000 g e peroxissomal.....	39
4.3.5. Parâmetros não-enzimáticos.....	39
4.3.5.1. Determinação da concentração de proteína total.....	39
4.3.5.2. Determinação da concentração em GSH e GSSG	40
4.3.5.3. Determinação da concentração de malonaldeído (MDA)	41
4.3.5.4. Capacidade antioxidante - DPPH	41
4.3.5.5. Capacidade antioxidante - ORAC	42
4.3.5.6. Quantificação de ROS – DCFH-DA	43
4.3.6. Determinação das actividades enzimáticas.....	44
4.3.6.1. Glutathione redutase.....	44
4.3.6.2. Glutathione peroxidase	44
4.3.6.3. Glucose-6-fosfato-desidrogenase	45
4.3.6.4. Catalases T e A	46
4.3.6.5. Fosfatase alcalina (ALP)	46
5. Resultados e Discussão.....	51
5.1. Crescimento e sobrevivência celular	51
5.2. Resposta não-enzimática ao V ₂ O ₅	54

5.3. Resposta enzimática ao V ₂ O ₅	57
6. Conclusão	61
7. Referências bibliográficas	65
Anexos.....	77

Índice de figuras

Figura 1.1. Diagrama típico de uma curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 1.2. Redução tetravalente do dióxigénio (O ₂) no mitocôndrio até à formação de água (H ₂ O).	11
Figura 1.3. Reacção de Fenton.....	12
Figura 1.4. Reacção de Haber-Weiss.....	12
Figura 1.5. Etapas da peroxidação lipídica	14
Figura 1.6. Processo de transformação de radicais livres pela acção de antioxidantes primários.....	15
Figura 1.7. O papel do ascorbato na desintoxicação de ROS.....	17
Figura 1.8. Processo pelo qual o glutatióno participa na desintoxicação de hidroperóxidos	17
Figura 1.9. Reacção de regeneração da vitamina E oxidada por intervenção do GSH	18
Figura 1.10. Interação metabólica entre catalases, ciclo de oxidação-redução do glutatióno, ciclo glutatióno-ascorbato e via das pentoses fosfato.....	20
Figura 1.11. Oxidação do ascorbato por um electrão (e ⁻) com formação do radical ascorbilo que, ao ser oxidado novamente, gera ácido dihidroascórbico.	21
Figura 1.12. Reacção da transferência de um átomo de hidrogénio (HAT) característica do método ORAC.....	23
Figura 1.13. Processo de apoptose e necrose celular.....	25
Figura 4.1. Reacção para a determinação do nível citoplasmático de malonaldeído	41
Figura 4.2. Estabilização do radical livre DPPH'.....	41
Figura 4.3. Curva do decaimento da fluorescência em função do tempo.....	42
Figura 4.4. Mecanismo proposto para a quantificação de H ₂ O ₂ pelo DCFH-DA.	43
Figura 4.5. Reacção para a determinação da actividade enzimática do GR.....	44
Figura 4.6. Reacção para a determinação da actividade enzimática GPx.....	44
Figura 4.7. Reacção para a determinação da actividade catalítica G6PD.....	45
Figura 4.8. Reacção para a determinação da actividade enzimática catalase.....	46
Figura 4.9. Reacção para a determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina.	46
Figura 5.1. Ilustração do crescimento de culturas de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ em meio YEPD com 2 % de glucose na ausência ou na presença de pró, antioxidantes ou V ₂ O ₅	52
Figura 5.2. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V ₂ O ₅ no conteúdo citoplasmático de malonaldeído (A), e actividade ALP (B) de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	53
Figura 5.3. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V ₂ O ₅ no conteúdo citoplasmático de GSH (A), no conteúdo citoplasmático de GSSG (B) e na soma GSH+GSSG (C) de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	55
Figura 5.4. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V ₂ O ₅ sobre a razão GSH/GSSG (A), no método de medição da capacidade antioxidante ORAC (B), no método de medição da capacidade antioxidante DPPH (C) e quantidade de ROS (D) de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	56

Figura 5.5. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V ₂ O ₅ sobre as actividades GR (A), GPx (B) e G6PD (C) de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	58
Figura 5.6. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V ₂ O ₅ sobre a actividade CAT T (A) e sobre a actividade CAT A (B) de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UE-ME ₃	59
Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração das proteínas.....	78
Figura A2 – Representação gráfica da curva de calibração do glutationo.....	78
Figura A3 – Representação gráfica da curva de calibração do dissulfureto de glutationo.....	78
Figura A4 - Representação gráfica da curva de calibração do malonaldeído.....	79
Figura A5 – Representação gráfica da curva de calibração do DPPH.....	79
Figura A6 – Representação gráfica da curva de calibração do ORAC.....	79
Figura A7 – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de ROS.....	80
Figura A9 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima GPx.....	81
Figura A8 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima GR.....	81
Figura A10 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima G6PD.....	82
Figura A11 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima CAT T.....	82
Figura A12 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima CAT A.....	83
Figura A13 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima ALP.....	83
Figura A14 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o método DPPH.....	84
Figura A15 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o método ORAC.....	84

Índice de quadros

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”).....	85
--	----

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

- ✓ 6PGDH 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44)
- ✓ AA Ascorbato
- ✓ AAPH 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida
- ✓ AAPx Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)
- ✓ AC Adenilato ciclasas (EC 4.6.1.1.)
- ✓ ALD Aldolase (EC 4.1.2.13)
- ✓ ALP Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
- ✓ Apaf-1 Factor citoplasmático associado à apoptose
- ✓ AsCH⁻ Ascorbato
- ✓ ATP Adenosina trifosfato
- ✓ AUC Área da curva de decaimento de absorvência
- ✓ Bax Proteína sinalizadora de apoptose
- ✓ Bcl-2 Proteína reguladora de apoptose
- ✓ BSA Albumina sérica bovina
- ✓ cAMP Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ✓ CAOT Capacidade antioxidante total
- ✓ CAT A Catalase peroxissomal (EC 1.11.1.6)
- ✓ CAT T Catalase citoplasmática (EC 1.11.1.6)
- ✓ Ced-4 Proteína reguladora de apoptose
- ✓ cfu Unidades formadoras de colónias
- ✓ CoA Coenzima A
- ✓ CTT Catalases
- ✓ D-AL D-arabino-1,4-lactona oxidase (EC 1.1.3.37)
- ✓ D-ARA D-arabinose desidrogenase (EC 1.1.1.46)
- ✓ DBH Dopamina-beta-hidroxilase (EC 1.14.17.1)
- ✓ D-CEA Via biossintética
- ✓ DCF 2',7'- diclorofluoresceína

- ✓ DCFH 2',7'- diclorofluoresceína (composto fluorescente)
- ✓ DCFH-DA 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (composto não-fluorescente)
- ✓ D-EAA D-Ácido-eritroascórbico
- ✓ DNA Ácido desoxirribonucleico
- ✓ DPGP Fosfoglicerato fosfatase (EC 3.1.3.13)
- ✓ DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
- ✓ DPPH[•] Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- ✓ EDTA Ácido etileno diaminotetracético
- ✓ ER Espécies reactivas
- ✓ F1,6P Frutose-1,6- bifosfato (EC 3.1.3.11)
- ✓ FAD Dinucleótido de adenina e flavina
- ✓ FAZ Ligando de processo apoptótico
- ✓ FK Fosfofrutocinase (EC 2.7.1.11)
- ✓ FL Fluoresceína
- ✓ G6PD Glucose-6-fosfato desidrogenase (E C 1.1.1.49)
- ✓ GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12)
- ✓ GPx Glutationo peroxidase dependente do Se (E C 1.11.1.9)
- ✓ GR Glutationo redutase (E C 1.6.4.2)
- ✓ GRAS Do inglês *Generally considered as safe*
- ✓ GS[•] Radical glutationo
- ✓ GSH Glutationo
- ✓ GSSG Dissulfureto de glutationo
- ✓ H2B Histona
- ✓ HAT Transferência de átomos de hidrogénio
- ✓ HK Hexocinase (EC 2.7.1.1)
- ✓ L-gul L-gulonolactona (EC.1.1.3.8)
- ✓ MDA Malonaldeído
- ✓ mRNA Ácido ribonúcleico mensageiro
- ✓ NAD Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
- ✓ NAD(P) Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)

- ✓ NADH Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
- ✓ NADPH Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
- ✓ NEM *N*-etilmaleimida
- ✓ OPT *o*-ftalaldeído
- ✓ ORAC Do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*
- ✓ ORFs Sequência de DNA que pode ser traduzida, do inglês *Open reading frame*
- ✓ PCD Morte celular programada
- ✓ PE β -ficoeritrina
- ✓ PGM Fosfoglicerato mutase (EC 5.4.2.1)
- ✓ pNP *p*-nitrofenol
- ✓ pNPP *p*-nitrofenilfosfato
- ✓ ROS Espécies reactivas de oxigénio
- ✓ SDS Duodecilssulfato de sódio
- ✓ SOD Superóxido dismutase (E C 1.15.1.1)
- ✓ TBA Ácido tiobarbitúrico
- ✓ t-BHP Terbutil hidroperóxido
- ✓ TE Equivalentes de trolox
- ✓ TNF- α Factor de necrose tumoral
- ✓ UV Ultra-violeta
- ✓ VRB Baterias redox de vanádio
- ✓ YAP-1 Proteína activadora da apoptose

Stress por metais – Pentóxido de vanádio como pró-oxidante em Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.

Resumo

Sara Isabel Santos Gonçalves (2010). ***Stress por metais – Pentóxido de vanádio como pró-oxidante em Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.*** Tese de Mestrado (R. Ferreira e I. Alves-Pereira, Orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia. Universidade de Évora, Évora, Portugal.

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do pentóxido de vanádio (2 mM), na presença e na ausência de ascorbato, em *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Os resultados obtidos mostram que o composto de vanádio inibiu o crescimento da levedura, observando-se decréscimo significativo da biomassa produzida e de células viáveis, no final do ensaio, 72 h, bem como, das actividades ALP, CAT T, CAT A e GPx, da razão GSH/GSSG e da capacidade antioxidante medida pelo ORAC e DPPH, acompanhado por aumento significativo das actividades GR e G6PD, da quantidade de ROS e MDA citoplasmáticos, respostas indiciadoras do papel pró-oxidante do vanádio. A presença do antioxidante ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura aumentou a quantidade de biomassa, a viabilidade celular, as actividades enzimáticas ALP, CAT A e GPx e diminuiu os níveis de MDA citoplasmático. Contudo a acção do ascorbato não reverteu totalmente os efeitos deletérios exercidos pelo vanádio.

Stress by metals - Vanadium pentoxide as a pro-oxidant in Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.

Abstract

Sara Isabel Santos Gonçalves (2010). ***Stress by metals - Vanadium pentoxide as a pro-oxidant in Saccharomyces cerevisiae UE-ME₃.*** Master's thesis (R. Ferreira e I. Alves-Pereira, Advisers) Science and Technology Scholl, University of Évora, Évora, Portugal.

The main objective of this study was to evaluate the effects of vanadium pentoxide (2 mM), in the presence and absence of ascorbate, in *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. The results show that vanadium compound inhibited the yeast growth, occurring a significant decrease in biomass production and viable cells at 72 h of culture, as well as ALP, CAT T, CAT A and GPx activities, GSH/GSSG ratio and antioxidant capacity measured by ORAC and DPPH, accompanied by a significant increase of GR and G6PD activities, cytoplasmic ROS and MDA level; responses indicative of pro-oxidant role of vanadium. The presence of the antioxidant ascorbate (0.025 mM) in the culture medium increased the amount of biomass, cell viability, ALP, CAT A and GPx activities and a decrease of cytoplasmic MDA levels. However the action of ascorbate did not reverse completely the deleterious effects exerted by vanadium.

1. Fundamento teórico

1.1. Vanádio

Em menos de 100 anos, o vanádio passou de um metal raro e obscuro, a metal de grande importância militar bem como, um pilar da tecnologia moderna (Nriagu, 1998). O vanádio foi descoberto em 1801, na cidade do México, pelo químico e mineralogista espanhol Don Andrés Manuel del Río (1764-1849), no mineral vanadinita. Inicialmente, Don Andrés deu ao vanádio o nome de pancrómio em alusão à variedade de cores dos seus sais para, em seguida, denominá-lo de eritrónio devido à coloração vermelha dos sais formados quando tratado com ácidos (Chasteen, 1983; Morinville, 1998; Nriagu, 1998; Guerra, 2007). Infelizmente, o químico francês Hippolyte Victor Collect-Descotils, declarou incorrectamente que o novo elemento descoberto por Del Rio não era mais do que crómio impuro. Del Rio julgou ele próprio estar enganado e aceitou o julgamento feito pelo químico francês. Este elemento foi redescoberto em 1830 pelo químico sueco Nils Gabriel Sefström (1787-1845), que descobriu que certos minérios de ferro, após fundidos, tornavam-se muito mais maleáveis, e que, por isso, deviam conter um elemento adicional que posteriormente identificou e ao qual atribuiu o nome de “*vanadin*”, em honra da deusa nórdica *Vanadis*, deusa da beleza, juventude e amor, devido aos belos compostos multicolores que produz quando em solução (Chasteen, 1983; Tsiani, 1997; Nriagu, 1998; Gândara, 2003; Guerra, 2007).

Curiosamente, bem antes de Sefström, F. Wöhler reexaminou a vanadinita estudada por Del Río e verificou que de facto Andrés havia descoberto o vanádio. No entanto, o vanádio só foi isolado pela primeira vez em 1867 pelo químico inglês Henry Enfield Roscoe (1833-1915), através da redução do VCl_2 com hidrogénio. Mais tarde, em 1925, os químicos americanos John Wesley Marden e Malcolm N. Rich obtiveram vanádio bastante puro (99,7%) pela redução do pentóxido de vanádio, V_2O_5 , com o cálcio (Chasteen, 1983; Nriagu, 1998).

O vanádio é o décimo nono elemento mais abundante na crosta terrestre, com uma concentração de 136 ppm, o quinto entre os metais de transição, apresentando na sua forma natural uma mistura de dois isótopos ^{50}V (0,24 %) e ^{51}V (99,76 %). Este metal de transição está distribuído no meio ambiente de forma não uniforme, sendo possível encontrá-lo em rochas, solos, plantas, animais e em menor extensão na água, onde os níveis raramente excedem 0,1 ppb (Chasteen, 1983; Nriagu, 1998; Conte, 2009). No ambiente não se encontra na sua forma elementar mas como parte integrante de minerais, dos quais se destacam a vanadinita $PbCl_2 \cdot 3Pb_3(VO_4)_2$ e a patronita, V_2S_5 (Greenwood, 1997; Metzler, 2000; Pryia, 2006).

A maioria dos países obtém o vanádio a partir de combustíveis fósseis como o crude (4%), ou o carvão, nos quais, este elemento está presente maioritariamente na forma de porfirinas de vanádio, existentes também em sistemas vivos. Estes complexos são depois convertidos em pentóxido de vanádio, V_2O_5 , constituindo o principal componente químico para a produção dos restantes compostos de vanádio. Durante o processamento, grande quantidade deste composto é libertada para a atmosfera, podendo causar problemas, tais como, a conversão de SO_2 em SO_3 , que produz chuvas ácidas (Etcheverry, 1998; Repinc, 2004; Tracey, 2007).

Entre os recursos mundiais de vanádio, cerca de 46% estão presentes no magma, localizados no complexo de *Bushveld*, na África do Sul, que possui as maiores reservas mundiais de ferro/vanádio, seguida pela Rússia com 25,8%, os Estados Unidos com 14,7% e a China com 11,0%. A produção mundial de minério concentrado em vanádio, como co-produto ou subproduto de outros minerais, atingiu, em 2004, um total de 44,2 milhões de toneladas. Estima-se que eventualmente o consumo de vanádio poderá vir a ser aumentado pelo uso de baterias redox de vanádio (VRB) que muito prometem e que seriam responsáveis pelo consumo adicional de ~ dez mil t de vanádio por ano (Emsley, 1998; Guerra, 2007).

Grande parte do vanádio mundial é consumida na indústria do aço, onde é utilizado na preparação da liga ferro-vanádio usada principalmente na produção de aço. O aço contendo vanádio é especialmente forte e duro possuindo uma melhor resistência ao choque e à corrosão, características que permitem a sua utilização como componente em moldes de aço que são, posteriormente, utilizados em processos químicos a temperatura elevada; na constituição de rotores de turbinas; em máquinas e equipamentos de força; em pontes e plataformas de perfuração; estruturas de asa e motores de avião; na indústria aeroespacial, no endurecimento de ligas de titânio e em componentes automobilísticos (Metzler, 2000; Huang, 2001; Priya, 2006; Tracey, 2007; Wang, 2007; Chary, 2008; Rowe, 2008; Sinev, 2008).

Para além da sua aplicação na indústria do aço, o vanádio é também largamente utilizado na indústria química, especialmente na síntese de H_2SO_4 , polímeros e compostos orgânicos; é também usado na indústria metalúrgica na produção de ligas metálicas; na indústria electroquímica como componente de baterias, na agricultura para a elaboração de fitofármacos e herbicidas, bem como, na medicina e indústria farmacêutica na elaboração de fármacos (Nriagu, 1998; Shechter, 2003; Priya, 2006).

O vanádio é um metal de transição que apresenta estados de oxidação que podem variar entre -1 e +5, sendo os mais comuns e biologicamente activos o +3, +4 e o +5, no entanto, o estado de oxidação mais estável é o V(+4) (Crans, 1998; Goc, 2006; Tracey, 2007). O ião vanadato VO_4^{3-} é a forma de V(+5) predominante em solução básica e em soluções diluídas a

pH 7. Contudo, em concentração na ordem dos milimolar, outras formas polinucleares, como $V_3O_9^{3-}$ e $V_4O_{12}^{4-}$ são predominantes (Metzler, 2000; Crans, 2004; Tracey, 2007).

O mecanismo de transporte dos iões de vanádio através das membranas não é ainda conhecido. Estudos realizados indicam que os iões vanadilo penetram na membrana dos eritrócitos por difusão passiva. Os compostos de vanadato penetram nas células através de canais aniónicos, onde são reduzidos a vanadilo. Em condições fisiológicas os estados V(+4) e V(+5) são predominantes. Após a sua entrada na célula, os iões vanadilo sofrem processos de oxidação podendo interconverterem-se um no outro por acção de um conjunto de elementos biológicos redutores como o catecol, o ascorbato, a cisteína, o glutatióno, NADPH e o NADH (Chasteen, 1983; Domingo, 1993; Barceloux, 1999; Crans, 2004; Goc, 2006; Tracey, 2007).

O estado no qual o vanádio se encontra dentro da célula depende da razão entre espécies redutoras e oxidantes, assim como da sua própria concentração no meio intracelular, também a coordenação e geometria dos compostos e minerais de vanádio estão dependentes do estado de oxidação e tipo de ligando coordenado (Greenwood, 1997; Goc, 2006; Tracey, 2007; Ferrer, 2007).

A química do V(+4) é essencialmente centrada no ião oxovanádio ou vanadilo, VO^{2+} . A ligação V=O é bastante forte, com um comprimento de ligação de cerca de 1,6 Å, um valor semelhante ao encontrado no óxido de V(+5) (Maurya, 2003; Tracey, 2007). O ião vanadilo, VO^{2+} , mostra elevada reactividade *in vitro*, só ocorrendo por isso na forma livre até à concentração de 10^{-7} mol/dm³, reagindo com os ligandos e formando complexos permanentes se a concentração for elevada. Em geral o V(+4) forma complexos com proteínas e outros ligandos mais pequenos como o citrato, ATP, ADP, catecolaminas, aminoácidos livres (principalmente cisteína e glutamina), ácidos nucleicos e lípidos reduzindo a possibilidade do vanadilo existir na forma livre em sistemas biológicos, excepto talvez, em vacúolos ácidos como os lisossomas (Chasteen, 1983; Barceloux, 1999; Goc, 2006). O V(+5) é o estado redox deste metal que apresenta maior estabilidade em sistemas aquosos. A pH ácido existe na forma de catião *cis*- VO_2^+ que complexa com agentes quelantes, como o EDTA (Crans, 1998), enquanto a valores de pH fisiológico ou superiores surgem os vanadatos, que são aniónicos e nos quais o metal está tetraedricamente coordenado (Chasteen, 1983; Pyrzyńsk, 2004). As soluções aquosas de vanadato consistem numa mistura de formas oligoméricas (Chasteen, 1983; Correia, 1994; Lobert, 1994) com diferentes estados de protonação e formas que dependem do pH, da concentração total de vanadato e da força iónica (Baes, 1976; Chasteen, 1983; Amado, 1993; Crans, 1998).

Em condições neutras e ao longo da gama de concentrações entre μ M e mM, frequentemente usadas em estudos bioquímicos, o ião vanadato existe sob a forma de VO_4^{3-} ,

$V_2O_7^{4-}$ e $V_4O_{12}^{4-}$ (Crans, 1994; Goc, 2007). O V_4 é a espécie predominante em soluções de vanadato mais concentradas, sendo referida como *metavanadato*. A sua proporção depende do pH no ambiente intracelular. A pH neutro, ocorre a rápida polimerização de monómeros a hexâmeros. A pH entre 2 e 6 ocorre a formação do polianião decamérico, correntemente designado por $V_{10}O_{28}^{6-}$ (Crans, 1994; Pyrzyńska, 2004; Goc, 2007), sendo predominante quando a concentração de vanadato é superior a 100 μ M (Stankiewicz, 1995; Plass, 1999; Tracey, 2007).

A importância biológica do vanádio está associada em grande parte ao monómero vanadato, devido à sua semelhança quer estrutural quer electrónica com o ião fosfato que lhe confere o estatuto de análogo estrutural desse anião, podendo substituí-lo no centro activo de diversos enzimas para que outros ésteres de fosfato possam ligar-se, levando à sua activação ou inactivação (Plass, 1999; Goc, 2007).

Com base no que já foi referido anteriormente, o VO_4^{3-} , tem a capacidade de inibir as fosfatases devido à semelhança estrutural tetraédrica do ião fosfato. No entanto, em muitos casos, a constante de dissociação enzima-inibidor é muito inferior à do fosfato. Estas características permitem a este ião adoptar uma coordenação trigonal piramidal, proposta para simular a conformação do grupo fosfato no estado de transição previsto para a transferência de grupo fosforilo. Como seria de esperar, a semelhança estrutural com o fosfato torna o vanadato um potente inibidor de vários enzimas envolvidos na transferência do grupo fosforilo, como acontece com a fosfatase alcalina, hidrolase e marcador de proliferação celular em estudo neste trabalho (Krauss, 1991; Deng, 2002; Davies, 2004).

As diferentes espécies de vanadato que se formam em solução podem apresentar diferentes alvos e tipos de modulação enzimática devido principalmente ao tipo de estrutura que se forma (Plass, 1999).

A analogia estrutural entre a espécie dimérica de vanadato e o pirofosfato, sugerem ainda que o $V_2O_7^{4-}$ pode interagir com locais de ligação a cofactores como NAD, NADP, FAD e CoA. Outros estudos indicam que o $V_2O_7^{4-}$ inibe competitivamente a interacção de NADP e NAD com o enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (Crans, 1990) ou que, actua como inibidor competitivo de fructose-1,6-bifosfato aldolase e não competitivo de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Stankiewicz, 1995; Goc, 2006).

As espécies tetraméricas de vanadato ($V_4O_{12}^{4-}$), não apresentam analogia estrutural com nenhum cofactor ou substrato. No entanto, $V_4O_{12}^{4-}$ inibe o enzima 6-fosfogluconato desidrogenase de forma competitiva em relação ao substrato e de forma não competitiva em relação ao cofactor (Stankiewicz, 1995). O decavanadato ($V_{10}O_{28}^{6-}$) é um bom inibidor não-competitivo potente da

hexocinase e da fosfofrutocinase (Stankiewicz, 1995). Este polivanadato inibe a cinase dependente de cAMP de forma não-competitiva relativamente ao ATP e de forma competitiva relativamente ao substrato. Além da propriedade inibitória que é atribuída ao vanadato, este também exerce efeitos estimulatórios na actividade de alguns enzimas, como a adenilato ciclases, a glucose 6-fosfato desidrogenase, a fosfoglicerato mutase e a fosfoglicerato fosfatase (Crans, 1994).

O estado de oxidação do vanádio é o factor que determina a extensão dos efeitos biológicos, manifestando-se não só na regulação da actividade de muitos enzimas, mas também nos processos envolvendo radicais livres e em mecanismos de fosforilação/desfosforilação de proteínas. Hoje, esses processos são investigados intensivamente, especialmente devido ao seu papel crucial quer na proliferação e diferenciação celular, quer na regulação do metabolismo celular (Tracey, 2007).

Em condições fisiológicas, o estado de oxidação V(+5) surge com maior predominância na forma aniónica, estruturalmente semelhante à do fosfato e designada por metavanadato ou ortovanadato (H_2VO_4^-). Quando se encontra no estado de oxidação V(+4), o vanádio surge incorporado na forma catiónica assemelhando-se a sua geometria à que conhecemos para o ião Mg^{2+} . Embora o vanadato ou vanádio (+5) seja a forma mais estável do vanádio na presença de dioxigénio a pH neutro é também a mais tóxica, ambientes redutores convertem-no facilmente em vanádio (+4), menos tóxico (Crans, 1990; Brichard, 1995; Baran, 2003; Ribeiro, 2004).

A literatura descreve o vanádio como um oligoelemento da dieta de muitos animais, uma vez que, em quantidade vestigial, favorece o crescimento celular actuando como factor promotor de crescimento, mas também por actuar como inibidor da síntese *de novo* do colesterol quando está presente em níveis intracelulares da ordem dos μgL^{-1} e como indutor da oxidação de resíduos acilo quando em níveis intracelulares mais elevados, mgL^{-1} (Crans, 1990; Rowe, 2008). Participa também na fixação e acumulação de azoto em plantas, no entanto, concentrações elevadas de vanádio nas plantas, reduzem a sua produtividade (Priya, 2006). O interesse de biólogos e bioquímicos nos efeitos do vanádio sobre os seres vivos aumentou quando estudos demonstraram que este elemento era capaz de inibir importantes funções celulares, como a actividade enzimática Na^+ , K^+ -ATPase (Galli, 1991; Tsiani, 1997; Goldwaser, 2000; Rowe, 2008). Após esta observação, novos estudos sugerem que para além da actividade enzimática da Na^+ , K^+ -ATPase, os derivados de vanádio conseguem também inibir a actividade da Ca^{2+} -ATPase (Metzler, 2000; Tracey, 2007).

Os tunicatos são capazes de acumular vanádio na forma reduzida, V(+3), em concentrações que chegam a atingir 1 M. Capturam-no nas formas HVO_4^{2-} ou H_2VO_4^- presentes na água do mar, e incorporam-no em vacúolos, vanadóforos, de células sanguíneas especializadas, vanadóцитos onde são reduzidos a V^{3+} e VO^{2+} pelo pigmento tunicromo, ao qual os catiões se podem associar (Crans, 1989; Cram, 1990; Brichard, 1995; Tsiani, 1997; Kanamari, 1999; Frank, 2007).

Também a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada no fabrico de cerveja e vinho, manifesta capacidade para acumular vanádio (+4) na ordem dos milimolar, em compartimentos específicos (Bode, 1990; Patel, 1990; Galli, 1991).

Em estudos realizados com ratos, observou-se que independentemente do estado de oxidação administrado por via venosa, a maior parte do vanádio adopta o estado de oxidação (+4) que é posteriormente complexado pela proteína transportadora de ferro, transferrina (Chasteen, 1981). Apesar de uma pequena parte do vanádio (+4) ser reoxidado a vanadato, a complexação da espécie reduzida impede a acumulação de vanádio (+5), impedindo as acções inibitórias deste elemento (Etcheverry, 1998).

A compreensão da acção dos iões vanádio na geração de espécies reactivas de oxigénio por reacções de *Fenton* e *Haber-Weiss* ajudou a compreender fenómenos como a peroxidação dos lípidos das membranas biológicas, a activação de processos mutagénicos no DNA e a indução de apoptose. A indução ou inibição do crescimento neoplásico, a estimulação da apoptose ou acção anti-apoptótica, a activação ou inibição dos genes reguladores do ciclo celular ou transformações metabólicas, estão todos relacionados com processos de fosforilação/desfosforilação das proteínas cinase e fosfatase, que por sua vez são reguladas pela acção dos iões de vanádio. A sua influência sobre estas enzimas resulta da capacidade dos complexos de vanádio para imitar um análogo do estado de transição, que pode ser reversível, no caso do vanadato, ou irreversível, no caso dos complexos peroxovanádicos com resíduos de cisteína da tirosina fosfatase (Willisky, 1985; Stohs, 1994; Galaris, 2001; Tracey, 2007).

1.2. As leveduras como modelo biológico

Os microrganismos, são utilizados há milénios na condução de processos com interesse comercial e estão na base da indústria biotecnológica. A diversidade metabólica e nutricional destes seres vivos, aliada à capacidade de se reproduzirem rápida e incansavelmente, produzindo compostos de grande utilidade e valor, confere-lhes um lugar privilegiado na biotecnologia moderna. A maior razão área/volume que apresentam permitem uma absorção rápida de nutrientes e uma taxa de metabolismo muito elevada, o que torna os processos mais económicos. São muito versáteis, com capacidade para converter compostos de natureza diversa e de produção de uma grande variedade de metabolitos finais. A possibilidade de

alterar as características naturais do microrganismo, através de engenharia genética, abriu novos horizontes e ampliou as aplicações em áreas relacionadas com a saúde, agricultura, energia ou ambiente (Lima, 2003; Madigan, 2004).

Os registos históricos das sociedades humanas revelam que a utilização e o estudo dos fungos, pertencentes ao reino *Fungi*, têm sido particularmente importantes para o Homem, pelos benefícios sócio-económicos que lhe trazem, como a produção de alimentos e bebidas, mas também por serem responsáveis por diversas patologias clínicas. Por outro lado, fungos, bactérias e alguns organismos heterotróficos actuam como decompositores de matéria orgânica disponibilizando carbono, azoto, fósforo e outros constituintes essenciais à vida (Azevedo, 1999; Madigan, 2004; Griffiths, 2006).

As leveduras constituem na actualidade o grupo de microrganismos mais importantes a ser explorado comercialmente e a ser consumido pela Humanidade. Na verdade, tanto do ponto de vista fisiológico como genético, a levedura é o organismo celular favorito para estudos de biologia molecular e o mais utilizado na investigação do *stress* oxidativo. As leveduras não constituem, no entanto, uma entidade taxonómica pois compreendem 39 géneros e cerca de 400 espécies (Lima, 2003; Lushchak, 2004; Butylina, 2006; Griffiths, 2006). Crescem em habitats onde existe abundância de glúcidos, como frutos, flores e cascas de árvores. Algumas espécies vivem simbioticamente com animais, em especial insectos, sendo espécies patogénicas para outros animais e para os seres humanos. As principais leveduras com importância sócio-económica correspondem ao género *Saccharomyces*. Embora os *habitats* naturais dessas leveduras sejam os frutos, as leveduras comerciais actualmente utilizadas são relativamente diferentes das linhagens nativas, visto que foram selectivamente aperfeiçoadas em laboratório ao longo dos anos (Ostergaard, 2000; Saito, 2003; Madigan, 2004).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular pertencente à classe Ascomycota. Apresenta forma ovóide com aproximadamente 10 µm de comprimento. Esta espécie é utilizada desde os tempos pré-históricos para fins comuns, nomeadamente confecção de pão, cerveja e fermentação alcoólica usada na produção de vinho. Apesar de se tratar de um organismo eucariota que apresenta as características celulares básicas das células eucariotas mais evoluídas, quer a nível estrutural, quer a nível funcional, este microrganismo também possui algumas características semelhantes às bactérias, como o facto de crescer rapidamente em qualquer tipo de meio nutritivo, líquido ou sólido, e de, quando em presença de nutrientes suficientes conseguir duplicar a sua população em menos de duas horas. Uma das suas características mais aliciantes reside no facto de possuir um genoma de pequenas

dimensões com cerca de 13500 kb, tendo sido o primeiro organismo eucariota a ter o seu genoma completamente sequenciado. Assim, as células de *Saccharomyces cerevisiae* são um bom sistema experimental para modelar células eucariotas superiores. O seu metabolismo é semelhante ao de eucariotas superiores, com mecanismos próprios de activação metabólica (citocromo P450) e de desintoxicação, que não estão presentes em bactérias. As células de *S. cerevisiae* podem ser facilmente manipuladas geneticamente, através da construção de mutantes, a qual é extremamente útil para a caracterização da função de diversas proteínas, bem como das respectivas vias metabólicas em que estão inseridas (Gralla, 1997; Jamieson, 1998; Verdoucq, 1999; Grzelak, 2005; Soares, 2005; Butylina, 2006; Marinho, 2006).

O crescimento das leveduras, como organismos heterotróficos que são, depende de uma variedade de compostos orgânicos e de alguns nutrientes minerais. Estes compostos são degradados por um conjunto de reacções químicas que ocorrem no interior da célula – o metabolismo. Durante o crescimento, as células utilizam substratos alimentares que satisfazem requisitos como: formação de compostos com ligações de potencial químico elevado, como o ATP, ou portadores de elevado poder redutor, como nucleótidos de piridina e NADPH utilizados na síntese *de novo* de materiais celulares. Em aerobiose, o poder redutor gerado sob a forma de NADH, na via glicolítica, na descarboxilação do piruvato e no ciclo dos ácidos tricarboxílicos é convertido em ATP, pela fosforilação oxidativa que ocorre nos mitocôndrios. As leveduras são seres aeróbios facultativos, dado que conseguem crescer na presença ou ausência de dióxigénio (Barlas, 1978; Hansen, 1996; King, 2003; Krantz, 2004; Schacherer, 2007; Rak, 2008).

O meio de cultura é um dos vários factores que é necessário controlar quando se trabalha com *S. cerevisiae*, uma vez que a fonte de carbono presente no meio de cultura poderá induzir alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Quando no meio de cultura temos uma fonte de carbono fermentável, como por exemplo a glucose, as células de *S. cerevisiae* apresentam três fases distintas de crescimento. Após um pequeno período de adaptação ao meio (fase *lag*) as células crescem rapidamente e a sua massa aumenta exponencialmente entrando-se na fase de crescimento exponencial (figura 1.1.). As necessidades energéticas das células são principalmente satisfeitas através do metabolismo fermentativo – glicólise, observando-se a acumulação de etanol. No entanto, se a fonte de carbono no meio de cultura for o glicerol ou piruvato, as células de *S. cerevisiae* manifestam mesmo em fase exponencial, metabolismo respiratório (Werner-Washburne, 1993; Longo, 1996; Werner-Washburne, 1996; Rettori, 1999). A segunda fase de crescimento inicia-se quando as células esgotam a maior parte da fonte de carbono fermentável, observando-se

então grandes alterações fisiológicas e morfológicas, bem como uma diminuição da taxa de crescimento. A transição entre estas duas fases é denominada por mudança diaúxica (figura 1.1.). Nesta fase de crescimento – fase de crescimento pós-diaúxica os enzimas fermentativos são inactivados e as células utilizam a respiração como principal via de síntese de ATP, sendo os produtos da fermentação, principalmente o etanol, a sua fonte de carbono (Werner-Washburne, 1996; Rettori, 1999; King, 2003; Krantz, 2004; Schacherer, 2007).

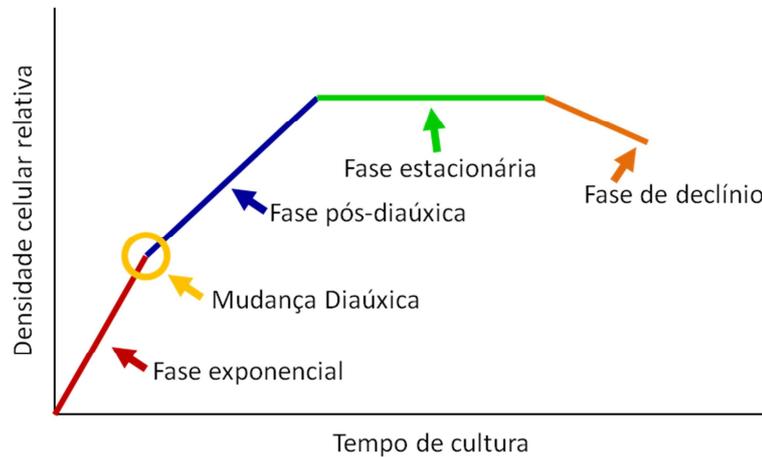


Figura 1.1. Diagrama típico de uma curva de crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico contendo glucose. A densidade celular pode ser determinada medindo a absorvência a 600 nm (adaptado de Werner-Washburne, 1996).

Na ausência de nutrientes, as células entram em fase estacionária, onde não ocorre qualquer divisão celular, a taxa metabólica decresce e a respiração é necessária. A grande maioria dos mRNAs, que se encontram em abundância na fase exponencial, é dificilmente detectada após a mudança diaúxica. Embora normalmente não ocorra crescimento nesta fase, muitas funções celulares podem ainda estar activas, inclusive o metabolismo energético e alguns processos biossintéticos. Quando uma população atinge a fase estacionária permanece nas mesmas condições de incubação podendo as células permanecer vivas ou morrerem. Se estas morrerem, podemos dizer que atingiram a fase de morte ou declínio. Em alguns casos, a morte é acompanhada por lise celular. A morte pode também ocorrer na fase exponencial; embora na maioria dos casos a taxa de morte celular seja muito inferior à taxa de crescimento exponencial (Werner-Washburne, 1993; Werner-Washburne, 1996; Rettori, 1999; Gray, 2004; Madigan, 2004; Marinho, 2006).

Os limites de longevidade em leveduras têm sido avaliados segundo dois paradigmas experimentais distintos: o envelhecimento cronológico pela perda de viabilidade celular durante o período estacionário do crescimento e o envelhecimento replicativo que corresponde ao número de filhas produzidas por cada célula individualmente (Adams, 1984). O envelhecimento cronológico é definido como o envelhecimento das células pós-mitóticas,

sendo um processo simples de deterioração e perda de viabilidade de células individuais durante a fase estacionária. O envelhecimento replicativo corresponde ao envelhecimento específico das células mãe baseado na quantidade de proles que uma mãe consegue produzir individualmente. No envelhecimento cronológico e replicativo de leveduras a apoptose pode ser detectada por marcadores característicos que não são observados em células em fase exponencial (Jakubowski, 1999; Costa, 2001; Grzelak, 2001; Sinclair, 2002; Fabrizio, 2003; Jazwinski, 2004; Grzelak, 2005; Frohlich, 2006; Laun, 2006; Fabrizio, 2007; Hamann, 2008). Em culturas de espécies transgênicas de leveduras que apresentam maior taxa de sobrevivência na fase estacionária do que as células nativas e, onde ocorre sobreexpressão da proteína YAP-1, um regulador chave da tolerância ao *stress* oxidativo, observa-se um decréscimo do envolvimento/participação da apoptose no envelhecimento celular cronológico (Jakubowski, 1999; Laun, 2006; Hamann, 2008). Quando as culturas de levedura entram em fase estacionária, a divisão celular pára e o metabolismo celular abranda. As células são capazes de sobreviver nesta fase durante semanas ou meses ocorrendo a indução da síntese de glúcidos de reserva como o glicogénio e a triose com reestruturação da parede celular sem suplementos nutritivos. A população de leveduras da fase estacionária pode ser subdividida em dois tipos de células: As células verdadeiramente quiescentes, em fase G₀ e as não-quiescentes que se formam apenas durante a divisão celular final, na fase diáuxica da curva de crescimento. As células não-quiescentes apresentam elevados níveis de ROS e maior predisposição para morrer por apoptose. As células quiescentes após um longo período de tempo de incubação, também começam por exibir marcadores de apoptose e posteriormente de necrose (Sinclair, 2002; Fabrizio, 2004; Jazwinski, 2004; Madeo, 2004; Frohlich, 2006; Laun, 2006).

1.3. Espécies reactivas de oxigénio, *stress* oxidativo e danos celulares

A evolução de seres procariotas com capacidade fotossintética foi um marco evolutivo que possibilitou o aproveitamento do dioxigénio existente na atmosfera e permitiu o aparecimento de formas de vida aeróbias, como protistas, fungos, plantas e seres superiores. O estado fundamental do dioxigénio, O₂, é utilizado tanto na produção de energia através da cadeia respiratória dos eucariotas, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais (Halliwell, 1989; Arouma, 1994; Halliwell, 1994; Ferreira, 1997; Cerqueira, 2006).

No metabolismo celular ocorre a formação de intermediários denominados de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Este termo colectivo é utilizado para a inclusão, não só dos radicais de oxigénio como: radical hidróxilo (OH[•]), anião radical superóxido (O₂^{•-}), óxido

nítrico (NO[•]) e radical peróxilo (ROO[•]), como também derivados reactivos de oxigénio não radicalares, como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o oxigénio singuleto (¹O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl), os quais podem induzir reacções radicalares no organismo (Halliwell, 1989; Sies, 1991; Gilgun-Sherki, 2002; Vieira, 2006).

Estas espécies são produzidas pelas células: (a) nos mitocôndrios, em consequência da respiração aeróbica normal que consome dioxigénio, reduzindo-o por uma sequência de etapas a água, conforme mostrado na Figura 1.2. (b) nas células fagocitárias como os linfócitos onde as ROS são produzidas e desempenham importante função biológica, através do reconhecimento das células do próprio organismo que se tornaram tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus, e as destroem pelo processo de oxidação através de NO[•], O₂^{•-}, H₂O₂ e ⁻OCl. (c) peroxissomas, organelos responsáveis pela degradação de ácidos gordos e outras moléculas e que produzem H₂O₂ (d) enzimas do citocromo P450 que constituem um sistema de defesa primário contra substâncias químicas tóxicas para o organismo (Arnes, 1993; Ferreira, 1997; Soares, 2002; Doudican, 2005; Cerqueira, 2006).

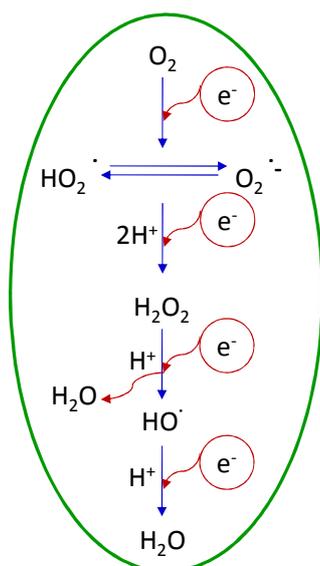


Figura 1.2. Redução tetravalente do dioxigénio (O₂) no mitocôndrio até à formação de água (H₂O). Várias espécies reactivas de O₂ são formadas no processo. Adaptado de Cohen (1989).

Cerca de 95 a 98 % do dioxigénio absorvido pelos organismos aeróbios é reduzido, e convertido em água pela cadeia respiratória (figura 1.2.) (Cohen, 1989; Halliwell, 1994; Winston, 1997; Kuss, 2005).

O peróxido de hidrogénio, H₂O₂, intermediário formado pela reacção de dismutação de O₂^{•-} catalisada pelo enzima SOD e pela redução tetravalente do O₂ a H₂O, não é um radical livre, mas um agente oxidante. Na presença do anião superóxido e de iões metálicos de transição, o H₂O₂ pode gerar OH[•] pela reacção de *Fenton* (figura 1.3). O OH[•], formado por esta reacção e pela redução tetravalente do O₂, é altamente reactivo, causando danos no DNA

e/ou iniciando a peroxidação lipídica. No entanto, o H₂O₂ não é apenas um metabolito celular tóxico para a célula, a sua geração aumenta a resposta a vários factores de *stress* implicando-o como factor chave na tolerância a estes agentes, onde, após a exposição inicial, as células ganham resistências ao agente (Gilgun-Sherki, 2002).

O H₂O₂ é continuamente gerado durante o metabolismo celular normal. O aumento dos níveis de H₂O₂ desencadeia uma resposta celular, que inclui activação enzimática, indução da expressão genética, danos celulares, morte celular programada (PCD) ou morte por necrose (Neill, 2002).

Algumas das principais defesas enzimáticas contra o H₂O₂ são o ciclo oxidação-redução do glutatono, presente no citoplasma e no mitocôndrio e as catalases presentes no citoplasma e peroxissomas (Davies, 1994; Tanaka, 1999; Costa, 2001; Fang, 2002; Kuss, 2005).

O radical hidróxilo, OH[•], é a espécie radicalar mais reactiva e a que apresenta tempo de meia-vida mais curto, actuando praticamente no seu local de formação. Este radical forma-se principalmente segundo a reacção de *Fenton*, por clivagem homolítica do peróxido de hidrogénio ou pela radiólise da molécula de água. Reage com uma série de endobióticos, glúcidos, ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, causa modificação no DNA, ao nível das suas bases azotadas e quebra de ligações, danos nas proteínas e inactivação enzimática (Cohen, 1989; Júnior, 1998; Vannucchi, 1998; Kuss, 2005; Vieira, 2006; Bonatto, 2007; Letelier, 2007).

O papel dos metais de transição na formação de ROS pode ser explicado pelas reacções de *Fenton* e *Haber-Weiss* (figura 1.4.). O ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reacções de oxidação de biomoléculas, embora o cobre possa também catalisar a reacção de *Haber-Weiss* (Halliwell, 1984; Stohs, 1994; Ferreira, 1997).

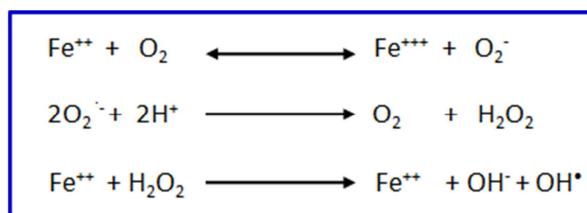


Figura 1.3. Reacção de *Fenton*.

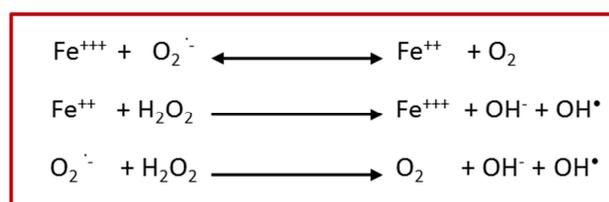


Figura 1.4. Reacção de *Haber-Weiss*.

A produção de ROS é uma consequência normal de uma série de reacções bioquímicas essenciais ao organismo e resulta em danos biológicos apenas quando essa produção se torna anormalmente elevada e/ou quando as defesas antioxidantes estão diminuídas. Essas reacções envolvem quatro vias importantes como catálise por oxido-redutases, autoxidação das biomoléculas, acção das peroxidases, acção catalítica de iões metálicos, como as reacções de *Fenton* e *Haber-Weiss* (Gutteridge, 1993; Halliwell, 1994).

Estas espécies para além de serem geradas como resultado do simples metabolismo celular aeróbio podem também resultar de agressões externas ao organismo como radiação UV, raios-X, contaminação radioactiva, fitofármacos, solventes industriais, poluição, entre outros, que levam à formação dos radicais livres exógenos (Kumpulainen, 1996; Gliszczynska-Swiglo, 2005).

Como já foi referido, os organismos expostos ao dióxigénio, como as leveduras, produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS), no seu metabolismo basal e como resposta a agentes de *stress*, (Sies, 1997; Santos-Ocanã, 1998). Para neutralizar o efeito oxidante destas espécies, os organismos, no seu processo evolutivo desenvolveram sistemas de defesa antioxidante que conseguem controlar e restabelecer o equilíbrio, como protecção contra a toxicidade do dióxigénio e espécies reactivas derivadas. O *stress* oxidativo pode ser compreendido como a condição na qual a produção de ROS está aumentada, as defesas antioxidantes normais estão diminuídas ou ambos, levando a um desequilíbrio entre a proporção de espécies oxidantes e redutoras no meio intracelular, com predominância das primeiras (Sies, 1997; Frei, 1999; Gheldof, 2002; Pereira, 2002; Regoli, 2002; Azzi, 2003; Lushchark, 2004; Butylina, 2007; Herrero, 2007; Lee, 2007; Rui-Yan, 2007).

As consequências do *stress* oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com a intensidade com que ocorre. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), os principais efeitos são: proliferação celular, onde algumas células podem responder ao *stress* oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular; adaptação, com aumento das defesas celulares, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida, onde os alvos de danos oxidativos podem ser redireccionados, ou, a produção basal de ROS diminuída; danos celulares em um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas ou DNA; senescência, com sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido; morte celular, onde após o dano a célula desencadeia o processo de morte celular, uma vez que danos oxidativos no DNA, mitocôndrio, ou outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de actuação das ROS e de outras espécies reactivas. Todos os componentes celulares são susceptíveis à acção das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Gonzalez, 1992; Arouma, 1994; Ferreira, 1997).

A peroxidação lipídica é o processo através do qual as ROS exercem acção deletéria sobre os resíduos acilo polinsaturados dos fosfolípidos de membrana, através de um conjunto de reacções químicas que envolvem a sua deterioração oxidativa. As fosfolipases, activadas pelas ROS rompem os fosfolípidos, libertando resíduos acilo insaturados, provocando efeitos adversos como a ruptura da membrana celular e consequentes falhas nas bombas Na/K e Ca/Mg, mutações do DNA, oxidação de lípidos insaturados; formação de resíduos químicos como o malonaldeído e comprometimento funcional de componentes da matriz extracelular como os proteoglicanos, o colagénio e a elastina (Halliwell, 1989; Costa, 2001; Lima, 2001; Kuss, 2005).

A peroxidação lipídica é uma reacção em cadeia, caracterizada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão representadas na figura 1.5., onde L representa o lípido. A iniciação ocorre quando um agente oxidante dá origem a um radical peróxilo iniciador (LOO[·]) através de uma reacção com o lípido (L) ou com um lipoperóxido pré-existente (LOOH). A propagação corresponde a ciclos de remoção de átomos de hidrogénio de ácidos gordos polinsaturados por LOO[·] para gerar novos LOO[·]s (após adição de O₂), o que resulta numa rede de conversão de lípidos a LOOHs que gera produtos secundários tais como o malonaldeído. A etapa de terminação inicia-se com a neutralização dos radicais formados por acção de antioxidantes lipossolúveis, sendo potentes inibidores da peroxidação lipídica, ou pela reacção de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares (Gonzalez, 1992; Arouma, 1994; Ferreira, 1997; Júnior, 1998; Costa, 2001; Lima, 2001; Pereira, 2002).

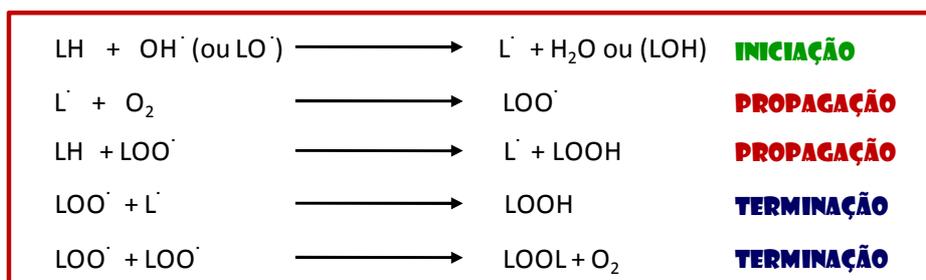


Figura 1.5. Etapas da peroxidação lipídica.

O malonaldeído (MDA) é um dialdeído de cadeia curta, que pode ser quantificado por reacção com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos lipoperóxidos particularmente quando na presença do grupo hemo e/ou glutationo e a sua concentração tem sido utilizada como marcador para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica pode ocorrer por via enzimática, mediada por cicloxigenases e peroxidases, e por via não-enzimática, via mecanismos de auto-oxidação que envolvem a participação de espécies reactivas de oxigénio, metais e outros radicais livres (Vasconcelos 2001; Kuss, 2005; Cipak, 2007; Martinez, 2007).

A peroxidação lipídica desempenha também, um papel muito importante na proliferação celular, especialmente de células tumorais. Há autores que sugerem que os produtos da peroxidação lipídica estão envolvidos no controlo da divisão celular (Gonzalez, 1992; Pereira, 2002; Cipak, 2007).

Para garantir o correcto funcionamento celular, deve haver uma compensação entre a formação de ROS e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula num estado geral reduzido. Se as defesas antioxidantes se tornarem insuficientes frente à excessiva produção de ROS, ocorre o já referido *stress* oxidativo (Halliwell, 1989; Halliwell, 1995; Sies, 1997; Arnao, 2000; Júnior, 2001; Gheldof, 2002; Scheneider, 2004; Palozza, 2007). Assim, os antioxidantes podem ser compreendidos, do ponto de vista biológico, como substâncias que, quando presentes em baixa concentração relativa à de um substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação desse substrato, podendo, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou inibir a fase de propagação, não podendo, contudo, evitar totalmente a oxidação. Isto implica que os diferentes antioxidantes podem actuar em níveis e com mecanismos de acção distintos (Halliwell, 1989; Halliwell, 1995; Sies, 1997; Júnior, 1998; Costa, 2001; Azzi, 2003; Herrero, 2007; Bednarska, 2008). Um pró-oxidante é toda a substância tóxica que pode causar danos oxidativos aos componentes celulares resultando em vários eventos patológicos e/ou doenças, sendo sinónimo de espécies reactivas. (Prior, 1999; Fukumoto, 2000) Os antioxidantes com efeitos preventivos - primários - podem actuar evitando o processo de iniciação pela captação de radicais iniciadores (R[·]) que agem como doadores de H⁺ ou de electrões (figura 1.6.) (Halliwell, 1989; Fukumoto, 2000; Martínez-Tomé, 2001; Bjelakovic, 2007):

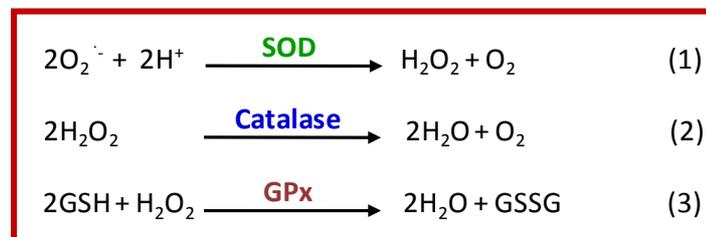


Figura 1.6. Processo de transformação de radicais livres pela acção de antioxidantes primários.

Entre esses compostos incluem-se antioxidantes sintéticos, carotenóides, tocoferóis, compostos fenólicos e alguns aminoácidos que têm também a capacidade de agir como quelantes de metais (Zheng, 2001; Sellappan, 2002).

Os antioxidantes podem também agir na decomposição de peróxidos, convertendo-os na sua forma inactiva por acção de agentes redutores, bloqueando a reacção em cadeia, por meio da captação de intermediários reactivos como radicais peróxilo e alcóxilo. Esses são os antioxidantes secundários. Os compostos fenólicos, antioxidantes sintéticos, vitaminas A e E, aminas, grupos tiol e dissulfuretos são capazes de agir sobre peróxidos, evitando a propagação da reacção de oxidação (Doudican, 2005; Bjelakovic, 2007).

Actualmente, as ROS estão associadas a várias formas de danos tecidulares, patologias e processo de envelhecimento. Os organismos aeróbios desenvolveram processos contra os efeitos deletérios dos radicais livres e das espécies tóxicas derivadas, incluindo defesas enzimáticas e não-enzimáticas (Sies, 1997; Elliot, 1999; Niki, 2001; Fang, 2002; Bonatto, 2007; Cipak, 2007). O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente pelos enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do anião radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e O_2 (Equação 1), a catalase (CAT) que actua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O (Equação 2) e o glutathione peroxidase (GPx), que actua sobre peróxidos em geral, com utilização do glutathione como cofactor (Equação 3) (Sies, 1997; Arrigoni, 2001; Kuss, 2005; 2006; Bonatto, 2007).



Os principais agentes antioxidantes não-enzimáticos podem ser vitaminas lipossolúveis como A e E ou vitaminas hidrossolúveis como a C e as do complexo B, o β -caroteno e diversos oligoelementos como o zinco, cobre, selénio, magnésio, e fitoflavonóides. Existe ainda uma série de outros antioxidantes não-enzimáticos que participam na defesa contra as espécies reactivas do oxigénio nos sistemas biológicos como, por exemplo, o glutathione, a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e os compostos fenólicos de origem vegetal (Halliwell, 1990; Sies, 1991; Sies, 1997; Arnao, 2000; Júnior, 2000; Fang, 2002; Ou, 2002; Bonatto, 2007; Cipak, 2007).

A acção conjunta da SOD, CAT e peroxidases assegura baixos níveis de anião superóxido e H₂O₂ reduzindo os riscos de formação do radical hidróxilo (figura 1.7.) (Arrigoni, 2001).

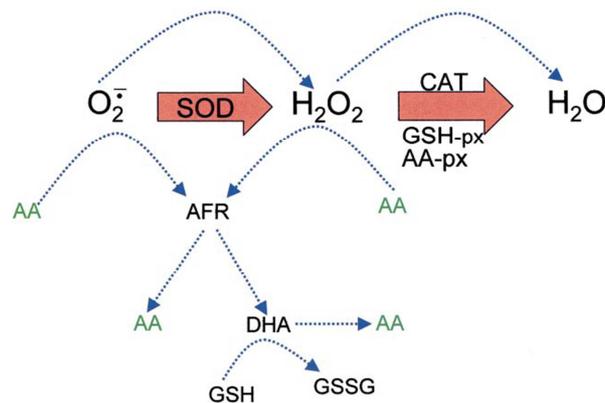


Figura 1.7. O papel do ascorbato na desintoxicação de ROS. As linhas a azul indicam reacções não-enzimáticas. Adaptado de Arrigoni, 2001.

O glutathione reduzido (GSH, L- γ -glutamyl-L-cisteinilglicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) não-proteico mais abundante no meio intracelular. Exerce funções essenciais na célula, sendo considerado por diversos autores como um bom marcador de saúde celular, podendo o seu decréscimo reflectir um aumento da produção endógena de antioxidantes, numa extensão que excederia a capacidade celular de desintoxicação (Izawa, 1995; Grant, 1996; Cotgreave, 1998; Júnior, 2001). Do ponto de vista estrutural, é um tripéptido formado por aminoácidos não-essenciais, onde a sua capacidade antioxidante é determinada pelo grupo -SH, presente na cisteína, sendo capaz de reagir com um electrão desemparelhado do radical livre, formando o radical GS \cdot , que produz por dimerização, o dissulfureto de glutathione (Kirlin, 1999; Lenton, 2000). Destaca-se ainda a sua função como cofactor de vários enzimas em diferentes vias metabólicas, principalmente da família dos enzimas glutathione peroxidase (GPx), em que desempenha um papel protector contra o *stress* oxidativo, com a sua oxidação a dissulfureto de glutathione (GSSG). Desempenha ainda funções como sequestrador de radicais hidróxilo e de oxigénio singuleto. O GSH é o único tiol não-proteico presente em espécies aeróbias e o seu papel intracelular inclui a desintoxicação de xenobióticos (figura 1.8.), através de processos de conjugação, e de espécies reactivas de oxigénio, via glutathione peroxidase (Arouma, 1994; Ferreira, 1997; Cotgreave, 1998; Pljesa-Ercegovac, 2006; Seo, 2006; Menone, 2007; Torres-Franklin, 2007).



Figura 1.8. Processo pelo qual o glutathione participa na desintoxicação de hidroperóxidos (Júnior, 1998).

Outra resposta protectora em que o GSH está envolvido corresponde à regeneração da vitamina E oxidada, de acordo com as equações (Júnior, 1998):

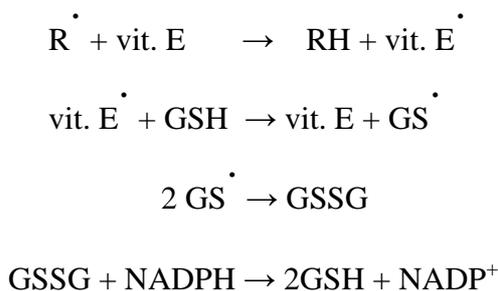


Figura 1.9. Reacção de regeneração da vitamina E oxidada por intervenção do GSH (Júnior, 1998).

Após exposição do GSH ao agente oxidante, ocorre a sua oxidação a GSSG. A recuperação de GSH dá-se pelo enzima GR (figura 1.10.), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de protecção celular pois, baixas concentrações de GSH estão associadas a *stress* oxidativo. O enzima glutationo redutase é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses fosfato. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como a deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GR que, como referido anteriormente, é o enzima responsável por manter o glutationo na sua forma reduzida e, possivelmente, por controlar o estado redox de NADP em tecidos onde o GSSG está disponível (figura 1.10.) (Ferreira, 1997; Schafer, 2001; Mahmoud, 2003).

O enzima glutationo peroxidase, foi descoberto por Mills em 1959, em tecidos de mamíferos. Não se observa a sua presença em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrado em algumas algas e fungos. Em *S. cerevisiae* foram detectados três tipos distintos de proteínas com actividade glutationo peroxidase, GPx1 (YKL026C), GPx2 (YBR244W) e GPx3 (YIR037W). O nível de expressão basal do GPx3 é muito superior ao dos outros dois genes, não encontrando na literatura qualquer referência à sua indução por qualquer agente de *stress*. A família GPx integra o grupo das selenoproteínas, que têm no seu centro activo o selénio (Se) reconhecido como nutriente antioxidante, obtido da dieta, ligado à metionina e ligado à cisteína (Izawa, 1995; Mahmoud, 2003; Arenas-Rio, 2007; Lee, 2007; Rui-Yan, 2007). Embora o enzima GPx tenha acção fundamentalmente citoplasmática, pode também expressar-se nos mitocôndrios (Schneider, 2004).

A catalase, cujo centro activo contém o grupo hemo está localizada no peroxissoma, principal organelo responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação dos ácidos gordos

de cadeia longa. É uma hemoproteína citoplasmática que apresenta especificidade para o peróxido de hidrogénio reduzindo-o a H₂O e O₂ (figura 1.10.), não actuando sobre peróxidos orgânicos (Halliwell, 1985; Scheneider, 2004; Vibet, 2007). Os nutrientes mais importantes coadjuvantes da catalase são o ferro e os tocoferóis, que se encontram distribuídos na fase hidrófoba da membrana celular. A catalase evita a acumulação de metahemoglobina e actua como regulador fisiológico dos níveis intracelulares de H₂O₂ diminuindo os seus níveis e evitando assim a degeneração e a morte celular. Alguns autores sugerem que a catalase é o enzima encarregue de fazer a conversão do H₂O₂ em H₂O e O₂ quando este está em elevadas concentrações no meio, no entanto, quando o peróxido de hidrogénio está presente em baixa concentração como acontece em condições fisiológicas normais, é o glutathione peroxidase que se encarrega de fazer a transformação do H₂O₂ em H₂O. Na literatura foi possível encontrar também alguns autores que mostram que no caso das leveduras, as catalases desempenham um papel antioxidativo importante na fase estacionária (Halliwell, 1985; Scheneider, 2004; Kuss, 2005; Vibet, 2007).

Na inactivação de um agente oxidante ocorre a produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de oxi-redução está íntegro, haverá recuperação de GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protector, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, condição característica de *stress* oxidativo. Assim, a magnitude do *stress* oxidativo em sistemas biológicos pode ser monitorizada pela razão GSH/GSSG (Kirlin, 1999).

Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutathione reduzido e oxidado (GSH/GSSG) é mantida em níveis elevados. O enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) não deixa de estar envolvido com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH), indispensáveis às reacções anabólicas e de defesa contra danos oxidativos, para regeneração do GSSG a GSH (figura 1.10.). Quando o fornecimento de NADPH é afectado, a função antioxidante do glutathione também fica prejudicada, pois o GSSG não pode ser regenerado, causando sérios danos no metabolismo celular. Neste sentido, o G6PD também pode ser considerado um enzima antioxidante coadjuvante (Ferreira, 1997; Sies, 1997; Halliwell, 2007).

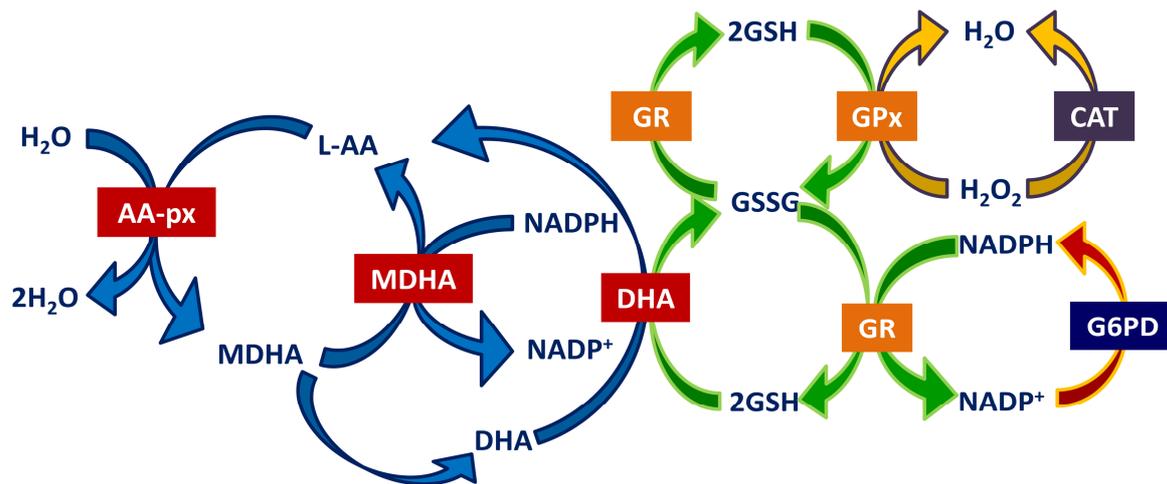


Figura 1.10. Interação metabólica entre catalases, ciclo de oxidação-redução do glutatióno, ciclo glutatióno-ascorbato e via das pentoses fosfato. Os equivalentes redutores sob a forma de NADPH produzidos pela acção do G6PD actuam como doadores de electrões na regeneração do GSH, e como ligando da catalase. O NADPH actua também como doador de electrões no ciclo do ascorbato e noutras reacções enzimáticas essenciais à biossíntese redutora. Adaptado de Davey (2000).

O ascorbato é uma molécula polar com quatro grupos hidróxilo (OH) na sua constituição, sendo que dois deles ocupam a posição C=C podendo interagir entre si por ligações de hidrogénio. É um antioxidante hidrossolúvel envolvido em múltiplas funções biológicas. É cofactor de vários enzimas, como as hidroxilases de prolina e lisina, envolvidas na biossíntese do colágeno e a dopamina-beta-hidroxilase, que converte a dopamina em adrenalina, sendo também importante a absorção do ferro proveniente da dieta, devido à sua capacidade para reduzir a forma férrica (Fe³⁺) a ferrosa (Fe²⁺), favorecendo a absorção do ferro não-hemático no tracto gastrointestinal (Fornaro, 1998). Constitui uma cetolactona de seis carbonos e um potente agente redutor que se oxida facilmente e de modo reversível a ácido dihidroascórbico. É capaz de reduzir a maioria das ROS fisiologicamente relevantes formadas nos sistemas biológicos. Em meio fisiológico encontra-se predominantemente na forma de monoanião ascorbato. A oxidação unieletrónica do ascorbato leva à formação do radical ascorbilo, que pode ser considerado um indicador de *stress* oxidativo. Esta acção antioxidante do ascorbato é importante para regenerar o radical tocoferilo a alfa-tocoferol, preservando a capacidade antioxidante deste último nas membranas biológicas, participando assim no mecanismo protector contra a peroxidação lipídica (Niki, 1991; Davey, 2000; Wilson, 2005). Os produtos da oxidação do ascorbato são o radical ascorbilo e dihidroascorbato (Figura 1.11.). O radical ascorbilo é relativamente estável e atóxico, quando comparado com outros radicais livres. Esta propriedade torna o ascorbato um eficiente

antioxidante, capaz de eliminar espécies altamente reactivas e de formar um radical de reactividade baixa. O radical ascorbilo pode ser convertido novamente em ascorbato (AscH⁻) por redutases dependentes de NADH ou por dismutação do radical ascorbilo a ascorbato e dihidroascorbato. Este último é pouco estável a pH fisiológico sendo, geralmente, reduzido a AscH⁻, ou hidrolisado irreversivelmente. Em situação de *stress* oxidativo, os níveis de radical ascorbilo são elevados possibilitando o seu uso como indicador de *stress* oxidativo em sistemas biológicos (Hancock, 2002).

Apesar da grande eficiência antioxidante, o ascorbato também age paradoxalmente como pró-oxidante *in vitro*. Soluções de ascorbato e ferro são usadas há décadas para induzir modificações oxidativas em lípidos, proteínas e DNA. A reacção de *Fenton*, redução de H₂O₂ por Cu⁺ ou Fe²⁺ a radical hidroxilo, é favorecida na presença de ascorbato, capaz de reduzir os metais de transição, tornando-os aptos para esta reacção. *In vivo* os metais encontram-se complexados a proteínas estando, portanto, indisponíveis (Lee, 2000; Hancock, 2002). Além da captação de radicais livres, estudos em culturas de células demonstraram que o ascorbato pode alterar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, apoptose e diferenciação celular. O mecanismo pelo qual o ascorbato altera a expressão de genes é desconhecido, mas supõe-se que actue indirectamente na expressão génica, alterando a expressão de genes que respondem a espécies oxidantes ou directamente, modulando a ligação de alguns factores de transcrição ao núcleo (Davey, 2000).

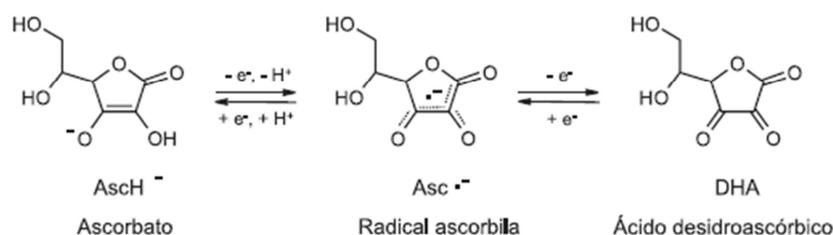


Figura 1.11. Oxidação do ascorbato por um electrão (e⁻) com formação do radical ascorbilo que, ao ser oxidado novamente, gera dehidroascorbato. Os electrões são recebidos por compostos oxidantes (Adaptado de Davey, 2000).

- *Biossíntese do ascorbato*

Aparentemente, nem o ascorbato nem os enzimas relacionados com este estão presentes em *Escherichia coli* e outras bactérias. A presença de D-araboascorbato foi detectada em *Penicillium*, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* podem sintetizar o análogo do carbono 5, o D-eritroascorbato (D-EAA) via D-arabinose e D-arabinono-1,4-

lactona. Todas as plantas conseguem sintetizar níveis elevados de ascorbato por via de quatro etapas, a via *Smirnoff-Wheeler* (Davey, 2000; Arrigoni, 2001; Wilson, 2005).

Devido ao uso generalizado de leveduras na bio-indústria, vários estudos encontrados na literatura sugeriram que este tipo de células contém ácido L-ascórbico (L-AA), contudo, reavaliações recentes indicam que as células de levedura crescem em meios comuns de substratos deficientes em L-AA, que é substituído pelo D-eritroascobato (D-EAA) que cumpre funções antioxidativas. As células de levedura são, no entanto, conhecidas por acumularem L-AA, quando cultivadas na presença de substratos não fisiológicos: L-gulonolactona (L-GuL), L-galactonolactona (L-GL) ou L-galactose, intermediários das vias biossintéticas L-AA de animais e plantas, respectivamente. Evidências crescentes sugerem que a biossíntese de L-AA a partir destes substratos em leveduras ocorre através da actividade dos enzimas da via biossintética D-CEA. Ao contrário dos enzimas correspondentes em plantas, os enzimas D-arabinose desidrogenase (D-ARA) e D-arabinolactona oxidase (D-AL) mostram ampla especificidade para o substrato *in vitro*, sendo capazes de oxidação, não só de D-ARA mas também de L-gal, L-fucose, L-xilose e das suas lactonas correspondentes (Lee, 2000; Hancock, 2002; Wilson, 2005).

Em alguns compartimentos celulares a regeneração de ascorbato é prejudicada pela carência de equivalentes redutores sob a forma de NAD(P)H e GSH. Apesar de o ascorbato poder ser considerado um antioxidante eficiente e, conseqüentemente, um activo agente no combate às ROS, não se pode ignorar que em algumas circunstâncias, como acontece na presença de iões metálicos e condições adequadas de pH, actua como pró-oxidante chegando a causar efeitos mutagénicos (Davey, 2000; Kinnunen, 2006).

As substâncias envolvidas no binómio antioxidante/pró-oxidante determinam o ambiente redox biológico e podem ser quantificadas por técnicas bioquímicas como a determinação espectrométrica, cromatográfica, electroanalítica, de ressonância magnética e espectrometria de massas entre outras, constituindo uma ferramenta importante no estudo de fenómenos biológicos vinculados ao *stress* oxidativo (Arouma, 1994; Ghiselli, 2000).

No que se refere a antioxidantes, alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total (CAOT), em vez da sua análise isolada, principalmente devido à interacção que pode existir entre eles e os constituintes do ambiente celular (Ghiselli, 2000). Neste tipo de análise tem-se em conta a acção acumulativa de todos os antioxidantes presentes obtendo-se um parâmetro integrado, capaz de revelar alterações no equilíbrio redox existente *in vivo* (Thaipong; 2006; Halliwell, 2007).

Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao tipo de indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de captação (*trap assays*). Nesses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite a sua análise quantitativa (Cano, 1998; Re, 1998; Thaipong, 2006).

O interesse na determinação da capacidade antioxidante tem crescido com a crescente consciencialização e evidências da elevada importância das espécies reactivas de oxigénio no processo de envelhecimento e patogénese (Ou, 2001).

Cao e Prior (1994) desenvolveram o método chamado de capacidade de absorção de radicais oxigénio (ORAC) que permite a medição directa da capacidade antioxidante para eliminar radicais peróxido, uma das espécies de oxigénio reactivo (ROS) vulgarmente encontradas no organismo (Griffiths, 2001; Ou, 2001; Alarcón, 2007). Embora os princípios químicos fundamentais e o modelo matemático do método ORAC permaneçam iguais desde 1994, Prior e seus colaboradores, substituíram a prova original β -ficoeritrina (PE) um pigmento fluorescente de alga vermelha, por fluoresceína (FL), um composto fluorescente de baixo peso molecular e que, ao contrário da β -ficoeritrina, não interage com os agentes antioxidantes, demonstrando excelente foto-estabilidade e reduzindo o custo do método (Sánchez-Moreno, 2002; Alarcón, 2007). Assim, o método actualmente utilizado é baseado na oxidação da fluoresceína por radicais peróxido via mecanismo clássico de transferência de átomos hidrogénio (HAT). Os radicais livres são gerados pelo composto solúvel em água 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida (AAPH). Os radicais peróxido assim gerados medem o decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo. Os antioxidantes bloqueiam/impedem a oxidação da fluoresceína por parte dos radicais peróxido até todos os antioxidantes presentes na amostra estarem esgotados, após o qual o composto azo AAPH gerador de radicais peróxido reage e *quench* a fluorescência da fluoresceína (figura 1.12.) (Ou, 2002; Prior, 2003; Price, 2005; Kohri, 2008).

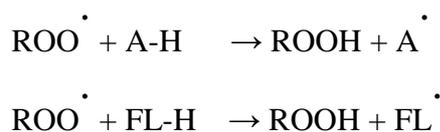


Figura 1.12. Reacção da tranferência de um átomo de hidrogénio (HAT) característica do método ORAC.

Há a combinação do tempo de inibição da acção dos radicais livres por antioxidantes usando a área abaixo da curva de decaimento de fluorescência (AUC) para quantificar a

actividade antioxidante total na amostra que é comparada a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações do análogo trolox da vitamina E solúvel em água (Kohri, 2008).

Ao contrário de outros ensaios o ORAC fornece uma medida directa da capacidade antioxidante contra a quebra hidrofílica da cadeia de radicais peróxilo através da técnica AUC ao invés da *fase lag* utilizada maioritariamente pelos outros métodos para quantificação dos radicais (Ou, 2002; Prior, 2003; Kohri, 2008).

O método DPPH desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995) é um método rápido, simples e barato para avaliar a capacidade antioxidante que envolve a captura do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) por antioxidantes, produzindo um decréscimo de absorvência a 515 nm. Este método tem sido amplamente utilizado para testar a capacidade dos compostos para actuar como sequestradores de radicais livres ou doadores de átomos de hidrogénio, assim como, para avaliar a actividade antioxidante em sistemas biológicos. O método DPPH pode ser utilizado para amostras sólidas ou líquidas e não apresenta especificidade para nenhum componente antioxidante em particular, fornecendo informação sobre a capacidade antioxidante total da amostra (Brand-Williams, 1995; Fukumoto, 2000; Lee, 2006).

Actualmente as ROS estão associadas a várias formas de danos celulares e processos de envelhecimento. Os organismos aeróbios, durante o seu processo de crescimento e como resposta ao *stress* ambiental, condicionado pela temperatura, carência de nutrientes e danos induzidos por radiações UV geram ROS. Contudo, a célula dispõe de um elaborado sistema enzimático e não-enzimático para as remover que é fortemente regulado para garantir o crescimento celular adequado (Franco, 2009). No entanto, deve-se considerar que em determinadas circunstâncias, as ROS, em geral, também desempenham um papel central na transdução de sinal e no mecanismo de acção enzimático, sendo a principal função de um antioxidante, enzimático ou não-enzimático, regular o excesso e não eliminar totalmente os radicais livres (Sies, 1997; Frei, 1999; Bonatto, 2007).

Em células de levedura senescentes podem ser detectadas marcas típicas de apoptose que podem ser resultantes de um aumento cronológico dos níveis de ROS intracelular. Na literatura encontra-se descrito que a diminuição do conteúdo intracelular de ROS prolonga o tempo de vida das células tanto no envelhecimento cronológico como no replicativo. Por outro lado, a depleção de glutathione intracelular de leveduras gera um perfil de fragmentação do DNA, característico da apoptose, e aumenta a sensibilidade celular ao H₂O₂. O enzima superóxido dismutase citoplasmático e mitocondrial, SOD₁ e SOD₂, respectivamente, são requeridos para a remoção de ROS da célula e para a sobrevivência a longo prazo da levedura. A sobreexpressão da catalase CTT₁, um elemento não essencial da levedura, reduz os níveis intracelulares de

H₂O₂ e protege as células contra a apoptose induzida pelo ácido acético (Madeo, 1997; Laun, 2006; Bonatto, 2007; López-Mirabal, 2007). O *stress* oxidativo e o aumento/crescente dos níveis intracelulares de ROS em levedura pode também ser causado pela deterioração de processos metabólicos que garantem a sobrevivência básica da célula (Costa, 2001; Temple, 2005).

A homeostasia de um organismo multicelular depende não só da sua capacidade em produzir novas células, mas também da capacidade destas de, individualmente, se autodestruírem quando se tornam supérfluas ou defeituosas, ou seja, depende da manutenção de um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (Madeo, 1997; Azevedo, 1999; Anazetti, 2007).

A morte celular fisiológica ocorre, primariamente, através de uma forma evolutiva e conservada de *suicídio* celular, denominada apoptose, em resposta a uma série de estímulos intrínsecos e extrínsecos. Ao contrário do outro tipo de morte, a necrose celular (Figura 1.13.), em que a célula é uma vítima passiva, a apoptose celular é uma forma activa de morte, em que a célula gasta energia para a execução deste processo de *suicídio* celular geneticamente programado, sendo por isso muitas vezes denominada de morte celular programada (PCD) (Azevedo, 1999; Zhang, 2001; Burhans, 2003; Baek, 2007; Hamann, 2008; Franco, 2009).

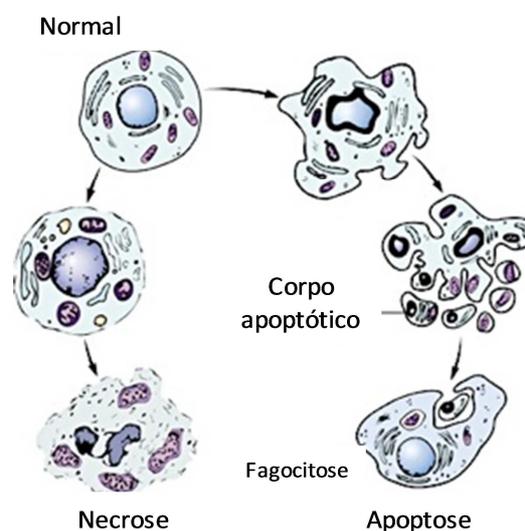


Figura 1.13. Processo de apoptose e necrose celular. Apoptose é a morte programada da célula, como se fosse uma auto-destruição. Necrose é a morte accidental, o que pode gerar lesões na célula, trata-se de um acontecimento degenerativo e irreversível.

A apoptose, processo identificado por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), é um processo extremamente coordenado que conduz à morte da célula e que é essencial, tanto durante o

desenvolvimento de um organismo, como na homeostase e manutenção de organismos pluricelulares. Apesar de ser necessário gerar novas células para manter processos vitais, convém não esquecer que o bom funcionamento de um determinado tecido, torna também imprescindível a eliminação de células prejudiciais, tais como células auto-reactivas do sistema imunitário, células infectadas por vírus, ou células com danos irreparáveis no DNA, que em organismos pluricelulares potencialmente degenerariam em tumores, são erradicadas dos organismos por apoptose. Esta remoção selectiva e rápida de células ocorre sem prejuízo dos tecidos circundantes (Jacobson, 1996; Madeo, 1997; Fröhlich, 2001; Anazetti, 2007).

A indução de apoptose pode ser dividida em três etapas – a interacção do agente indutor com a célula, a transferência do sinal bioquímico de morte e a execução pela maquinaria apoptótica. Diferentes sinais extracelulares e vias de transdução de sinal convergem numa via comum final durante a fase de execução da apoptose celular. Existem essencialmente duas vias de sinalização celular que conduzem à morte da célula por apoptose – a via membranar ou extrínseca, que envolve a activação de receptores membranares, e a via mitocondrial ou intrínseca (Davidson, 2001; Ludovico, 2002; Franco, 2009).

Em termos morfológicos e bioquímicos, a apoptose é caracterizada por alterações na membrana celular, formação de vacúolos, encolhimento e diminuição do contacto entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina, despolarização da membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidos. No centro deste processo encontra-se um conjunto de enzimas proteolíticas, designado por caspases (Madeo, 1997; Azevedo, 1999; Moon, 2001; Madeo, 2004; Zadrag, 2005; Anazetti, 2007; Fabrizio, 2007).

Existem determinados sinais que levam uma célula a induzir apoptose, como por exemplo, concentração elevada de agentes oxidantes, DNA danificado (tanto devido a acção de agentes oxidantes como de luz ultravioleta, radiação e toxinas), acumulação de proteínas incorrectamente enroladas, ou presença de moléculas que se ligam a receptores existentes na superfície das células, como o ligando FAS ou o TNF- α , factor de necrose tumoral. Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às alterações ambientais (Zhvivotovsky, 1997; Moon, 2001; Madeo, 2004; Zadrag, 2005; Anazetti, 2007; Fabrizio, 2007).

A morte celular apoptótica em leveduras foi considerada durante muitos anos como pouco provável uma vez que a existência de um programa de suicídio celular não fazia sentido numa população constituída por células individuais. No entanto, este processo considerado

exclusivo de organismos multicelulares foi descoberto por Madeo na levedura *S. cerevisiae*. A *S. cerevisiae* expressa marcadores apoptóticos típicos quando é tratada com vários agentes de stress como o peróxido de hidrogénio e o ácido acético. Por outro lado a PCD em leveduras tem sido associada com outros eventos apoptóticos como a fragmentação mitocondrial, libertação do citocromo c, envelhecimento e fosforilação da histona H2B, factos que quando considerados em conjunto, confirmam que o sistema de apoptose está presente e funcional nas leveduras (Zhivotovsky, 1997; Madeo, 2004; Owsianowski, 2007).

Estudos avançados sobre apoptose em leveduras revelaram a ocorrência de uma rede de factores de regulação, que podem ser produzidos por eventos intra ou extracelulares. No entanto, a pesquisa em base de dados, realizada após a sequenciação completa do genoma de *S. cerevisiae* não detectou ORFs de alguns dos principais executantes de apoptose, como as caspases da família do Bcl-2/Bax ou Apaf-1, semelhante ao que acontece na apoptose de metazoários. Contudo, as leveduras são utilizadas como ferramenta celular em estudos de apoptose. No entanto a expressão de alguns genes pró-apoptóticos incluindo Bax, caspases e Apaf-1/Ced-4 provocam a morte das células de levedura. Ligr (1998) demonstrou que a proteína Bax medeia a morte celular em *S. cerevisiae* com características típicas de apoptose, como a externalização da fosfatidilserina para a superfície da membrana citoplasmática, condensação da cromatina, clivagem do DNA e formação de bolha na membrana (Frohlich, 2001; Moon, 2001; Lipton, 2002; Leadsham, 2007; Owsianowski, 2007).

2. Problema

As leveduras constituem na actualidade o grupo de microrganismos mais importante a ser explorado comercialmente pela Humanidade. São organismos unicelulares, GRAS e de fácil manipulação, cujas características as tornam num modelo biológico ideal para estudos moleculares no âmbito da resposta ao *stress* por metais em eucariotas.

Os organismos expostos ao dióxigénio, como as leveduras, produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS) como subprodutos do seu metabolismo basal e como resposta a agentes de stress, em que a produção de ROS aumenta.

A produção de ROS é uma consequência normal de uma série de reacções bioquímicas essenciais ao organismo podendo causar danos biológicos quando a produção se torna anormalmente elevada e/ou quando as defesas antioxidantes se encontram diminuídas, criando situações de *stress* oxidativo.

Os motivos apresentados, bem como o facto de a levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, ser nativa da região do Alentejo, foram determinantes na selecção deste modelo biológico para compreender o papel pró-oxidante do pentóxido de vanádio em células eucariotas, crescidas na ausência e na presença de pró e antioxidantes conhecidos.

O vanádio, no estado de oxidação +5 foi o metal de transição escolhido, pela sua importância como oligoelemento da dieta de muitos animais, bem como, pela sua aplicação com fins terapêuticos.

Avaliou-se a sobrevivência celular recorrendo a marcadores como a biomassa produzida, cfu, conteúdo em MDA ou actividade enzimática ALP, a capacidade antioxidante mediada pelo glutathione e por outras moléculas antioxidantes de pequena dimensão, assim como, a capacidade antioxidante mediada pelos enzimas GR, G6PD, GPx, CAT A e CAT T, tendo em vista esclarecer os mecanismos moleculares de resposta ao pentóxido de vanádio.

3. Objectivos

3.1. Gerais

Este trabalho teve como principal objectivo utilizar a levedura vínica nativa *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ como modelo eucariota para identificar e compreender o papel pró-oxidante do V₂O₅.

3.2. Específicos

Conhecer:

- agentes pró e antioxidantes;
- métodos para a quantificação da capacidade antioxidante em sistemas biológicos;
- métodos ORAC e DPPH para detectar capacidade antioxidante;
- métodos para a quantificação de ROS;
- as características físico-químicas e a reactividade do V₂O₅, H₂O₂ e ascorbato;
- metodologia para avaliar a resposta de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao ascorbato, H₂O₂ e V₂O₅;
- a resposta de *S. cerevisiae* UE-ME₃ à exposição prolongada ao V₂O₅, H₂O₂ e ascorbato, sobre marcadores enzimáticos e não enzimáticos de *stress*.

Compreender:

- papel dos agentes pró e antioxidantes em estudo;
- procedimentos experimentais ORAC e DPPH;
- procedimentos experimentais para a quantificação de ROS;
- as propriedades físico-químicas do V₂O₅, H₂O₂ e ascorbato;
- os protocolos para avaliar a resposta ao V₂O₅ por *S. cerevisiae* UE-ME₃;
- os efeitos gerados em *S. cerevisiae* UE-ME₃ pela exposição prolongada ao V₂O₅, sobre marcadores enzimáticos e não-enzimáticos de *stress*.

Valorizar:

- a curva de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃;
- funções biológicas de pró e antioxidantes importantes para compreender a acção do pentóxido de vanádio em *S. cerevisiae* UE-ME₃;

- a informação disponibilizada pelos métodos ORAC, DPPH, de medição da capacidade antioxidante;
- a informação disponibilizada pela quantificação de ROS;
- propriedades físico-químicas do H₂O₂ e ascorbato relevantes para interpretar a acção do V₂O₅ em *S. cerevisiae* UE-ME₃;
- protocolos experimentais para detectar a resposta ao *stress* pelo V₂O₅ por parte da *S. cerevisiae* UE-ME₃;
- respostas metabólicas ao V₂O₅ por *S. cerevisiae* UE-ME₃, em termos de conteúdo em GSH, GSSG, MDA e ROS, bem como, actividades enzimáticas ALP, GR, GPx, G6PD, CAT T e A e a capacidade antioxidante ORAC, DPPH.

Aplicar:

- avaliar resposta *in vivo* por *S. cerevisiae* UE-ME₃ a outros compostos de vanádio;
- a resposta *in vivo* por *S. cerevisiae* UE-ME₃ a outros metais;
- conhecimentos da resposta *in vivo* por *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao vanádio na elaboração de mecanismos interpretativos da resposta à toxicidade dos metais por células eucariotas.

4. Metodologia

4.1. Estratégia adoptada

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

Local de Realização: Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III, do Departamento de Química sito no Colégio Luis António Verney, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

Apoios: Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) e Departamento de Química, Universidade de Évora.

Duração: Um ano lectivo.

Modelo biológico: Levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃
Estirpe isolada em vinhos regionais do Alentejo e depositada na colecção do laboratório de enologia - Universidade de Évora.

Agente de stress: Pentóxido de vanádio (V₂O₅);

Agente pró e antioxidante: Peróxido de hidrogénio (H₂O₂);
Ascorbato (AA).

Ensaio: Leveduras crescidas durante 72 h

I – Controlo, sem exposição ao agente de stress;

II – exposição ao ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura;

III – exposição ao V₂O₅, (2 mM) no meio de cultura;

IV – exposição ao V₂O₅ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura;

V – exposição ao H₂O₂, (2 mM) no meio de cultura;

VI – exposição ao H₂O₂ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura.

Resultados obtidos ao longo da cultura: Acompanhamento da cultura pela turbidez a 640 nm e determinação das unidades formadoras de colónias (cfu).

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

Fracções sub-celulares seleccionadas: Peroxissomal

Pós-12000 g

Parâmetros:

- Conteúdo em proteínas do sobrenadante pós-12000 g e peroxissomal;
- Marcadores não-enzimáticos
 - Glutationo (GSH)
 - Dissulfureto do glutatino (GSSG)
 - Malonaldeído (MDA)
- Marcadores enzimáticos:
 - Glutationo redutase (GR)
 - Glutatio peroxidase (GPx)
 - Glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)
 - Catalases T e A
 - Fosfatase alcalina (ALP)
- Capacidade antioxidante:
 - ORAC (*Oxygen-Radical Absorbancy Capacity*)
 - DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
- Quantificação de ROS:
 - DCFH-DA

Técnicas utilizadas:

Cultura de microrganismos em meio líquido e sólido

Desintegração celular, homogenizador de sonda de ultra-sons

Fracionamento celular, centrifugação diferencial

Conteúdos - proteínas, espectrometria de absorção molecular

- MDA, GSH e GSSG, espectrometria de fluorescência

Actividades enzimáticas, ALP, GR, G6PD, GPx e CAT A CAT T, espectrometria de absorção molecular;

Capacidade antioxidante - DPPH, espectrometria de absorção molecular;

- ORAC espectrometria de fluorescência.

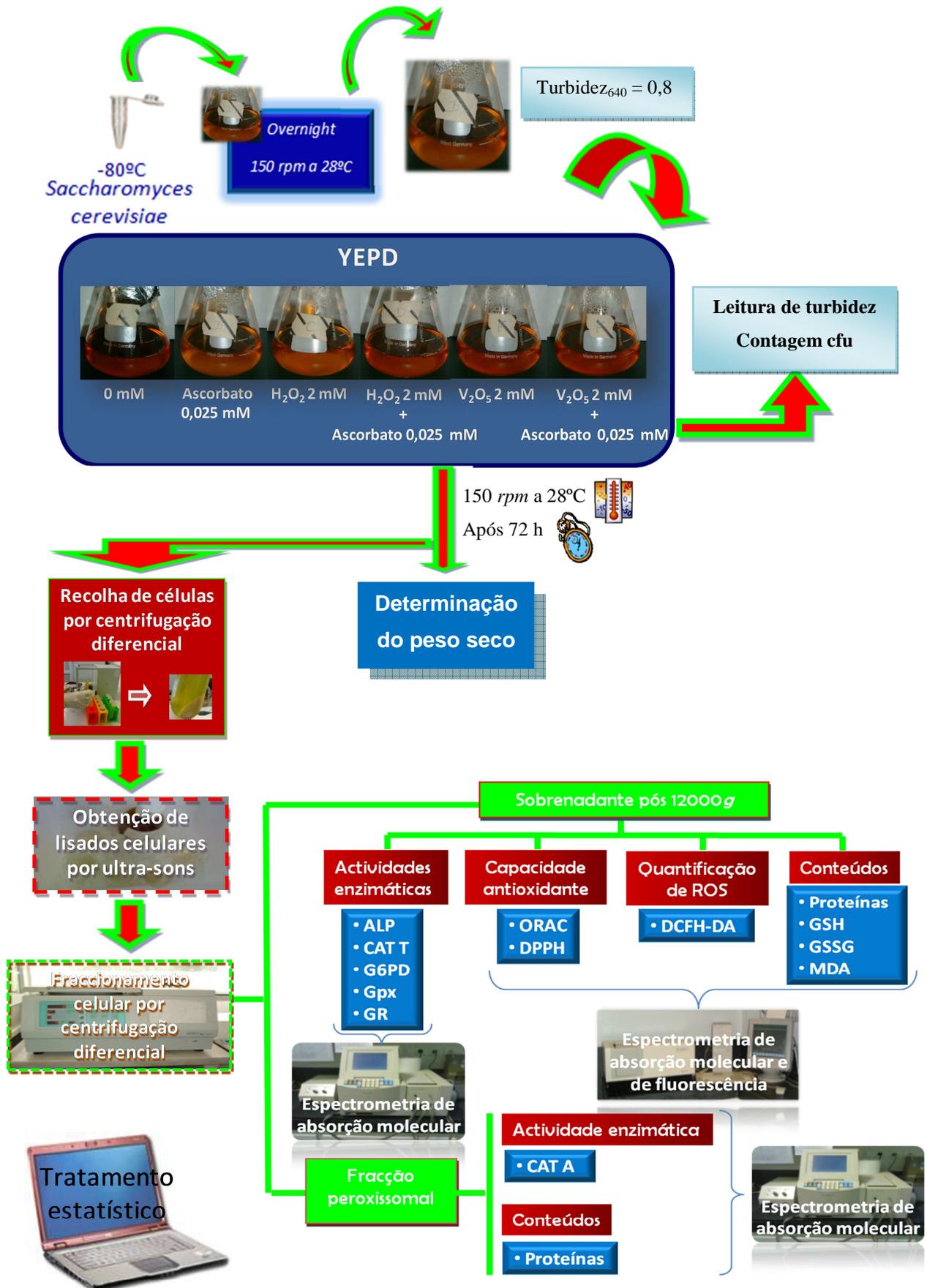
Quantificação de ROS – DCFH-DA, espectrometria de fluorescência.

Ferramentas informáticas - folha de cálculo e software para análise estatística

Análise estatística dos resultados:

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

4.2. Diagrama do trabalho



4.3. Protocolo experimental

4.3.1. Cultura de microrganismos

A levedura, *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, é uma estirpe isolada em vinhos regionais do Alentejo depositada na colecção do laboratório de enologia – Universidade de Évora, gentilmente cedida por Paulo Laureano e mantida no nosso laboratório a -80 °C em presença de glicerol. A estirpe utilizada neste estudo vem sendo utilizada no nosso laboratório em estudos Bioquímicos de sobrevivência a fenilureias e metais de transição (Rosado, 2009; Ferreira, 2006).

Na realização deste trabalho foi utilizado meio YEPD de acordo com a formulação clássica do mesmo descrito por Atlas (2006), assim, meio YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) era constituído por extracto de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) dissolvidos em água ultra-pura e esterilizado pelo calor húmido, ao qual posteriormente foi adicionada glucose (20 g/L) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µm) bem como volume adequado de solução aquosa de pentóxido de vanádio, peróxido de hidrogénio ou ascorbato. A preparação de meio YEPD sólido incluiu a adição de agar (20 g/L) antes da esterilização em autoclave.

Meio YEPD foi inoculado com *S. cerevisiae* UE-ME₃ preservada a -80 °C em presença de glicerol e incubado em banho com agitação (150 rpm), termostaticado a 28°C. Com esta cultura fresca inoculou-se meio YEPD, 1/3 de líquido para 2/3 de ar, e acompanhou-se o crescimento da cultura lendo a turbidez a 640 nm. Quando a cultura atingiu a fase exponencial média, 0,8 de turbidez a 640 nm, foi utilizada para inocular os meios YEPD e YEPD em presença de: ascorbato (0,025 mM); H₂O₂ (2 mM); H₂O₂ (2 mM) + ascorbato (0,025 mM); V₂O₅ (2 mM) e V₂O₅ (2 mM) + ascorbato (0,025 mM), de forma a iniciar o ensaio com culturas a 0,8 de turbidez, incubadas, nas condições anteriormente descritas, durante 72 h. No final do tempo de cultura, as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 20 min a 4°C e lavadas em água bi-destilada estéril para posterior lise e fraccionamento celular, como descrito em 4.3.4.

A concentração (2 mM) de agente de *stress*, pentóxido de vanádio, utilizada para o delineamento deste estudo foi considerada tendo em conta os resultados obtidos previamente aquando da realização do trabalho de estágio, concentração que parece desencadear maiores danos celulares (Gonçalves, 2010; Rosado, 2009). Assim, a fim de tentar perceber os mecanismos através dos quais a *S. cerevisiae* UE-ME₃ responde a esta concentração de pentóxido de vanádio, foram determinados no presente trabalho a sua resposta em meio

contendo o pró-oxidante peróxido de hidrogénio (2 mM) (Collinson, 1992) e em meio contendo o antioxidante ascorbato (0,025 mM) (Soares, 2003; Soares, 2005).

4.3.2. Monitorização do crescimento da levedura

O crescimento das culturas em estudo foi monitorizado pela leitura de turbidez a 640 nm durante 72 h, no tempo zero e com 24, 48 e 72 horas de cultura. Nos mesmos intervalos de tempo, procedeu-se à recolha em triplicado de amostras para determinação de unidades formadoras de colónias (cfu) em placas contendo meio YEPD as quais foram incubadas a 28°C em estufa até não se observar o aparecimento de novas colónias.

4.3.3. Determinação do peso seco

Amostras de células crescidas na ausência ou na presença de pró e antioxidantes foram recolhidas após 72 horas e antes do procedimento descrito na secção 4.3.1.. O sedimento foi colocado a secar em estufa a 80°C, até atingir peso constante.

4.3.4. Preparação das fracções pós-12000 g e peroxissomal

A preparação das fracções celulares foi realizada seguindo o método proposto por Lake (1987) e Sugimoto (1990). As células recolhidas de acordo com o descrito na secção 4.3.1. foram lavadas três vezes em água ultra-pura estéril. As células foram ressuspensas em 15 mL de tampão fosfato (10 mM), pH 7. Submeteu-se a suspensão celular, mantida a 4°C, a homogeneização por ultrasons (3 x 5min; 0,1; 1). Os lisados celulares foram a centrifugar a 12000 g, durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante pós-12000 g obtido foi guardado em alíquotas a -20 °C. O sedimento foi ressuspensado em 5 ml de tampão fosfato (10 mM), pH 7 e guardado em alíquotas, a -20 °C.

4.3.5. Parâmetros não-enzimáticos

4.3.5.1. Determinação da concentração de proteína total

Utilizou-se o método de Lowry (1951) cujo princípio reaccional se fundamenta na reacção, catalisada pelo cobre em meio alcalino, entre o reagente de Folin-Ciocalteu, ou ácido fosfomolibdicofosfotungstico, e os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas, levando à formação de um complexo de heteromolibdénio de cor azul intensa.

Embora a resposta do método dependa da composição em aminoácidos da proteína, o seu maior problema tem a ver com o elevado número de substâncias que podem interferir na reacção. Os interferentes podem ser aminoácidos e seus derivados, constituintes de soluções

tampão, detergentes, drogas, glúcidos, ácidos nucleicos, sais e reagentes sulfidrílicos. Contudo, escolhemos este método devido à sua elevada sensibilidade e ao facto de as substâncias interferentes encontrarem-se muito diluídas e, como tal, os seus efeitos estarem minimizados.

Tomamos uma alíquota de 0,1 mL de amostra que foi diluída com NaOH (0,5 M) para um volume total de 1,0 mL. Adicionamos a 1,0 mL de cada solução-padrão ou das amostras diluídas, 5,0 mL de reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1 % (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,2 % (p/v) em carbonato de sódio a 2 % (p/v). Após agitação no vortex, adicionamos 0,5 mL de solução de ácido fosfomolibdicofosfotungstico – o reagente de *Folin* – diluído $\frac{1}{2}$ com água bidestilada e voltamos a agitar. Aguardamos 30 min. Após nova agitação no vortex, lemos a absorvência a 720 nm.

Construiu-se a curva de calibração para o intervalo de concentração de 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$, utilizando uma solução de BSA de concentração conhecida como padrão (figura A1) e calculamos, por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

4.3.5.2. Determinação da concentração em GSH e GSSG

O nível citoplasmático de GSH e GSSG foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por Hissin (1976) que utiliza a NEM para sequestrar o GSH endógeno e OPT para desenvolver um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência.

No caso do GSH incubaram-se alíquotas da fracção sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada, em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (0,1M) com EDTA (0,005M) e 0,1 mL de OPT em etanol absoluto para um volume final de 2,0 mL. Agitou-se e deixou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 15 min, lendo-se a potência de fluorescência aos $\lambda_{\text{excitação}} 350 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} 420 \text{ nm}$.

Calculou-se a concentração em GSH na fracção sobrenadante pós-12000 g das amostras, por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente construída com GSH para o intervalo de concentração 0,5-100 μM (figura A2).

A determinação do conteúdo em GSSG na fracção pós-12000 g, iniciou-se pela incubação de alíquotas de sobrenadante pós-12000 g na diluição adequada, com NEM 20 μM durante 30 min à temperatura ambiente, da qual vamos tirar 0,1 mL que foram adicionados a 1,8 mL NaOH (0,1M) e 0,1 mL OPT, lendo-se a potência de fluorescência da mistura aos $\lambda_{\text{excitação}} 350 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} 420 \text{ nm}$.

Calculou-se a concentração em GSSG na fracção pós-peroxissomal por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente construída com GSSG entre 0,4-24 μM (figura A3).

4.3.5.3. Determinação da concentração de malonaldeído (MDA)

O nível citoplasmático de malonaldeído foi determinado de acordo com o método proposto por Ohkawa (1979) e Durfinova (2007), por espectrometria de fluorescência, o qual fundamenta-se na reacção:

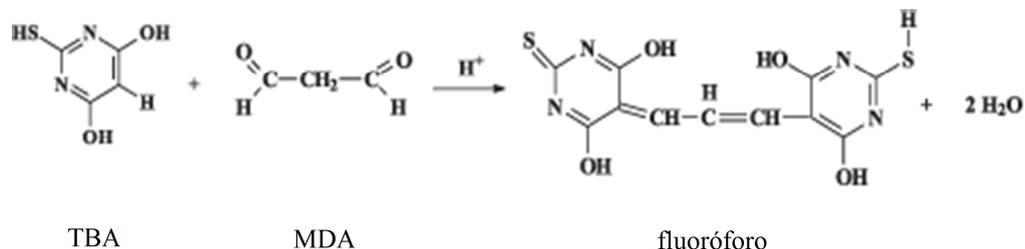


Figura 4.1. Reacção para a determinação do nível citoplasmático de malonaldeído de acordo com o método proposto por Ohkwa (1979) e Durfinova (2007).

Na quantificação de MDA presente nas amostras pipetou-se para tubos de ensaio 0,1 mL da fracção sobrenadante pós-12000 g, 0,2 mL de SDS 8,1 % e 3 mL de TBA 0,4 % em ácido acético 10 %, pH 3,5. A mistura reaccional foi colocada em banho com temperatura controlada a 95 °C e agitação orbital durante 60 min de incubação para o desenvolvimento do fluoróforo, após o que se parou a reacção por arrefecimento a 4 °C durante 15 min. O MDA foi extraído por adição de 2,5 mL de *n*-butanol e agitação vigorosa no vórtex. Após a separação de fases recolheu-se a fase orgânica e leu-se a potência de fluorescência aos $\lambda_{\text{excitação}}$ 515 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 553 nm. Calculou-se a concentração em MDA por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente construída no intervalo de 5 a 100 μM (figura A4), utilizando MDA gerado pela hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em meio adequado (Turton, 1997).

4.3.5.4. Capacidade antioxidante - DPPH

O método DPPH desenvolvido por Brand-Williams (1995) baseia-se na captura do radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvência a 515 nm até à sua estabilização.

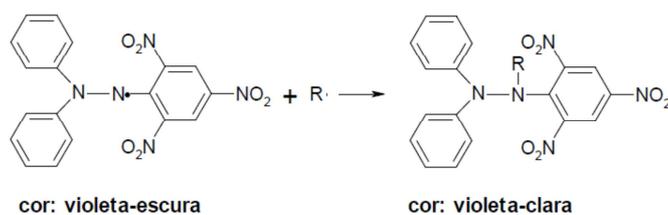


Figura 4.2. Estabilização do radical livre DPPH \cdot .

Incubaram-se alíquotas de fracção sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada de proteína em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção

composto por solução DPPH 0,03 (g/L) em MeOH e registou-se a absorvência a 515 nm de 10 em 10s durante 120 s a 25 °C, descontando-se os valores de branco previamente preparado no qual se substituiu a amostra por igual volume de solução tampão (tampão fosfato 10 mM pH 7.0). Calculou-se a capacidade antioxidante sobre o radical DPPH na fracção pós-12000 g por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente construída com ácido gálico de concentração conhecida no intervalo de 12 a 178 µM (figura A5 e A14).

4.3.5.5. Capacidade antioxidante - ORAC

O método ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigénio) desenvolvido por Cao e Prior (1994) permite a medição directa da capacidade antioxidante da amostra para eliminar radicais peróxido gerados pelo composto solúvel em água 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida (AAPH). Incubaram-se alíquotas de fracção sobrenadante pós-12000 g, em células de absorção que continham uma mistura de reacção composta por solução fluoresceína (100 nM). Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional durante 5 min, com temperatura controlada a 37 °C. Iniciou-se a reacção com a adição de AAPH (80 mM), registando-se o decaimento da fluorescência da fluoresceína, a cada minuto, ao longo do tempo (Ou, 2001; Price, 2005). As leituras foram efectuadas descontando um branco, previamente preparado no qual se substituiu o extracto por igual volume de tampão fosfato (0,075 M) pH 7,4, de acordo com a seguinte equação e como demonstrado na figura 4.3:

$$AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \dots + \frac{f_{59}}{f_0} + \frac{f_{60}}{f_0}$$

A capacidade antioxidante ORAC da amostra foi determinada interpolando os valores obtidos de AUC na curva padrão previamente construída com diferentes concentrações (20-60 µM) do análogo trolox da vitamina E solúvel em água (figura A6 e A15).

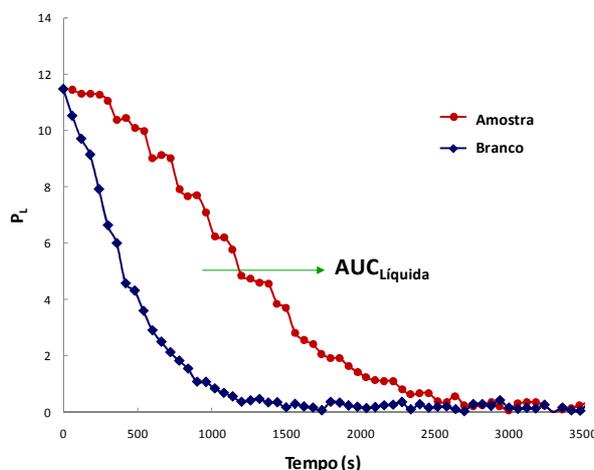


Figura 4.3. Curva do decaimento da fluorescência em função do tempo para a amostra (vermelho) e para o branco (em azul), a área do meio corresponde à área líquida ($AUC_{Líquida} = AUC_{Amostra} - AUC_{Branco}$).

4.3.5.6. Quantificação de ROS – DCFH-DA

O nível de ROS na amostra foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel (1990) que utiliza a 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para determinar os níveis de peróxido de hidrogénio. O DCFH-DA é hidrolizado por esterases ao composto não fluorescente 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH), o qual na presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é rapidamente oxidado a 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) que apresenta elevada fluorescência (figura 4.4) (LeBel, 1990; Takanashi, 1997).

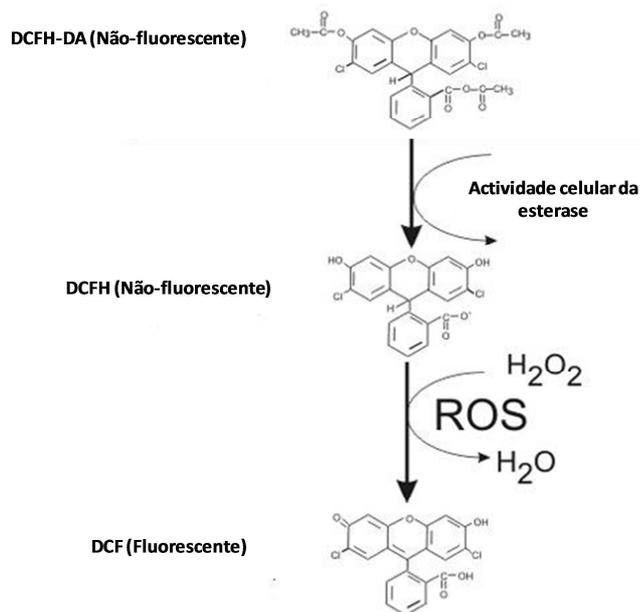


Figura 4.4. Mecanismo proposto para a quantificação de H_2O_2 pelo DCFH-DA.

Na determinação da quantidade de ROS presente na fracção sobrenadante pós-12000 g após estabilização do DCFH (25 μM) em tampão Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 a 37°C durante 5 min iniciou-se a reacção pela adição de uma alíquota de amostra, num volume final de 2,00 mL, seguida de incubação durante 10 min a 37°C, após o que se fez a leitura da potência de fluorescência da mistura aos $\lambda_{excitação}$ 488 nm e $\lambda_{emissão}$ 525 nm.

A solução DCFH (1 mM) é previamente preparada em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 com NaOH (0,01 M). Calculou-se a quantidade de ROS nas amostras por interpolação gráfica recorrendo a curva de calibração previamente preparada com peróxido de hidrogénio no intervalo de valores de 100 a 1500 μM . (Figura A7).

4.3.6. Determinação das actividades enzimáticas

4.3.6.1. Glutatio *reductase*

A determinação espectrométrica da actividade enzimática glutatio *reductase* fundamenta-se na reacção:



Figura 4.5. Reacção para a determinação da actividade enzimática do GR de acordo com o método proposto por Goldberg e Spooner.

Embora a reacção seja reversível, dá-se em maior extensão no sentido que conduz à formação da forma reduzida do glutatio. A actividade catalítica foi determinada no citoplasma, de acordo com o método proposto por Goldberg e Sponer (1987) acompanhando-se o decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH. Incubaram-se alíquotas de 0,132 mL da fracção sobrenadante pós-12000 g (0,2 mg.mL⁻¹ proteína) em células de absorção do espectrofotómetro que continham o meio de reacção composto por glutatio na sua forma oxidada (GSSG) (6,35 mM), EDTA (0,15 mM) e NADPH (0,17 mM) dissolvidos em 0,802 mL de tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2.

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional, no compartimento das células do espectrómetro, durante 5 min, sem a presença do NADPH, com a temperatura controlada a 37 °C. Iniciou-se a reacção com a adição de 0,017 mL de NADPH e registou-se a variação de absorvência durante 180 s, nas mesmas condições de temperatura. As leituras foram efectuadas contra um branco previamente preparado no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão. Determinou-se a actividade enzimática, a partir do valor do coeficiente angular de curvas de reacção (0,9982692 < r < 0,9703122, figura A8) obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹.

4.3.6.2. Glutatio *peroxidase*

A determinação espectrofotométrica da actividade enzimática GPx fundamenta-se na reacção:

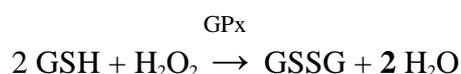


Figura 4.6. Reacção para a determinação da actividade enzimática GPx, baseada no método proposto por Flohé.

A actividade catalítica GPx foi determinada por espectrometria de absorção molecular na fracção sobrenadante pós-12000 g, de acordo com o método proposto por Flohé (1984) acompanhando-se o decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH. Incubaram-se alíquotas de 0,1 mL de fracção sobrenadante pós-12000 g (0,2 mg.mL⁻¹ proteína) em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção composto por GR (0,24 U), GSH (5 mM), NADPH (1,6 mM) e t-BHP (1,0 mM) dissolvidos em tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2. Iniciou-se a reacção com a adição de t-BHP (1,0 mM) e registou-se a variação de absorvência no intervalo de tempo de 50-90 s a 37 °C, descontando-se os valores de branco previamente preparado no qual se substituiu a amostra por igual volume de solução tampão.

Determinou-se a actividade enzimática, a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reacção ($0,9980315 < r < 0,8897959$, figura A9) obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹.

4.3.6.3. *Glucose-6-fosfato-desidrogenase*

A actividade catalítica G6PD foi determinada na fracção pós-12000 g de acordo com o método proposto por Bergmeyer (1983) e Postma (1989), fundamentando-se a determinação espectrométrica na reacção:

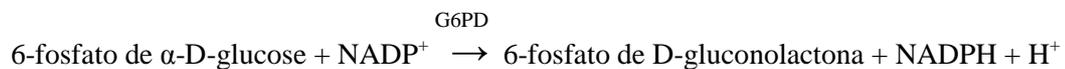


Figura 4.7. Reacção para a determinação da actividade catalítica G6PD seguindo o método proposto por Bergmeyer.

O G6PD catalisa a reacção de oxidação da glucose-6-fosfato pelo NADP⁺, formando-se como produtos 6-fosfato de gluconolactona e NADPH. Assim, a determinação da actividade do G6PD pode ser efectuada acompanhando espectrometricamente, a 340 nm, a formação do NADPH a partir do NADP⁺. Este doseamento é baseado no facto do NADPH ter um máximo de absorção a 340 nm, com um coeficiente de absorvidade molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹, enquanto o NADP⁺ não absorve a este comprimento de onda.

Incubaram-se alíquotas de fracção sobrenadante pós-12000 g na diluição adequada de proteína (0,2 mg.mL⁻¹), em células de absorção que continham um meio de reacção composto por Tris-HCl (1M) pH 8,0, NADP (0,04 M) e MgCl₂.6H₂O (0,5 mM). Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional, no compartimento das células do espectrómetro, durante 1 min, com a temperatura controlada a 37 °C. Iniciou-se a reacção com a adição de glucose-6-

fosfato (0,1 mM), registando-se a variação de absorvência durante 180 s, nas mesmas condições de temperatura. As leituras foram efectuadas contra um branco previamente preparado no qual se substituiu o extracto por igual volume de H₂O desionizada. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ e a partir do valor do coeficiente angular de curvas de reacção (0,9995153 < r < 0,9962180, figura A10) no cálculo da actividade enzimática.

4.3.6.4. *Catalases T e A*

A determinação espectrométrica da actividade enzimática catalase fundamenta-se na reacção:

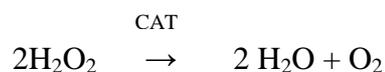


Figura 4.8. Reacção para a determinação da actividade enzimática catalase.

Os enzimas catalase têm a função de proteger a célula dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) formado durante o metabolismo celular, uma vez que aceleram a decomposição desse composto em H₂O e O₂. A sua actividade catalítica foi determinada na fracção sobrenadante pós-12000 g e peroxissomal de acordo com o método proposto por Beers (1952) acompanhando a decomposição do H₂O₂, pelo decréscimo de absorvência a 240 nm ao longo de 120 s no caso da CAT T e 180 s no caso da CAT A.

Incubaram-se alíquotas da fracção sobrenadante pós-12000 g na diluição adequada de proteína (0,01mg.mL⁻¹) e alíquotas do sedimento peroxissomal na diluição adequada de proteína (0,1mg.mL⁻¹) em células de absorção que continham um meio de reacção composto por H₂O₂ (30 mM) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,0. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o H₂O₂ de 0,0435 mM⁻¹cm⁻¹ e o coeficiente angular de curvas de reacção (0,9985531 < r < 0,9769516 figura A11 para a fracção pós-12000 g e 0,9996331 < r < 0,9898875 figura A12 para a fracção peroxissomal) para o cálculo da actividade enzimática de cada enzima.

4.3.6.5. *Fosfatase alcalina (ALP)*

A determinação espectrométrica da actividade enzimática fosfatase alcalina fundamenta-se na reacção:



Figura 4.9. Reacção para a determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina.

A fosfatase alcalina constitui um marcador enzimático funcional de proliferação celular, utilizado em estudos de toxicidade por metais. A sua actividade catalítica foi determinada na fracção pós-12000 g, de acordo com o método proposto por Bretauiere (1984) acompanhando a hidrólise das ligações fosfoéster do substrato, pelo aumento de absorvência a 405 nm ao longo de 180 s. Deste modo, é possível utilizar um substrato cromogéneo artificial, o p-nitrofenilfosfato (pNPP) e estudar a sua hidrólise catalisada pela fosfatase alcalina, em que o pNPP forma p-nitrofenol (pNP) e fosfato inorgânico.

Incubaram-se alíquotas de fracção sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada de proteína (0,05 mg.mL⁻¹) em células de absorção que continham uma mistura de reacção composta por pNPP (6 mM) em tampão Tris-HCl (0,5 mM) pH 8,5. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o pNPP de 18,5 mM⁻¹cm⁻¹ para o cálculo da actividade enzimática. Os valores de actividade ALP referente a cada tratamento foi calculada a partir do coeficiente angular de curvas de reacção lineares (0,999801 < r < 0,994335, figura A13).

4.4. Análise estatística

A variação biológica contribui, muitas vezes, para que os resultados experimentais em bioquímica sejam obtidos com uma dispersão elevada. A estatística diz-nos que a incerteza do valor médio de uma amostra depende da sua própria dimensão e diminui em função do número de indivíduos ou da unidade que representa. Contudo, em muitos estudos biológicos torna-se difícil obter resultados com um número elevado de replicados. Embora possa controlar-se muitos dos factores que são responsáveis pela dispersão dos resultados como, por exemplo, a fase de crescimento, o meio ambiente e nutrientes, existem outros que, pela sua estrutura, são difíceis de identificar e controlar, justificando por si só a análise estatística dos resultados experimentais, com a finalidade de discriminar as variações devido ao acaso, à variação biológica ou às diferenças populacionais. Os resultados experimentais são muitas vezes *imperfeitos* pois, apesar de constituírem informação valiosa, estão sempre afectados pela incerteza das medições efectuadas e, no caso das experiências bioquímicas, pela variação biológica (Morgan, 1996; Pestana, 2000; Murteira, 2002).

Na análise de resultados realizou-se análise de variância simples, ANOVA I e o teste de significância de *Duncan* para os parâmetros analisados na levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃ utilizando o programa SPSS para Windows, versão 18 licenciada para a Universidade de Évora.

4.5. Equipamento

- Autoclave, microClave 4000 4777 da marca *Select*
- 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 de ultra-sons da marca *Sonorex*, modelo *Bandelin RK 100*
- Banho termostaticado com agitação da marca *Memmert*, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca *Aquatron*, modelo A 4D
- Centrifuga da marca *Hermle*, modelo Z380
- Espectrómetro de feixe duplo da marca *Hitachi*, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca *Grant*
- Espectrómetro de fluorescência de feixe simples da marca *Shimadzu*, modelo RF-5001 PC
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca *Branson sonifier*, modelo 450
- Medidor de pH da marca *Hanna*, modelo HI 3050 N
- Microcentrífuga da marca *Beckman*, modelo microfuge ETM
- Placa de agitação da marca *Labinco*
- Supercentrífuga da marca *Hermle*, modelo Z323K
- Vórtex da marca *Heidolph*, modelo *Reax 2000*

4.6. Reagentes

- 2- mercapto etanol, 98%, SIGMA, St. Louis
- AAPH, 99%, SIGMA, St. Louis
- Ácido acético glacial, pró-análise, 100%, MERCK, Darmstadt
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, MERCK, Darmstadt
- Ácido gálico, 99%, SIGMA, St. Louis
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de magnésio hexahidratado, 99%, SIGMA, St. Louis
- Cloreto de sódio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- DCFH-DA, 99%, SIGMA, St. Louis
- Didrogenofosfato de sódio-1-hidrato, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt

- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, pró-análise, 97,0 %, SIGMA, St. Louis
- Dodecilsulfato de sódio, 99%, SIGMA, St. Louis
- DPPH, 99%, SIGMA, St. Louis
- Etanol, pró-análise, 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Etilendiaminotetracetato pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Etilendiaminotetracetato, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Fluoresceína, 99%, SIGMA, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, pró-análise, 98,0%, SIGMA, St. Louis
- Glucose-6-P, SIGMA, St. Louis
- Glutationo reduzido, pró-análise, 98,0%, SIGMA, St. Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0%, SIGMA, St. Louis
- Hidrogenocarbonato de sódio, 99,5%, SIGMA, St. Louis (NaHCO₃)
- Hidrogenofosfato de di-sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Metanol, Lichrosolv gradiente grade para cromatografia, MERCK, Darmstadt
- N-butanol, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- o- fetaldeído, SIGMA, St. Louis
- Óxido de vanádio, 99,5%, RIEDEL, Seeize
- Peróxido de hidrogénio, 30%, RIEDEL, Seeize
- *p*-nitrofenilfosfato, “Tablet sets”, SIGMA, St. Louis
- Reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteau, pró-análise, SIGMA, St. Louis
- Sulfato de cobre, 99,5-102%, PANREAC, Barcelona
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9%,MERCK, Darmstadt
- Ter-butil-hidroperóxido, 70%, SIGMA, St. Louis
- Ácido tiobarbitúrico, 99%, MERCK, Darmstadt
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
- Trolox, 99%, SIGMA, St. Louis

5. Resultados e Discussão

5.1. Crescimento e sobrevivência celular

A utilização da levedura vínica nativa *S. cerevisiae* UE-ME₃ para identificar e compreender o papel do pentóxido de vanádio em presença de pró e antioxidantes conhecidos pode constituir uma mais-valia para a interpretação da resposta ao *stress* induzido por metais ao permitir identificar fenótipos distintos dos observados em estirpes mais estudadas.

O acompanhamento da cultura, por leitura da turbidez, ao longo de 72 h permitiu traçar a curva de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ na ausência e na presença de pró, antioxidantes e V₂O₅ (figura 5.1A), revelando um perfil idêntico em todos os ensaios, porém, em presença de vanádio o crescimento foi mais atenuado.

Na figura 5.1B podemos observar que o ascorbato (0,025 mM), agente antioxidante em estudo, não contribuiu para um aumento significativo do peso seco ($p < 0,01$) determinado ao fim de 72 h de ensaio, apesar de na figura 5.1C poder observar-se às 72 h, que o ascorbato na concentração de (0,025 mM) contribuiu para aumentar a quantidade de células viáveis de *S. cerevisiae* UE-ME₃ na mistura de ensaio. Por outro lado, a exposição ao H₂O₂ (2 mM), utilizado como agente pró-oxidante neste estudo, não causou alterações significativas ($p < 0,01$) na quantidade de biomassa produzida nem na quantidade de células viáveis presentes ao longo do ensaio. Quando comparamos o efeito simultâneo do ascorbato (0,025 mM) e do H₂O₂ (2 mM) notamos que quer a biomassa produzida, quer a viabilidade celular não foram significativamente afectadas (figura 5.1A-D).

Contudo, o peso seco de células crescidas na presença de V₂O₅ (2 mM), o composto metálico que utilizamos como eventual agente de *stress* e que constitui o composto problema, mostrou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) relativamente ao controlo (53 %).

No que diz respeito à resposta ao V₂O₅ (2 mM) na presença de ascorbato (0,025 mM) observamos a reposição do peso seco das células para valores semelhantes ao da situação controlo, pelo que, somos levados a supor que o ascorbato (0,025 mM) exerce efeito protector na célula.

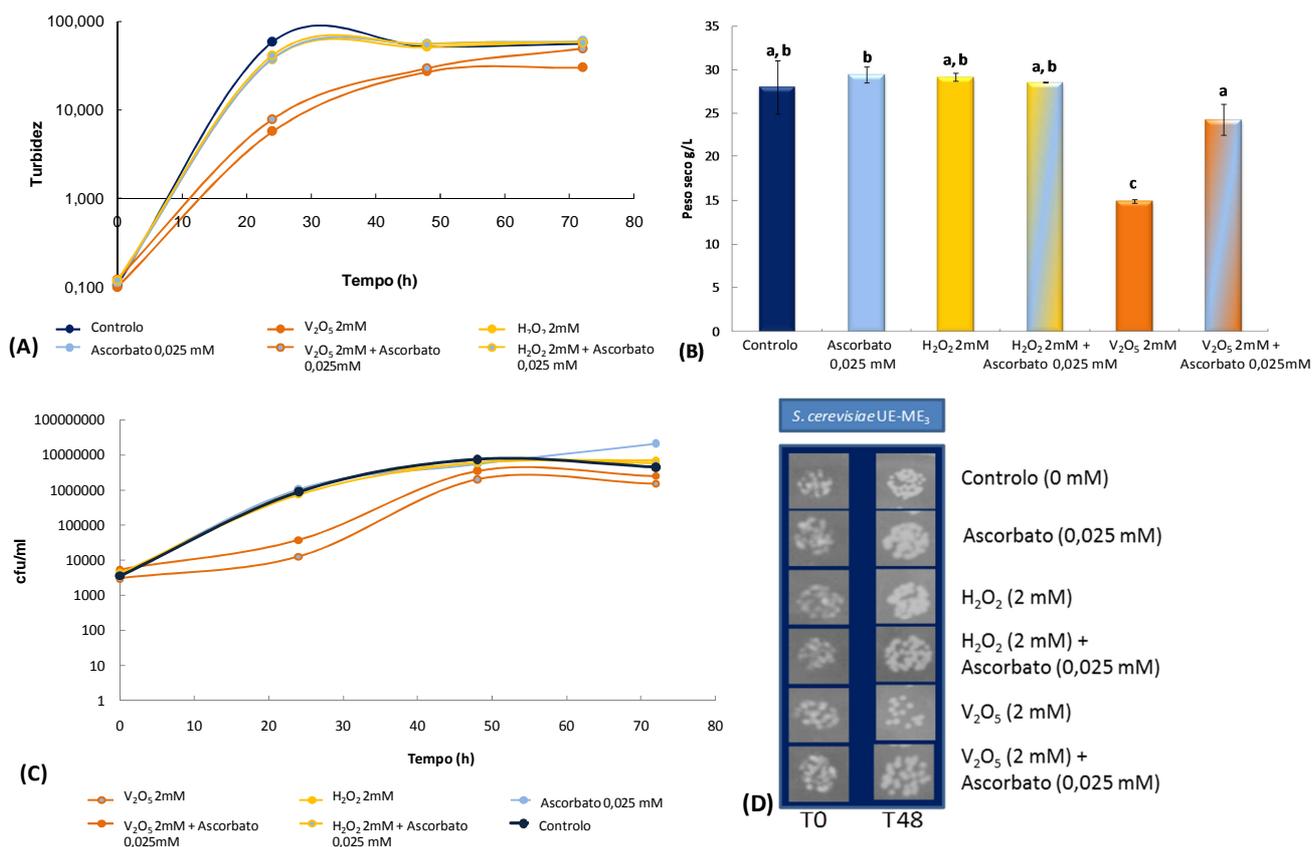


Figura 5.1. Ilustração do crescimento de culturas de *S. cerevisiae* UE-ME₃ em meio YEPD com 2 % de glucose na ausência ou na presença de pró, antioxidantes ou V₂O₅: curva de crescimento obtida por leitura de turbidez a 640 nm (A); pesos secos após 72 h em cultura (B); curva de crescimento obtida por contagem de cfu em placa (C) e cfu no início da cultura, semelhança entre as culturas e às 48 h, diferenciação das culturas (D).

O malonaldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, que pode ser quantificado por reacção com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A sua formação ocorre pela decomposição dos lipoperóxidos particularmente quando na presença do grupo hemo e/ou glutationo, sendo a sua concentração utilizada como índice de peroxidação lipídica em sistemas biológicos, e consequentemente um marcador de danos celulares, uma vez que o MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da ruptura no carbono β da endociclicação de resíduos acilo polinsaturados (Vasconcelos 2001; Kuss, 2005; Cipak, 2007; Martinez, 2007). Os resultados obtidos na quantificação do MDA estão de acordo como o que vem descrito na literatura consultada (Espindola, 2003). Assim, a partir da figura 5.2A podemos observar que em *S. cerevisiae* crescidas na presença de ascorbato (0,025 mM), peróxido de hidrogénio (2 mM) ou da mistura ascorbato (0,025 mM) + H₂O₂ (2 mM), não ocorreu aumento com significado estatístico ($p < 0,01$) de danos celulares relativos ao controlo. Contudo, em células crescidas em meio YEPD-V (2 mM) e YEPD-V (2 mM) + ascorbato (0,025 mM),

constatámos um aumento significativo ($p < 0,01$) do conteúdo em MDA, 5000 x no primeiro caso e 1200 x, no segundo caso, sendo esta última resposta fortemente atenuada pela presença do antioxidante no meio de cultura, resultados que explicam em parte, a resposta ao pentóxido de vanádio apresentadas e discutidas na figura 5.1.

Por outro lado, a fosfatase alcalina constitui um marcador enzimático funcional da proliferação celular, utilizado em estudos de toxicidade por metais (Krauss, 1991; Deng, 2002; Davies, 2004).

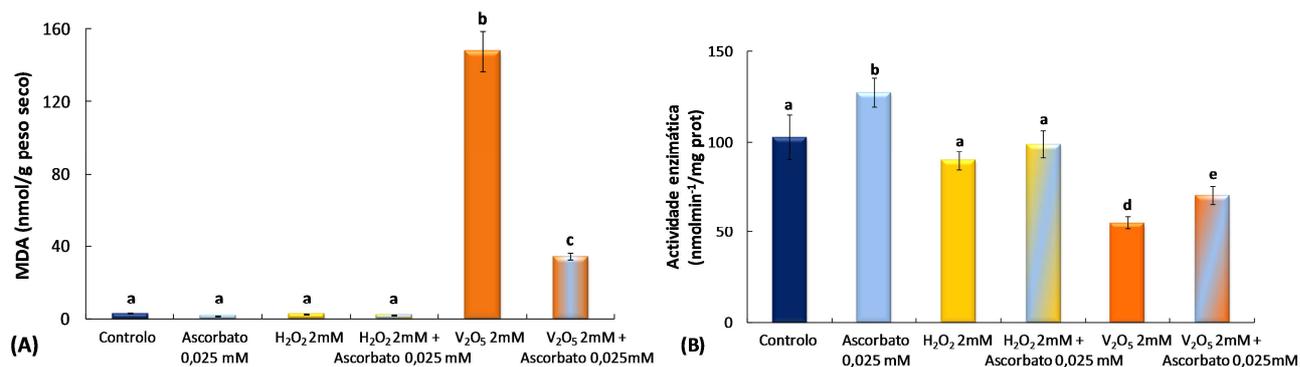


Figura 5.2. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V₂O₅ no conteúdo citoplasmático de malonaldeído (A), e actividade ALP (B) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Cada coluna representa a média \pm desvio-padrão de cinco experiências independentes. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No que diz respeito à actividade fosfatase alcalina, a figura 5.2B mostra que os resultados obtidos para esta actividade catalítica estão de acordo como o que vem descrito na literatura consultada (Fernandes, 2008). A referida figura mostra ainda a ocorrência de um aumento significativo ($p < 0,01$) da proliferação celular em *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de ascorbato (0,025 mM), resposta que não observámos quando o peróxido de hidrogénio (2 mM) está presente no meio de cultura. Contudo células crescidas na presença de V₂O₅ (2 mM) exibem um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da actividade ALP, que parece ser contrariado, com significado estatístico ($p < 0,01$) quando a exposição ao vanádio ocorre na presença de ascorbato, sem contudo atingir capacidade proliferativa próxima do controlo. Esta resposta ao V₂O₅ (2 mM) mostrou-se coerente com os indicadores de sobrevivência e de danos celulares discutidos nas figuras 5.1 e 5.2A.

5.2. Resposta não-enzimática ao V₂O₅

Os organismos expostos ao dióxigénio, como as leveduras, produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS) no seu metabolismo basal e como resposta a agentes de *stress*. A produção de ROS é uma consequência normal de uma série de reacções bioquímicas essenciais ao organismo e causa danos biológicos apenas quando essa produção se torna anormalmente elevada e/ou quando as defesas antioxidantes se encontram diminuídas. Os locais da célula viva onde a produção de ROS é maioritária são o mitocôndrio, o retículo endoplasmático e o citoplasma. (Sies, 1997; Frei, 1999; Gheldof, 2002; Pereira, 2002; Azzi, 2003; Lushchark, 2004; Butylina, 2007; Herrero, 2007; Lee, 2007; Rui-Yan, 2007).

Para neutralizar o efeito pró-oxidante destas espécies, as células dispõem de uma variedade de mecanismos de defesa designadas por defesas antioxidantes. Para o correcto funcionamento celular, deve haver uma compensação entre a formação de ROS e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula num estado geral reduzido (Halliwell, 1989; Halliwell, 1995; Sies, 1997; Júnior, 1998; Costa, 2001; Azzi, 2003; Herrero, 2007; Bednarska, 2008). Uma das principais defesas enzimáticas é o ciclo oxidação-redução do glutatióno, presente no citoplasma e mitocôndrio, bem como as catalases do citoplasma e dos peroxissomas (Sies, 1997; Arrigoni, 2001; Kuss, 2005; Bonatto, 2007). Dentro dos principais agentes antioxidantes não-enzimáticos, a célula utiliza o ascorbato proveniente da dieta que interage com o ciclo oxidação-redução do glutatióno, promovendo a eliminação da maior parte das ROS formadas nos sistemas biológicos, exibindo particular capacidade para regenerar o radical tocoferilo a α -tocoferol, potenciando a sua capacidade antioxidante nas membranas, um mecanismo protector indirecto contra a peroxidação lipídica (Niki, 1991; Davey, 2000; Wilson, 2005). A inactivação de um agente pró-oxidante leva à formação de GSSG e à depleção de GSH. Em situações em que o sistema de oxi-redução está íntegro, haverá regeneração de GSH, via GR. No entanto, sob condições de excesso de agentes pró-oxidantes e/ou deficiência do sistema protector celular, ocorrerá desequilíbrio entre o consumo de GSH e produção de GSSG, entrando a célula em *stress* oxidativo (Kirlin, 1999). Os resultados obtidos para o nível de GSH e GSSG citoplasmático nestes ensaios estão de acordo como o que vem descrito na literatura consultada (Elskens, 1996; Penninckx, 1999).

A figura 5.3 mostra a resposta não-enzimática antioxidante de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao composto metálico de V(+5), utilizando como marcadores dessa resposta o glutatióno, o glutatióno dissulfureto e a soma GSH+GSSG, bem como, a capacidade antioxidante para capturar radicais livres em geral e o radical peroxilo, medida pelos métodos do DPPH e ORAC respectivamente. Assim, podemos observar que o ascorbato (0,025 mM) causou um

decréscimo significativo ($p < 0,01$) do conteúdo citoplasmático em glutatióno, não afectou significativamente ($p < 0,01$) o conteúdo em dissulfureto de glutatióno mas causou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) do conteúdo em tióis totais não-proteicos (GSH+GSSG). Por sua vez, o H₂O₂ (2 mM) desencadeou um aumento dos três parâmetros anteriormente referidos. Em células de levedura crescidas na presença de H₂O₂ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) observou-se um decréscimo com significado estatístico ($p < 0,01$) do conteúdo em GSH, um aumento do conteúdo em GSSG e um aumento da quantidade em tióis não-proteicos GSH+GSSG ($p < 0,01$). Surpreendentemente observamos que na presença de vanádio (2 mM), ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$) do conteúdo em glutatióno e dissulfureto de glutatióno, bem como, de tióis não-proteicos em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, efeito que foi atenuado pela presença de ascorbato (0,025 mM), factos que apontam um papel relevante do glutatióno na resposta ao vanádio.

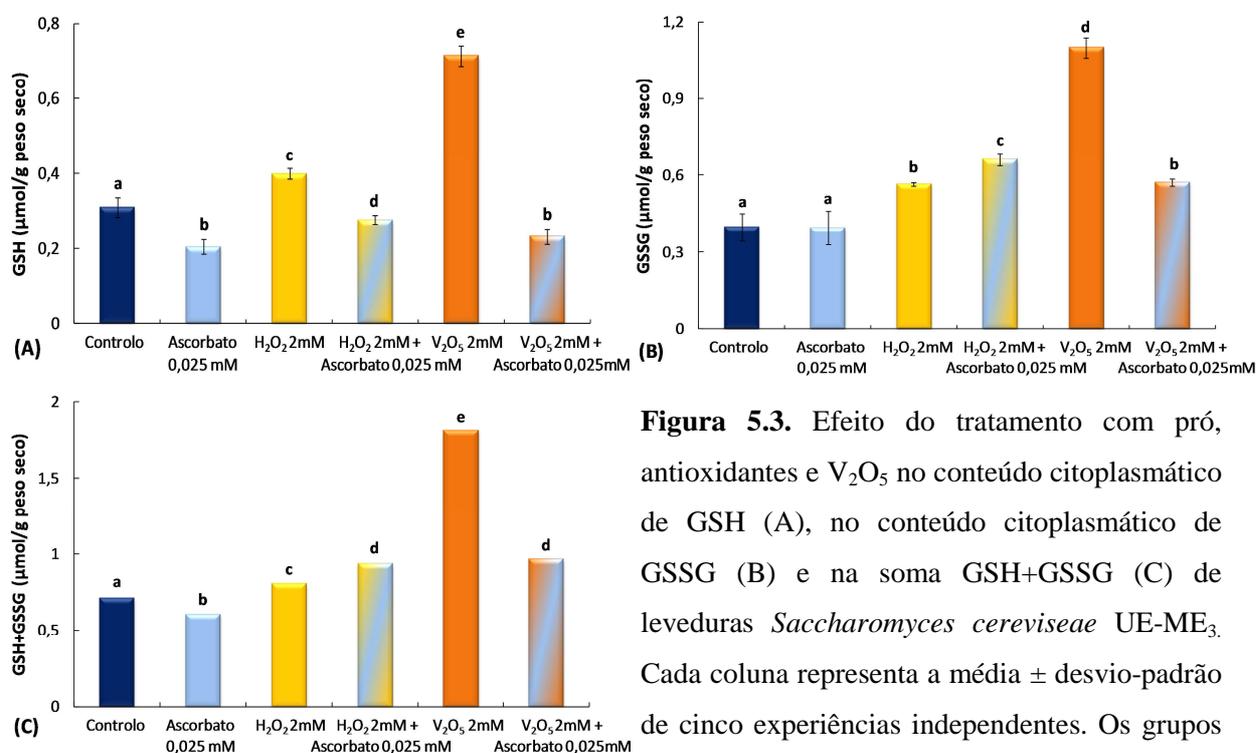


Figura 5.3. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V₂O₅ no conteúdo citoplasmático de GSH (A), no conteúdo citoplasmático de GSSG (B) e na soma GSH+GSSG (C) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Cada coluna representa a média ± desvio-padrão de cinco experiências independentes. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Em geral, a razão GSH/GSSG é utilizada para monitorizar a magnitude do *stress* oxidativo, pois um decréscimo no nível de GSH citoplasmático cria um ambiente mais oxidante, que favorece a formação de ligações dissulfureto nas proteínas portadoras do grupo tiol (-SH). As ligações dissulfureto oxidam essas proteínas prejudicando as suas funções celulares (Arouma, 1994; Ferreira, 1997; Cotgreave, 1998). Cao e Prior (1994) desenvolveram um método designado por capacidade de absorção de radicais de oxigénio

(ORAC) que permite a medição directa da capacidade antioxidante para capturar radicais livres, nomeadamente, radicais peróxido, uma das espécies de oxigénio (ROS) vulgarmente encontradas nos organismos vivos (Griffiths, 2001; Alarcón, 2007). Por outro lado, Brand-Williams *et al.* (1995) desenvolveram outro método conhecido por DPPH, amplamente utilizado para testar a capacidade dos compostos antioxidantes para capturar radicais livres ou doadores de átomos de hidrogénio em sistemas biológicos (Brand-Williams, 1995; Fukumoto, 2000; Lee, 2006).

Analisando a figura 5.4. podemos inferir que, o ambiente intracelular torna-se significativamente ($p < 0,01$) mais oxidante em todas as situações estudadas, uma vez que a razão GSH/GSSG mostra um decréscimo significativo em todos os ensaios ($p < 0,01$) (figura 5.4A). No entanto, não observamos reversão deste parâmetro em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃, crescidas na presença de ascorbato (0,025 mM) e H₂O₂ (2 mM), pelo que infere-se que o ascorbato não potenciou o papel tampão redox do glutatono na célula.

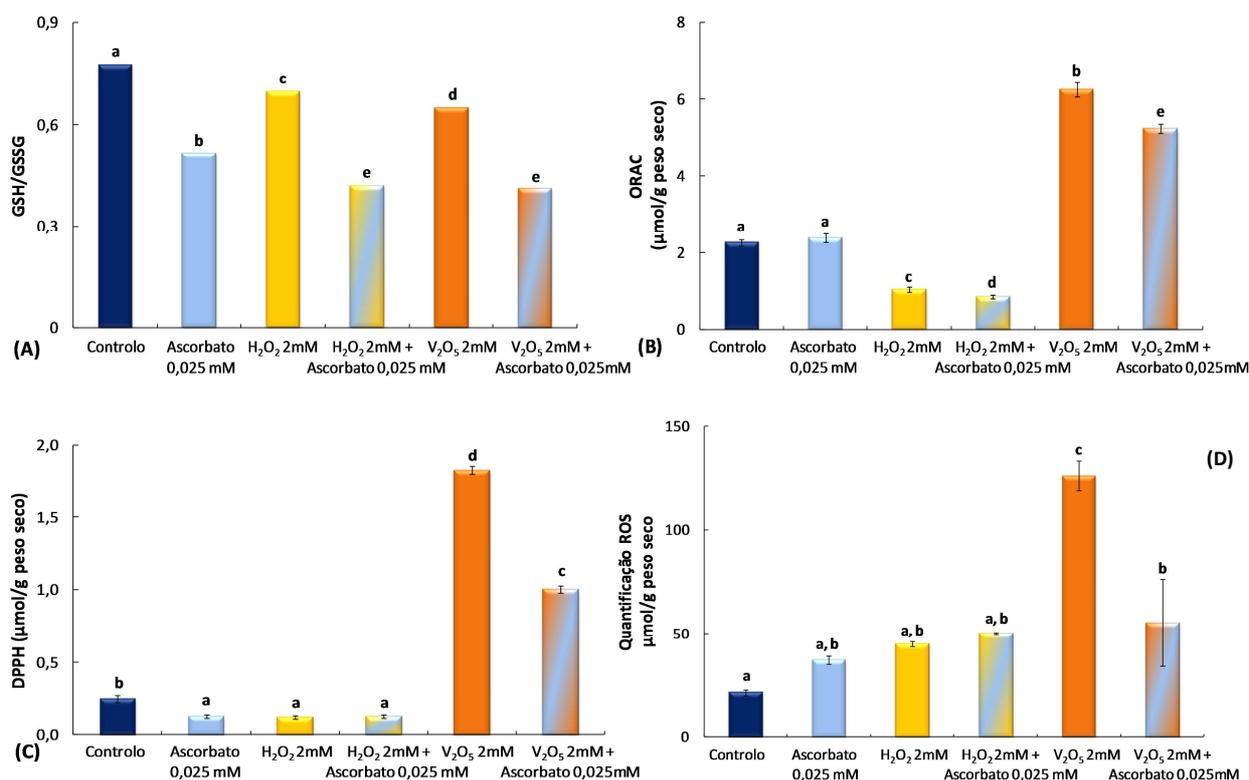


Figura 5.4. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V₂O₅ sobre a razão GSH/GSSG (A), no método de medição da capacidade antioxidante ORAC (B), no método de medição da capacidade antioxidante DPPH (C) e quantidade de ROS (D) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Cada coluna representa a média ± desvio-padrão de cinco experiências independentes. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

No seguimento do trabalho podemos também observar que os resultados obtidos para a determinação da capacidade antioxidante medida pelos métodos ORAC e DPPH estão de acordo como o que vem descrito na literatura (Moore, 2007 e Letelier, 2008, respectivamente). Podemos ainda constatar que o ascorbato (0,025 mM) não afectou a resposta antioxidante medida pelo ORAC (figura 5.4B) mas causou um decréscimo desta propriedade medida pelo DPPH (figura 5.4C). No entanto, células crescidas na presença de peróxido de hidrogénio (2 mM) e deste com ascorbato (0,025 mM), exibiram um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da capacidade para capturar radicais livres medida pelos dois métodos descritos anteriormente. Contudo, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$) da capacidade antioxidante medida pelo ORAC e DPPH em células crescidas em presença de vanádio V(+5) (2 mM), 3 x e 8 x, respectivamente. Neste caso, a presença de ascorbato (0,025 mM) parece ter atenuado a resposta medida pelos dois métodos, detectando-se valores mais baixos em células crescidas na presença de V₂O₅ (2 mM) + ascorbato (0,025 mM), (2 x e 4 x), provavelmente devido à quantidade de espécies reactivas resultantes da resposta ao vanádio, em presença deste antioxidante ser inferior às ROS geradas apenas em presença de pentóxido de vanádio. A figura 5.4D mostra que células crescidas em presença de ascorbato, peróxido de hidrogénio e mistura dos dois no meio de cultura causaram aumento da quantidade de espécies reactivas de oxigénio no interior celular, facto que justifica em parte a sugestão de ocorrência de *stress* oxidativo medida pela razão GSH/GSSG por outro lado a presença de pentóxido de vanádio no meio de cultura despoletou um aumento significativo (6 x) da quantidade de ROS intracelular que parece ser atenuada pela presença de ascorbato em meio com vanádio. Os resultados obtidos para a quantificação de ROS estão de acordo como o que vem descrito na literatura (Doudican, 2005). A resposta a este incremento de ROS despoletado pela presença de vanádio no meio de cultura parece não ser mediada apenas pelo sistema antioxidante controlado pelo glutatióno uma vez que não ocorre reposição da razão GSH/GSSG mas observou-se um aumento altamente significativo ($p < 0,01$) da capacidade para capturar radicais livres, em particular o radical peroxilo, medida pelo DPPH e pelo ORAC respectivamente.

5.3. Resposta enzimática ao V₂O₅

Organismos aeróbios, como as leveduras, desenvolveram processos contra os efeitos deletérios dos radicais livres e das espécies tóxicas derivadas, incluindo defesas enzimáticas e não-enzimáticas, alguns dos quais já referidos anteriormente (Wang, 1996; Sies, 1997; Elliot, 1999; Fang, 2002; Bonatto, 2007; Cipak, 2007). Os sistemas enzimáticos incluem enzimas antioxidantes como catalases (CAT T e CAT A) que actuam na decomposição de H₂O₂ a O₂ e

H₂O, GPx, dependente de Se, que actua sobre peróxidos em geral, com utilização do glutatono como co-factor, GR que mantém os níveis intracelulares de GSH e G6PD que fornece os equivalentes redutores sob a forma de NADPH necessários ao adequado funcionamento do ciclo oxidação-redução do glutatono (Sies, 1997; Kuss, 2005; Bonatto, 2007).

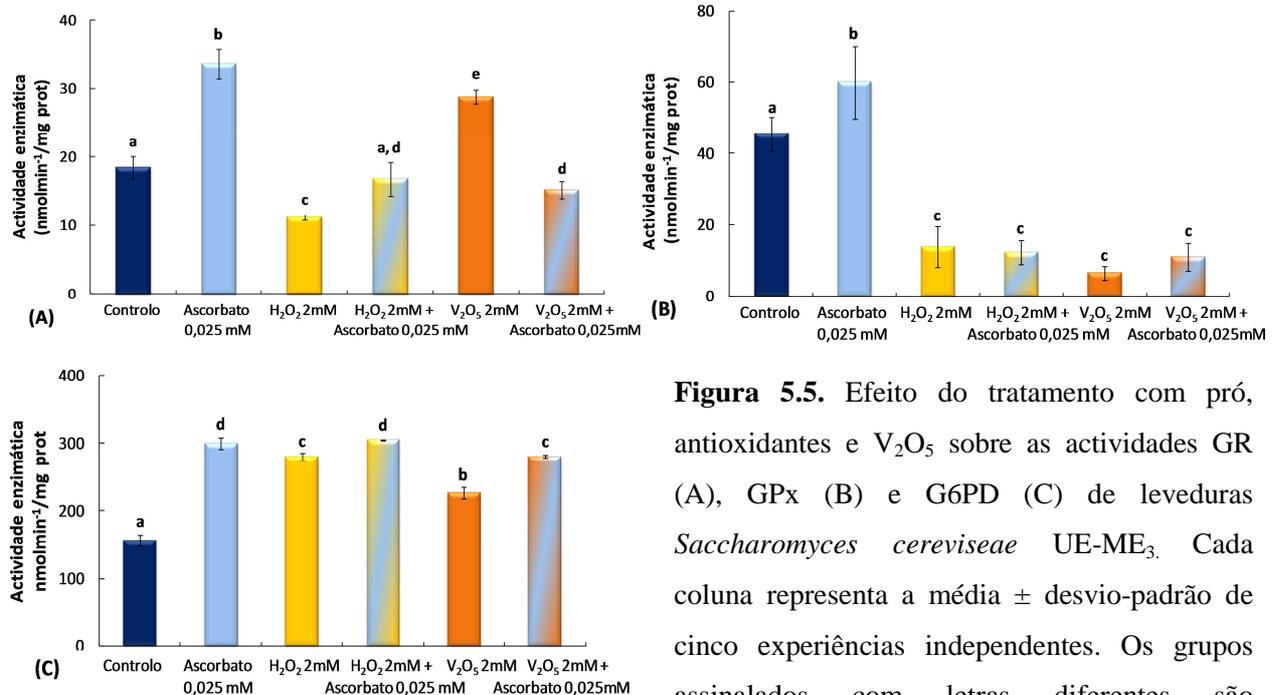


Figura 5.5. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V₂O₅ sobre as actividades GR (A), GPx (B) e G6PD (C) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Cada coluna representa a média ± desvio-padrão de cinco experiências independentes. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

Os resultados apresentados da figura 5.5 mostram que a presença de apenas ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura foi suficiente para induzir um aumento com significado estatístico (p < 0,01) da actividade enzimática GR, GPx e G6PD (2x, 1x e 2x) respectivamente, resposta antioxidante que sugere uma indução do ciclo oxidação-redução do glutatono e que não parece totalmente compatível com o decréscimo significativo (p < 0,01) da razão GSH/GSSG (33 %). Por outro lado, o H₂O₂ (2 mM) comportou-se aparentemente como pró-oxidante causando o decréscimo das actividades GR (39 %), e GPx (70 %) apesar de aumentar a actividade G6PD (79 %) resposta que poderá estar relacionada com outra opção metabólica consumidora de equivalentes redutores. Observou-se ainda que células crescidas na presença de H₂O₂ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) manifestaram um decréscimo acentuado da actividade GR que também é seguido pelo decréscimo da actividade GPx com aparente inibição do ciclo oxidação-redução do glutatono apesar de ocorrer um aumento significativo (p < 0,01) da actividade G6PD cujos equivalentes redutores gerados sob a forma de NADPH poderão estar a ser mobilizados para outras funções da célula que não a protecção

antioxidante tal como inferimos para a resposta ao peróxido de hidrogénio. Os resultados obtidos para a actividade enzimática GR estão de acordo com o que é descrito na literatura consultada (Ohmori, 1999; Lushchak, 2004), assim como, os resultados para o GPx (Ohmori, 1999) e para a actividade enzimática G6PD (Cordier, 2006).

Mais uma vez, observou-se que a capacidade antioxidante manifestada pelas células crescidas na presença de V₂O₅ (2 mM), neste caso expressa a nível enzimático, aumentou em termos de actividade GR e G6PD, pelo que somos levados a supor que a disponibilidade de equivalentes redutores sob a forma de NADPH e GSH terá sido adequada para manter o ciclo de oxidação-redução do glutathione, embora o decréscimo significativo (86 %) da actividade GPx possa estar na origem da resposta insuficiente do sistema antioxidante dependente do glutathione à presença de pentóxido de vanádio no meio de cultura. A presença de ascorbato (0,025 mM) em meio YEPD com vanádio mostrou-se capaz de reverter a resposta ao metal pelos enzimas GR e GPx confirmando algum papel antioxidante desta vitamina.

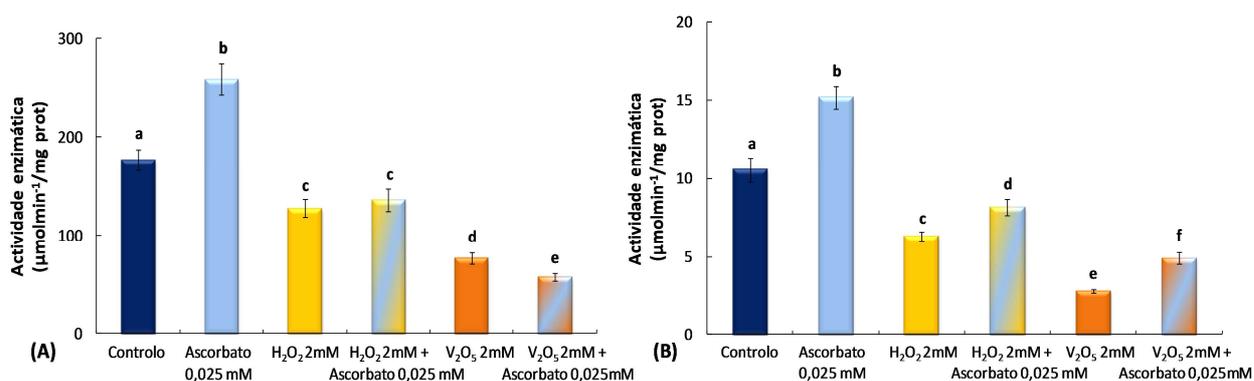


Figura 5.6. Efeito do tratamento com pró, antioxidantes e V₂O₅ sobre a actividade CAT T (A) e sobre a actividade CAT A (B) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. Cada coluna representa a média ± desvio-padrão de cinco experiências independentes. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,01).

Na figura 5.6 podemos constatar que o ascorbato (0,025 mM) aumentou a actividade CAT T e CAT A em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na sua presença. Como seria de esperar o H₂O₂ (2 mM) causou um decréscimo significativo (p < 0,01) destas duas actividades catalíticas quando presente no meio de cultura, facto que parece confirmar o seu papel pró-oxidante. No entanto, na presença de H₂O₂ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) observou-se um aumento significativo (p < 0,01) da actividade CAT A relativamente aquele que foi obtido com células crescidas apenas na presença de peróxido de hidrogénio (2 mM) embora permaneça inferior ao valor obtido em células crescidas em meio YEPD (p < 0,01).

Os resultados obtidos para as actividades enzimáticas CAT T e CAT A estão de acordo com o que se encontrou descrito na literatura consultada (Skoneczny, 1987; Lushchak, 2004 e Todorova, 2006) respectivamente.

O V(+5) causou um decréscimo da actividade CAT T e CAT A idênticos aos observados com o H₂O₂ (2 mM), sugerindo um papel pró-oxidante do composto metálico. Contudo a presença de ascorbato (0,025 mM) apenas reverteu significativamente ($p < 0,01$) este efeito sob a CAT A que também permaneceu com valores inferiores aos do controlo em meio YEPD.

A deficiente resposta do sistema antioxidante mediados pelo ciclo de oxidação-redução do glutatióno parece ser a principal causa da débil sobrevivência das células crescidas na presença de pentóxido de vanádio.

6. Conclusão

As leveduras, organismos unicelulares GRAS, de fácil manipulação, constituem um modelo biológico ideal para estudos de *stress* e sobrevivência celular que permitam compreender a resposta a agentes químicos de circulação ambiental em termos biológicos e moleculares. Por esse motivo, escolheu-se a levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃, isolada de mostos da região do Alentejo, para avaliar a sua resposta ao pentóxido de vanádio (2 mM), um metal de transição com relevância bioquímica, tendo em vista esclarecer o seu papel como pró-oxidante em células eucariotas (Ostergaard, 2000; Saito, 2003; Madigan, 2004).

Os resultados obtidos, mostraram que a curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ em presença de vanádio seguiu um perfil mais atenuado do que aquele que foi observado para as células crescidas em meio YEPD, controlo, em presença do antioxidante ascorbato, YEPD-ascorbato ou do pró-oxidante peróxido de hidrogénio, YEPD-H₂O₂, mostrando dificuldade de adaptação à presença de pentóxido de vanádio no meio de cultura.

A presença de ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura não contribuiu para um aumento significativo ($p < 0,01$) da biomassa produzida ao fim de 72 h de ensaio, embora tenha promovido um aumento da quantidade de células viáveis no final do ensaio.

A exposição ao peróxido de hidrogénio (2 mM), utilizado como agente pró-oxidante não causou alterações significativas na quantidade de biomassa produzida, nem na quantidade de células viáveis no final do ensaio.

A exposição simultânea ao ascorbato (0,025 mM) e ao H₂O₂ (2 mM) não afectou significativamente ($p < 0,01$) a quantidade de biomassa produzida nem a viabilidade celular no final do ensaio.

A exposição ao pentóxido de vanádio (2 mM), o composto metálico problema deste estudo, causou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da quantidade de biomassa produzida, bem como, de células viáveis, no final do ensaio, 72 h, relativamente ao controlo.

A resposta ao pentóxido de vanádio (2 mM) na presença de ascorbato (0,025 mM) revelou uma reposição da quantidade de biomassa produzida, expressa em peso seco, para valores idênticos aos da situação controlo, facto que sugere um efeito protector exercido pelo ascorbato em células expostas ao vanádio.

O nível citoplasmático de MDA em *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de ascorbato, peróxido de hidrogénio (2 mM) ou da mistura ascorbato (0,025 mM) e H₂O₂ (2 mM) não apresentou alterações com significado estatístico, relativas ao controlo ($p < 0,01$).

O indicador de danos celulares, via peroxidação lipídica, aumentou significativamente ($p < 0,01$) em células crescidas na presença de vanádio (2 mM), ou de vanádio e ascorbato, mostrando-se significativamente atenuada na presença do antioxidante ($p < 0,01$).

A actividade ALP de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de ascorbato (0,025 mM) aumentou com significado estatístico ($p < 0,01$), não tendo ocorrido resposta idêntica, em células expostas ao peróxido de hidrogénio (2 mM), facto que traduz um aumento da proliferação celular induzida pelo ascorbato.

Células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de V₂O₅ (2 mM) exibiram um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da actividade ALP, efeito contrariado, com significado estatístico ($p < 0,01$) pela presença de ascorbato (0,025 mM). Contudo o efeito induzido pela presença de ascorbato no meio com vanádio não repoz a capacidade proliferativa do controlo. Esta resposta ao pentóxido de vanádio mostrou-se coerente com os indicadores de sobrevivência e de danos celulares discutidos anteriormente.

Surpreendentemente, a presença de vanádio (2 mM) no meio de cultura induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) do conteúdo em tióis não-proteicos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ expresso pelo somatório dos níveis de glutatióno e dissulfureto de glutatióno citoplasmático, efeito que foi atenuado pela presença de ascorbato (0,025 mM) e que indicia um papel relevante do glutatióno na resposta ao vanádio. Contudo células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de vanádio apresentam características de *stress* oxidativo, uma vez que essas condições experimentais minimizam a razão GSH/GSSG e maximizam o conteúdo citoplasmático de MDA. Por outro lado, não observamos reversão deste parâmetro em células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de ascorbato e peróxido de hidrogénio, ou ascorbato e pentóxido de vanádio, pelo que supõe-se que o ascorbato não potenciou o papel de tampão redox do glutatióno em *S. cerevisiae* UE-ME₃. Admitindo que o ciclo de oxidação-redução do glutatióno respondeu adequadamente à presença de vanádio no meio, pode-se interpretar o decréscimo de GSH apenas pelo seu consumo excessivo por via de desintoxicação do metal, distinta da que estabiliza o ambiente redutor celular, hipótese que poderá contribuir para o desequilíbrio entre o consumo de GSH e a sua reposição que leva a célula a entrar em *stress* oxidativo.

A capacidade antioxidante medida pelos métodos ORAC e DPPH diminuiu significativamente ($p < 0,01$) em células crescidas na presença de peróxido de hidrogénio (2 mM), ou peróxido de hidrogénio (2 mM) e ascorbato (0,025 mM), enquanto que na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e pentóxido de vanádio (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$) destes parâmetros que surgem atenuados pelo

antioxidante. Esta resposta parece depender da quantidade elevada de ROS gerada na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), que é atenuada pelo antioxidante sugerindo que sistemas antioxidantes que não dependem directamente do glutatióno, como os que são mediados pelo α -tocoferol, ou fenóis poderão também ter papel relevante na resposta de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao pentóxido de vanádio. Contudo, as células não conseguiram sobreviver à acção do agente pentóxido de vanádio, talvez por alguma debilidade no sistema de óxido-redução do glutatióno.

A resposta antioxidante medida pelas actividades enzimáticas GR, GPx e G6PD mostram que a presença de ascorbato (0,025 mM) no meio de cultura foi suficiente para induzir um aumento com significado estatístico ($p < 0,01$), da taxa de resposta do ciclo oxidação-redução do glutatióno, mas que parece não compatível com o decréscimo significativo ($p < 0,01$) da razão GSH/GSSG. Por outro lado, o H₂O₂ (2 mM) comportou-se aparentemente como pró-oxidante causando o decréscimo das actividades GR, e GPx, apesar de aumentar a actividade G6PD, resposta que poderá estar relacionada com um desvio metabólico para consumo de equivalentes redutores sob a forma de NADPH. *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de H₂O₂ (2 mM) e ascorbato (0,025 mM) manifestaram um decréscimo altamente significativo ($p < 0,01$) da actividade GR que também foi seguido pelo decréscimo da actividade GPx com aparente inibição do ciclo oxidação-redução do glutatióno, apesar de ocorrer um aumento significativo ($p < 0,01$) da actividade G6PD cujos equivalentes redutores gerados sob a forma de NADPH poderão, de novo, ter sido mobilizados para outras funções da célula que não a protecção antioxidante, tal como se inferiu para a resposta ao peróxido de hidrogénio (2 mM).

As actividades enzimáticas GR e G6PD de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) aumentaram, pelo que supõe-se que a disponibilidade de equivalentes redutores sob a forma de NADPH e GSH terá sido adequada para manter o ciclo oxidação-redução do glutatióno a funcionar. Todavia o decréscimo significativo ($p < 0,01$) da actividade GPx pode estar na origem da resposta insuficiente do sistema antioxidante dependente do glutatióno à presença de pentóxido de vanádio (2 mM) no meio de cultura. A presença de ascorbato (0,025 mM) em meio YEPD com vanádio (2 mM) mostrou-se capaz de reverter a resposta ao metal pelos enzimas G6PD e GPx, de novo o papel antioxidante desta vitamina.

O pentóxido de vanádio (2 mM) causou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) das actividades CAT T e CAT A semelhante aos que foram observados com o H₂O₂ (2 mM), mas com maior amplitude, sugerindo, de novo, um papel pró-oxidante deste composto metálico.

Contudo a presença de ascorbato (0,025 mM) apenas reverteu de forma parcial mas significativa ($p < 0,01$) este efeito sob a CAT A que permaneceu com valores inferiores aos do controlo em meio YEPD.

O pentóxido de vanádio (2 mM) comportou-se como um agente metálico pró-oxidante em *S. cerevisiae* UE-ME₃, capaz de induzir morte celular.

A resposta deficiente do GPx, enzima integrado no sistema antioxidante mediado pelo glutationo, parece ser a principal causa da débil sobrevivência de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na presença de pentóxido de vanádio (2 mM).

O antioxidante ascorbato (0,025 mM) parece reverter parcialmente os efeitos pró-oxidantes do pentóxido de vanádio (2 mM), sem contudo exercer efeito suficiente que permita repor as condições basais de sobrevivência de *S. cerevisiae* UE-ME₃.

7. Referências bibliográficas

- ADAMS, A.; PRINGLE, J. (1984). Relationship of Actin and Tubulin Distribution to Bud Growth in Wild-type and Morphogenetic-Mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 98, pp. 934-945.
- ALARCÓN, E.; CAMPOS, A.M.; EDWARDS, A.M.; LISSI, E.; LÓPEZ-ALARCÓN, C. (2007). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*. Vol. 107, pp. 1114–1119.
- AMADO, A.; AURELIANO, M.; RIBEIRO-CLARO, P.; TEIXEIRA-DIAS, J. (1993). Vanadium (V) oligomerization in aqueous alkaline solutions: A combined raman and V NMR spectroscopic study. *J. Raman Spect.*, Vol. 24, pp. 669-703.
- AMES, N.B.; SHIGENAGA, K.M.; HAGEN, M.T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 90, pp. 7915-7922.
- ANAZETTI, A.C.; MELO, P.C. (2007). Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, Vol. 1, Nº1, pp. 37-58.
- ARENAS-RÍOS, E.; LEÓN-GALVÁN, M.A.; MERCADO, P.E.; LÓPEZ-WILCHIS, R.; CERVANTES, D.L.M.I.; ROSADO, A. (2007). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in the testis of the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*) during its annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* Vol. 148, pp. 150–158.
- ARNAO, B.M.; CANO, A.; ACOSTA, M. (2000). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. Vol. 73, pp. 239-244.
- ARNES, N.B.; SHIGENAGA, M.; HAGEN, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). *Proc. Natl. Acad.* Vol. 90, pp. 7915-7922.
- ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. (2001). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1569, pp. 1-9.
- AROUMA, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, Vol. 32, pp. 671-683.
- ATLAS, R.M. (2006). Handbook of microbiological media for the examination of food, 2nd edn. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 403.
- AZEVEDO, C. (1999). Biologia celular e molecular, 3rd Ed., *Lidel*, Lisboa.
- AZZI, A.; DAVIES, K.; KELLY, F. (2003). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Letters*. Vol. 558, pp. 3-6.
- BAEK, D.; JIN, Y.; JEONG, J.C.; LEE, H.J.; MOON, H.; LEE, J.; SHIN, D.; KANG, C.H.; KIM, D.H.; NAM, J.; LEE, S.Y.; YUN, D.J. (2007). Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase. *Phytochemistry*, Vol. 69, pp. 333–338.
- BAES, C.F.; MESMER, R.E. (1976). The hydrolysis of cations. *Willey-Interscience*. New York, pp. 197-210.
- BARAN, E.J. (2003). Model Studies Related to Vanadium Biochemistry: Recent Advances and Perspectives. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No. 6, pp. 878-888.
- BARCELOUX, D.G. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*, Vol. 37, pp. 265-276.
- BARLAS, M.; RUIS, H.; SLEDZIEWSKI, A. (1978). Synthesis of catalase T under anaerobic conditions in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs letters*. Vol.92, Nº 2.
- BEDNARSKA, S.; LEROY, P.; ZAGULSKI, M.; BARTOSZ, G. (2008). Efficacy of antioxidants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* correlates with their effects on protein thiols. *Biochimie*, pp. 1-10.
- BEERS, R.; JR., SIZER, I. (1952) - A Spectrophotometric Method For Measuring The Breakdown Of Hydrogen Peroxide By Catalase, *J Biol Chem*; Vol.195, pp. 133-140.
- BERGMEYER, H.; GRABL, M. (1983) – Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, L.L.; SIMONETTI, R.; GLUUD, C. (2007). Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. Vol 297, Nº8.
- BODE, H.; FRIEBEL, C.; FURHMAN, G. (1990). Vanadium uptake by yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1022, pp.163-170.

- BONATTO, D. (2007). A systems biology analysis of protein–protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radical Biology & Medicine* Vol.43, pp. 557–567.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Academic Press*. Vol. 28, pp. 25-30.
- BRETAUDIÈRE, J.P.; SPILLMAN, T. (1984). Alkaline Phosphatases. In: BERGMAYER – *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., Verlag Chemie, Florida.
- BRICHARD, M.; JEAN-CLAUDE H. (1995). The role of vanadium in the management of diabetes, *Elsevier*, Vol. 16, pp. 265-270.
- BUDAK, N.H., GUZEL-SEYDİM, B.Z. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *J Sci Food Agric*, Vol. 90, pp. 2021–2026.
- BURHANS, W.C.; WEINBERGER, M.; MARCHETTI, M.A.; RAMACHANDRAN, L.; D'URSO, G.; HUBERMAN, J.A. (2003). Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutation Research*, Vol. 532, pp. 227–243.
- BUTYLINA, S.; SHATAEVA, L.; NYSTRÖM, M. (2006). Separation of nucleoprotein complexes with antioxidant activity from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Separation and Purification Technology*. Vol. 53, pp. 64–70.
- CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUÍZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M.; ARNAO, M. (1998). An End-point Method for Estimation of the Total Antioxidant Activity in Plant Material. *Phytochemical analysis*. Vol. 9, pp.196–202.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.*, Vol. 14, pp.303-311.
- CERQUEIRA, M.F.; GENNARI DE MEDEIROS, M.H.; E AUGUSTO, O. (2006). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, pp. 441-449.
- CHARY, K.V.R.; RAMESH, K.; NARESH, D.; RAO, P.V.R.; RAO, A. R.; RAO, V.V. (2008). The effect of zirconia polymorphs on the structure and catalytic properties of V₂O₅/ZrO₂ catalysts. *Catalysis Today*.
- CHASTEEN, N. (1983) The biochemistry of vanadium. *Structure and Bonding*, Vol. 53, pp.105-138.
- CIPAK, A.; JAGANJAC, M.; TEHLIVETS, O.; KOHLWEIN, S.D.; ZARKOVIC. N. (2007). Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1781, pp. 283–287.
- COHEN, M.V. (1989). Free radical in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann. Intern. Med.* Vol. 111, pp.918-931.
- COLLINSON, P.L.; DAWES, W.I. (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *Journal of General Microbiology*, Vol. 134, pp.329-335.
- CONTE, V.; FLORIS, B. (2009). Vanadium catalyzed oxidation with hydrogen peroxide. *Chimica Acta*.
- CORDIER, H.; MENDES, F.; VASCONCELOS, I.; FRANÇOIS J. M. (2006). A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering*, Vol. 9, pp.364–378.
- CORREIA, J.J.; LIPSCOMB, L.D.; DABROWIAK, J.C.; ISERN, N.; ZOUBIETA, J. (1994). Cleavage of tubulin by vanadate ion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 309, pp. 94-104.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 22, pp. 217-246
- COTGREAVE, A.I.; GERDES, G.R. (1998). Recent Trends in Glutathione Biochemistry Glutathione–Protein Interactions: A Molecular Link between Oxidative Stress and Cell Proliferation? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 242, pp. 1-9.
- CRAM, D.C.; BUNCH, R.L.; THEISEN, L.A. (1989). Interaction of Trace Levels of Vanadium(IV) and Vanadium(V) in Biological Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 111, N°1, pp. 7597-7607.
- CRANS, D. (1994). Aqueous chemistry of labile oxovanadates: relevance to biological studies. *Comments Inorg. Chem.*, Vol. 16, pp. 1-33.

- CRANS, D.; AMIN, S.; KERAMIDAS, A. (1998). Chemistry of relevance of vanadium in the environment. In: "Vanadium in the Environment". Part 1: "Chemistry and Biochemistry" (J. Nriagu), John Wiley & Sons, pp. 73-95.
- CRANS, D.; SCHELBLE, S. (1990). Vanadate Dimer and Tetramer Both Inhibit Glucose-6 phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*?. *Biochemistry*, Vol. 29, pp. 6698-6706.
- CRANS, D.C.; SMEE, J.J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L. (2004). The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities. *Chem. Rev.* Vol. 104, pp. 849-902.
- DAVEY, W.M.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.; STRAIN, J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 80, pp. 825-860.
- DAVIDSON, J.; SCHIESTL, R. (2001). Cytotoxic and Genotoxic Consequences of Heat Stress Are Dependent on the Presence of Oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*. Vol. 183, No. 15.
- DAVIES, J.M.S.; LOWRY, C.V.; DAVIES, K.J.A. (1994). Transient Adaptation to Oxidative Stress in Yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 317, No.1, pp. 1-6.
- DENG, H.; CALLENDER, R.; HUANG, Z.; ZHANG, Z. (2002). Is the PTPase-Vanadate Complex a True Transition State Analogue? *Biochemistry*. Vol. 41, pp. 5865-5872.
- DOMINGO, J. (1996). Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*. Vol. 3, pp. 175-182.
- DOMINGO, J.; BOSQUE, M.; LUNA, M.; CORBELLA, J. (1993). Prevention by tiron (sodium-4,5-dihydroxybenzene-1,3-dissulfonate) of vanadate-induced developmental toxicity in mice. *Teratology*, Vol. 48, pp.133-138.
- DOUDICAN, N.; SONG, B.; SHADEL, G.; DOETSCH, P. (2005). Oxidative DNA Damage Causes Mitochondrial Genomic Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 25, No. 12, pp. 5196–5204.
- ĐURFINOVÁ, M.; BRECHTLOVÁ, M.; LIŠKA, B.; BAROŠKOVÁ, Z. (2007) - Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues, *Chemical Papers*, 61, 4, 1336-9075.
- ELLIOTT, J.G. (1999). Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages. *Food Technology*. Vol.53, No 2, pp. 46- 48.
- ELSKENS, M.T.; PENNINGKX, M. J. (1996). Thiram and Dimethyldithiocarbamic Acid Interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a Possible Metabolic Pathway under the Control of the Glutathione Redox Cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 7, pp. 2857–2862.
- EMSLEY, J. (1998). Moléculas em exposição – O mundo fantástico das substâncias e dos materiais que fazem parte do nosso dia-a-dia, *Oxford University Press*.
- ESPINDOLA, A.S.; GOMES D.S.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. (2003). The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* , Vol. 47, pp. 236–241.
- ETCHEVERRY, S.; CORTIZO, A.M. (1998). Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture. In: *Vanadium in the Environment* (J. O. Nriagu, ed.), pp. 359-394.
- FABRIZIO, P.; LONGO V.D. (2004). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, Vol. 2, pp. 73-81.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, Vol. 18, pp. 872– 879.
- FERNANDES, J.; AMORIM, R.; AZEVEDO, I.; MARTINS, M.J. (2008). In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of *Saccharomyces cerevisiae* grown in low or high phosphate medium *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 41, pp. 41-46.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. Vol.43, No. 1, pp-61-8.
- FERREIRA, R.; ALVES-PEREIRA, I.; MAGRIC, O.S.; FERRAZ-FRANCO, C. (2006). Comparative effects of NH₄VO₃ on detoxication enzymes and redox state of wine *Saccharomyces*. In: Collery P (ed) *Metal ions in biology and medicine*. *John Libbey Eurotext*, Vol 9. pp. 169–174.
- FERRER, E.G.; BOSCH, A.; YANTORNO, O.; BARAN, E.J. (2007). A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin. *Biorganics & Medical Chemistry*, Vol. 16, pp. 3878-3886.

- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. (1984). Assay of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, Vol. 105, pp. 114-121.
- FORNARO, A.; COICHEV, N. (1998). Ácido l-ascórbico: reacções de complexação e de óxido-redução com alguns iões metálicos de transição. *Química Nova*. Vol. 21, No. 5.
- FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLE, R.; REYES-REYES, E.; PANAYIOTIDIS, M. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*. Vol. 674, pp. 3–22.
- FRANK, P.; CARLSON E.J.; CARLSON, R.M.K.; HEDMAN, B.; HODGSON, K.O. (2007). The uptake and fate of vanadyl ion in ascidian blood cells and a detailed hypothesis for the mechanism and location of biological vanadium reduction. A visible and X-ray absorption spectroscopic study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 102, pp. 809–823.
- FREI, B. (1999). Molecular and biological mechanism of antioxidant action. *The FASEB Journal*, Vol. 13, pp. 963 – 964.
- FROHLICH, K.U.; FUSSI, H.; RUCKENSTUHL, C. (2007). Yeast apoptosis—From genes to pathways. *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 17, pp.112–121.
- FRÖHLICH, KAI-UWE.; MADEO, F. (2001). Apoptosis in yeast: a new model for aging research. *Experimental Gerontology*. Vol.37, pp. 27-31.
- FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 48, pp. 3597-3604.
- GALARIS, D.; EVANGELOU, A. (2001). The role of oxidative stress in mechanisms of metal induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Vol. 42, pp. 93–103.
- GALLI, A.; VELLOSI, R.; FIORIO, R.; DELLA CROCE, C.; DEL CARRATORE, R; MORICHETTI, E.;GIROMINI, L.; ROSELLINI, D.; BRONZETTI, G. (1991). Genotoxicity of Vanadium Compounds in Yeast and Cultured Mammalian Cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, Vol. 11, pp. 175-183.
- GÂNDARA, R.M.C. (2003). Efeitos in vivo de oligómeros de vanadato em marcadores de stresse oxidativo.
- GHELDOLF, N.; ENGESETH, N.J. (2002). Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, pp. 3050-3055.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 29, No. 11, pp. 1106-1114.
- GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. (2002). Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: current state. *Pharmacological reviews*, Vol. 54, No. 2.
- GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. (2005). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*. Vol. 96, pp. 131-136.
- GOC, A. (2006). Biological activity of vanadium compounds. *Central European Journal*. Vol. 3, No.1, pp. 314-332.
- GOLDBERG, D.; SPOONER, R. (1987) – Glutathione reductase, in: Bergmeyer - *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., 258-265, Bergmeyer, VCH, New York.
- GOLDWASER, I.; GEFEL, D.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M.; SHECHTER, Y. (2000). Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 80, pp. 21–25.
- GONÇALVES, S.; FERREIRA, R.; ALVES-PEREIRA, I. (2010) – Vanadium pentoxide: an oxidative stress agent which disturbs glutathione conjugates metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃. *Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products*, pp. 214-218, Antonio Mendez-Vilas edition, World Scientific Publishing Co., Singapore.
- GONZALEZ, M.J. (1992). Lipid peroxidation and tumor growth: an inverse relationship. *Med. Hypotheses*, Vol.38, pp. 106-110.
- GRALLA, E.B. (1997) Superoxide dismutase: studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Scandalios, J. Ed., pp. 495-525. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- GRANT, C.; MACIVER, F.; DAWES, I. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* Vol. 29, pp. 511–515.
- GRAY, J.V.; PETSKO, G.A.; JOHNSTON, G.C.; RINGE, D.; SINGER, R.A.; WERNER-WASHBURNE, M. (2004). “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology review.* Vol. 68, No. 2, p. 187–206.
- GREENWOOD, N.; EARNSHAW, A. (1997). *Chemistry of the elements*. Second edition, Butterworth-Heinemann, pp. 976-1001.
- GRIFFITHS, H.; MOLLER, L.; BARTOSZ, G.; BAST, A.; BERTONI-FREDDARI, C.; COLLINS, A.; COOKE, M.; COOLEN, S.; HAENEN, G.; HOBERG, A.; LOFT, S.; LUNEC, J.; OLINSKI, R.; PARRY, J.; POMPELLA, A.; POULSEN, H.; VERHAGEN, H.; ASTLEY, S. (2002). Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine.* Vol. 23, pp. 101–208.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. (2006). Introdução à genética, 8nd Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- GRZELAK, A.; MACIERZYNSKA, E.; BARTOSZ, G. (2005). Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology*, Vol. 41, pp. 813–818.
- GRZELAK, A.; SKIERSKI, J.; BARTOSZ, G. (2001). Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the ‘baby machine’ method. *FEBS Letters.* Vol. 492, pp. 123-126.
- GUERRA, E.M. (2007). “Preparação e caracterização de Pentóxido de Vanádio Mesoporoso e Reações de Intercalação”. Universidade de São Paulo.
- GUTTERIDGE, J.M.C. (1993). Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*, Vol. 19, pp. 141-158.
- HALLIWELL, B. (1989) How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Commun.*, Vol. 9, pp. 1-32.
- HALLIWELL, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, Vol.35, part 5.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 33, No. 7, pp. 601-617.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, Vol. 219, No. 1, pp. 1-14.
- HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H.D. (2008). Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Cell Press Review*.
- HANCOCK, R.; VIOLA, R. (2002). Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *TRENDS in Biotechnology.* No.7, Vol.20.
- HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M.C. (1996). Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. *Journal of Biotechnology*, Vol. 49, pp. 1- 12.
- HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. (2007). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- HISSIN, A.; HILF, P.J. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, Vol.74, pp. 214–226.
- HUANG, C.; DING, M.; LI, J.; LEONARD, S. S.; ROJANASAKUL, Y.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V.; JUI, G.; SHI, X. (2001). Vanadium-induced Nuclear Factor of Activated T Cells Activation through Hydrogen Peroxide. *The journal of biological chemistry*, Vol. 276, No. 25, pp. 22397–22403.
- IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* Vol. 368, pp. 73-76.
- JACOBSON, M. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS.* Vol. 1, No. 2, pp. 83-86.
- JAKUBOWSKI, W.; BILINSKI, T.; BARTOSZ, G. (1999). Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.28, No. 5, pp. 659–664.
- JAMIESON, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol.14. pp.1511-1527.

JAZWINSKI, S.M. (2004). Yeast longevity and aging—the mitochondrial connection. *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol. 126, pp. 243–248.

JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. (1998). Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, Ribeirão Preto, Vol. 31, pp. 434-449.

JÚNIOR, L.R.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. (2000). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, pp. 112-119.

KANAMARI, K.; SAKURAI, M.; KINOSHITA, T.; UYAMA, T.; UEKI, T.; MICHIBATA, H. (1999). Direct reduction from vanadium(V) to vanadium(IV) by NADPH in the presence of EDTA. A consideration of the reduction and accumulation of vanadium in the ascidian blood cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 77, pp. 157–161.

KING, D.A.; HANNUM, D.M.; QI, J.S.; HURST, J.K. (2003). HOCl-mediated cell death and metabolic dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 423, pp. 170–181.

KINNUNEN, S.; HYYPPÄ, S.; LEHMUSKERO, A.; OKSALA, N.; MÄENPÄÄ, P.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. (2005). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise induced oxidative stress in trotters. *Eur J Appl Physiol*. Vol. 95, pp. 550–556.

KIRLIN, W.; CAI, J.; THOMPSON, S.; DIAZ, D.; KAVANAGH, T.; JONES, D. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation And enzyme inducers. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 27, Nos. 11/12, pp. 1208–1218.

KOHRI, S.; FUJI, H.; OOWADA, S.; ENDOH, N.; SUEISHI, Y.; KUSAKABE, M.; SHIMMEI, M.; KOTAKE, Y. (2008). An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*. Vol. 386, pp. 167–171.

KRANTZ, M.; NORDLANDER, B.; VALADI, H.; JOHANSSON, M.; GUSTAFSSON, L.; HOHMANN, S. (2004). Anaerobicity Prepares *Saccharomyces cerevisiae* Cells for Faster Adaptation to Osmotic Shock. *Eukaryotic cell*, pp.1381–1390.

KRAUSS, M.; BASCH, H. (1991). Is the Vanadate Anion an Analogue of the Transition State of RNase A? *J. Am. Chem. SOC.* Vol. 114, pp. 3630-3634.

KUMPULAINEN, J. T.; SALONEN, J. T. (1996). Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention. pp. 449.

KUSS, F. (2005). Agentes oxidantes e antioxidantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LAKE, B. G. (1987). Preparation and characterization of microsomal fractions for studies practical approach, 1ª Ed, *IRL Press*, Oxford.

LAUN, P.; RINNERHALER, M.; BOGENGRUBER, E.; HEEREN, G.; BREITENBACH, M. (2006). Yeast as a model for chronological and reproductive aging – A comparison. *Experimental Gerontology*, Vol. 41, pp. 1208–1212.

LEADSHAM, J.E.; GOURLAY, C.W. (2007). Cytoskeletal induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*.

LEBEL, P.C.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDYS, C.S. (1990). Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res.* Vol.5, pp. 227-231.

LEE, J.; CHUNG, H.; CHANG, P.; LEE, J. (2006). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*. Vol. 103, pp. 662–669.

LEE, J.; HUH, W.; LEE, B.; BAEK, Y.; HWANG, C.; KIM, S.; KIM, Y.; KANG, S. (2000). Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase plays a crucial role in the reduction of D-erythroascorbyl free radical in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1527, pp. 31-38.

LEE, P.Y.; KHO, C.W.; LEE, D.H.; KANG, S.; KANG, S.; LEE, S.C.; PARK, B.C.; CHO, S.; BAE, K.H.; PARK, S.G. (2007). Glutathione peroxidase 3 of *Saccharomyces cerevisiae* suppresses non enzymatic proteolysis of glutamine synthetase in an activity-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 362, pp. 405–409.

- LENTON, K.; THERRIault, H.; CANTIN, A.; FÜLÖP, T.; PAYETTE, H.; WAGNER, R. (2000). Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes1–3. *Am J Clin Nutr.* Vol. 71, pp. 1194–1200.
- LETELIER M.E.; MOLINA-BERRÍOS, A.; CORTÉS-TRONCOSO, J.; JARA-SANDOVAL, J.; HOLST, M.; PALMA, K.; MONTOYA, M.; MIRANDA D.; GONZÁLEZ-LIRA, V. (2007). DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomoléculas. *Toxicology in Vitro.* Vol. 22, pp. 279–286.
- LIMA, N.; MOTA, M. (2003). *Biocologia – Fundamentos e aplicações*, Lidel, Lisboa.
- LIPTON, S.A.; BOSSY-WETZEL, ELLA (2002). Dueling Activities of AIF in Cell Death versus Survival: DNA Binding and Redox Activity. *Cell*, Vol. 111, 147–150.
- LOBERT, S.; ISERN, N.; HENNINGTON, B.S.; CORREIA, J.J. (1994) Interaction of tubulin and microtubule proteins with vanadate oligomers. *Biochemistry*, Vol. 33, pp. 6244–6252
- LONGO, V.D.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, pp. 12275–12280.
- LÓPEZ-MIRABAL, H.R.; WINTHER, J.R. (2007). Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1783, pp. 629–640.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Vol. 193. pp. 265–75.
- LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; ALMEIDA, A.; SILVA, M.; BARRIENTOS, A.; CÔRTE-REAL, M. (2002). Cytochrome *c* Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 13, pp. 2598–2606.
- LUSHCHAK, V.I.; GOSPODARYOV, D.V. (2004). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International*, Vol. 29, pp. 187–192.
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. (1997). A Yeast Mutant Showing Diagnostic Markers of Early and Late Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 139, No. 3, pp. 729–734.
- MADEO, F.; HERKER, E.; WISSING, S.; JUNGWIRTH, H.; EISENBERG, T.; FROHLICH, K.U. (2004). Apoptosis in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 7, pp. 655–660.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (2004). *Microbiologia de Brook*, 10nd Ed., Pearson Prentice Hall, São Paulo, Brasil.
- MAHMOUD, K.; EDENS, Z. (2003). Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. Vol. 136, pp. 921–934.
- MARINHO, H.S.; FERNANDES, L.; ANTUNES, F.; COUTINHO, A.; CYRNE, L. (2006). Protocolos experimentais. *Bioquímica Experimental III da Licenciatura em Bioquímica*. Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- MARTINEZ, V.G.; WILLIAMS, K.J.; STRATFORD, I.J.; CLYNES, M.; O’CONNOR, R. (2007). Overexpression of cytochrome P450 NADPH reductase sensitizes MDA 231 breast carcinoma cells to 5-fluorouracil: Possible mechanisms involved. *Toxicology in Vitro*, Vol. 22, pp. 582–588.
- MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; GARCÍA-CARMONA, F.; MURCIA, M. (2001). Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 81, pp. 1019–1026.
- MAURYA, M.R. (2003). Development of the coordination chemistry of vanadium through bis(acetylacetonato)oxovanadium(IV): Synthesis reactivity and structural aspects. *Chem. Rev.* Vol. 237, pp. 163–181.
- MENONE, M.L.; PESCE, S.F.; DÍAZ, M.P.; MORENO, V.J.; WUNDERLIN, D.A. (2007). Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry*, Vol. 69, pp. 1150–1157.
- METZLER, E.D. (2000). *Biochemistry – The Chemical Reaction of Living Cells*. Vol. 1&2, 2^a Ed. Elsevier.
- MOON, H.; BAEK, D.; LEE, B.; PRASAD, T.; LEE, S.Y.; CHO, M.J.; LIM, C.O.; CHOI, M.S.; BAHK, J.; KIM, M.O.; HONG, J.C.; YUN, D.J. (2001). Soybean Ascorbate Peroxidase Suppresses Bax-Induced Apoptosis in Yeast by Inhibiting Oxygen Radical Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 290, pp. 457–462.
- MOORE, J.; CHENG, Z.; HAO, J.; GUO, G.; LIU, J.; LIN, C.; YU, L. (2007). Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55, pp. 10173–10182.

- MORINVILLE, A.; MAYSINGER, D.; SHAVER, A. (1998). From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TiPS*. Vol. 19. NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. (2002). Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 5, pp. 388–395.
- MORGAN, C. J.; SIEGAL, A. F. (1996). *Statistics and data analysis - An introduction*, 2nd Ed., John Wiley e Sons, Inc, New York.
- MURTEIRA, B.; RIBEIRO, C.S.; SILVA, J.A., PIMENTA, C. (2002). *Introdução à estatística*. McGraw-Hill, Lisboa.
- NIKI, E. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals¹. *Am J C/in Nuir*. Vol. 54, pp. 1119S-24S.
- NRIAGU, J. (1998) History, occurrence and uses of vanadium. *In: "Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry"*, John Wiley & Sons, pp. 1-24.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. (1979) - Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, Vol. 95, No. 2, pp. 351–358.
- OHMORI, S.; NAWATA, Y.; KIYONO, K.; MURATA, H.; TSUBOI, S.; IKEDA, M.; AKAGI, R.; MOROHASHI, K.; ONO, B.I. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* cultured under aerobic and anaerobic conditions: air-level oxygen stress and protection against stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1472, pp. 587-594.
- OLIVEIRA, E.; PEDROSA, C.; PIRES, R. (2000). *Ciências da Terra e da Vida – do Big-Bang à Célula*, 3rd Ed., Texto Editora, Lisboa.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, Vol. 64, No. 1, pp. 34–50.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, L.R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agri. Food Chem*, Vol. 49, pp. 4619-4626.
- OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; DEEMER, E. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 50, pp. 3122-3128.
- OWSIANOWSKI, E.; WALTER, D.; FAHRENKROG, B. (2007). Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- PALOZZA, P.; SIMONE, R.; PICCI, N.; BUZZONI, L.; CILIBERTI, N.; NATANGELO, A.; MANFREDINI, S.; VERTUANI, S. (2007). Design, synthesis, and antioxidant potency of novel α tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 44, pp.1452–1464.
- PATEL, B.; HENDERSON, G.E.; HASWELL, S.J.; GRZESKOWIAK, R. (1990). Speciation of Vanadium Present in a Model Yeast System. *Analyst*. Vol. 115.
- PENNINCKX, M. (1999). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, pp.737–742.
- PEREIRA, C.; AGOSTINHO, P.; MOREIRA, P.; DUARTE, I.A.I.; SANTOS, M.S.; OLIVEIRA, C.R. (2002). Estratégias de neuroproteção. Efeito da Vimipocetina em Modelos in vitro de Stresse Oxidativo. *Acta médica portuguesa*. Vol. 16, pp. 401-406.
- PESTANA, M.H.; GAGEIRO, J.N. (2000). *Análise de dados para ciências sociais – A complementaridade do SPSS*, 2nd Ed., Edições Sílabo, Lisboa.
- PLASS, W. (1999). Phosphate and vanadate in biological systems: chemical relatives or more? *Angew. Chem*. Vol.38, pp. 909-912.
- PLJESA-ERCEGOVAC, M.D.; MIMIC-OKA, J.; DRAGICEVIC, D.; SAVIC-RADOJEVIC, A.; OPACIC, M.; PLJESA, S.; RADOSAVLJEVIC, R.; SIMIC, T. (2006). Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: Role of glutathione associated enzymes. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Vol. 26, pp. 175–181.
- POSTMA (1989) - Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 55, pp. 468.
- PRICE, J.; SANNY, C.; SHEVLIN, D. (2005). Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Vol. 54, pp. 56-61.

- PRIOR, R.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, pp. 3273-3279.
- PRIOR, R.; CAO, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different Analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine.* Nos. 11/12, Vol. 27, pp. 1173–1181.
- PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53, pp. 4290-4302.
- PRIYA, K.; SUBRAHMANYAM, P.; KUMAR, D.; CHIRANJEEVI, P. (2006). Simple Sensitive Spectrophotometric Determination of Vanadium in Biological and Environmental Samples. *E Journal of Chemistry.* Vol. 3, No.13, pp 286-297.
- PYRZYŃSKA, K.; WIERZBICKI, T. (2004). Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta.* Vol. 64, pp. 823–829.
- RAK, M.; ZENG, X.; BRIERE, J.J.; TZAGOLOFF, A. (2008). Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Molecular Cell Research.*
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved abts radical Cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* Nos. 9/10, Vol. 26, pp. 1231–1237.
- REGOLI, F.; WINSTON, G. (1999). Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology.* Vol. 156, pp. 96–105.
- REPINC, U.; BENEDIK, L.; STIBILJ, V. (2004). Determination of vanadium in biological and environmental samples by RNAA with emphasis on quality control. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* Vol. 264, No. 1, pp. 39-43.
- RETTORI, D.; VOLPE, P. (1999). Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova,* Vol. 23, No. 2.
- RIBEIRO, A.C.F.; VALENTE, A.J.M.; LOBO, V.M.M.; AZEVEDO, E.F.G.; AMADO, A.M.; AMORIM DA COSTA, A.M.; RAMOS, M.L.; BURROWS, H.D. (2004). Interactions of vanadates with carbohydrates in aqueous solutions. *Journal of Molecular Structure,* Vol. 703, pp. 93–101.
- ROSADO, T.; CONIM, A.; ALVES-PEREIRA, I.; FERREIRA, R. (2009). Vanadium pentóxido effects on stress responses in wine *Saccharomyces cerevisiae* strain UE-ME₃. *Ecotoxicology.* Vol. 18, pp. 1116-1122.
- ROWE, C.L.; HEYES, A.; HOPKINS, W. (2008). Effects of Dietary Vanadium on Growth and Lipid Storage in a Larval Anuran: Results from Studies Employing Ad libitum and Rationed Feeding. *Aquatic Toxicology.*
- RUI-YAN, F.; JIAN, C.; YIN, L. (2007). The Function of the Glutathione/Glutathione Peroxidase System in the Oxidative Stress Resistance Systems of Microbial Cells. *Chin J Biotech,* Vol. 23, N°5, pp. 770–775.
- SAITO, T.L.; OHTANI, M.; SAWAI, H.; SANO, F.; SAKA, A.; WATANABE, D.; YUKAWA, M.; OHYA, Y.; MORISHITA, S. (2003). SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database. *Nucleic Acids Research,* Vol. 32.
- SANTOS-OCANÁ, C.; CÓRDOBA, F.; CRANEI, F.; CLARKE, C.; NAVAS, P. (1998). Coenzyme Q6 and Iron Reduction Are Responsible for the Extracellular Ascorbate Stabilization at the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemistry.* Vol. 273, No. 14, pp. 8099–8105.
- SCHACHERER, J.; TOURRETTE, Y.; POTIER, S.; SOUCIET, J.L.; MONTIGNY, J. (2007). Spontaneous duplications in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *DNA Repair,* Vol. 6, pp. 1441–1452.
- SCHNEIDER, C.; OLIVEIRA, A. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* Vol.10, No. 4.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. Vol. 50, pp. 2432 – 2438.
- SEO, J.S.; LEE, K.W.; RHEE, J.S.; HWANG, D.S.; LEE, Y.M.; PARK, H.G.; AHN, I.Y.; LEE, J.S. (2006). Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione

reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, Vol. 80, pp. 281-289.

SHECHTER, Y.; GOLDWASER, I.; MIRONCHIK, M.; FRIDKIN, M.; GEFEL, D. (2003). Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 237, pp. 3-11.

SIES, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am.J.Med.*, Vol. 91.

SIES, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* Vol. 82.

SINCLAIR, D.A. (2002). Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 123, pp. 857–867.

SINEV, I.; KARDASH, T.; KRAMAREVA, N.; SINEV, M.; TKACHENKO, O.; KUCHEROV, A.; KUSTOV, L.M. (2008). Interaction of vanadium containing catalysts with microwaves and their activation in oxidative dehydrogenation of ethane. *Catalysis Today*.

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.* Vol. 174, pp. 297- 302.

SOARES, G.D.; ANDREAZZA, C.A.; SALVADOR, M. (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *Journal agricultural and food chemistry*. Vol. 51, pp. 1077-1080.

SOARES, S. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes *Phenolic acids as antioxidants. Rev. Nutr.*, Vol. 15, No. 1, pp.71-81.

SOARES, G.D.; ANDREAZZA, C.A.; SALVADOR, M. (2005). Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 41, Nº. 1, pp. 95-100.

STANKIEWICZ, P.; TRACEY, A.; CRANS, D. (1995). Inhibition of phosphate metabolizing enzymes by oxovanadium (V) complexes. In “Vanadium and its role for life”, chapter 9 (Marcel Dekker, Inc), NY, Vol.31, pp. 287-323.

STANKIEWICZ, P.J.; GRESSER, J.M. (1988). Inhibition of Phosphatase and Sulfatase by Transition State Analogues? *Biochemistry*, Vol. 27, pp. 206-212.

STOHS, S.; BAGCHI, D. (1994). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 18, No. 2, pp. 321-336.

SUGIMOTO, Y.; OTHA, Y.; MARIKAWA, T.; YAMASHITA, T.; YOSHIDA, M.; TAMAOK, B. (1990). In vitro metabolismo f testosterone of hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*), *J. Steroid Biochem.* Vol. 35, pp. 271-279.

TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; KISHITANI, S.; TAKABE, T.; YOKOTA, S.; TAKABE, T. (1999). Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Science*, Vol.148, pp. 131–138.

TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G.; DAWES, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology* Vol.15 No.6.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOSC, 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*. Vol. 19, pp. 669–675.

TODOROVA, D.; NEDEVA, D.; ABRASHEV, R.; TSEKOVA, K. (2006). Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B 77. *Journal of Applied Microbiology*, pp.1364-5072.

TORRES-FRANKLIN, M.L.; CONTOUR-ANSEL, D.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.T. (2006). Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 165, pp. 514-521.

TRACEY, S.A.; WILLSKY, R.G.; TAKEUCHI, S.E. (2007). Vanadium . Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Practical Application. CRC Press. USA.

TSIANI, E.; FANTUS, I.G. (1997). Vanadium Compounds Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents. *TEM*, Vol. 8, No. 2.

TURTON, H.; DAWES, I.; GRANT, C. (1997) - *Saccharomyces cerevisiae* Exhibits a YAP-1-Mediated Adaptive Response to Malondialdehyde, *Journal of Bacteriology*, pp. 1096–1101.

VALKO, M.; MONCOL, R.; IZAKOVIC, J.; MAZURA, M. (2005). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 160, pp. 1–40.

- VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V. M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A. (1998). Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Nutrição clínica*. Vol. 31, pp. 31-44.
- VASCONCELOS, S.; GOULART, M.; MOURA, J.; BENFATO, V.; KUBOTA, L. (2001). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, pp. 1323-1338.
- VERDOUCQ,L., VIGNOLS,F., JACQUOT,J.P., CHARTIER,Y. AND MEYER,Y. (1999) In Vivo Characterization of a Thioredoxin h Target Protein Defines a New Peroxiredoxin Family. *J.Biol.Chem.*, Vol.274, pp.19714-19722.
- VIEIRA, A. (2006). Radicais oxidantes: da Química à Biologia. Química.
- WANG, C.T.; HUANG, H.H. (2007). Photo-chargeable titanium/vanadium oxide composites. *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 354, pp. 3336–3342.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 44, pp. 701-705.
- WERNER-WASHBURNE,M., BRAUN,E.L., CRAWFORD,M.E. AND PECK,V.M. (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.*, Vol.19, pp.1159-1166.
- WERNER-WASHBURNE,M.; BRAUN,E.; JOHNSTON,G.C; SINGER,R.A. (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.*, Vol.57, pp.383-401.
- WILLIAMS, N. (2003). Models for biological phosphoryl transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1697, pp. 279-287.
- WILLSKY, G.; WHITE, D.; MCCABE, B. (1985). Metabolism of Added Orthovanadate to Vanadyl and High-molecular weight Vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 259, No. 21, pp. 13273-13281.
- WILSON, J. (2005). Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.* Vol. 25, pp. 105–25.
- WINSTON, G.; REGOLI, F.; DUGAS, A.; FONG, J.; BLANCHARD, K. (2007). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical Scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 24, No. 3, pp. 480–493.
- ZADRAG, R.; WOJNAR, L.; BARTOSZ, G.; BILINSKI, T. (2005). Does yeast shmooing mean a commitment to apoptosis?. *Cell Biology International*, Vol. 30, pp. 205-209.
- ZHANG, Y.; HERMAN, B. (2001). Ageing and apoptosis. Mechanisms of Ageing and Development Vol. 123, pp. 245–260.
- ZENGH, W. WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, pp. 5165 – 5170.
- ZHIVOTOVSKY, B.; BURGESS, D.; VANAGS, D.; ORRENIUS, S. (1997). Involvement of Cellular Proteolytic Machinery in Apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 230, pp. 481–488.

Anexos

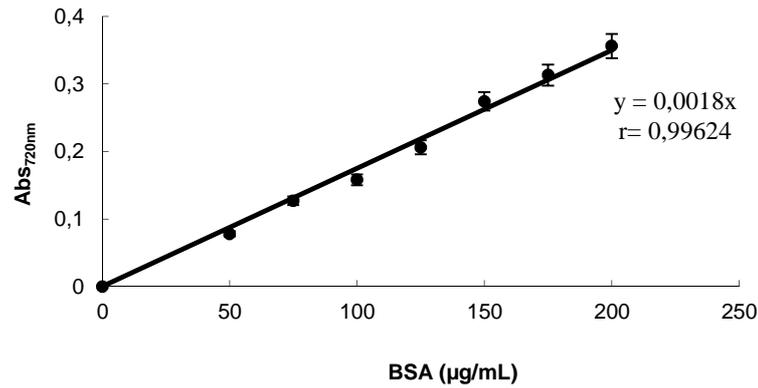


Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração das proteínas, construída a partir de uma solução de BSA de concentração conhecida como padrão (50-200 µg/mL).

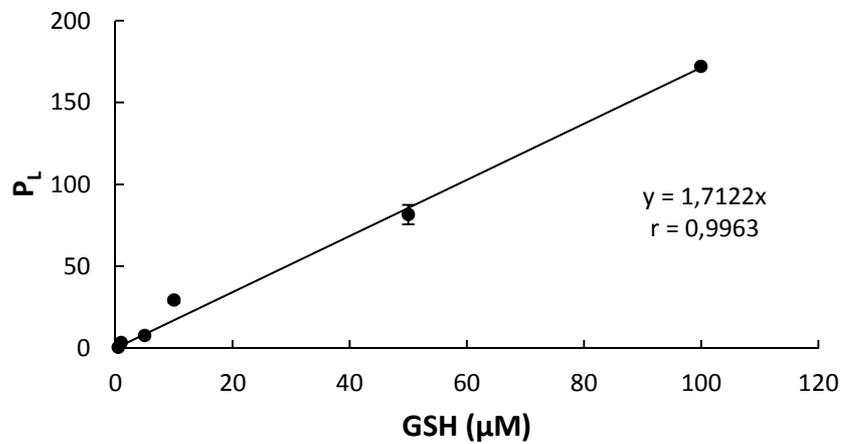


Figura A2 – Representação gráfica da curva de calibração do glutatióno, construída a partir da leitura fluorimétrica de GSH no intervalo de concentração (0,5 – 100 µM) (adaptado de Rosado, 2008).

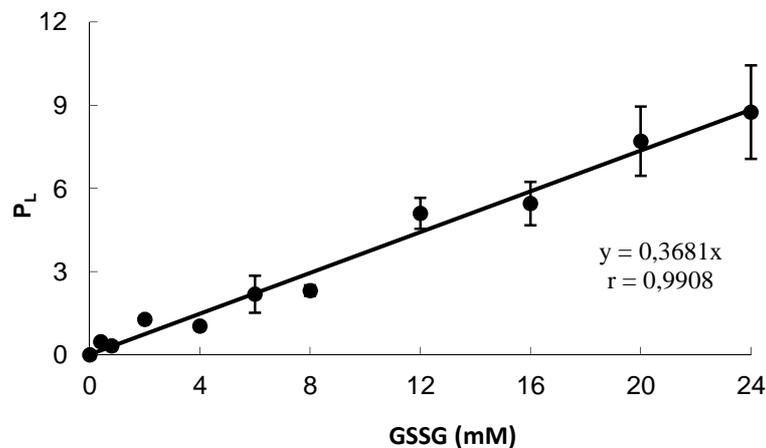


Figura A3 – Representação gráfica da curva de calibração do dissulfureto de glutatióno, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de GSSG no intervalo de concentração (0,4-24 µM) (adaptado de Rosado, 2008).

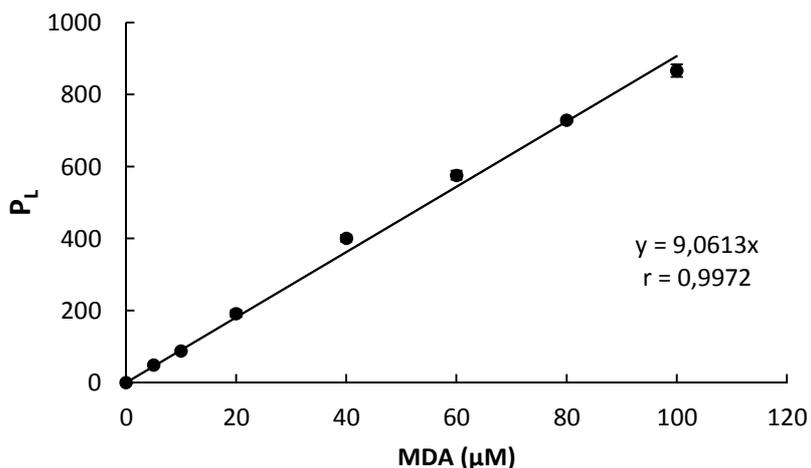


Figura A4 - Representação gráfica da curva de calibração do malonaldeído, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão de MDA no intervalo de concentração (5 – 100 µM) (adaptado de Rosado, 2008).

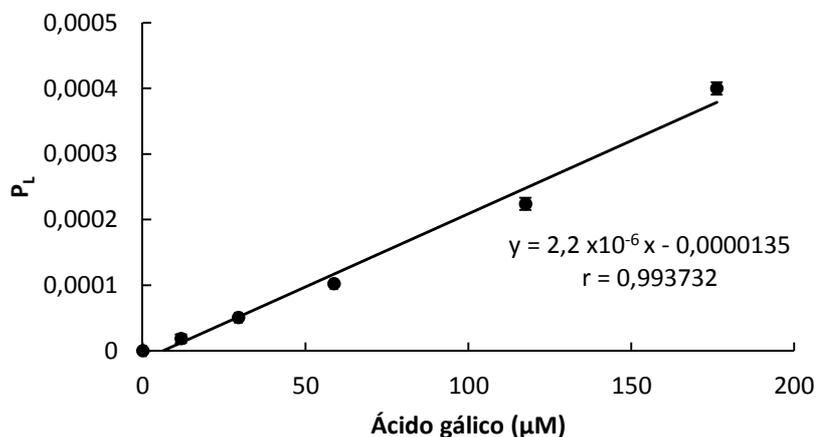


Figura A5 – Representação gráfica da curva de calibração do DPPH, construída a partir da leitura espectrométrica de ácido gálico de concentração conhecida no intervalo (12-178 µM).

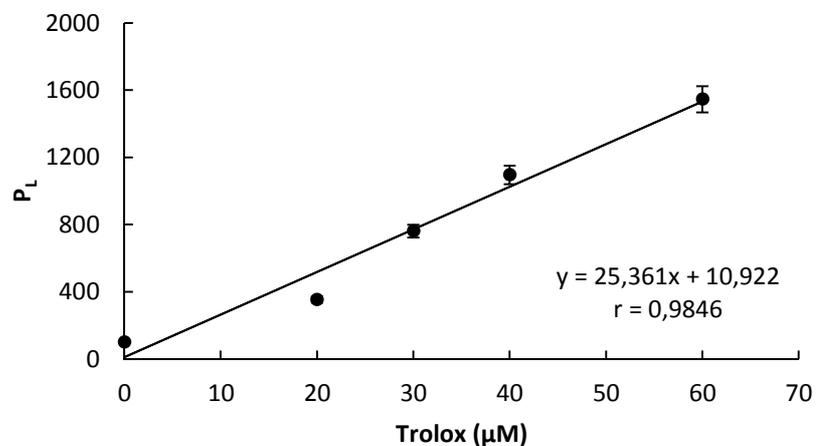


Figura A6 – Representação gráfica da curva de calibração do ORAC, construída a partir da leitura de fluorescência de soluções padrão de Trolox no intervalo (20-60 µM).

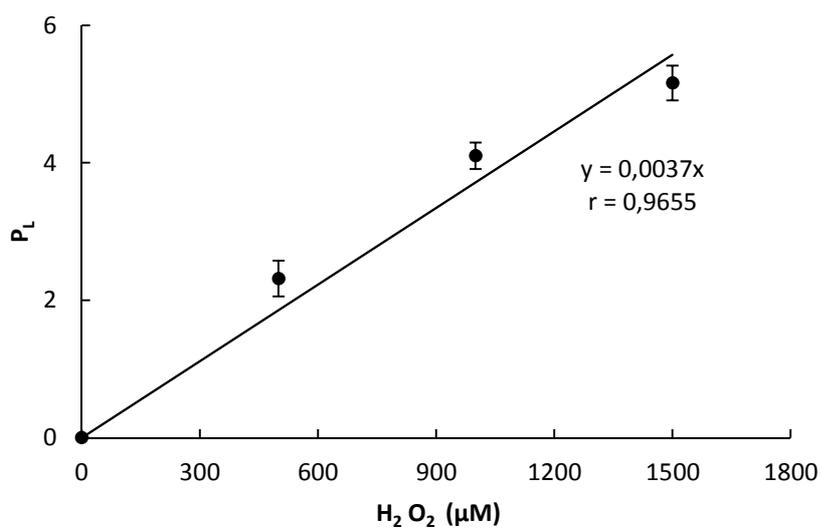


Figura A7 – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de ROS, construída a partir da leitura fluorimétrica utilizando uma soluções padrão H_2O_2 de concentração conhecida (100-1500 μM).

Curvas de reacção

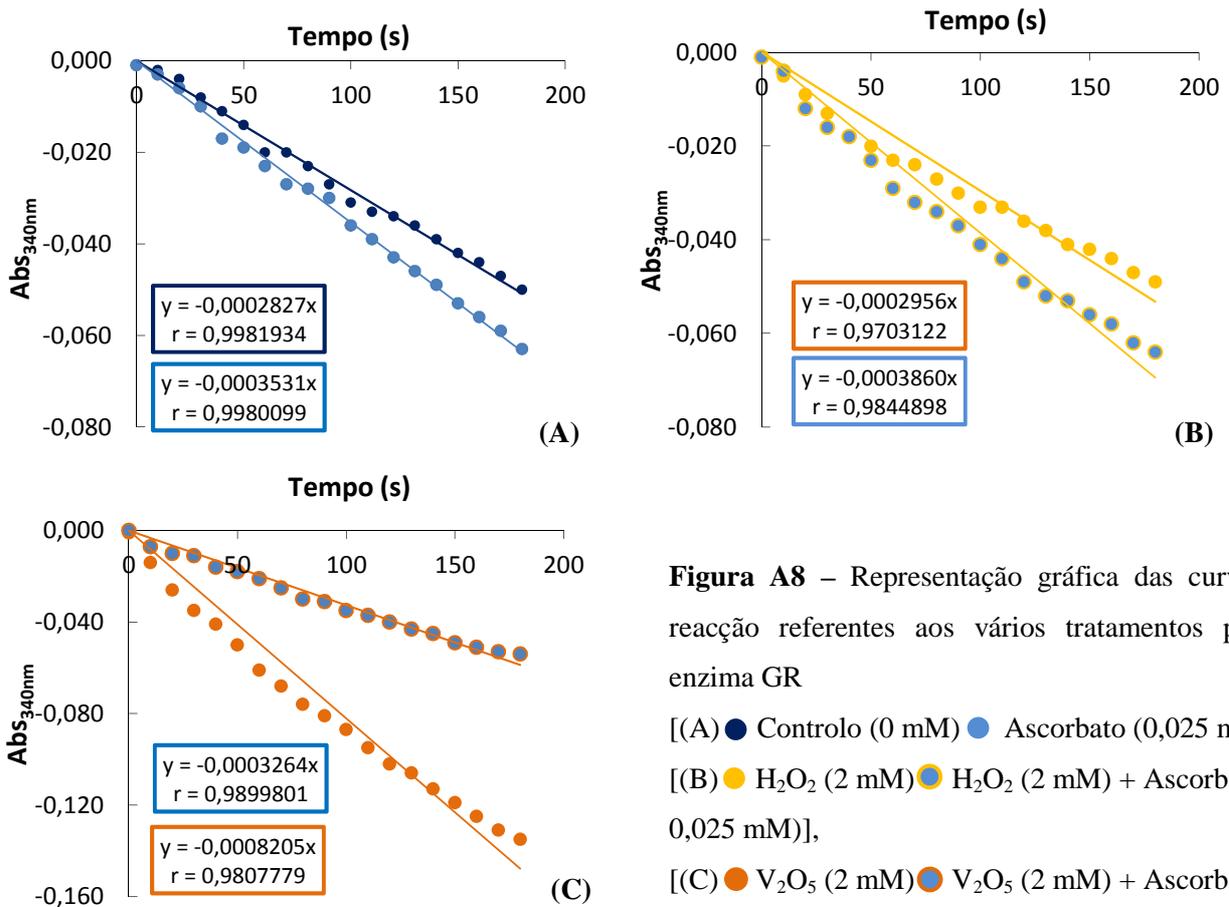


Figura A8 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima GR

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],

[(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],

[(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].

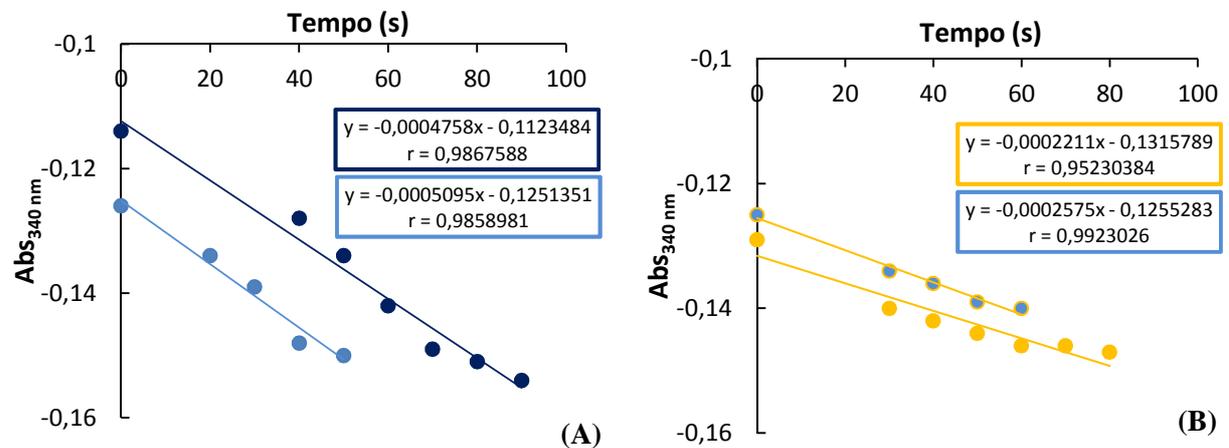


Figura A9 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima GPx.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],

[(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],

[(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].

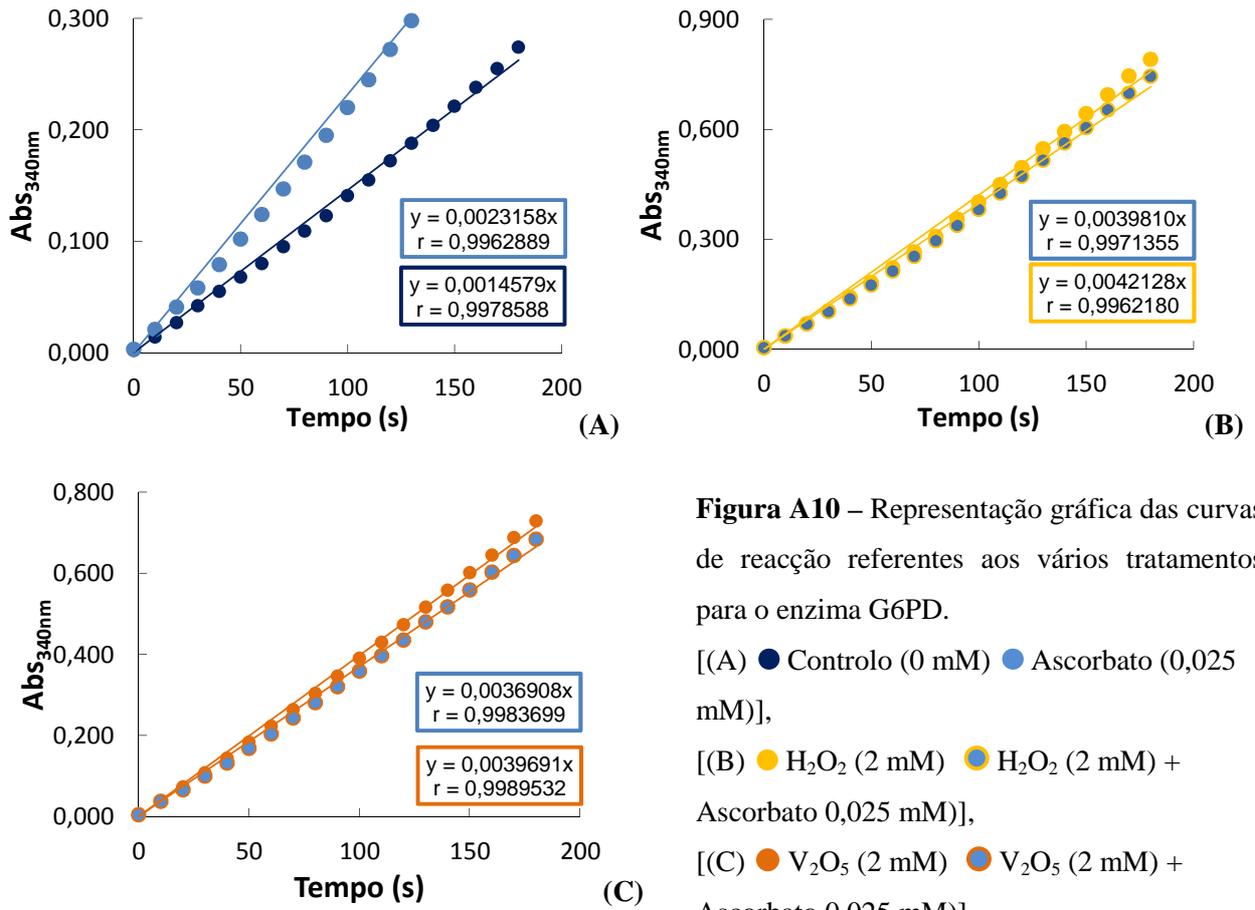


Figura A10 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima G6PD.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],

[(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],

[(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].

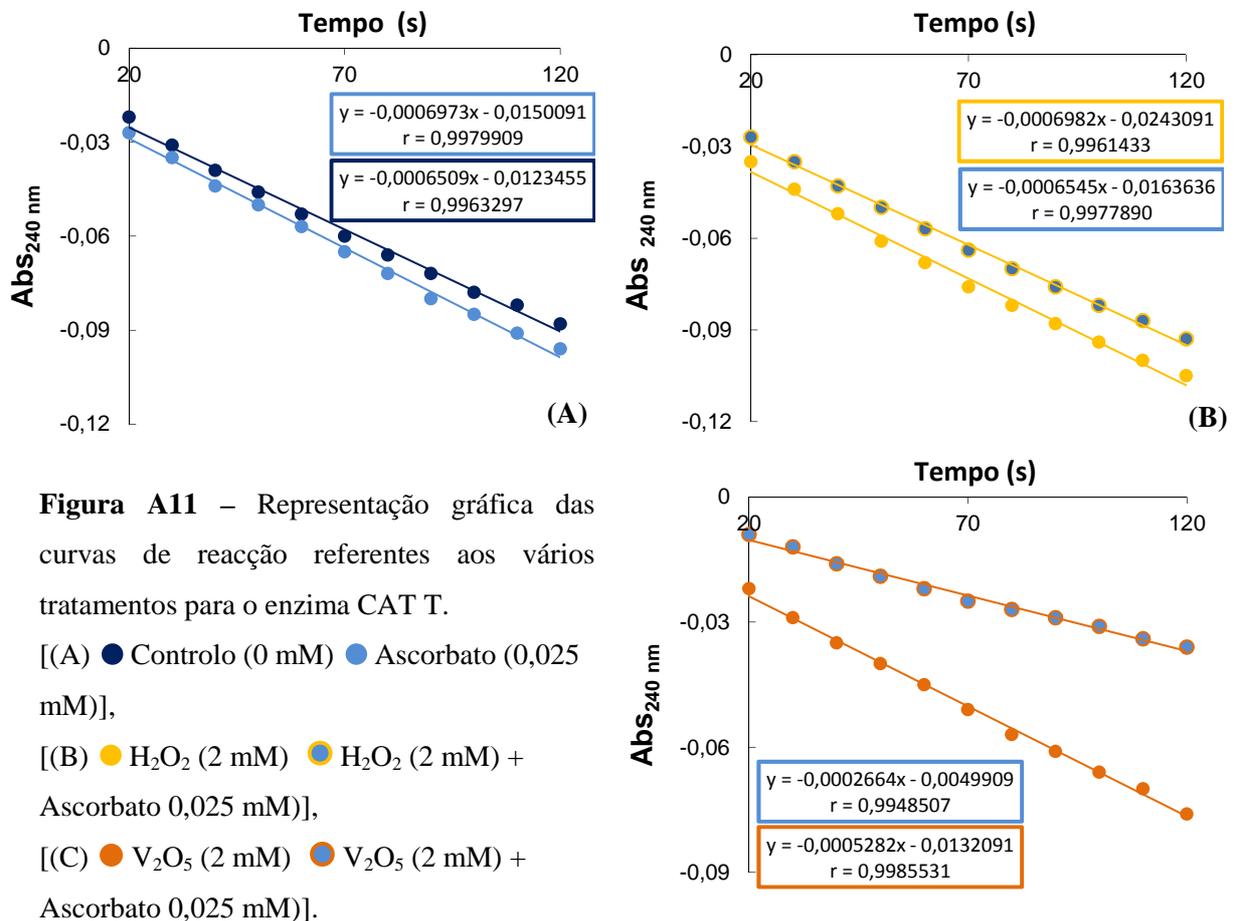


Figura A11 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima CAT T.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],

[(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],

[(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].

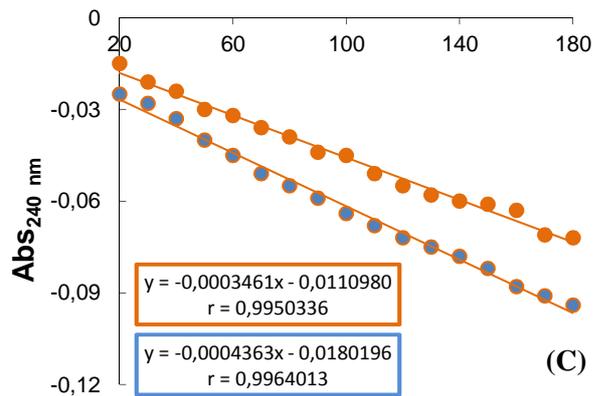
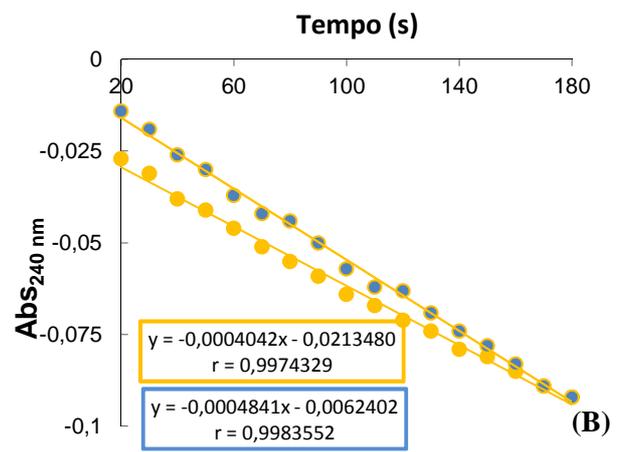
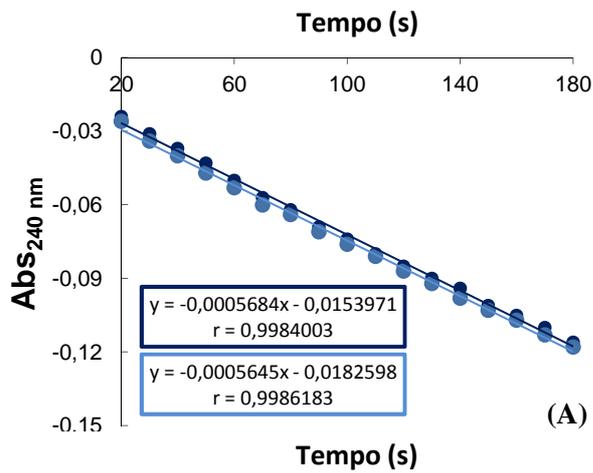


Figura A12 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima CAT A.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],
 [(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM],
 [(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM].

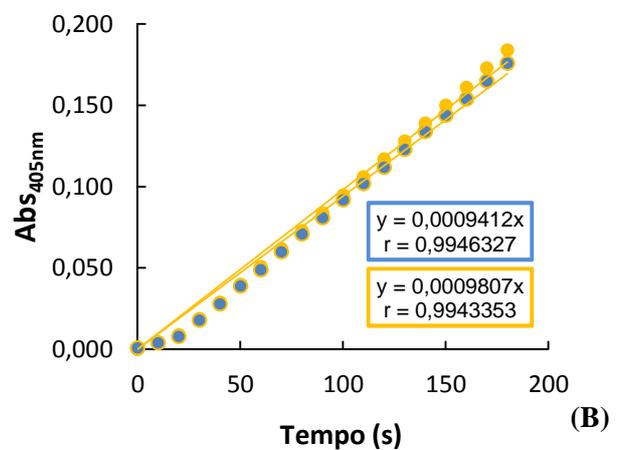
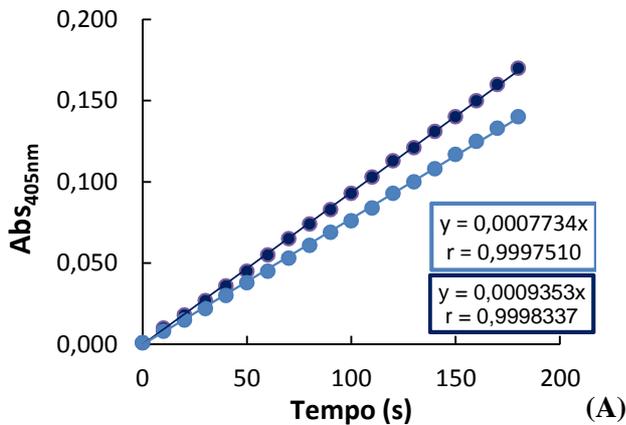
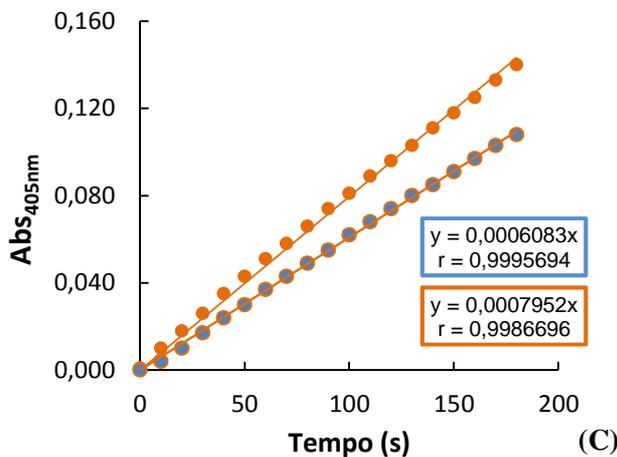


Figura A13 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o enzima ALP.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],
 [(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM],
 [(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM].



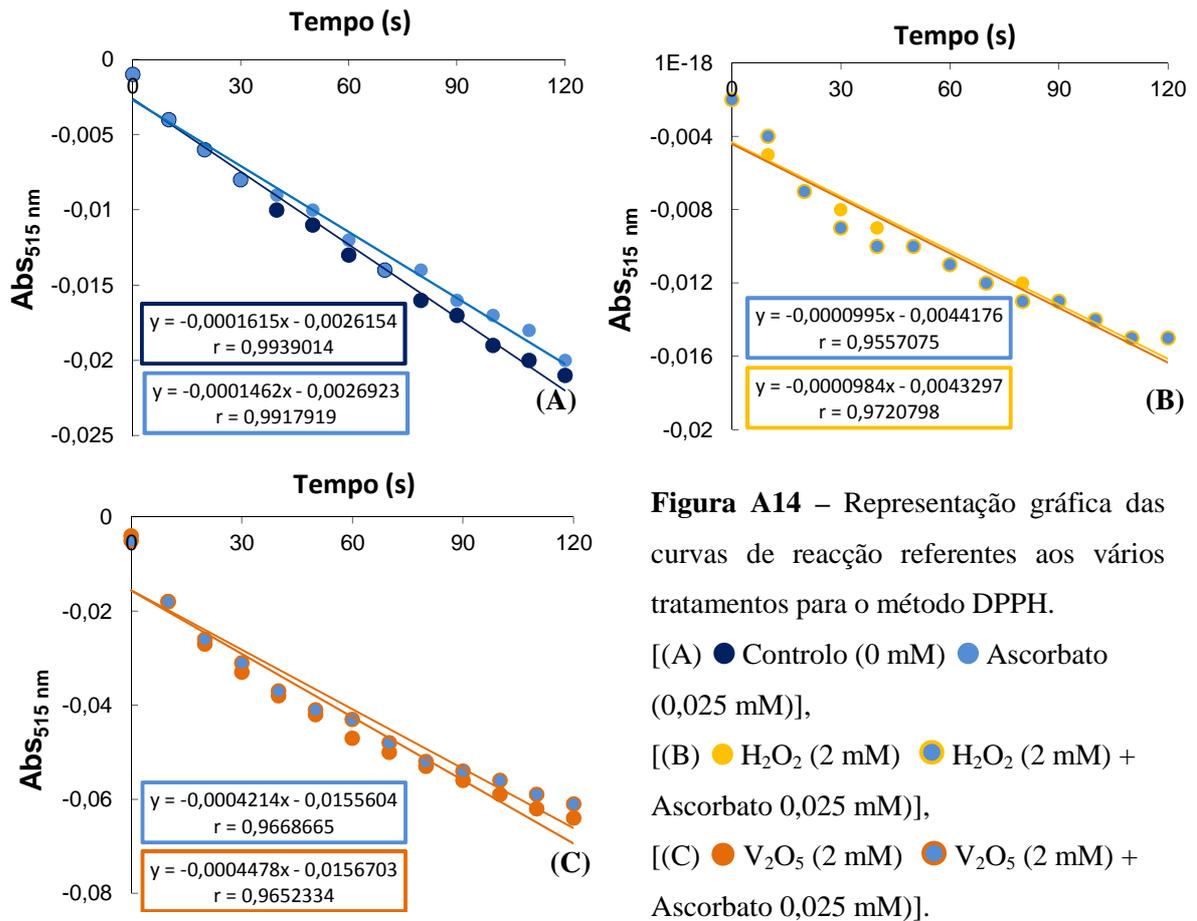


Figura A14 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o método DPPH.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],
 [(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],
 [(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].

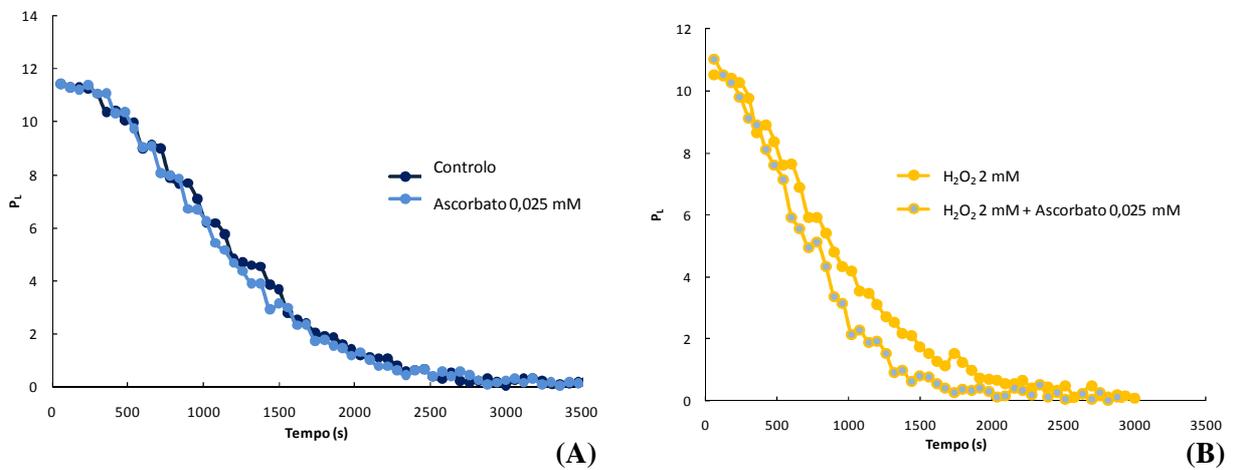
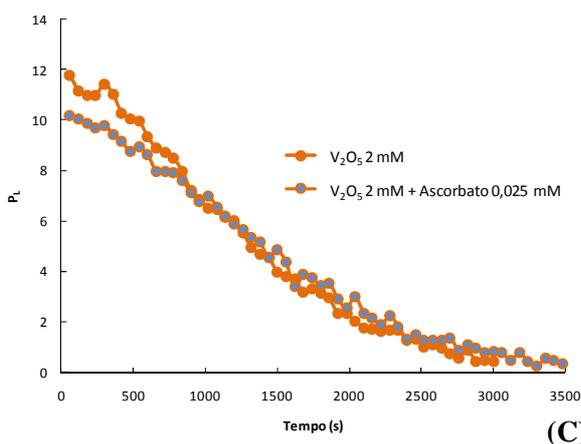


Figura A15 – Representação gráfica das curvas de reacção referentes aos vários tratamentos para o método ORAC.

[(A) ● Controlo (0 mM) ● Ascorbato (0,025 mM)],
 [(B) ● H₂O₂ (2 mM) ● H₂O₂ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)],
 [(C) ● V₂O₅ (2 mM) ● V₂O₅ (2 mM) + Ascorbato 0,025 mM)].



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

Conc. ou Activ.Enz.	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
cfu	Entre grupos	1,269E19	5	2,537E18	95,890	,000
	No interior dos grupos	6,350E17	24	2,646E16		
	Total	1,332E19	29			
ps	Entre grupos	783,909	5	156,782	22,701	,000
	No interior dos grupos	165,750	24	6,906		
	Total	949,659	29			
MDA	Entre grupos	84963,603	5	16992,721	1115,664	,000
	No interior dos grupos	365,545	24	15,231		
	Total	85329,148	29			
ALP	Entre grupos	16098,325	5	3219,665	58,035	,000
	No interior dos grupos	1331,480	24	55,478		
	Total	17429,805	29			
GSH	Entre grupos	,873	5	,175	550,374	,000
	No interior dos grupos	,008	24	,000		
	Total	,881	29			
GSSH	Entre grupos	1,684	5	,337	164,950	,000
	No interior dos grupos	,049	24	,002		
	Total	1,733	29			
GSH S GSSG	Entre grupos	4,765	5	,953	3769,500	,000
	No interior dos grupos	,006	24	,000		
	Total	4,771	29			
GSH R GSSG	Entre grupos	,602	5	,120	1300,410	,000
	No interior dos grupos	,002	24	,000		
	Total	,604	29			
DPPH	Entre grupos	12,347	5	2,469	4928,703	,000
	No interior dos grupos	,012	24	,001		
	Total	12,359	29			
ORAC	Entre grupos	124,211	5	24,842	2503,717	,000
	No interior dos grupos	,238	24	,010		
	Total	124,449	29			
ROS	Entre grupos	31928,516	5	6385,703	34,477	,000
	No interior dos grupos	4445,163	24	185,215		
	Total	36373,680	29			
GR	Entre grupos	1866,887	5	373,377	135,752	,000
	No interior dos grupos	66,011	24	2,750		
	Total	1932,897	29			
GPX	Entre grupos	12380,231	5	2476,046	52,782	,000
	No interior dos grupos	1125,859	24	46,911		
	Total	13506,090	29			
G6PD	Entre grupos	81040,456	5	16208,091	389,803	,000
	No interior dos grupos	997,925	24	41,580		
	Total	82038,382	29			
CATT	Entre grupos	131910,322	5	26382,064	248,092	,000
	No interior dos grupos	2552,153	24	106,340		
	Total	134462,475	29			
CATA	Entre grupos	489,725	5	97,945	349,537	,000
	No interior dos grupos	6,725	24	,280		
	Total	496,450	29			