

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ALINE BISINELLA IANOSKI**

**EFEITO ESTRESSOR DO GLIFOSATO E PARAQUATE EM *Saccharomyces cerevisiae***

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA  
2019**

**ALINE BISINELLA IANOSKI**

**EFEITO ESTRESSOR DO GLIFOSATO E PARAQUATE EM *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselle Maria Maciel

**CURITIBA  
2019**

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

Ianoski, Aline Bisinella

Efeito estressor do glifosato e paraquate em *Saccharomyces cerevisiae* / Aline Bisinella Ianoski.-- 2019.

1 arquivo de texto : PDF ; 2,92 MB

Disponível via World Wide Web

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019

Bibliografia: p. 61-70

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Leveduras. 3. Herbicidas. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Estresse oxidativo. 6. Radicais livres (Química). I. Haminiuk, Charles Windson Isidoro, orient. II. Maciel, Giselle Maria, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 117

A Dissertação de Mestrado intitulada: Efeito estressor do glifosato e paraquate em *Saccharomyces cerevisiae*, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Aline Bisinella Ianoski**, no dia 26 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk - Presidente - UTFPR

Profa. Dra. Marlene Soares – UTFPR

Profa. Dra. Thabata Maria Alvarez – UP

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2019.

*A minha “vóvis”, **Hermínia Breda Ianoski**, a quem foi permitido estudar apenas para aprender a assinar o próprio nome. Vingou-se, sendo a melhor professora que pude ter, capaz de transmitir os mais preciosos ensinamentos através das suas atitudes e de seus olhares.*

*Aos meus pais **Marcos Antonio Ianoski e Dalila Lucia Bisinella Ianoski** por tudo, pelo apoio, paciência, disponibilidade, estímulo, confiança e amor incondicional.*

*A minha irmã **Lires Bisinella Ianoski** por ser minha alma gêmea e sempre meu porto seguro.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* e aos *espíritos de luz*, por me guiarem todos os dias, por atenderem as minhas preces, por não se cansarem dos meus lamentos e clamores, que foram muitos. Deus que o diga!

A *minha família*, pelo suporte, carinho amor, compreensão, respeito, estímulo e paciência, muita paciência nos momentos de crise. Amo vocês!

Ao meu orientador, *Doutor Charles Windson Isidoro Haminiuk*, pelo suporte e esforço em disponibilizar todo o material necessário para execução deste trabalho, pela compreensão e por me guiar na trajetória até aqui. Muito obrigada!

A *Doutora Giselle Maria Maciel*, pela parceria, ensinamentos e disponibilidade. É difícil descrever em palavras o quanto sou grata pela sua orientação e coorientação nestes 4 anos em que trabalhamos juntas. Foram anos de aprendizado profundo, de desafios, frustrações e conquistas. Giselle é uma orientadora que empolga, que coloca pra cima, que não deixa desistir e que impressiona por tamanha inteligência e criatividade. Hoje, agradeço pela amizade construída, pelas conversas sobre a vida, sobre os lugares e pelo riso solto. A você, minha gratidão!

A admirável *Doutora Marlene Soares*, pelas preciosas contribuições no exame de qualificação e pelo estímulo na conclusão desta pesquisa. Marlene é dessas professoras que transmitem conhecimento com imensa leveza e generosidade. Você nasceu com o dom de ensinar: de ensinar a ser profissional, de respeitar a vida, de se importar com o próximo, de amar. Muito obrigada por me tornar uma pessoa melhor!

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia: *Jéssica Crecencio Matej, Anna Lou Mucharski Strafit de Oliveira, Tatiane Brugnari, Raquel Rossetto, Isabela de Andrade Arruda Fernandes, Bruno Torres, Camila Souza Almeida dos Santos, Elaine Nogueira e Avany Judith Ferraro Miorim*, pelos momentos de descontração, pela disponibilidade em auxiliar nos experimentos, no desenvolvimento de metodologias e análises estatísticas. Ah, e é claro! Pelos momentos de surpresa, tensão, desespero e união. Este último ano foi desafiador. Me sinto honrada por fazer parte de uma equipe tão “gente boa”. Raros são estes ambientes de estudo e trabalho, raras são estas pessoas!

Agradecimento especial à *Morgana Kuwaki*, por ajudar no desenvolvimento desta pesquisa, pelo interesse, disponibilidade, pelas risadas, histórias e amizade. Muito obrigada!

As amigas *Nigella Mendes de Paula*, *Tamara de Freitas Pereira* e *Halanna de Paula Riedi* (com dois enes), pela ajuda com as metodologias enzimáticas até altas horas nos finais de semana, pelo apoio, pela companhia, pelo carinho e amizade. Vocês são os presentes que o mestrado me deu!

As inseparáveis *Ana Paula Stafussa* e *Valéria Rampazzo Ribeiro*, pela parceria, pelas histórias e por me mostrarem tudo o que o norte tem de bom para oferecer. Como vocês fazem falta na minha rotina!

Aos meus “malas” prediletos *Lires Bisinella Ianoski*, *Diego Luiz Bernieri Ianoski*, *Manuela de Carvalho Sanches*, *Rafhael Souza Pinto* e *Dariany Monteiro*, pela amizade, pelas piadas, jogos, comilanças e por compreenderem a minha ausência durante o desenvolvimento deste estudo. Vocês são demais!

Aos queridos amigos *Lincoln Thiago Calixto*, *Manoel Augusto de Freitas* e *Ezequiel “Zeca” Westphal*, por proporcionarem excelentes finais de semana de descontração no litoral e pelas histórias e conversas mais engraçadas do mundo. Vocês são fantásticos!

A minha amada amiga *Adriana Schmidt Riedi*, um ser humano ímpar, de uma força admirável e inspiradora. Adriana é dessas pessoas que não nos cansamos de ter por perto, dessas que vivem intensamente as alegrias e as tristezas que aparecem pelo caminho sem deixar de olhar para o próximo. Você é maravilhosa!

A *Dayane Moreira Braga*, pelas caronas tão divertidas, por ser calma nos meus dias de caos, pela capacidade de respeitar o próximo, por ser uma amiga tão dedicada e compreensiva. Day, você é uma inspiração, um ser de luz!

A minha “fofis” *Aline Cristine Hermann Bonato*, pela amizade descomplicada, companheirismo, carinho, pelas dicas e pelo interesse. Nós compartilhamos o mesmo nome, o mesmo porte físico, o mesmo signo e o mesmo humor. A Hermann é uma daquelas amigas otimistas, que não tem tempo ruim, que pra tudo tem uma solução e que te coloca pra cima. A sua amizade é um presente de Deus na minha vida!

A *CAPES*, pelo apoio financeiro que possibilitou a minha dedicação exclusiva no desenvolvimento desta pesquisa.

*"As pessoas educam para a competição e esse é o princípio de qualquer guerra. Quando educarmos para cooperarmos e sermos solidários uns com os outros, nesse dia estaremos a educar pela paz."*

*Maria Montessori*

*"Ambiente limpo não é o que mais se limpa e sim o que menos se suja."*  
*Chico Xavier*



## RESUMO

IANOSKI, Aline Bisinella. **Efeito estressor do glifosato e paraquate em *Saccharomyces cerevisiae***. 77 f. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

O glifosato e o paraquate são herbicidas utilizados em vários países. O descarte destes produtos e seus metabólitos ocasionam a contaminação de diversos compartimentos ambientais, sendo muitas vezes conduzidos para estações de tratamento de esgoto e de água. Estudos relatam que a exposição a estes compostos pode ocasionar estresse oxidativo nos organismos. Um estímulo exagerado na produção de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), pode estar relacionado a mais de cinquenta doenças. Uma maneira de verificar o efeito destes micropoluentes nos seres vivos é empregar a *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo eucariótico. Neste contexto, utilizou-se esta levedura para avaliação do efeito estressor gerado pelos micropoluentes glifosato e paraquate, tanto com os padrões analíticos como com as suas formulações comerciais TROP® e TOCHA®, respectivamente. Foram realizadas análises de sobrevivência celular em diferentes períodos de tempo, da geração de EROs e de dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) após 2 e 3 horas de exposição aos pesticidas. Para o ensaio de sobrevivência celular as células provenientes da fase de crescimento logarítmico foram tratadas com os padrões analíticos glifosato e paraquate nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração que mais afetou a taxa de crescimento da levedura foi a de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo esta a concentração aplicada nos demais ensaios. Nos testes de sobrevivência com as formulações comerciais TROP® (glifosato) e TOCHA® (paraquate) a taxa de crescimento celular foi drasticamente afetada. Houve elevação na produção de EROs durante a segunda e terceira hora de exposição a quase todos os compostos analisados, exceto para o padrão analítico paraquate na segunda hora. A produção de CAT na segunda hora aumentou apenas para o padrão analítico glifosato, já na terceira hora aumentou tanto para esta substância quanto para a formulação comercial TROP®. Para as demais substâncias estudadas não houve alterações significativas na produção de CAT. A enzima SOD aumentou na presença dos padrões analíticos glifosato e paraquate na segunda hora, já na terceira hora ocorreu redução significativa na atividade enzimática frente apenas ao padrão analítico paraquate. As formulações comerciais TROP® e TOCHA® não apresentaram diferença significativa na produção de SOD em relação ao controle em nenhum dos períodos analisados. Os resultados obtidos evidenciam que há necessidade de abordar não apenas os ingredientes ativos dos pesticidas, mas principalmente as suas formulações comerciais, pois é assim que os pesticidas são disponibilizados no ambiente.

**Palavras-chave:** Levedura. Herbicida. Espécies reativas de oxigênio. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

IANOSKI, Aline Bisinella. **Stressor effect of glyphosate and paraquat on *Saccharomyces cerevisiae***. 77 f. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Glyphosate and paraquat are herbicides used in many countries. The disposal of these products and their metabolites lead to the contamination of several environmental compartments, and are often conducted to sewage and water treatment plants. Studies report that exposure to these compounds may lead to oxidative stress in organisms. An exaggerated stimulus in the production of free radicals, such as reactive oxygen species (ROS), may be related to more than fifty diseases. One way to monitor the effect of these micropollutants on living things is to employ *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryotic model. In this context, this yeast was used to evaluate the stressor effect generated by the micropollutants glyphosate and paraquat, both with the analytical standards and with its commercial formulations TROP<sup>®</sup> and TOCHA<sup>®</sup>, respectively. Cell survival analyzes were performed at different time periods, from the generation of ROS and the determination of the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes after 2 and 3 hours of exposure to the pesticides. For the cell survival assay the cells from the logarithmic growth phase were treated with the analytical standards glyphosate and paraquat at the concentrations of 50, 100 and 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The concentration that most affected the growth rate of the yeast was 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , and this was the concentration applied in the other assays. In the survival trials with the commercial formulations TROP<sup>®</sup> (glyphosate) and TOCHA<sup>®</sup> (paraquat) the cell growth rate was drastically affected. There was an increase in the production of ROS during the second and third hour of exposure to almost all the compounds analyzed, except for the paraquat analytical standard in the second hour. CAT production in the second hour increased only to the glyphosate analytical standard, and in the third hour it increased for both the substance and the TROP<sup>®</sup> commercial formulation. For the other substances studied, there were no significant changes in CAT production. The enzyme SOD increased in the presence of the analytical standards glyphosate and paraquat in the second hour, and in the third hour there was a significant reduction in the enzymatic activity against analytical paraquate. Commercial formulations TROP<sup>®</sup> and TOCHA<sup>®</sup> showed no significant difference in the production of SOD in relation to the control in any of the analyzed periods. The results obtained show that there is a need to address not only the active ingredients of pesticides, but especially their commercial formulations, as this is how pesticides are made available in the environment

**Keywords:** Yeast. Herbicide. Reactive oxygen species. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de contaminação e exposição humana aos fármacos e desreguladores endócrinos .....	17
Figura 2. Estrutura química e propriedades físico-químicas do glifosato .....	20
Figura 3. Rotas de biodegradação do glifosato no solo .....	21
Figura 4. Estrutura química e propriedades físico-químicas do paraquate .....	22
Figura 5. Mecanismo de ação do paraquate .....	23
Figura 6. Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o funcionamento celular .....	25
Figura 7. Características da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo eucariótico .....	28
Figura 8. Etapas para o desenvolvimento da pesquisa .....	31
Figura 9. Colônia matriz da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
Figura 10. Células viáveis (A) e células inviáveis (B) da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
Figura 11. Etapas para a dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) .....	37
Figura 12. Cultivo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio YPG com agitação em shaker a 130 rpm por 24 horas a 30°C e obtenção da biomassa celular após centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4°C .....	38
Figura 13. Curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada .....	43
Figura 14. Sobrevivência celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após exposição aos padrões analíticos glifosato e paraquate .....	45
Figura 15. Produção de EROs após exposição da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aos padrões analíticos de glifosato e paraquate .....	47
Figura 16. Dosagem das enzimas catalase e superóxido dismutase após exposição da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aos padrões analíticos de glifosato e paraquate .....	49
Figura 17. Sobrevivência celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após exposição às formulações comerciais TROP® e TOCHA® .....	52
Figura 18. Produção de EROs após exposição da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> às formulações TROP® e TOCHA® .....	54
Figura 19. Dosagem das enzimas catalase e superóxido dismutase após a exposição as formulações comerciais TROP® e TOCHA® .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Micropoluentes</b> .....	<b>17</b>
3.1.1	Herbicidas: glifosato e paraquate .....	19
<b>3.2</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio e mecanismos de ação antioxidante</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Modelo eucariótico: <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Etapa 1 – Acompanhamento da curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Etapa 2 – Sobrevivência celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após exposição ao herbicidas</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Etapa 3 – Avaliação do estresse oxidativo causado à <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>35</b>
4.3.1	Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	36
4.3.2	Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) .....	37
4.3.2.1	<i>Obtenção da biomassa celular de Saccharomyces cerevisiae e adição dos herbicidas</i> .....	37
4.3.2.2	<i>Preparo do extrato intracelular da Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
4.3.2.3	<i>Dosagem da enzima catalase (CAT)</i> .....	39
4.3.2.4	<i>Dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD)</i> .....	39
4.3.2.5	<i>Determinação das proteínas totais</i> .....	40
<b>4.4</b>	<b>Curvas analíticas para o preparo das soluções comerciais TROP® e TOCHA®</b> .....	<b>40</b>
4.4.1	Metodologia da curva analítica de glifosato.....	41
4.4.2	Metodologia da curva analítica das formulação TOCHA® (paraquate).....	41
<b>4.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Acompanhamento da curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>43</b>

<b>5.2</b>	<b>Análises com os padrões analíticos dos herbicidas glifosato e paraquate</b>	<b>44</b>
5.2.1	Sobrevivência celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com os padrões analíticos glifosato e paraquate	44
5.2.2	Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em células da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas com os padrões analíticos de glifosato e paraquate	48
<b>5.3</b>	<b>Análises com as formulações comerciais TROP® (glifosato) e TOCHA® (paraquate)</b>	<b>51</b>
5.3.1	Sobrevivência celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com os herbicidas comerciais TROP® (glifosato) e TOCHA® (paraquat)	51
5.3.2	Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em células da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento com os herbicidas TROP® e TOCHA®	55
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICE A – Curva analítica da albumina bovina</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE B – Curva analítica do glifosato</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE C – Curva analítica do paraquate</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXO A – Culturas para as quais o ingrediente ativo glifosato encontra-se autorizado, com seus respectivos limites máximos de resíduo</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO B – Culturas para as quais o ingrediente ativo paraquate encontra-se autorizado, com seus respectivos limites máximos de resíduo</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO C – Formulação TROP®</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO D – Formulação TOCHA®</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na década de 50, o aumento do interesse da população por bens de consumo fomentou o desenvolvimento de novos produtos e a síntese de novos compostos, que passaram a ser produzidos e consumidos em larga escala. Porém, neste período ainda não havia uma preocupação em relação às consequências que tais produtos pudessem vir a causar no ambiente e nos seres vivos. Somente com a criação de novas estratégias e instrumentos analíticos mais sensíveis foi possível detectar estes compostos, que aparecem em concentrações muito baixas, no solo, no sedimento e na água, sendo denominados de micropoluentes (SODRÉ, 2012).

A exposição dos seres vivos a estes micropoluentes tem se mostrado danosa, pois algumas destas substâncias apresentam potencial toxicológico em organismos não-alvo, mesmo em concentrações muito reduzidas, como é o caso dos pesticidas (FENG et al., 2013).

Os pesticidas utilizados em atividades agrícolas podem escoar e lixiviar diretamente aos rios, contaminar os lençóis freáticos ou sofrerem volatilização (RAIMUNDO, 2011). Entre os pesticidas que vêm sendo estudados quanto ao seu efeito danoso ao meio ambiente e aos organismos vivos, estão os herbicidas glifosato e paraquate (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; 2011; RICHARD et al., 2005; SAITÚA; GIANNINI; PADILLA, 2012; SOUZA, 2011).

Estudos tem relacionado a geração exacerbada de radicais livres de oxigênio (EROs) à exposição de organismos ao glifosato e paraquat. O estresse oxidativo pode estar relacionado a mais de 50 enfermidades, como a artrite, a diabetes e o câncer (BIANCHI; ANTUNES, 1999; COLOMBO, 2013; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GAFFNEY et al., 2014; TREVISAN, 2014).

O estudo realizado por Gluszczak et al. (2011) relacionou a indução do estresse oxidativo no peixe *Leporinus obtusidens* ao herbicida a base de glifosato. Angelova et. al (2005) expuseram fungos filamentosos, como o *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Alternaria solani*, ao paraquat e observaram que ele foi capaz de provocar o estresse oxidativo nestes microrganismos.

Para evitar esta situação os seres vivos possuem defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, a fim de manter o equilíbrio do metabolismo celular, como as enzimas catalase e superóxido dismutase e as vitaminas C e E. Porém,

quando estes mecanismos não são suficientes para manter esse equilíbrio, o estresse oxidativo prevalece.

Uma forma de verificar esse possível desequilíbrio entre as EROs e os mecanismos antioxidantes é a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico. Este microrganismo representa uma ferramenta de sucesso para avaliação da capacidade de micropoluentes afetarem os organismo eucariontes (BARCELLOS, 2016; ISIDORI et al., 2006; SILVA, 2015). A *Saccharomyces cerevisiae* possui características biológicas importantes para um organismo modelo em testes laboratoriais, tais como não ser patogênica, possuir tempo de duplicação curto e, ter o seu genoma e sua fisiologia molecular bem conhecidos (AZARIAS, 2015; ESTRUCH, 2000; SIQUEIRA JUNIOR, 2013; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2004, 2005).

Através desta levedura é possível obter informações mecanicistas sobre a resposta a produtos tóxicos, como por exemplo a toxicidade imposta por metais e contaminantes ambientais aos organismos (SANTOS; SÁ-CORREIA, 2015). Nos últimos anos a *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se um organismo notável para a área da toxicogenética. No trabalho desenvolvido por Cabral et al. (2003) foi utilizado levedura para testar a toxicidade de herbicidas compostos por ácido fenoxiacético clorado.

Alguns estudos avaliaram o estresse oxidativo desencadeado pelos micropoluentes glifosato e paraquat em *Saccharomyces cerevisiae* são realizados, porém o período de ensaio é geralmente longo, não abordando o que ocorre nas primeiras horas de contato das células com estes micropoluentes (BRACONI et al., 2006; GUARIENTI et al., 2010).

É importante avaliar como pequenas concentrações destes micropoluentes, atuam nos primeiros instantes de contato de uma célula eucariótica, assim como é fundamental analisar não só os ingredientes ativos dos herbicidas glifosato e paraquate, mas também as suas respectivas formulações comerciais, já que é nesta composição que estes herbicidas são dispostos nos compartimentos ambientais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito estressor dos padrões analíticos glifosato e paraquate e suas respectivas formulações comerciais TROP® e TOCHA® na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar os dados de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e determinar a fase de crescimento exponencial;
- Avaliar a sobrevivência celular após exposição aos herbicidas;
- Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após exposição aos herbicidas;
- Dosar as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) após exposição aos herbicidas;



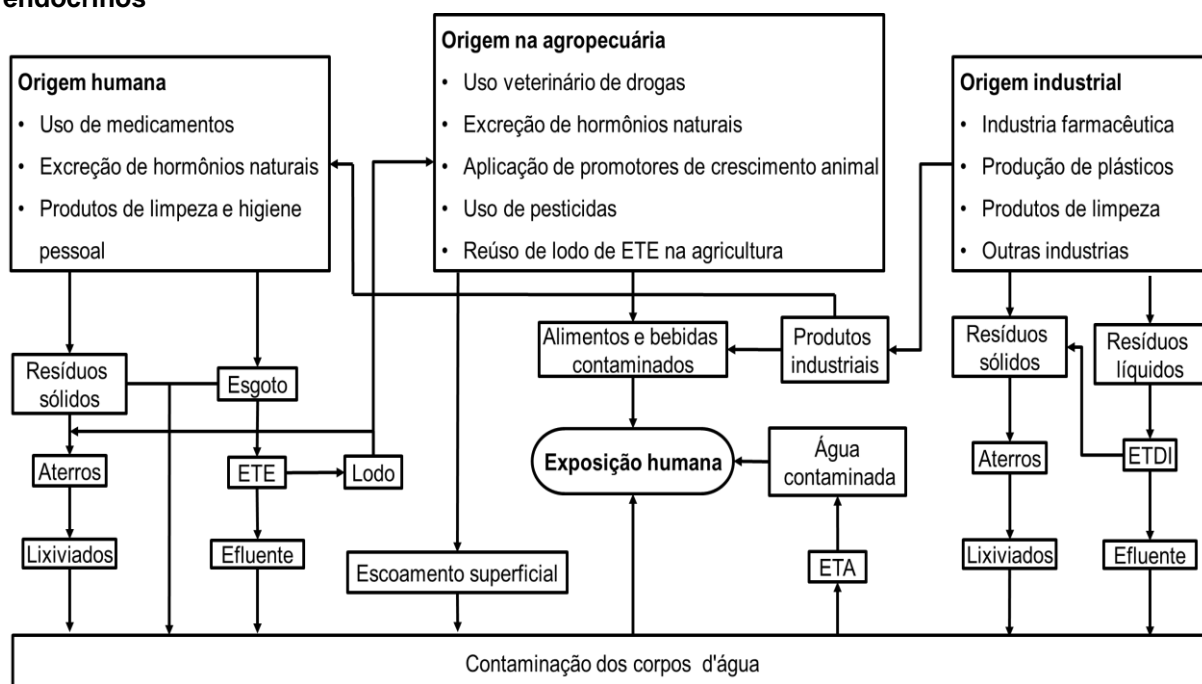
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Micropoluentes

Os micropoluentes estão no meio ambiente há muito tempo, porém em concentrações tão baixas ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ ) que apenas a evolução de técnicas analíticas tornou possível a sua detecção. Neste grupo estão os compostos presentes nos produtos de higiene pessoal, os hormônios, os fármacos e os pesticidas, por exemplo (JIANG; ZHOU; SHARMA, 2013; LUO et al., 2014; STUART et al., 2012).

Os principais meios de introdução destes micropoluentes no ambiente ocorrem através das águas residuárias domésticas ou industriais, através do escoamento e da lixiviação de campos agrícolas, pelo descarte de produtos, por vazamentos acidentais ou pela eliminação biológica de seus metabólitos alterados ou inalterados, tendo como consequência a poluição do solo, dos corpos hídricos e do sedimento (Figura 1) (FERREIRA, 2011; RAIMUNDO, 2011; SANTANA, 2013).

**Figura 1. Rotas de contaminação e exposição humana aos fármacos e desreguladores endócrinos**



ETE e ETDI: Estações de Tratamento de Esgoto e de Dejetos Industriais; ETA: Estação de Tratamento de Água

Fonte: Aquino; Brandt e Chernicharo, 2013.

Os micropoluentes são introduzidos continuamente no ambiente sendo caracterizados como pseudo-persistentes. Vale ressaltar que o tratamento convencional de esgoto não é capaz de remover de maneira eficiente esses produtos, possibilitando assim a sua permanência na água para consumo.

Estudos têm apontado para os possíveis efeitos danosos relacionados à exposição dos seres vivos aos micropoluentes. Dentre estes compostos estão os pesticidas, capazes de contaminar os principais recursos naturais do planeta: a água, o solo e o ar. Eles chegam facilmente aos organismos vivos, que quando expostos podem apresentar alterações no sistema imunológico, reprodutivo e estresse oxidativo em resposta a toxicidade destes compostos (GROSICKA-MACIĄG, 2011; SARATOVSKIKH, 2017; TREVISAN, 2014).

No Brasil ainda não há uma legislação que contemple de maneira detalhada todos os micropoluentes, evidenciando, assim, a necessidade da realização de pesquisas que abordem estas substâncias e os seus possíveis efeitos no meio ambiente e na saúde (SANTANA, 2013). Os resultados destes estudos podem auxiliar de forma direta ou indireta em uma regulamentação mais assertiva dos micropoluentes quanto aos aspectos que englobem o seu uso, a sua concentração e o seu descarte no ambiente.

Dessa forma, cada vez mais pesquisas são realizadas a fim de detectar a presença desses compostos no meio ambiente. Dentre as substâncias detectadas recentemente estão os pesticidas, como os herbicidas glifosato e paraquate (Quadro 1).

**Quadro 1. Presença de glifosato e paraquate em matrizes aquosas**

<b>Herbicidas</b>	<b>Concentrações (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Matriz</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Glifosato	140	Água de lixiviação (solo agrícola)	Brasil	Queiroz et al., 2011
Glifosato	7,6	Água superficial	Argentina	Aparicio et al., 2013
Glifosato	5,0	Rio	Alemanha	Sanders; Lassen, 2015
Paraquate	3,14	Água superficial	Nigéria	Ikpesu, 2014
Paraquate	3,95	Lagoa	Espanha	Fernández et al., 1998
Paraquate	0,28	Água superficial	Brasil	Veríssimo; Moreira; Meyer, 2018

### 3.1.1 Herbicidas: glifosato e paraquate

O Estado do Paraná é um dos maiores representantes da produção agrícola do país, como consequência desta atividade há também um expressivo uso de pesticidas nas lavouras. Segundo dados da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná (2018), o Brasil é o maior consumidor de pesticidas do mundo desde 2008, sendo que em 2017 no Paraná, os herbicidas utilizados representaram 60,58% deste total. Entre os ingredientes ativos mais consumidos, em primeiro lugar está glifosato, com 29,86% e em segundo lugar o paraquate com 7,43%.

A Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (2018) apresenta uma lista com os agrotóxicos aprovados para comércio e uso no Estado. Muitos dos herbicidas que constam nesta lista são utilizados simultaneamente nas lavouras, pois algumas plantas daninhas apresentam resistência ao mecanismo de ação de determinados produtos como é o caso dos herbicidas glifosato e paraquat, muitas vezes utilizados concomitantemente na plantação.

Uma grande parte dos pesticidas não são abordados pela legislação, não havendo um limite máximo permitido para sua presença nos compartimentos ambientais (SODRÉ, 2012). Isto é evidenciado na Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde, que estabelece o valor máximo permitido de alguns herbicidas em água para consumo, onde especifica este dado para o herbicida glifosato e seu principal metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA), sendo este valor de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), porém não menciona o herbicida paraquate.

Em 2015, o Parecer Técnico de Reavaliação nº 01 de 2015/GGTOX/ANVISA sugeriu o cancelamento do registro de produtos compostos pelo ingrediente ativo paraquate, uma vez que este composto está relacionado ao desenvolvimento da doença de Parkinson. Após um período de dois anos a Resolução da Diretoria Colegiada nº 177 de 21 de setembro de 2017 determinou que a fabricação e o uso do ingrediente ativo paraquate será proibido, porém somente a partir de setembro de 2020. Contudo, a exposição dos seres vivos não está ligada apenas pela contaminação das águas, solo ou sedimento, mas também a contaminação dos alimentos que são cultivados com estes herbicidas e fornecidos a população.

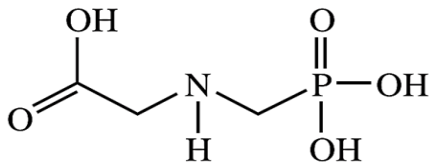
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através dos documentos intitulados como Monografias de Agrotóxicos, traz informações sobre a toxicologia, as

características técnicas e os esclarecimentos sobre em quais lavouras o glifosato e o paraquate podem ser aplicados, o limite máximo de resíduo (LMR) permitido no produto cultivado e a ingestão diária aceitável (IDA) para cada um destes compostos (ANEXOS A e B). Para o glifosato a IDA é de 0,042 mg/Kg p.c. ( $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e para o paraquate é de 0,004 mg/kg p.c. ( $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Para a Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (2016), eles devem ser classificados principalmente pelas estruturas químicas semelhantes e pelo mecanismo de ação, sendo essa última a classificação mais significativa, pois possibilita atingir os objetivos esperados dentro da agricultura, como por exemplo exterminar determinada erva daninha sem afetar o rendimento da cultura de interesse.

O glifosato (Figura 2) é um herbicida sistêmico, de amplo espectro de ação e pós-emergente, sendo um dos mais vendidos no mundo, comercializado por diferentes companhias e apresentando-se em diversas formulações (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Esse uso expressivo é consequência do seu emprego em inúmeras culturas agrícolas, como feijão, arroz, milho e soja (QUEIROZ et al., 2011).

**Figura 2. Estrutura química e propriedades físico-químicas do glifosato**

	Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P
	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	169,07
	S (mg L <sup>-1</sup> )	10.500
	Log K <sub>ow</sub>	-3,20
	pK <sub>a</sub>	2,34
	PV (mPa)	1,31x10 <sup>-2</sup>
	DT50 <sub>solo</sub> (d)	12
	DT50 <sub>Hidro</sub>	E
	K <sup>oc</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	21,699
	GUS	-0,36
	S: solubilidade em água a 20°C; K <sub>ow</sub> : coeficiente de partição octanol/água; pH = 7, 20°C; PV: pressão de vapor a 25°C; DT50 meia vida; K <sup>oc</sup> : coeficiente de adsorção a matéria orgânica; GUS: índice de vulnerabilidade da água subterrânea; E: estável (muito persistente)	

Fonte: Coutinho; Mazo, 2005; Milhome et al., 2009.

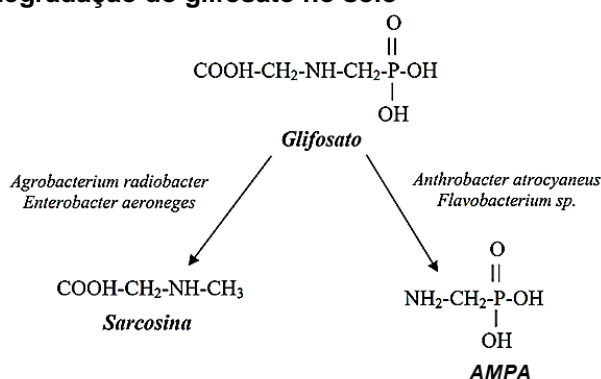
Após a sua aplicação na lavoura, o glifosato é absorvido pelas folhas e pelos caulículos afetando os processos bioquímicos de todo o organismo, atuando em diversos sistemas enzimáticos, como por exemplo na enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), inibindo a biossíntese de aminoácidos

aromáticos essenciais, como o triptofano e a tirosina, por fim resultando na morte da planta invasora (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; BOHM et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011).

Esse herbicida apresenta uma rápida adsorção no solo, o que dificulta a sua lixiviação e consequente contaminação da água subterrânea (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Porém, Queiroz et al. (2011), observaram que após 24 horas de aplicação do produto, com tempo de simulação de chuva de 60 minutos, o glifosato ainda estava presente na água de lixiviação, o que aumentaria a possibilidade da contaminação das águas subterrâneas por glifosato, caso o lençol freático seja próximo à superfície do solo e ocorra uma forte chuva após a aplicação do produto. Desta forma, ainda que o glifosato seja rapidamente adsorvido pelo solo, isso é influenciado pelo tipo de solo, pelo manejo da pulverização na lavoura e pela chuva após a aplicação. Além disso, a contaminação das matrizes aquosas pode ocorrer devido a acidentes que envolvam o vazamento do produto ou o descarte inadequado das embalagens.

O processo de degradação microbiológica do glifosato (Figura 3) resulta na sarcosina como metabólito intermediário e, no ácido aminometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito, este último apresenta uma persistência maior no solo quando comparado com o glifosato e uma meia vida de mais de 900 dias, enquanto o glifosato pode apresentar uma meia-vida inferior a 3 dias (BENETTI, 2015).

**Figura 3. Rotas de biodegradação do glifosato no solo**



Fonte: Arantes, 2007.

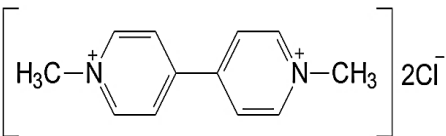
Coutinho e Mazo (2005) afirmam que grupo o fosfonato R-PO(OH)<sub>2</sub> do glifosato pode formar complexo metálicos, como o complexo de cobre (II), por exemplo. No estudo conduzido por Guilherme et al. (2014), o metabólito AMPA

demonstrou efeito genotóxico em peixes comparável aos danos causados pelo próprio glifosato.

Em seu estudo, Richard et al. (2005) concluíram que os efeitos endócrinos e tóxicos da formulação comercial do glifosato podem ser observados em mamíferos, mesmo em concentrações 100 vezes menores do que o uso recomendado na agricultura. Os autores sugerem que os efeitos nocivos do glifosato são potencializados pela presença dos adjuvantes em formulações comerciais, pois estes melhoram a biodisponibilidade deste composto, apresentando inclusive maior toxicidade do que o seu ingrediente ativo. Saitúa, Giannini e Padilla (2012) relatam que estudos toxicológicos mostram que os herbicidas a base de glifosato danificam o ácido desoxirribonucleico (DNA) e causam efeitos mutagênicos e efeitos cancerígenos em humanos. Aguiar et al. (2016) avaliaram a influência na resposta antioxidante de *Drosophila melanogaster* à exposição a um herbicida a base de glifosato, e verificaram um desequilíbrio oxidativo, que afetou significativamente os sistemas antioxidantes e a expressão gênica relacionada a este sistema.

Outro herbicida largamente utilizado é o paraquate, sendo comumente comercializado como sal diclorídrico (Figura 4). É classificado como um herbicida extremamente tóxico aos animais, sendo proibido em diversos países e futuramente no Brasil (NASPOLINI, 2016). É um herbicida de contato, não seletivo, de ação pós-emergente, utilizado em diversas culturas, como uva, cana-de-açúcar, maçã e café (ALMEIDA et al., 2007).

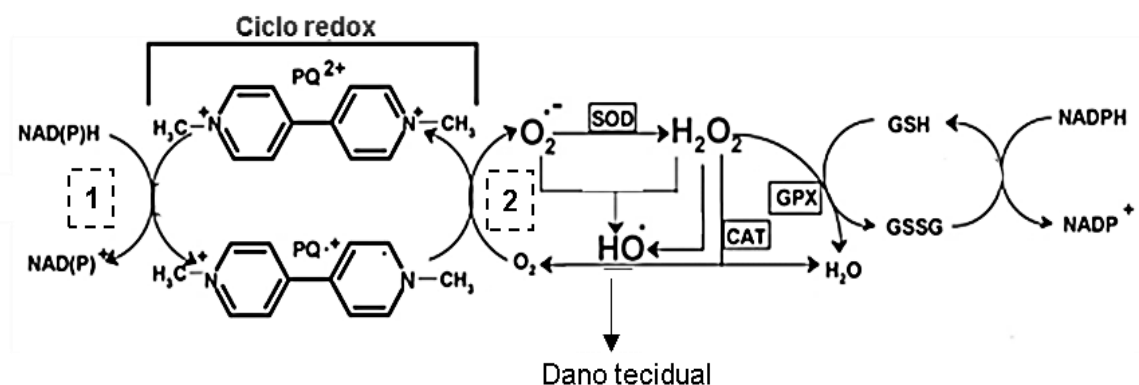
**Figura 4. Estrutura química e propriedades físico-químicas do paraquate**

	Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	257,16
	S (mg L <sup>-1</sup> )	620.000
	Log K <sub>ow</sub>	- 4,50
	pK <sub>a</sub>	NA
	PV (mPa)	1,0x10 <sup>-2</sup>
	DT50 <sub>solo</sub> (d)	12
	DT50 <sub>Hidro</sub>	E
	K <sup>oc</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	1.000.000
	GUS	- 6,25
S: solubilidade em água a 20°C; K <sub>ow</sub> : coeficiente de partição octanol/água; pH = 7, 20°C; PV: pressão de vapor a 25°C; DT50 meia vida; K <sup>oc</sup> : coeficiente de adsorção a matéria orgânica; GUS: índice de vulnerabilidade da água subterrânea; E: estável (muito persistente); NA: não aplicável.		

Fonte: Milhome et al., 2009. Adaptado de Souza e Machado, 2003.

O paraquate é um forte agente redutor que age horas após a sua aplicação na lavoura, causando a desidratação do tecido verde da planta. Quando ele entra em contato com vegetal atua no cloroplasto, captando os elétrons do fotossistema 1 e oxidando NAD(P)H a NAD(P), desencadeando uma reação em cadeia e resultando na produção de radicais superóxidos, que após sofrer o processo de dismutação formarão radicais peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio, após uma reação tipo Fenton, resulta no radical hidroxila, responsável pela degradação da membrana através da peroxidação dos seus lipídios e consequente vazamento do conteúdo celular (Figura 5) (CAMPOS, 2015; FERREIRA, 2005; FRANCO et al., 2010; SUNTRES, 2002).

Figura 5. Mecanismo de ação do paraquate



- 1: O paraquat é reduzido ao radical paraquat através da oxidação de NAD(P)H a NAD(P)<sup>+</sup>.
- 2: O radical paraquat é então imediatamente oxidado para o composto original com a transferência de um elétron para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido.

Fonte: Adaptado de Dinis-Oliveira et al., 2006.

O paraquate é um pesticida muito solúvel em água, porém possui baixa mobilidade no solo. Ainda assim, de acordo com Milhome et. al. (2009) ele pode ser transportado solubilizado em água ou associado ao sedimento, resultando na contaminação do meio ambiente. Quando presente na forma livre o paraquate adsorvido ao solo é inerte biologicamente e biodegradável. Embora este composto seja uma boa opção de herbicida, devido ao seu baixo custo e danos ambientais

reduzidos, ainda assim ele é extremamente tóxico aos animais e aos humanos, uma contaminação acidental do meio ambiente pode ser fatal para os seres vivos.

Naspolini (2016) verificou que a exposição de ratos ao paraquate causou comprometimento do metabolismo energético e estresse oxidativo. Suntres (2002) afirma que o envenenamento por paraquate causa insuficiência respiratória derivada do estresse oxidativo causado por este composto, sendo necessário entender como os processos antioxidantes poderiam afetar a toxicidade apresentada pelo herbicida paraquat. De acordo com Franco et al. (2010) apesar de diversos estudos relacionarem o paraquate com a doença de Parkinson, ainda existem muitas controvérsias quanto a esta relação, porém a sua interferência no estresse oxidativo e sua neurotoxicidade são evidentes.

### **3.2 Espécies reativas de oxigênio e mecanismos de ação antioxidante**

Os radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, podendo ser formados por diversos mecanismos. Existem muitas espécies de radicais livres nos seres vivos, dentre elas estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, 2006).

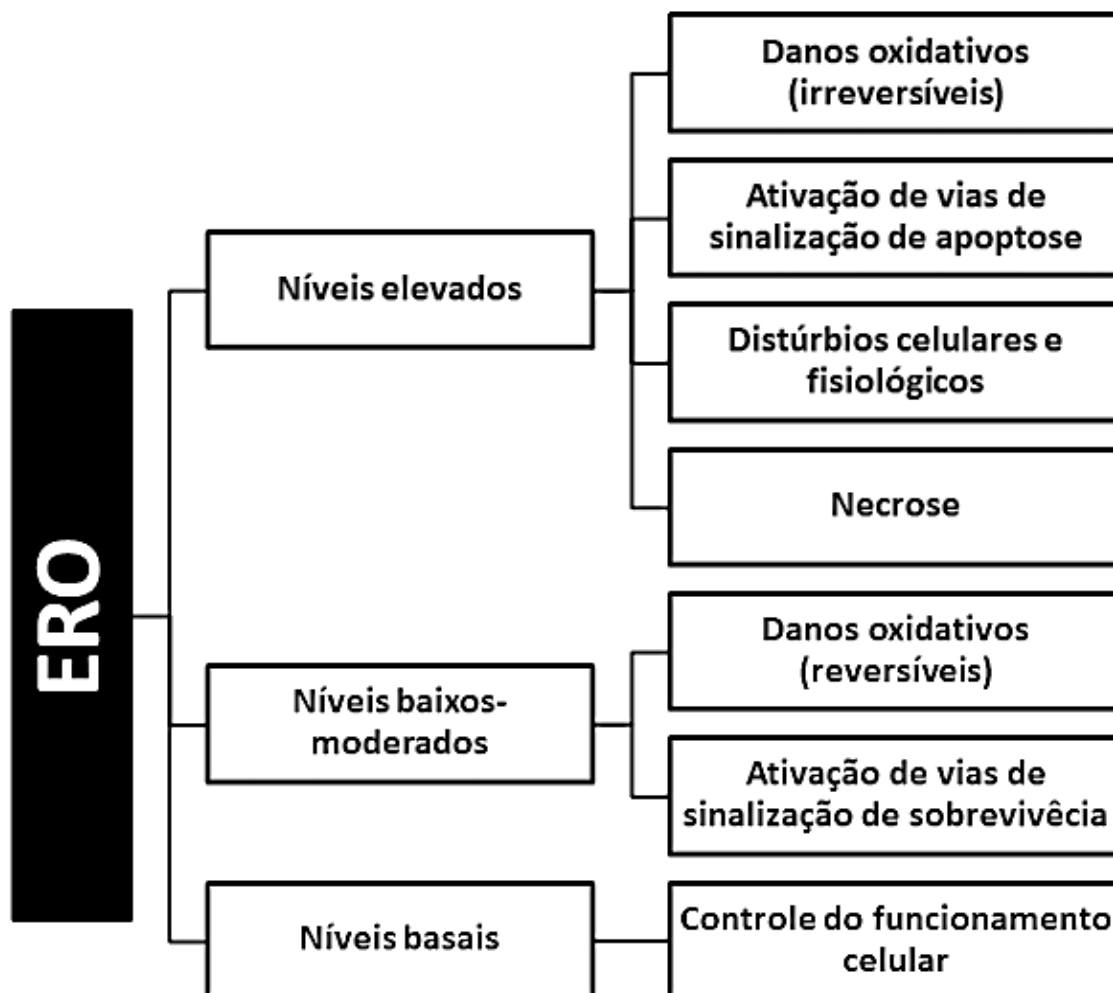
O oxigênio é um dos principais gases presentes em nossa atmosfera, sendo indispensável para a vida na Terra e participando de diversas reações bioquímicas vitais para os seres vivos. Durante o metabolismo desta molécula há a geração de EROs, que estão envolvidas em diversos processos biológicos, como na produção de energia e no crescimento celular. O oxigênio em seu estado fundamental já representa um radical, pois possui um par de elétrons desemparelhados, e participa das reações de oxidação na presença de metais de transição como os íons de  $\text{Fe}^+$  e  $\text{Cu}^+$  e na presença de enzimas, dando origem a inúmeras outras reações. Dentre as EROs estão o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ) (COLOMBO, 2013; HALLIWELL, 2006; TREVISAN, 2014)

As EROs estão presentes nos animais, nas plantas e nos microrganismos, sendo fundamentais na defesa contra infecções, por exemplo. Contudo, quando essas espécies reativas estão presentes em altas concentrações podem causar inúmeros efeitos deletérios aos seres vivos, tanto reversíveis quanto irreversíveis, podendo



inclusive resultar em necrose e apoptose (Figura 6) (HALLIWELL, 2006; TREVISAN, 2014).

Figura 6. Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o funcionamento celular



Fonte: Trevisan, 2014.

Para se proteger dos danos causados pelas EROs, os organismos desenvolveram uma forma de equilibrar as reações de oxidação através de mecanismos antioxidantes. Tais mecanismos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (MACIEL et al., 2013a; RATNAM et al., 2006).

O mecanismo não enzimático engloba a ação de antioxidantes como a vitamina C, os minerais, a vitamina E, os carotenos, flavonóides, ácido úrico e glutathione. E o mecanismo enzimático é composto por diversas enzimas, entre as quais estão a

superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), a catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) e a glutationa peroxidase (GSH-Px) (Quadro 2) (RATNAM et al., 2006; TREVISAN, 2014).

**Quadro 2. Ações e mecanismos de diversas substâncias antioxidantes**

Antioxidantes	Ação	Referência
<b><i>Não enzimáticos (de origem dietética)</i></b>		
Vitamina A ( $\beta$ caroteno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA	Rodrigo, Guichard e Charles, 2007
Vitamina C (ácido ascórbico)	Inibição das EROs. Estimula o poder antioxidante da vitamina E e do selênio. Proteção contra os danos causados pela lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox)	Rodrigo, Guichard e Charles, 2007
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	Proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana celular e da LDL. Converte $O_2^{\cdot-}$ e $H_2O_2$ em formas menos reativas	Rodrigo, Guichard e Charles, 2007
Cobre, Zinco, Manganês, Selênio	Cofatores das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px.	
Outros carotenoides (licopeno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos, LDL, proteínas e DNA. Sequestro e inativação de radicais livres	Visioli et al., 2003
Fitoquímicos (reverastrol, catequinas, quercetinas, ácidos fenólicos e outros)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA	Fitó et al., 2007
<b><i>Enzimáticos</i></b>		
SOD	Catalisa a conversão de $O_2^{\cdot-}$ em $H_2O_2$	Vincent, Innes e Vincent, 2007
CAT	Catalisa a conversão de $H_2O_2$ em $O_2$ e $H_2O$	
GSH-Px	Catalisa a redução de $H_2O_2$ à $H_2O$	

Fonte: Adaptado de Barbosa et al., 2008.

Porém quando a capacidade antioxidante de um organismo é inferior à produção de EROs ocorre o chamado estresse oxidativo. Este é um fenômeno que vem sendo cada vez mais estudado devido às evidências que o relacionam ao aceleração do processo de envelhecimento e ao desencadeamento de uma série de doenças (Quadro 3) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAHAL et al., 2014).

**Quadro 3 - Doenças relacionadas ao estresse oxidativo**

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

Fonte: Bianchi e Antunes, 1999.

Os radicais livres podem ter origem endógena ou exógena e a exposição aos compostos xenobióticos pode auxiliar no agravamento destas condições (GHELFI, 2014).

Para Carochó e Ferreira (2013) alguns fatores exógenos podem influenciar no aumento da produção de radicais livres no organismo, destacando-se os poluentes ambientais, as drogas e os pesticidas.

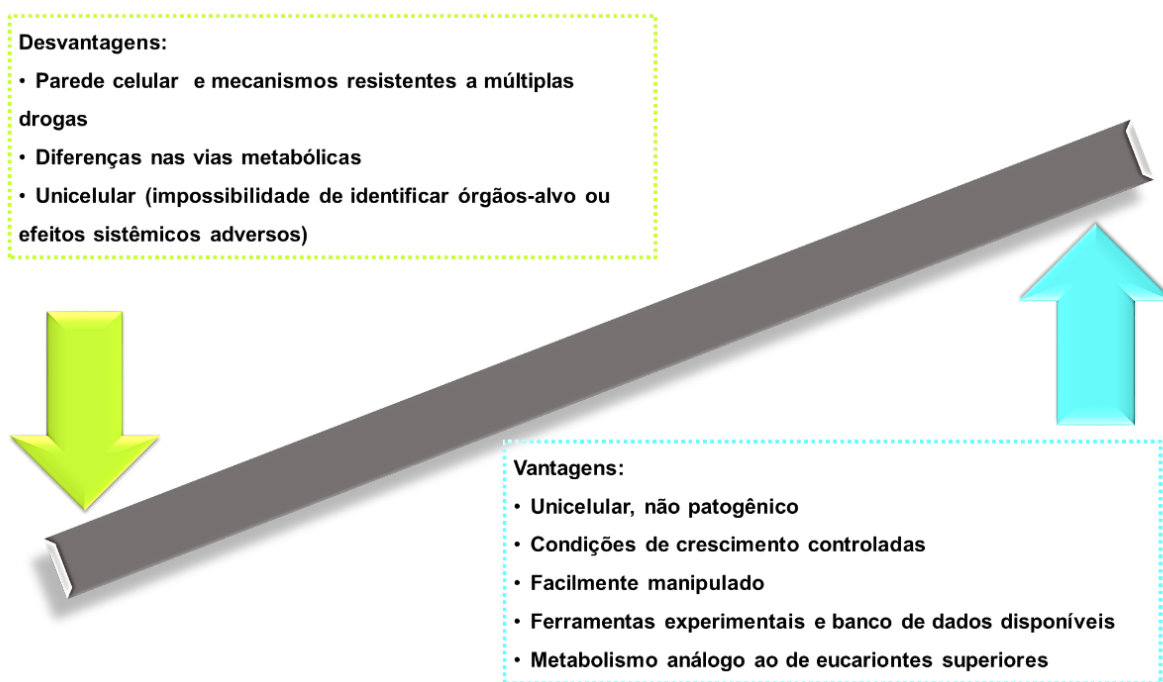
Uma maneira de monitorar os efeitos da exposição de eucariotos aos xenobióticos, como fármacos e pesticidas, é através de um modelo eucariótico com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BRACONI, BERNARDINI E SANTUCCI, 2016).

### 3.3 Modelo eucariótico: *Saccharomyces cerevisiae*

Amplamente utilizada nos processos fermentativos da indústria alimentícia e sucroalcooleira, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também se destaca na pesquisa científica como um interessante modelo eucariótico. Um dos fatores que fortaleceu sua aplicação deve-se ao fato dela possuir características fisiológicas e genéticas bem conhecidas (AZARIAS, 2015).

Esse fungo representa um microrganismo eucarionte, não patogênico, unicelular e, embora algumas vias metabólicas sejam distintas em relação aos eucariontes superiores, as suas vantagens como organismo modelo superam as suas desvantagens (Figura 7).

**Figura 7. Características da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico**



Fonte: Adaptado de Braconi, Bernardini e Santucci, 2016.

Os ensaios realizados com microrganismos, em geral, são mais fáceis, rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado em humanos quando comparados com animais. O genoma totalmente elucidado da *Saccharomyces cerevisiae* auxilia no entendimento da sua função celular, além disto, há a possibilidade da utilização de um elevado número de células geneticamente iguais (SOARES;ANDREAZZA;SALVADOR, 2004, 2005). Estas características viabilizam a sua utilização como modelo eucariótico em diversas pesquisas, dentre elas, as que avaliam os efeitos endócrinos e os danos celulares causados pelas EROs por agentes xenobióticos (AZARIAS, 2015; SANTOS; SÁ-CORREIA, 2015; SIQUEIRA JUNIOR, 2013).

A levedura é um microrganismo anaeróbio facultativo, ou seja, cresce tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias, apresentando ambos os mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, para neutralizar os danos oxidativos causados pela presença de EROs no organismo (JAMIESON, 1998).

Os mecanismos antioxidantes são inúmeros e geralmente não atuam de maneira independente e sim de forma simultânea nos organismos, prevenindo, sinalizando, combatendo e regenerando os danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio. Nas leveduras o Yap1p, Skn7p, Msn2p e Msn4p são os

principais fatores de transcrição que controlam a expressão de genes relacionados aos mecanismos de defesa antioxidante (MENG et al, 2017, FARRUGIA, BALZAN 2012). Além da CAT e da SOD, outras enzimas também degradam as EROs e estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, como as enzimas do citocromo P450 (CYP 1, CYP 40), citocromo-c peroxidase (CCP1) e a glutathiona peroxidase (HYR1 1).

Portanto, este microrganismo representa uma importante ferramenta para pesquisas que abordem os mecanismos antioxidantes protetores das células e do DNA quando estas são expostas a agentes antioxidantes ou a condições de estresse ambiental (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001; GASPARRI, 2010).

Estudos envolvendo perturbadores endócrinos utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante como modelo eucariótico para monitoramento de micropoluentes através dos bioensaios *Yeast Estrogen Screen* (YES) e *Yeast Androgen Screen* (YAS). Urbatzka et al. (2007) realizaram o ensaio YAS para determinar a atividade androgênica e antiandrogênica no sedimento e água do rio Lambro na Itália. Lv et al. (2016) avaliaram a atividade estrogênica em bebedouros na China através do ensaio YES.

Estruch (2000) afirma que a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo de sistema eucariótico pode auxiliar no isolamento e caracterização de proteínas envolvidas no estresse em eucariotos superiores. Assim como Soares, Andreazza e Salvador (2005) que destacam esta levedura como um dos melhores modelos eucarióticos para avaliação do estresse oxidativo.

Neste contexto, estudos vêm sendo realizados para verificar os efeitos que os micropoluentes causam nas células desta levedura, dentre estes poluentes estão os pesticidas.

Guarienti, Bertolin e Costa (2010) avaliaram a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquate. Nguyen et al. (2015) utilizaram a levedura *Sacharomyces cerevisiae* recombinante como um sensor da presença de tetraciclina no ambiente, na presença deste composto o microrganismo apresentava coloração diferenciada. Já Soares, Andreazza e Salvador (2005) induziram o estresse oxidativo e *Saccharomyces cerevisiae* com apomorfina, a fim de avaliar a capacidade antioxidante de diversos compostos, como flavonóides, por exemplo. Nascimento (2007) utilizou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico para avaliar o efeito estressor do alcaloide braquicerina e Castilhos et al. (2007) analisaram

a atividade antioxidante e a ação inibitória do alcaloide montanina sobre o crescimento deste microrganismo.

Estève et al. (2009) realizaram um bioensaio com *Saccharomyces cerevisiae*, *Vibrio fisheri* e *Daphnia magna* para analisar o efeito tóxico do herbicida Diuron e os resultados indicaram que o ensaio realizado com a levedura é mais barato e fornece resultados mais rapidamente que os outros dois organismos.

North et al. (2011) aplicaram a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico para identificação dos genes que modulam a toxicidade celular de derivados fenólicos do benzeno. Diversos genes que foram identificados pelos autores possuem homólogos humanos, evidenciando a possibilidade de desempenharem um papel relacionado à exposição ao benzeno e ao desenvolvimento de diversas doenças.

De acordo com Ferreira (2006) esse microrganismo apresenta um abundante número de proteínas com funcionalidade altamente conservadas com proteínas homólogas humanas. Para este autor estudos que utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* colaboram com a elucidação da relação entre as EROs e a doenças relacionadas a este fenômeno.

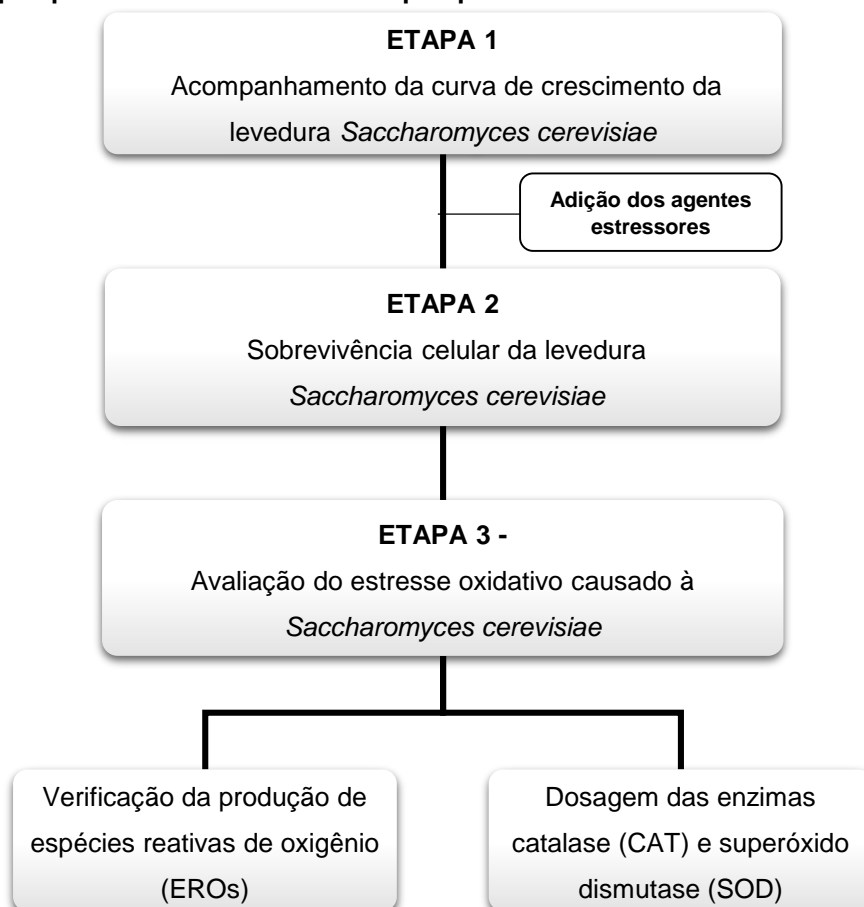
Desta maneira, o fungo unicelular *Saccharomyces cerevisiae*, representa uma maneira promissora de monitoramento ambiental do efeito estressor dos micropoluentes glifosato e paraquate.

## 4 METODOLOGIA

As células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram expostas aos padrões analíticos de glifosato PESTANAL® (CAS: 1071-83-6) e paraquate PESTANAL® (CAS: 75365-73-0) e às formulações comerciais TROP® e TOCHA®, as quais correspondem ao glifosato e paraquate, respectivamente (ANEXO C e D).

Para monitorar o efeito estressor causado por estes micropoluentes, a pesquisa foi realizada em 3 etapas (Figura 8).

Figura 8. Etapas para o desenvolvimento da pesquisa



Para os experimentos da segunda e terceira etapa uma amostra controle foi elaborada com água ultrapura no lugar dos estressores. Os micropoluentes foram

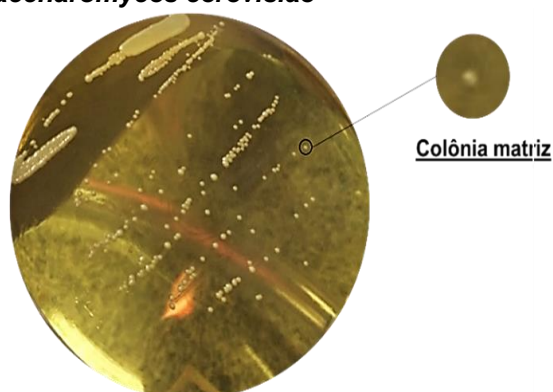
sempre testados separadamente e todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura.

#### 4.1 Etapa 1 – Acompanhamento da curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O modelo eucariótico utilizado nos experimentos foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*) 3191 Lenticule® Sigma-Aldrich (ATCC: 9763). A cultura liofilizada vem numa matriz sólida em forma de discos que são hidrossolúveis.

Foram adicionados dois discos ao meio de cultivo líquido YPG (1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona e 2% (p/v) de glicose), sendo posteriormente incubado por 24 horas a 30°C. Após este período, uma alíquota deste cultivo foi repicada para uma placa de Petri contendo meio sólido YPG com o auxílio de uma alça de platina, esta placa foi novamente incubada a 30°C por 24 horas. Desta placa uma única colônia foi removida e cultivada em caldo YPG, sendo denominada colônia matriz (Figura 9).

Figura 9. Colônia matriz da *Saccharomyces cerevisiae*



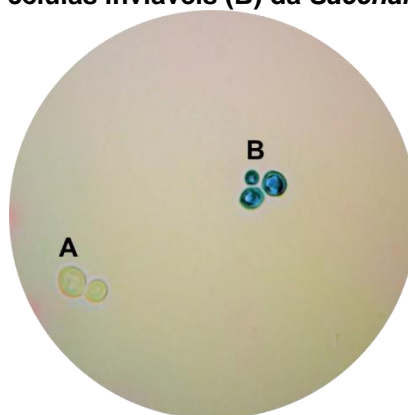
A curva de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada a fim de determinar a fase exponencial (*Log*) de crescimento do microrganismo.



Para verificação da viabilidade celular foi utilizado o corante azul de metileno. Este corante não é capaz de penetrar pela membrana das células viáveis da levedura, portanto estas células continuam incolores, já nas células inviáveis o corante atravessa a membrana celular e cora as células de azul (SHEN et al., 2014)

As células da levedura foram observadas no microscópio Carl Zeiss, modelo Primo Star, através da objetiva de 400x (Figura 10). Para a curva de crescimento foram consideradas apenas as células viáveis.

**Figura 10. Células viáveis (A) e células inviáveis (B) da *Saccharomyces cerevisiae***



Inicialmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, oriunda da colônia matriz, foi cultivada em caldo YPG e incubada em estufa a 30°C por 16 horas. Após Este período uma alíquota de 200 µL da amostra e 200 µL da solução de azul de metileno 0,0075% foram adicionados a um microtubo (VARGAS, 2011), após 2 minutos de reação foi realizada a contagem celular através da câmara de Neubauer (Equação 1). O resultado foi expresso em células mL<sup>-1</sup>.

$$Cc = \left(\frac{Nc}{Qc}\right) fd \times 10^4 \quad (1)$$

onde:  $Cc$  = contagem celular;  $Nc$  = número de células contadas;  $Qc$  = número de quadrantes contados;  $fd$  = fator de diluição;  $10^4$  = transformação de 0,1 mm<sup>3</sup> para mL.

As células da *Saccharomyces cerevisiae* foram inoculadas em meio YPG na concentração inicial de  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> e incubadas em shaker a 30°C com agitação de 130 rpm. O crescimento foi monitorado durante 24 horas, nos intervalos

de tempo: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 10;16; 18 e 24 horas. Uma alíquota do cultivo era retirada em cada tempo e diluída em NaCl 0,9%, então a semeadura em placa de Petri por espalhamento em meio YPG sólido era realizada. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Após este período as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas.

Para verificação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* inicialmente foi calculado o número de gerações ( $n$ ) que ocorreram durante a fase *Log* (Equação 2) (BOYD, 1985).

$$n = (\ln N - \ln N_0) \div \ln 2 \quad (2)$$

onde:  $N$  = número de células no tempo  $t^*$ ;  $N_0$  = número de células no tempo  $t_0^{**}$ .

Posteriormente, foi calculada a taxa de crescimento ( $\mu$ ) (Equação 3), que é a variação do número de células por hora ou por minuto.

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) \div (t - t_0) \quad (3)$$

Por último, foi calculado o tempo de geração ( $t_g$ ) (Equação 4), que corresponde ao intervalo de tempo para que uma célula se duplique.

$$t_g = \ln 2 \div \mu \quad (4)$$

## 4.2 Etapa 2 – Sobrevivência celular da *Saccharomyces cerevisiae* após exposição ao herbicidas

Primeiramente o ensaio de sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado a fim delimitar uma concentração única de trabalho para todos os compostos testados e ensaios realizados.

---

\*  $t$ : tempo em que as células apresentaram uma taxa de crescimento exponencial.

\*\*  $t_0$ : tempo em que a fase exponencial iniciou.

Através do cálculo de verificação do crescimento celular, foi selecionada a concentração de glifosato e paraquate que no período de 2 horas desencadeasse maior alteração na taxa de crescimento celular ( $\mu$ ) em relação ao controle e às outras concentrações testadas, mas ainda não causasse incapacidade de recuperação celular em até 3 horas para ambos os herbicidas.

Optou-se por realizar este teste utilizando somente os padrões analíticos, uma vez que estes representam os ingredientes ativos dos herbicidas estudados.

Para avaliação da sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* após exposição aos padrões analíticos glifosato e paraquate e às formulações comerciais TROP® (glifosato) e TOCHA® (paraquat), foi realizada a contagem celular das células viáveis em câmara de Neubauer do inóculo cultivado em meio YPG por 16 horas em estufa a 30°C.

Foram testadas 3 concentrações diferentes dos micropoluentes, 50, 100 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em 4 tempos: 0, 1, 2 e 3 horas (GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010). Uma solução estoque na concentração 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada com a dissolução do estressor em água ultrapura.

Após este período,  $2 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  da levedura foram inoculadas em novo meio YPG até atingir a fase exponencial de crescimento do microrganismo. Realizou-se uma nova contagem celular e uma concentração de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  oriundas da fase exponencial foram expostas durante 0, 1, 2 e 3 horas aos herbicidas, a exposição era realizada em shaker com agitação de 130 rpm a 30°C.

Em cada tempo, uma alíquota foi retirada e efetuou-se a diluição seriada em NaCl 0,9% para posterior semeadura em placas de Petri por espalhamento em meio YPG sólido. Estas placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Por fim, a contagem de UFC foi realizada.

### **4.3 Etapa 3 – Avaliação do estresse oxidativo causado à *Saccharomyces cerevisiae***

Nesta etapa foi verificada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a dosagem enzimas intracelulares catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)

nas leveduras submetidas aos padrões analíticos glifosato e paraquate e às formulações comerciais TROP® (glifosato) e TOCHA® (paraquate).

#### 4.3.1 Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a verificação da produção de EROs nas células levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada a sonda diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (H<sub>2</sub>DCF-DA) (CAS: 4091-99-0). Esta é uma sonda não fluorescente que penetra nas células e através da ação das esterases endógenas perde seu grupo acetato, transformando-se em 2', 7'-diclorofluorescina (H<sub>2</sub>DCF) que ao reagir com os radicais hidroxila e compostos de peroxidases I e II resultantes da catálise do peróxido de hidrogênio torna-se fluorescente. Portanto esta sonda funciona como um apontador indireto da presença de EROs em células intactas (PAVIANI, 2010).

A determinação das EROs foi realizada conforme metodologia de James et al. (2015), com algumas modificações. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada em meio YPG até atingir a fase exponencial. As células foram contadas em câmara de Neubauer e  $1,5 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> foram centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C, depois foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 (NaCl 0,137 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,0027 mol L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mol L<sup>-1</sup>) e ressuspensas no mesmo tampão. Os agentes estressores foram adicionados às células e a produção de EROs foi verificada no tempo de 2 horas e 3 horas.

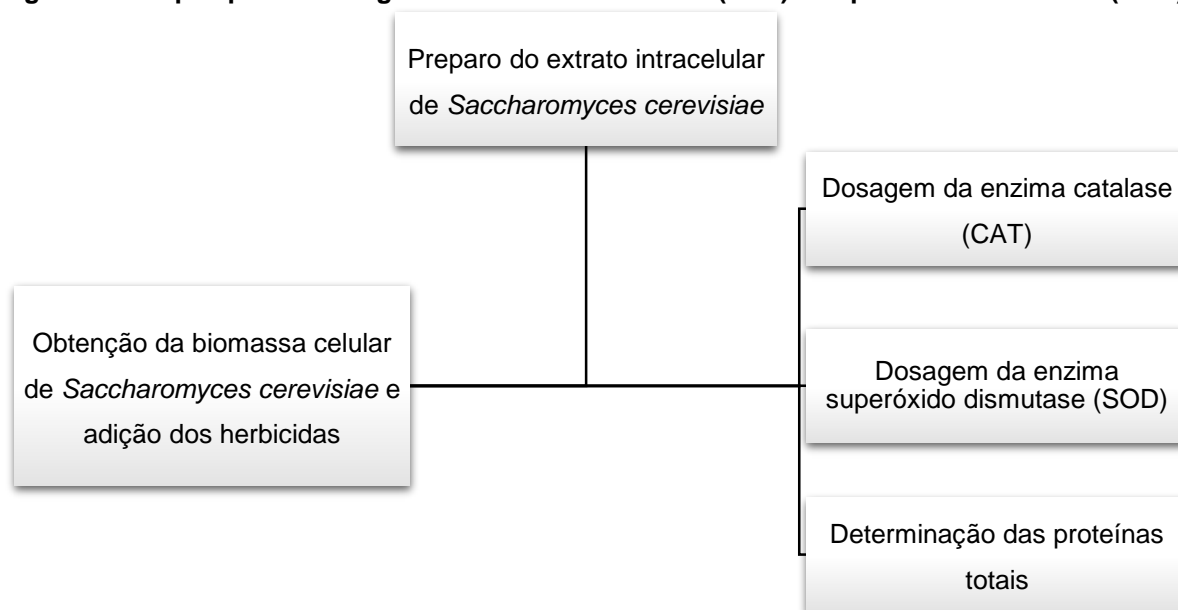
Nos últimos trinta minutos de cada tempo foi adicionada a sonda H<sub>2</sub>DCF-DA na concentração final de 10 mM. Após este período as células foram novamente centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas no tampão PBS. O branco foi composto apenas por tampão PBS e a sonda H<sub>2</sub>DCF-DA.

A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro marca Varian, modelo Cary Eclipse, fabricante Agilent Technology, com comprimento de onda de excitação de 504 nm e de emissão de 524 nm. Todo o ensaio foi realizado no escuro.

#### 4.3.2 Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)

Este experimento foi realizado com o extrato intracelular *Saccharomyces cerevisiae*. As etapas envolvidas no desenvolvimento do ensaio são apresentadas na figura 11.

Figura 11. Etapas para a dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)



##### 4.3.2.1 Obtenção da biomassa celular de *Saccharomyces cerevisiae* e adição dos herbicidas

A levedura cresceu no meio YPG em shaker com agitação de 130 rpm a 30°C por 24 horas e para obtenção da biomassa celular o cultivo foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min a 4°C (Figura 12). Após a centrifugação sobrenadante foi descartado e a biomassa resultante foi pesada e adicionada na concentração de 10% (p/v) em novo meio YPG até atingir a fase exponencial (BAYLIAK, SEMCHYSHYN e LUSHCHAK, 2006).

Figura 12 - Cultivo da *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPG com agitação em shaker a 130 rpm por 24 horas a 30°C e obtenção da biomassa celular após centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4°C



As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, 300 mg da biomassa foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8 e os herbicidas (padrões analíticos e formulações comerciais) foram adicionados. As células ficaram expostas por 3 horas, sendo que a CAT e a SOD foram dosadas na segunda e na terceira hora do ensaio (BAYLIAK; SEMCHYSHYN; LUSHCHAK, 2006).

#### 4.3.2.2 Preparo do extrato intracelular da *Saccharomyces cerevisiae*

Após a etapa 4.3.2.1, a biomassa celular da levedura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8 e o sobrenadante foi descartado.

Para o rompimento das células foi adicionado 300 µL do reagente de lise celular CellLytic™ Y (referência: C4482) com DL-Ditiotreitol (DTT) 6 mmol L<sup>-1</sup> (CAS: 3483-12-3) e 150 µL do inibidor de protease SIGMAFAST™ (referência: S8820). Por fim, acrescentou-se 450 mg de esferas de vidro de 2 mm. O meio reacional foi agitado em vórtex por 15 ciclos de 30 segundos (30 segundos sob agitação e 30 segundos em banho de gelo com sal). Para a confirmação da lise celular, as células foram

observadas no microscópio Carl Zeiss, modelo Primo Star, através da objetiva de 400x. O meio reacional foi centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios enzimáticos (LOQUE, 2009).

#### *4.3.2.3 Dosagem da enzima catalase (CAT)*

A CAT está presente nas células, principalmente nos peroxissomos, sendo responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e também pela oxidação de doadores de hidrogênio, como o etanol por exemplo. A determinação da catalase é baseada na decomposição do peróxido de hidrogênio, que é proporcional à concentração de peróxido (AEBI, 1984; WEYDERT; CULLEN, 2010).

A dosagem da enzima CAT foi realizada de acordo com o protocolo de Weydert e Cullen (2010). Em um tubo de ensaio foram adicionados 4 mL do tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8 e 0,02 mL do extrato intracelular, esta solução foi aplicada tanto para zerar o espectrofotômetro quanto para dosagem da atividade enzimática de CAT. Para zerar o espectro (cubeta A): 2 mL da solução do tubo de ensaio e 1 mL do tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8 foram colocados na cubeta A. Para a dosagem da atividade enzimática (cubeta B): 2 mL da solução do tubo de ensaio e 1 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30 mM foram adicionados na cubeta B.

A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51 UV/VIS, com comprimento de onda de 240 nm, cinética de 2 minutos e leitura a cada 30 segundos. A atividade enzimática foi expressa em mk/mg de proteína.

#### *4.3.2.4 Dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD)*

A superóxido dismutase é responsável pela dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, na presença de íons H<sup>+</sup> (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A dosagem desta enzima foi baseada na metodologia de Marklund e Marklund (1974) e Maciel et al. (2013). Em um tubo de ensaio foi adicionado 2,8 mL de Tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> com EDTA 1mM pH 9

e 0,1 mL da amostra. O tubo foi incubado em banho-maria a 30°C por 5 minutos. Após este período a amostra foi colocada na cubeta e adicionou-se 0,05 mL de ácido pirogálico 10 mmol L<sup>-1</sup> em HCl 10 mmol L<sup>-1</sup>.

A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51 UV/VIS, com comprimento de onda de 420 nm, cinética de 5 minutos com intervalos de 30 segundos. O cálculo da atividade foi baseado na porcentagem de inibição da auto-oxidação do ácido pirogálico, onde uma unidade enzimática corresponde a 50% de inibição e foi expressa em U/mg de proteína.

#### *4.3.2.5 Determinação das proteínas totais*

A dosagem das proteínas é baseada na formação de um complexo entre o corante da solução reagente e as proteínas da amostra. Foi utilizada a metodologia de Bradford (1976) e os resultados foram utilizados para o cálculo da atividade enzimática das enzimas CAT e SOD. Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,1 mL de amostra e 1 mL do reagente de Bradford, após 5 minutos de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51 UV/VIS, com comprimento de onda de 595 nm . Uma curva analítica foi plotada utilizando o padrão de albumina bovina (APÊNDICE A).

#### **4.4 Curvas analíticas para o preparo das soluções comerciais TROP® e TOCHA®**

Para o preparo das soluções comerciais utilizadas nos ensaios foram elaboradas curvas analíticas com os padrões de cada herbicida, a fim possibilitar que a concentração tanto dos padrões analíticos quanto das formulações comerciais fossem a mesma.

As soluções estoque de TROP® e TOCHA® foram elaboradas utilizando a concentração do equivalente ácido (glifosato) e equivalente em cátion (paraquate) dos herbicidas comerciais.



#### 4.4.1 Metodologia da curva analítica de glifosato

A metodologia utilizada para a elaboração da curva analítica de glifosato foi a descrita por Bhaskara e Nagaraja (2006). Neste método o glifosato reage com a ninhidrina na presença do molibdato de sódio formando um composto de cor púrpura.

Toda a vidraria utilizada foi lavada previamente com solução de KOH/etanol 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Uma solução estoque do padrão analítico glifosato 500 µmol L<sup>-1</sup> foi feita para a elaboração da curva. Em tubos com volume final de 10 mL foram adicionados diferentes concentrações da solução estoque, 1 mL de ninhidrina 5% e 1mL de molibdato de sódio 5% o volume foi completado com água ultrapura. Os tubos foram colocados em banho fervente durante 5 minutos, para parar a reação os tubos foram colocados em banho frio dentro do refrigerador. Para o branco no lugar da solução estoque foi colocado no tubo de ensaio água ultra pura.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51 UV/VIS, com comprimento de onda de 570 nm e a curva analítica foi plotada (APÊNDICE B). Toda a análise foi realizada no escuro.

#### 4.4.2 Metodologia da curva analítica das formulação TOCHA® (paraquate)

A curva analítica do paraquate foi realizada de acordo com a metodologia Kesari, Rai e Gupta (1997). Neste método a glicose atua como agente redutor do paraquate formando um produto azul.

Uma solução mãe contendo 500 µmol L<sup>-1</sup> do padrão analítico paraquate foi preparada em balão volumétrico, desta solução foram realizadas as diluição pra a curva. Em um tubo de ensaio foram adicionadas as diluições da solução estoque, 1 mL de glicose 0,5% e 2 mL de NaOH 2 mol L<sup>-1</sup> e o volume foi completado com água ultrapura até 5 mL. Para o branco foi colocado água ultrapura no lugar da amostra.

Os tubos foram incubados a 80°C por dois minutos e a leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51 UV/VIS, com comprimento de onda de 600 nm e a curva analítica foi plotada (APÊNDICE C).

#### 4.5 Análise estatística

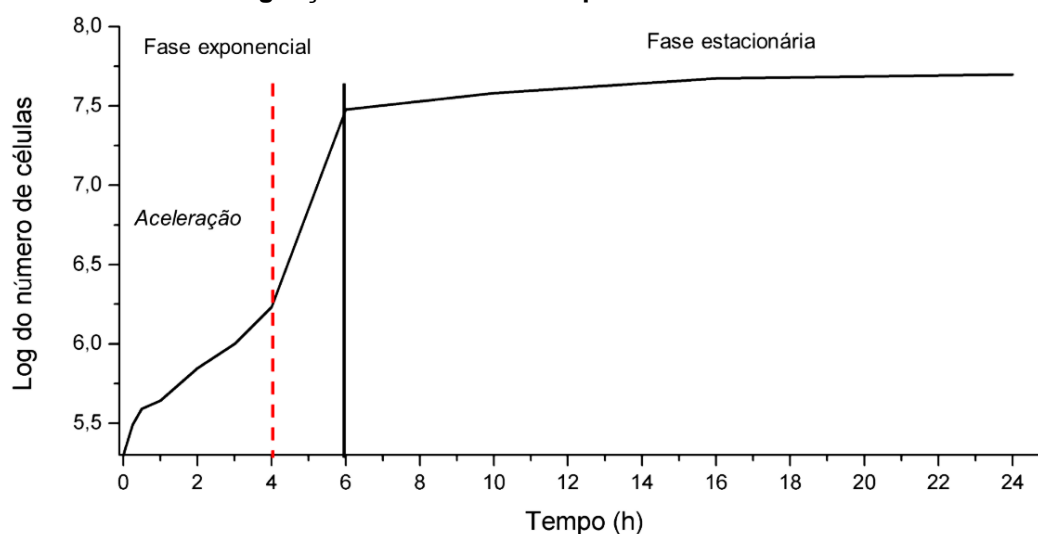
Para análise estatística dos dados utilizou-se o *software OriginPro 8*. Foi efetuada a análise de variância (*ONE-WAY ANOVA*) e o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) através dos valores médios das amostras. Os resultados foram expressos pela média e desvios-padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Acompanhamento da curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para definição do período em que ocorre a fase exponencial (*Log*) de crescimento da levedura, uma curva de crescimento foi realizada através do cultivo da colônia matriz da *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPG, e a contagem das UFCs foi realizada em placas de Petri (Figura 13).

**Figura 13. Curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio YPG com agitação em shaker a 130 rpm a 30°C**



Uma vez que o meio de cultivo (YPG) utilizado no acompanhamento da curva de crescimento foi o mesmo, a fase de latência (*Lag*), que corresponde ao período de adaptação do microrganismo às novas condições de cultivo, não foi observada (MULLER et al., 2007).

Até a quarta hora ocorreu um período de aceleração do crescimento celular da levedura, correspondente ao início da fase exponencial (*Log*), caracterizada pelo crescimento celular logarítmico. Entre a quarta e sexta hora do experimento a fase

*Log* é bem evidente, sendo este o período estabelecido para a utilização do inóculo nos ensaios e para o cálculo da taxa de crescimento. Após a sexta hora ocorre a fase estacionária, onde o número de novas células viáveis é proporcional ao número de células mortas, esta fase se mantém ao menos até a vigésima quarta hora. A fase de declínio não foi observada até o final do experimento.

Durante toda a fase exponencial ocorreram 4 gerações da levedura, com tempo de geração de 29 minutos e taxa específica de crescimento de  $0,02 \text{ min}^{-1}$ . Estes valores são influenciados por diversos fatores, sejam eles ambientais, nutricionais ou genéticos, o que dificulta estabelecer um valor bem definido de crescimento celular para cada microrganismo. Uma maneira de garantir a reprodutibilidade dos experimentos foi manter constante os parâmetros de concentração e composição do meio de cultivo, a temperatura e o tempo de incubação (REGENBERG et al., 2006).

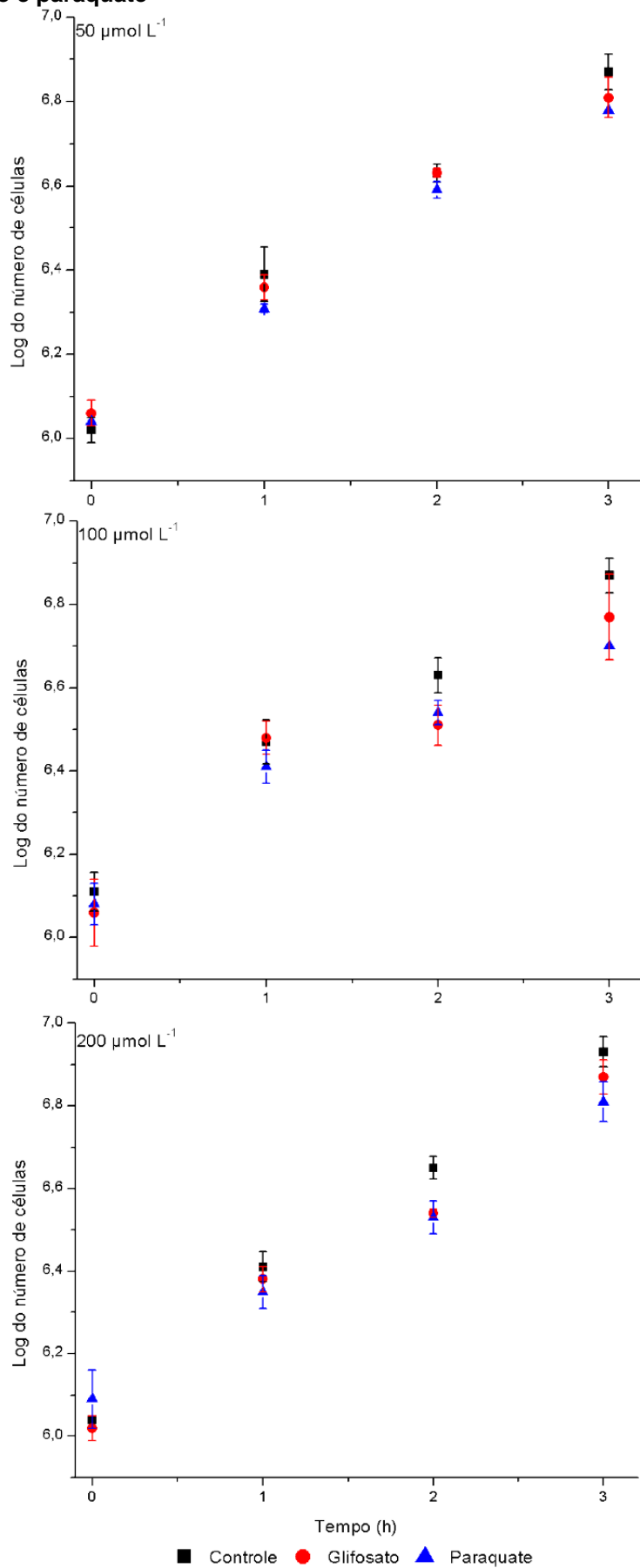
## **5.2 Análises com os padrões analíticos dos herbicidas glifosato e paraquate**

Para padronizar a quantidade de herbicida que seria aplicada nos experimentos o ensaio de sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente aos padrões analíticos de cada herbicida foi realizado com mais de uma concentração.

### **5.2.1 Sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com os padrões analíticos glifosato e paraquate**

Inicialmente as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, oriundas da fase exponencial, foram expostas a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos padrões analíticos glifosato e paraquate, mediante os resultados obtidos outras duas concentrações foram testadas, 100 e  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A sobrevivência celular foi avaliada em 4 tempos: 0, 1, 2 e 3 horas (Figura 14).

Figura 14. Sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* após exposição aos padrões analíticos glifosato e paraquate



A taxa de crescimento celular ( $\mu$ ) foi calculada no período de 0 a 2 horas, pois foi neste intervalo que observou-se decaimento no crescimento celular (Tabela 1).

**Tabela 1. Taxa de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após exposição aos padrões analíticos de glifosato e paraquate**

Amostra	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Número de gerações ( $n$ )	Tempo de geração ( $t_g$ ) (minutos)	Taxa de crescimento ( $\mu$ ) ( $\text{min}^{-1}$ )
Controle		2,02 $\pm$ 0,01	59,47 $\pm$ 0,74	<b>0,0117 <math>\pm</math> 0,0001</b>
Glifosato	50	1,89 $\pm$ 0,08	63,70 $\pm$ 3,81	<b>0,0109 <math>\pm</math> 0,0007</b>
Paraquate		1,81 $\pm$ 0,06	66,50 $\pm$ 2,93	<b>0,0104 <math>\pm</math> 0,0005</b>
Controle		1,73 $\pm$ 0,01	69,50 $\pm$ 0,59	<b>0,0100 <math>\pm</math> 0,0001</b>
Glifosato	100	1,51 $\pm$ 0,42	82,93 $\pm$ 23,38	<b>0,0087 <math>\pm</math> 0,0025</b>
Paraquate		1,47 $\pm$ 0,08	78,69 $\pm$ 4,21	<b>0,0088 <math>\pm</math> 0,0005</b>
Controle		2,03 $\pm$ 0,09	59,14 $\pm$ 2,64	<b>0,0117 <math>\pm</math> 0,0005</b>
Glifosato	200	1,72 $\pm$ 0,13	70,05 $\pm$ 5,17	<b>0,0099 <math>\pm</math> 0,0007</b>
Paraquate		1,45 $\pm$ 0,13*	82,98 $\pm$ 7,20*	<b>0,0084 <math>\pm</math> 0,0007*</b>

*O período abordado nos cálculos foi de 0 a 2 horas. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .*

É possível verificar que em todas as concentrações de glifosato e paraquate às quais a *Saccharomyces cerevisiae* foi exposta houve decaimento no número de gerações, aumento no tempo de geração e redução da taxa de crescimento celular nas primeiras 2 horas de ensaio. Este fato indica que o crescimento da levedura foi afetado negativamente pela presença dos pesticidas testados.

Entre a segunda e terceira hora de exposição a levedura apresentou capacidade de recuperação depois do contato com os padrões analíticos em todas as concentrações testadas. O que demonstrou a capacidade de recuperação da *Saccharomyces cerevisiae* frente a estas duas substâncias.

Quando comparadas a amostra controle, na concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a taxa de crescimento celular da levedura diminuiu 7% e 11% frente ao glifosato e ao paraquate, respectivamente. Quando expostas a concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o dobro da concentração anterior, o valor de  $\mu$  diminuiu 13% para o glifosato e 12% para o paraquat.

Ao dobrar a concentração dos herbicidas mais uma vez, agora para 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a *Saccharomyces cerevisiae* sofreu uma redução na taxa de crescimento celular

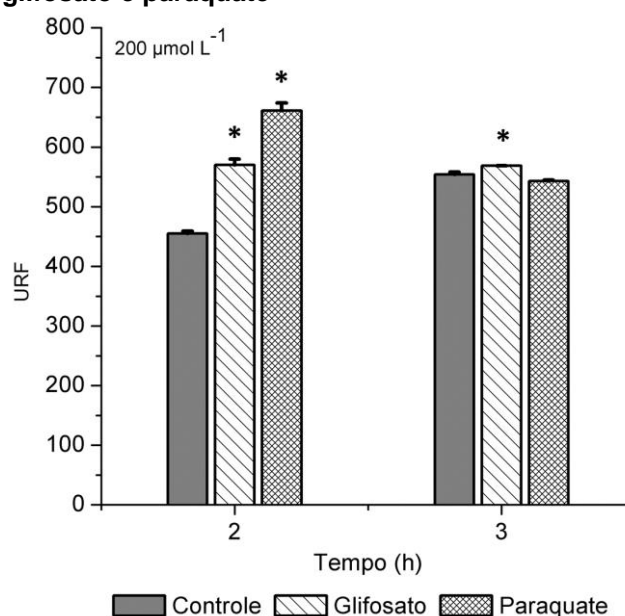
de 15% frente ao glifosato e de 28% quando exposta ao paraquate, este último apresentou resultado com diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados demonstram que a redução da taxa de crescimento da levedura, não foi diretamente proporcional para todas as concentrações avaliadas dos padrões analíticos, podendo apresentar oscilações. De fato, isso também aconteceu no estudo de Braconi et al. (2006), que testou cinco concentrações (0,45 nM, 0,90 mM, 1,80 mM, 17,98 mM e 179,78 mM) do ingrediente ativo glifosato e também não observou diferença entre elas no crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. Provavelmente estas oscilações estão relacionadas ao metabolismo dos EROS resultantes dos tratamentos com os herbicidas (BRACONI et al., 2006; GUARIENTI et al., 2010).

Como as células tratadas com  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos herbicidas foram as que apresentaram maior alteração na taxa de crescimento celular, quando comparadas à amostra controle, os demais ensaios foram realizados com esta concentração.

Para conferir se esta alteração na taxa de crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae* tem relação com o estresse oxidativo possivelmente gerado pelos padrões analíticos glifosato e paraquat, realizou-se a verificação da produção de EROs nos tempos de 2 e 3 horas (Figura 15).

**Figura 15. Produção de EROs após exposição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* aos padrões analíticos de glifosato e paraquate**



Os resultados são as médias de três experimentos independentes e as barras de erro representam os desvios-padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .

Os dois padrões analíticos estimularam significativamente a produção de EROs na segunda hora, o que explica a queda na taxa de crescimento da levedura neste período.

Na terceira hora, momento em que a levedura recupera o crescimento celular, o padrão analítico glifosato ainda apresenta diferença significativa em relação ao controle, porém esta produção de EROs não impossibilitou que as células retomassem o crescimento.

No caso do padrão analítico paraquate, na terceira hora esta amostra evoluiu junto com o controle, não apresentando diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) na produção de EROs.

Pode-se observar que o controle também apresentou aumento na produção de EROs na terceira hora, e este aumento provavelmente é decorrente do envelhecimento e do metabolismo normal da célula, principalmente da respiração celular, uma vez que estas moléculas são necessárias para diversas reações bioquímicas do organismo (HALLIWELL, 2006).

A partir destes resultados é possível afirmar que estes dois compostos estimularam a produção de EROs na *Saccharomyces cerevisiae*, desencadeando um estresse oxidativo moderado e reversível, onde as células não morrem, mas há decaimento do tempo de geração e conseqüente alteração na taxa de crescimento. Isto ocorre para que as células possam reparar os possíveis danos causados ao DNA, quando adaptadas ao ambiente oxidante gerado pelos padrões analíticos paraquate e glifosato voltaram a crescer (HALLIWELL, 2006; TREVISAN, 2014).

Desta forma, o desequilíbrio na geração destes radicais, possivelmente ativou os sistemas antioxidantes da levedura, permitindo que o crescimento entre a segunda e a terceira hora fosse retomado.

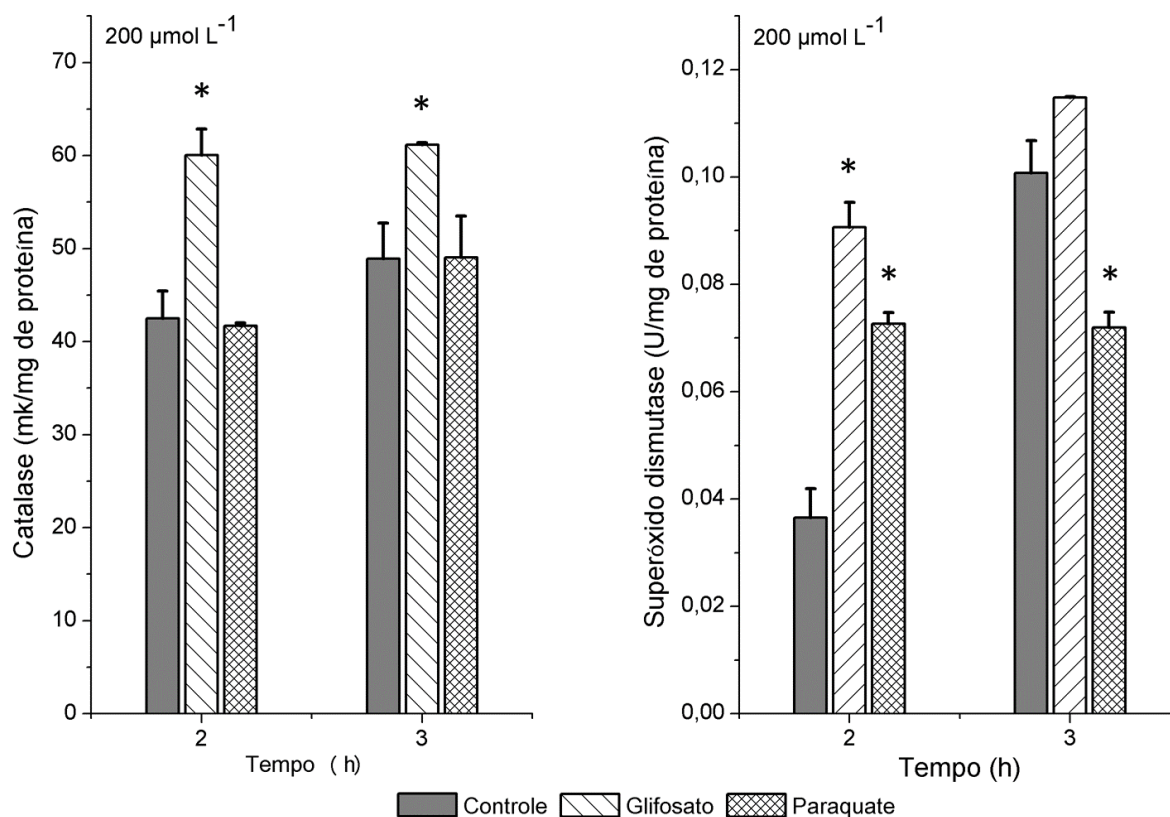
### 5.2.2 Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em células da *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com os padrões analíticos de glifosato e paraquate

Como a CAT e a SOD são enzimas intracelulares, primeiramente foi necessário realizar a lise celular da levedura, e o extrato intracelular resultante foi utilizado nos



ensaios. A produção destas enzimas foi avaliada nos tempos de 2 e 3 horas de contato da *Saccharomyces cerevisiae* com os padrões analíticos de glifosato e paraquate (Figura 16).

**Figura 16. Dosagem das enzimas catalase e superóxido dismutase após exposição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* aos padrões analíticos de glifosato e paraquate**



Os resultados são as médias de três experimentos independentes e as barras de erro representam os desvios-padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .

As enzimas CAT e SOD são produzidas constantemente pelas células da levedura como resposta antioxidante à presença de EROs derivadas do metabolismo celular, por este motivo mesmo a amostra controle apresenta alterações na produção destas enzimas com o decorrer do tempo.

Na segunda hora as células tratadas com o padrão analítico glifosato apresentaram diferença significativa tanto na produção de CAT quanto na produção de SOD, o que indica a presença de radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio no extrato intracelular da levedura. Ao avaliar a terceira hora, nota-se que a produção de CAT manteve-se significativa e a produção da SOD não apresentou diferença

estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) entre o controle e a amostra, indicando que neste momento havia maior concentração de peróxido de hidrogênio do que de radical superóxido na amostra, ou mesmo a ativação de outro mecanismo antioxidante não avaliado no presente estudo.

Para o paraquate, no tempo de duas horas, a produção de CAT não foi significativa, porém a de SOD foi, o que demonstra que o paraquate estimulou a produção de radicais superóxidos neste período.

Ao avaliar a terceira hora de exposição ao padrão analítico paraquat, a geração de CAT continuou não apresentando diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e a SOD reduziu consideravelmente em relação a amostra controle. Segundo Schmitt et al. (2006) a geração de grande quantidade de radical superóxido pode suprimir a SOD, e então a reação de dismutação ocorre por mecanismos antioxidantes não enzimáticos. Porém, neste mesmo período, também não houve geração significativa de EROs nas células expostas a este herbicida, o que sugere que o que ocorreu foi a redução dos radicais livres excedentes na amostra.

A produção das enzimas CAT e SOD não foi significativa em alguns dos tempos analisados. Os resultados indicam que há possibilidade de outros mecanismos antioxidantes terem atuado de forma mais expressiva no combate as EROs presentes nas amostras tratadas com os padrões glifosato e paraquat, como por exemplo as enzimas do citocromo P450.

Como o genoma da *Saccharomyces cerevisiae* é totalmente sequenciado, é possível o desenvolvimento de diversos estudos com leveduras mutantes, deficientes ou acrescidas de alguma molécula antioxidante, a fim de elucidar como a sua presença afeta na resposta celular frente a uma geração exagerada de EROs (MANFREDINI et al., 2004; MONTLLOR-ALBALATE et al., 2019).

Na *Saccharomyces cerevisiae* as enzimas CAT e SOD estão presentes em mais de um local na célula. Duas formas de catalase são encontradas, a catalase A (CTA 1) e a catalase T (CTT 1), uma localizada no peroxissoma e outra no citoplasma, respectivamente. Assim como para a superóxido dismutase, a SOD 1 fica no citoplasma e a SOD2 fica na mitocôndria (MONTLLOR-ALBALATE et al., 2019; NISHIMOTO et al., 2014). Embora estas duas enzimas representem a linha de frente de combate as EROs, muitos estudos ainda são realizados, não só para compreender os seus mecanismos de ação, mas também para verificar como a sua presença ou ausência suprime ou ativa os sistemas antioxidantes em células eucarióticas.

Manfredini et al. (2004) expuseram ao peróxido de hidrogênio a levedura mutante *Saccharomyces cerevisiae* sem SOD 1 e 2, os resultados mostraram que a resposta antioxidante se torna independente da catalase e sim dependente da glutathione peroxidase que passa a atuar como antioxidante primário. Montllor-Albalade et al. (2019) descobriram que SOD 1 é mais importante na sinalização redox através de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que para eliminar o radical superóxido, atividade na qual apenas as pequenas frações desta enzima é aplicada.

O fato da catalase não ser significativamente produzida nos dois tempos avaliados sugere que outra peroxidase foi ativada para a remoção do radical peróxido, como por exemplo a glutathione peroxidase ou outro sistema não enzimático (GRAVINA et al., 2017; MANFREDINI et al., 2004).

Estas pesquisas ressaltam a necessidade de estudos que avaliem como as substâncias antioxidantes podem ser afetadas por alterações genéticas ou xenobióticas.

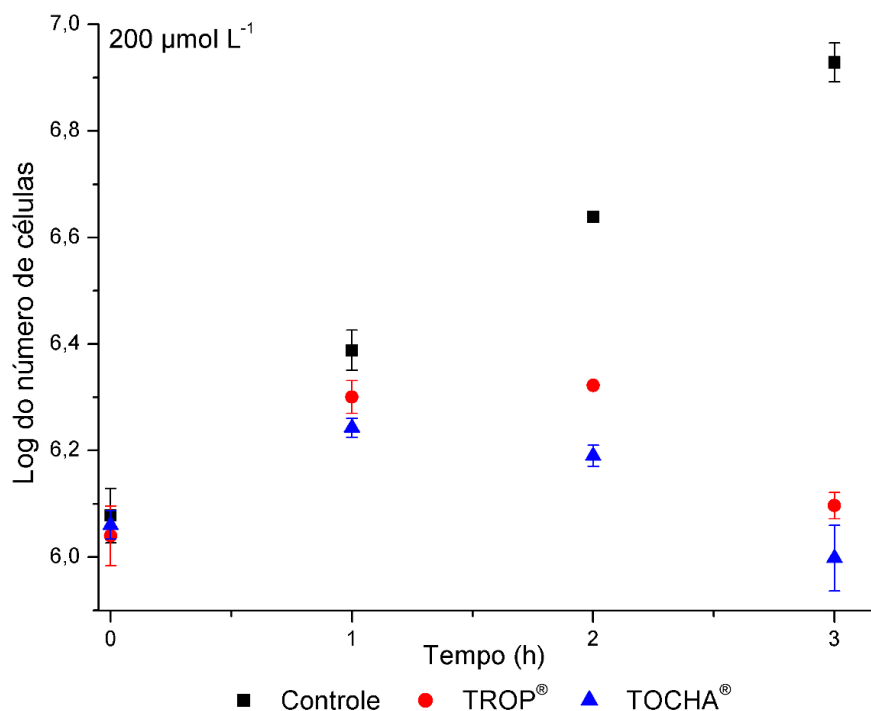
### **5.3 Análises com as formulações comerciais TROP<sup>®</sup> (glifosato) e TOCHA<sup>®</sup> (paraquate)**

Nos ensaios com os pesticidas TROP<sup>®</sup> e TOCHA<sup>®</sup> as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram tratadas com 200 µmol L<sup>-1</sup> herbicidas comerciais, conforme definido no item 5.2.1. Foi realizado o teste sobrevivência celular da levedura, a verificação da produção de EROs e a dosagem das enzimas CAT e SOD.

#### **5.3.1 Sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com os herbicidas comerciais TROP<sup>®</sup> (glifosato) e TOCHA<sup>®</sup> (paraquat)**

As células da levedura foram tratadas com o TROP<sup>®</sup> e TOCHA<sup>®</sup> (paraquat) por 3 horas e a avaliação da sobrevivência celular foi verificada nos tempos de 0, 1, 2 e 3 horas (Figura 17).

**Figura 17. Sobrevivência celular de *Saccharomyces cerevisiae* após exposição às formulações comerciais TROP® e TOCHA®**



A taxa de crescimento celular ( $\mu$ ) foi calculada no período de 0 a 2 horas e no período de 2 a 3 horas, pois nestes dois momentos observou-se redução no crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae* em relação à amostra controle (Tabela 2).

**Tabela 2. Taxa de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após exposição às formulações comerciais TROP® e TOCHA®**

<b>0 a 2 horas</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Número de gerações (<math>n</math>)</b>	<b>Tempo de geração (<math>t_g</math>) (minutos)</b>	<b>Taxa de crescimento (<math>\mu</math>) (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>
Controle	$1,86 \pm 0,19$	$64,77 \pm 6,74$	$0,0108 \pm 0,0011$
Glifosato	$0,94 \pm 0,19^*$	$130,37 \pm 25,83$	$0,0054 \pm 0,0011^*$
Paraquate	$0,43 \pm 0,02^*$	$278,66 \pm 14,81$	$0,0025 \pm 0,0001^*$
<b>2 a 3 horas</b>			
Controle	$0,96 \pm 0,14$	$62,94 \pm 9,38$	$0,0111 \pm 0,0017$
Glifosato	-	-	-
Paraquate	-	-	-

- representa valores negativos para os parâmetros avaliados.

Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .

Quando tratadas com os herbicidas comerciais, no período de duas horas, o tempo de geração das células da levedura, em relação ao controle, praticamente duplicou para o herbicida TROP® (glifosato) e sextuplicou para o TOCHA® (paraquate), resultando na diminuição de 50% e de 82% na taxa de crescimento para as amostras tratadas com TROP® e com TOCHA®, respectivamente.

Neste experimento não houve recuperação da *Saccharomyces cerevisiae* até a terceira hora de exposição a estes compostos, pelo contrário, enquanto o controle seguiu crescendo exponencialmente, as amostras expostas ao TROP® e TOCHA® apresentaram declínio bem evidente no crescimento.

As formulações comerciais dos dois herbicidas afetaram drasticamente o crescimento da levedura quando comparado ao ensaio com os padrões analíticos glifosato e paraquate. Este fato provavelmente está relacionado aos compostos excipientes, como os adjuvantes e surfactantes, presentes nas formulações comerciais dos herbicidas TROP® e TOCHA®.

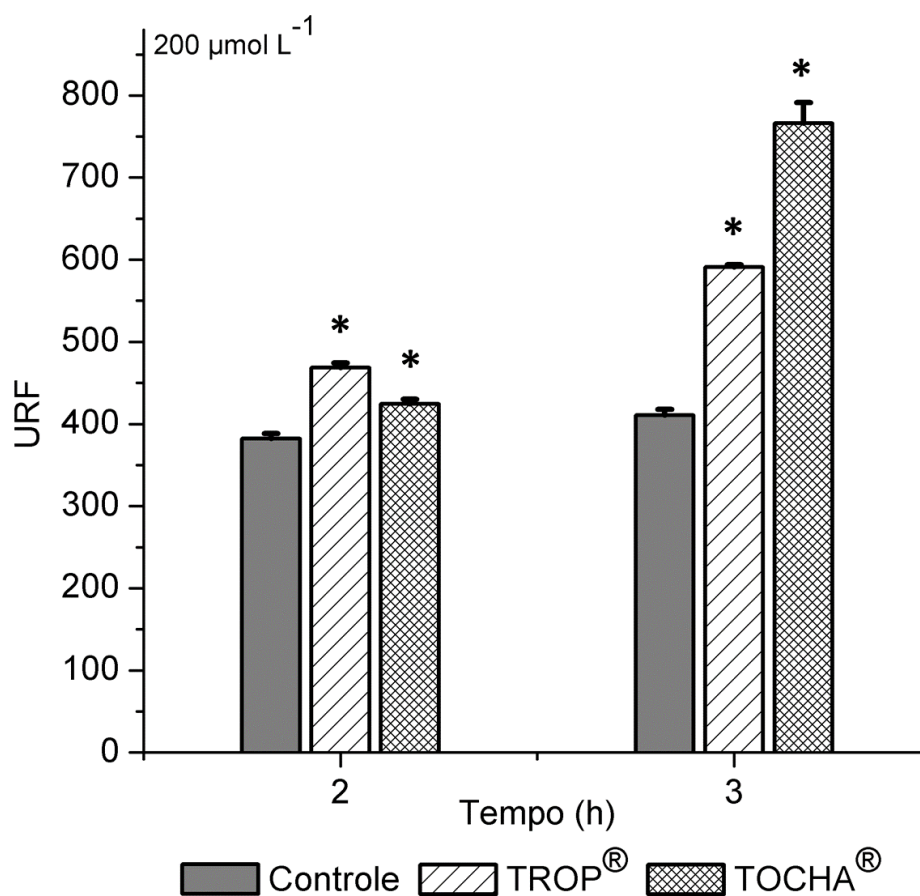
Gravina et al. (2017) expuseram a bactéria *Escherichia coli* à formulação comercial do paraquate, o Gramoxone®, o que diminuiu a viabilidade celular do microrganismo, assim como aconteceu a *Saccharomyces cerevisiae* na presente pesquisa. Salam et al. (1993) também observaram expressivo decaimento no crescimento celular da *Sacharomyces cerevisiae* exposta ao herbicida Gramoxone® (paraquate).

Braconi et al. (2008) compararam o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* exposta Silglif (glifosato) e ao seu ingrediente ativo, a levedura exposta ao ingrediente ativo praticamente não teve seu crescimento afetado, já a exposta à formulação comercial apresentou alterações no crescimento. Romero, Molina e Juárez (2011) observaram que a microalga *Chlorella kessleri* apresentou redução na sua taxa de crescimento frente a formulação ATANOR® (glifosato).

Por outro lado, estudos sugerem que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de degradar até 21 % do glifosato durante os estágios de fermentação do processo de panificação e de desenvolver tolerância ao paraquate (BRACONI et al., 2006; HANSSON; HÄGGSTRÖM, 1986; LOW; SHAW; GERRARD, 2005). Portanto, embora até a terceira hora não tenha sido observada a retomada do crescimento celular deste microrganismo, há possibilidade de recuperação após a exposição durante um período maior de tratamento.

Para verificar se produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio foi estimulada pelas formulações comerciais dos herbicidas TROP® e TOCHA®, o ensaio para determinação das EROs foi realizado e os resultados encontram-se na Figura 18.

**Figura 18. Produção de EROs após exposição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* às formulações TROP® e TOCHA®**



Os resultados são as médias de três experimentos independentes e as barras de erro representam os desvios-padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .

Houve aumento na produção de EROs nos dois tempos avaliados. No período de duas horas a geração de EROs pelos dois herbicidas foi significativa, porém foi na terceira hora que ocorreu o aumento mais expressivo na produção destes radicais, principalmente na amostra exposta ao TOCHA®.

Estes resultados demonstram que o decaimento na taxa de crescimento e redução de células viáveis no teste de sobrevivência celular foram consequências da significativa geração de EROs nas células expostas aos herbicidas comerciais,

evidenciando que os mecanismo antioxidantes não foram capazes de manter o equilíbrio do sistema até a terceira hora, desencadeando o estresse oxidativo nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e consequente morte celular.

Alguns autores, ao estudarem o impacto destes herbicidas em outras células e organismos, chegaram a resultados semelhantes aos alcançados nesta pesquisa. Em seu trabalho Luo et al. (2017) descobriram que o Roundup® (glifosato) é capaz de provocar o acúmulo de EROs em hepatócitos humanos, resultando em desequilíbrio dos sistema antioxidantes, peroxidação lipídica, dano celular e apoptose. Assim como Kronberg et al. (2018) que expuseram o nematóide *Caenorhabditis elegans* tanto ao Atanor II® (glifosato) quanto ao Gramoxone® (paraquate), e obtiveram respostas semelhantes para os dois herbicidas, a produção de EROS foi significativamente elevada e como consequência os sistemas de crescimento e reprodução foram afetados negativamente. Estes autores afirmam que a esta produção exacerbada de EROs altera a homeostase de maneira significativa.

De acordo com Halliwell e Whiteman (2004), o estresse oxidativo pode resultar em adaptação da célula à nova condição, em lesão celular ou morte celular. O organismo pode reparar o dano oxidativo através da substituição das moléculas danificadas, pode sobreviver com o dano oxidativo persistente, assim como pode desencadear a morte por apoptose ou necrose, especialmente se houver danos ao DNA.

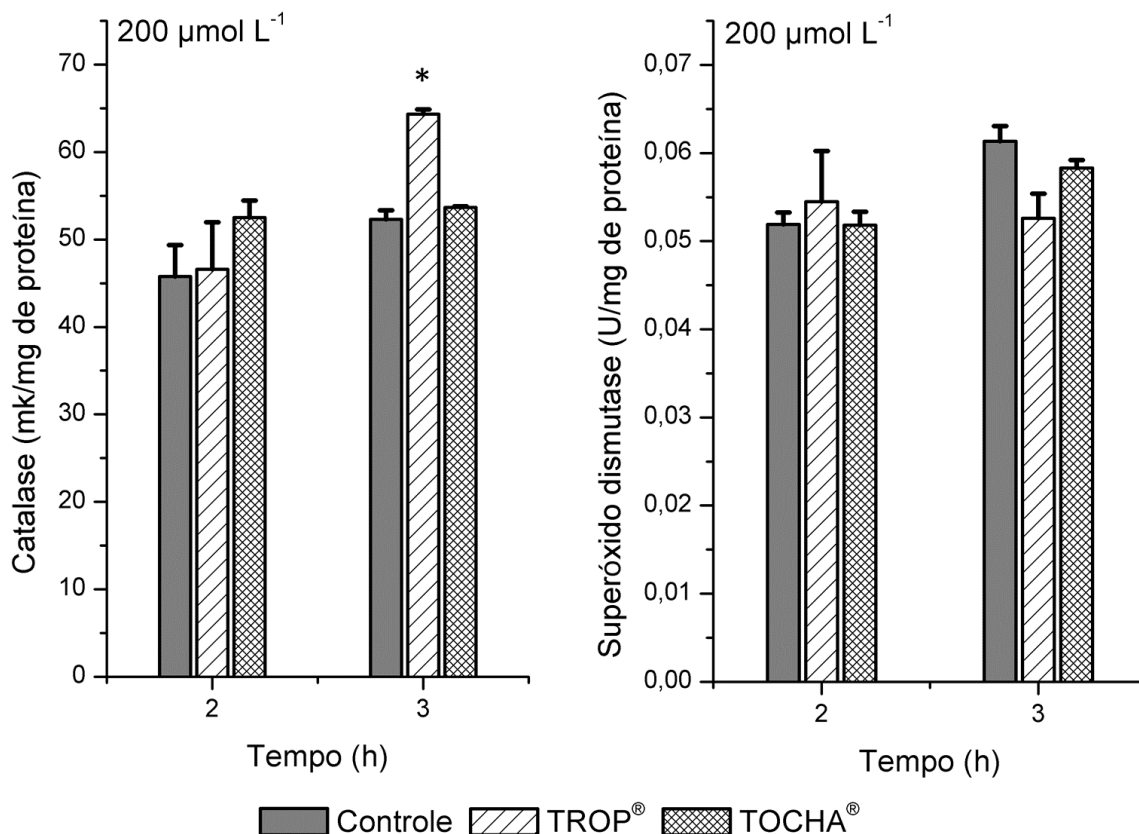
Como no presente estudo não houve recuperação do crescimento celular e a taxa de crescimento foi negativa sugere-se que a *Saccharomyces cerevisiae* sofreu dano oxidativo na molécula de DNA pelo acúmulo de EROs, o que resultou na morte celular do modelo eucariótico durante este período de análise.

### 5.3.2 Dosagem das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em células da *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com os herbicidas TROP® e TOCHA®

Após o rompimento celular da levedura, foram realizadas as dosagens das enzimas CAT e SOD nos tempo de 2 e 3 horas de tratamento com as formulações

comerciais TROP® e TOCHA® (Figura 19). Este ensaio permitiu avaliar se a elevação da concentração de EROs ativou estas duas enzimas do sistema antioxidante

**Figura 19. Dosagem das enzimas catalase e superóxido dismutase após a exposição as formulações comerciais TROP® e TOCHA®**



Os resultados são as médias de três experimentos independentes e as barras de erro representam os desvios-padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ONE-WAY ANOVA. Para o teste de Tukey comparou-se as amostras versus controle, sendo que \* refere-se a  $p \leq 0,05$ .

A presença de EROs no meio reacional foi elevada em todos os períodos para os dois herbicidas, ainda assim as enzimas a CAT e SOD não foram estimuladas, com exceção da CAT para o tratamento com o herbicida TROP® na terceira hora.

Uma hipótese para estes resultados é que o tempo de ensaio não tenha sido suficiente para a adaptação da *Saccharomyces cerevisiae* ao meio, assim como para a resposta antioxidante da CAT e da SOD no período de duas horas. Outra hipótese aponta para a susceptibilidade destas enzimas à oxidação, que poderiam passar a apresentar efeitos pró-oxidantes e consequentemente serem inativadas pelos demais mecanismos antioxidantes disponíveis. Além disso, a SOD pode ser inativada pelo



radical peróxido de hidrogênio e a CAT por ânions superóxido e por radicais hidroxila (LUSHCHAK et al., 2005; PIGEOLET et al., 1990).

No presente estudo, embora não tenha sido constatada a inativação total da CAT e da SOD, ainda assim a sua redução dentro do sistema poderia levar ao aumento contínuo das EROs e conseqüentemente a morte celular.

No tempo de 3 horas houve menor produção da enzima SOD em relação ao controle tanto para o TROP<sup>®</sup> quanto o TOCHA<sup>®</sup>, o que corrobora com o resultado da sobrevivência celular neste mesmo período, pois se o número de células está diminuindo, espera-se que a atividade metabólica também diminua. A tratamento com o herbicida TOCHA<sup>®</sup> também não estimulou a produção de CAT neste mesmo período. Já a amostra tratada com o herbicida TROP<sup>®</sup> apresentou aumento significativo pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a enzima CAT.

O aumento da CAT na terceira hora frente ao TROP<sup>®</sup> pode estar relacionado a presença células viáveis no ensaio, que ainda apresentassem alta atividade metabólica e estivessem tentando responder ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. Assim como, a membrana peroxissomal pode ter sofrido peroxidação lipídica, o que teria alterado a integridade da membrana, ocasionando a liberação da catalase A (CTA 1) para o meio reacional (SOARES, 2013).

Estudos que abordam os herbicidas apresentam resultados bem diversificados, afinal é necessário considerar o sistema estudado, as formulações comerciais dos compostos utilizados, as concentrações avaliadas, quais os EROs e mecanismos antioxidantes são estimulados, além das metodologias desenvolvidas em cada ensaio (BRACONI et al., 2011; CHAUFAN; COALOVA; MOLINA, 2014).

Neste sentido, pesquisas são realizadas com diversas células e organismos a fim de verificar o estresse oxidativo causado pelas formulações comerciais dos herbicidas glifosato e paraquate.

A exemplo disto a literatura traz estudos desde as células humanas (HepG2), que quando expostas ao Roundup<sup>®</sup> (glifosato) não apresentam aumento da CAT mas apresentam aumento da SOD (Chaufan et al. 2014), até a própria *Saccharomyces cerevisiae*, que ao ser tratada com Silglic (glifosato) apresentou atividade de CAT, mesmo quando esta enzima não foi detectada nem na amostra controle, e a concentração de SOD ficou abaixo do controle (BRACONI, 2008). Também são realizados estudos com procariontes, como a bactéria *Escherichia coli*, que quando

exposta ao Gramoxone® (paraquat), não apresentou diferença significativa para a produção de CAT, apenas para SOD (GRAVINA, 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de pesquisas não apenas com os ingredientes ativos glifosato e paraquat, mas principalmente com suas respectivas formulações comerciais TROP® e TOCHA®.

As formulações comerciais, mostraram-se mais estressoras que os padrões analíticos. Como os herbicidas não são disponibilizados apenas com os seus ingredientes ativos no ambiente, e sim como uma mistura de diversos compostos, isto desperta preocupações quanto à possibilidade do desenvolvimento de uma série de doenças relacionadas ao estresse oxidativo desencadeado pelos herbicidas à base de glifosato e paraquate.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível verificar o efeito estressor dos padrões analíticos glifosato e paraquate e suas respectivas formulações comerciais TROP® e TOCHA® utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental.

Ao analisar os dados de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* determinou-se que nas condições estudadas, a fase exponencial (*Log*) de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCPF 3191 Lenticule® Sigma-Aldrich (ATCC: 9763) acontece entre a quarta e sexta hora de cultivo.

A avaliação sobre a sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente aos ingredientes ativos glifosato e paraquate mostrou que em todas as concentrações testadas a levedura apresentou uma taxa de crescimento menor em relação ao controle e tenha retomado o crescimento até a terceira hora de ensaio, sendo na concentração de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos herbicidas que o decaimento no crescimento foi mais expressivo.

Quando as células da levedura foram tratadas com as formulações comerciais TROP® e TOCHA®, a taxa de crescimento foi afetada desde a primeira hora de ensaio, e o número de células diminuiu drasticamente ao final da terceira hora.

Um dos fatores que poderia estar relacionado à diminuição na taxa de sobrevivência deste microrganismo seria a geração de EROs, esta hipótese foi confirmada através da verificação da produção destas moléculas durante o período estudado com todos os compostos avaliados. Os resultados comprovaram que o decaimento na taxa de crescimento da levedura está relacionado a uma significativa geração de EROs no sistema que, dependendo da amostra analisada, foram eficientemente combatidos ou não pelos agentes antioxidantes.

Ao dosar as enzimas CAT e SOD pode-se afirmar que a retomada de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* quando tratada com os ingredientes ativos paraquate e glifosato está relacionada à capacidade antioxidante destas duas enzimas. Porém quando as células da levedura foram expostas às formulações comerciais TROP® e TOCHA® estas enzimas apresentaram comportamentos bem diferentes dos acima citados. Os resultados sugerem que a produção de CAT e SOD foram inibidas ou então não foram estimuladas até a terceira hora do experimento, sendo incapazes de combater as EROs, que por sua vez desencadearam um estresse oxidativo irreversível até o final do experimento.

Os ingredientes ativos paraquate e glifosato apresentaram resultados em geral muito diferentes das suas respectivas formulações comerciais TROP® e TOCHA®, possivelmente isto está relacionado presença de adjuvantes nos produtos comerciais.

Diante deste cenário, fica evidente que as pesquisas devem abordar não apenas os ingredientes ativos dos pesticidas, mas principalmente as suas formulações comerciais, já que é nesta composição que eles são disponibilizados no ambiente.

Por fim, sugere-se que em trabalhos futuros, após um período maior de exposição da *Saccharomyces cerevisiae* a estes herbicidas, sejam investigados a presença de marcadores de estresse oxidativo celular no meio reacional e de outros mecanismos antioxidantes envolvidos na resposta às EROs.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, pp. 121–126, 1984.
- AGUIAR, L. M. D.; FIGUEIRA, F. H.; GOTTSCHALK, M. S.; ROSA, C. E. D. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 185-186, pp. 94-101, ago. 2016.
- ALMEIDA, G. L. et al. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, pp. 1506–1512, out. 2007.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P. D.; SANTOS, T. C. R. D.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, pp. 589-593, jul. 2002.
- ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SPASOVA, B. K.; VASSILEV, S. V.; SLOKOSKA, L. S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycological Research**, v. 109, pp. 150-158, fev.2005.
- ANVISA**. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Parecer Técnico de Reavaliação nº 01 de 2015/GGTOX/ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2541353/CP%2B94-2015%2B-%2BNT.pdf/50fb348f-3c2a-4992-a3a2-ca89fd4d2127>>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- ANVISA**. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.. Monografias de Agrotóxicos. Glifosato. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>>. Acesso em: 06 jan. 2019.
- ANVISA**. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.. Monografias de Agrotóxicos. Paraquat. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/P01%2B%2BParaquate.pdf/0ec98b27-1b1f-49de-b788-7bbaa9dfb191>>. Acesso em: 06 jan. 20
- APARICIO, V. C. et al. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, pp. 1866–1873, jul. 2013.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 18, pp. 187–204, jul. 2013.
- ARANTES, S. A. DO C. M. **Retenção e degradação de 14C-glifosato e remobilização dos seus resíduos ligados em diferentes classes de solos**. 2007. 121f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE AÇÃO À RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba, 2006. 4ª ed.

AZARIAS, G. D. S. **Análise proteômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 cultivada em diferentes concentrações de sacarose**. 2015. 102f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

BARBOSA, K. B. F. et al. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 31, pp. 259–280, set. 2008.

BARCELLOS, M. M. **Ocorrência de Hormônios Estrogênicos e Avaliação da Atividade Estrogênica de Esgoto Bruto e Tratado em uma ETE do Município do Rio de Janeiro (RJ)**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Janeiro, 2016.

BAYLIAK, M.; SEMCHYSHYN, H.; LUSHCHAK, V. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific. **Biochemistry ( Moscow)**, v. 71, pp. 1013 - 1020, out. 2006.

BENETTI, F. **Avaliação cromatográfica e estudos de sorção e de toxicidade em minhocas de deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico**. 2015. 262 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

BHASKARA, B. L.; NAGARAJA, P. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, pp. 2686 - 2693, 2006.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, pp. 123 - 130, mai. 1999.

BOYD, B. S. G. C. **Growth parameters for *Saccharomyces cerevisiae* in glucose containing media**. 1985. 134 p. (Master of Science in Chemical Engineering) - Faculty of Texas Tech University, 1985.

BOHM, G. M. B. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, pp. 192–197, dez. 2008.

BRACONI, D. et al. Comparative analysis of the effects of locally used herbicides and their active ingredients on a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, abr. 2006.

BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. **Journal of**

**Proteomics**, v. 137, pp.19-34, mar. 2016.

BRACONI, S. P. et. al. **Oxidative Damage Mediated by Herbicides on Yeast Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, pp3836-3845, mai. 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248–254, mai 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso e: jul.2017.

CABRAL, M. G. et al. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: Role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. **Chemosphere**, v. 51, pp. 47–54, abr.2003.

CAMPOS, P.S. **Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (CDSE) para a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas da região Amazônica**. 2015. 77 f. Tese (Doutorado em Diversidade Biológica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, pp. 15-25, jan. 2013.

CASTILHOS, T. S. et al. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, pp. 209–214, jun. 2007.

CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; MOLINA, M. C, R. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: Differences with its active ingredient. **International Journal of Toxicology**, V. 33, pp. 29-38, jan. 2014.

COLOMBO, N. B. R. **Ação dos composto antioxidantes na redução do estresse oxidativo em modelo experimental de câncer de pulmão: estudo do pequi (*Caryocar brasiliense camb*)**. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, pp. 217-246, ago. 2001.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato:

revisão. **Química Nova**, v. 28, pp. 1038-1045, dez. 2011.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 27, pp. 1110–1122, jul. 2006.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, pp.469-486, out. 2000

ESTÈVE, K. et al. A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, pp. 1529–1534, out. 2009.

FENG, L.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; RODRIGO, M. A.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, pp.944-964, jul. 2013.

FERNÁNDEZ, M. et al. Spatial and temporal trends of paraquat, diquat, and difenzoquat contamination in water from marsh areas of the Valencian community (Spain). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, pp. 377–384, out. 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, pp. 61–68, jan. 1997.

FERREIRA, J. C. R. **Remoção de micropoluentes emergentes em efluentes sanitários através de carvão ativado**. 2011. 160f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FERREIRA, T. C. **Clonagem e Expressão do Fator 1 Humano Induzível por Hipóxia (HIF-1) na Levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 181f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

FRANCO, R. LI, S.; Rodriguez-Rocha, H. ; Burns, M. ; Panayiotidis, M. I. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, pp. 289-300, nov. 2010.

GAFFNEY, V. J.; CARDOSO, V.V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, pp. 138-149, 2014.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante emutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GHELFI, A. **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen***. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Ecologia em Conservação) – Universidade



Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GLUSCZAK, L. et al. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, pp. 624–630, abr. 2011.

GRAVINA, F. et al. Metabolic Interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, pp. 89-96, mai. 2017.

GROSICKA-MACIĄG, E. Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, pp. 357–366, 2011.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, pp. 106-111, mar. 2010.

GUILHERME, S. et al. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)-the major environmental breakdown product of glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 14, p. 8730–8739, 2014.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, pp. 312–322, jun. 2006.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, pp. 231 - 255, mai. 2004.

HANSSON, L.; HÄGGSTRÖM, M. H. Metabolic effects of paraquat on *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 13, pp. 81 - 83, 1986.

IKEPSU, T. O. Assessment of occurrence and concentrations of paraquat dichloride in water, sediments and fish from Warri River Basin, Niger Delta, Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, pp. 8517-85825, jun. 2015.

JAMES, J. et al. A rapid method to assess reactive oxygen species in yeast using H<sub>2</sub>DCF-DA. **Analytical Methods**, v. 7, pp. 8572–8575, 2015.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, pp. 1511–1527, dez. 1998.

JIANG, J.; ZHOU, Z.; SHARMA, V.K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - A review from global views. **Microchemical Journal**, v 110, pp. 292-300, set. 2013.

KESARI, R.; RAI, M.; GUPTA, V. K. Spectrophotometric method for determination of paraquat in food and biological samples. **Journal of AOAC International**, v. 80, p. 388 - 391, abr. 1997.

KRONBERG, M. F. et al. Glyphosate-based herbicides modulate oxidative stress response in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 214, pp. 1 - 8, dez. 2018.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v 473-474, pp. 619-641, mar. 2014.

LUO, L. et al. In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 52, pp. 410-417, jun. 2017.

LOQUE, C. P. **Fungos algícolas associados à macroalgas do litoral do Paraná e Península Antártica**.2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

LUSHCHAK, V. et al. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, pp. 35 - 40, set. 2005.

2005, Vol.441(1), pp.35-40

LOW, F. L.; SHAW, I. C.; GERRARD, J. A. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the stability of the herbicide glyphosate during bread leavening. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, pp. 133 – 137, 2005.

LV, X. et al. Occurrence and removal of phenolic endocrine disrupting chemicals in the water treatment processes. **Scientific Reports**, v. 6, pp. 1-10, mar. 2016.

MACIEL. G. M. et al. Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp. **Chemical Engineering Journal**, v.215, pp.331-338, jan.2013.

MANFREDINI, V. et al. Glutathione peroxidase induction protects *Saccharomyces cerevisiae* *sod1 Δsod2Δ* double mutants against oxidative damage. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, fev. 2004.

MARKLUND, S.; MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, pp. 469-474, set. 1974.

MILHOME, M. A. L. et al. Assessment of surface and groundwater potential contamination by agricultural pesticides applied in the region of Baixo Jaguaribe, CE, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, pp. 363–372, jul. 2009.

MONTLLOR-ALBALATE, C. et al. Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Biology**, v. 21, ago. 2019.

MULLER, J. L. et al. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em

fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciênci. Tecnol. Aliment.**, dez. 2007.

NASCIMENTO, N.C.D. **O alcaloide braquicerina e estresse oxidativo em *Psychotria brachyceras* e *Saccharomyces cerevisiae***.2007.81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

NASPOLINI, N. F. **Efeito neuroprotetor do extrato butanólico de *Ilex paraguariensis* na toxicidade induzida por paraquat em hipocampo de ratos pré-púberes**. 2016. 122 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

NGUYEN, N. T. et al. Toxicity detection using lysosomal enzymes, glycoamylase and thioredoxin fused with fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 141–146, nov. 2015.

NISHIMOTO, T. et al. Important role of catalase in the cellular response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ionizing radiation. **Current Microbiology**, v. 70, pp. 404 - 407, nov. 2014.

NORTH, M. et al. Genome-Wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. **PLoS ONE**, v. 6, pp. 1-19, ago. 2011.

PARANÁ (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Lista de agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná**.Curitiba, 2007, Disponível em:< <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GAT/lista.pdf>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

PARANÁ (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Lista de agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná**. Disponível em:< [http:// adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GAT/lista.pdf](http://adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GAT/lista.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2019.

PARANÁ (Estado). Secretaria do Estado da Saúde. Superintendência de Vigilância em Saúde. **Plano de Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná 2017 a 2019**. Disponível em:< [http://saude.pr.gov.br/arquivos/File/PlanoAgrotoxic30\\_05\\_18.pdf](http://saude.pr.gov.br/arquivos/File/PlanoAgrotoxic30_05_18.pdf) >. Acesso em: 6 jan. 2019.

PAVIANI, V. **Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus***. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PIGEOLET, E. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, pp. 283 - 297, fev.1990.

QUEIROZ, G. M. P. et al. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por

lixiviação em um solo agrícola. **Química Nova**, v. 34, pp. 190–195, 2011.

RAHAL, A. et. al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, pp. 1-19, jan. 2014

RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011. 172f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, pp. 189-207, mai. 2006.

REGENBERG, B. et al. Growth-rate regulated genes have profound impact on interpretation of transcriptome profiling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biology**, 2006.

RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, pp. 716-720, jun. 2005.

ROMERO, D. M.; RÍOS DE MOLINA, M. C.; JUÁREZ, Á. B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, pp. 741 - 747, 2011.

SAITÚA, H.; GIANNINI, F.; PADILLA, A. P. Drinking water obtaining by nanofiltration from waters contaminated with glyphosate formulations: Process evaluation by means of toxicity tests and studies on operating parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v.227-228, pp.204-210, ago. 2012.

SALAM, A. Z. E. et al. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, pp. 89-101, out. 1993.

SANDERS, T.; LASSEN, S. The herbicide Glyphosate affects nitrification in the Elbe estuary , Germany. v. 17, pp. 13076, abr. 2015.

SANTANA, J. S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SANTOS, S. C.; SÁ-CORREIA, I. Yeast toxicogenomics: Lessons from a eukaryotic cell model and cell factory. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, pp.183-191, mar. 2015.

SARATOVSKIKH, E. A. Molecular Mechanisms of the Damage Effect of Pesticides of Various Structures on Target Organisms. **Russian Journal of Physical Chemistry B**. v. 11, p. 652–662, 2017.

SCHMITT, G. C. et al. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da

intoxicação por paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, ago. 2006.

SHEN, L.; LI, Y.; JIANG, L.; WANG, X. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Stimulation of Lipopolysaccharide. **PLoS ONE**, v. 9, ago. 2014.

SILVA, G. G. M. DA. **Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica**. 2015. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2015.

SIQUEIRA JUNIOR, E. F. D. **Perfil de expressão protéica de leveduras comerciais do gênero *Saccharomyces* e o papel das proteínas na seleção de espécies com potencial biotecnológico**. 2013. 168f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, pp. 45-47, mar. 2004.

SOARES D. G.; ANDREAZZA A. C.; SALVADOR M. Avaliação de compostos com atividade e antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, pp.95-100, mar. 2005.

SOARES, J. J. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* ( L .) Skeels**. 2013. 82 f. Dissertação ( Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

SODRÉ, F.F. Interferentes Endócrinos como Contaminantes Emergentes: Uma questão de saúde pública. **Artigos Temáticos do AQQUA**, v. 1, pp. 1-8, jan. 2012.

SOUZA, D. D.; MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, pp. 664-647, out. 2003.

SOUZA, N. C. D. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais**. 2011. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

STUART, M. et. al. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 416, pp.1-21, fev. 2012.

SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, pp. 65–77, out. 2002.

TREVISAN, R. **Mecanismos de defesas celulares relacionados a defesas antioxidantes e de biotransformação em mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos**. 2014. 200 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina,

Florianópolis, 2014.

TOCHA® - Stockton-Agrimor do Brasil Ltda. Disponível em: <<http://adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/tocha191018.pdf>>. Acesso em 12 fev. 2018.

TROP® - ADAMA BRASIL S/A. Disponível em: <<https://www.adama.com/documents/407112/419152/Trop%C2%AE+-+Bula>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

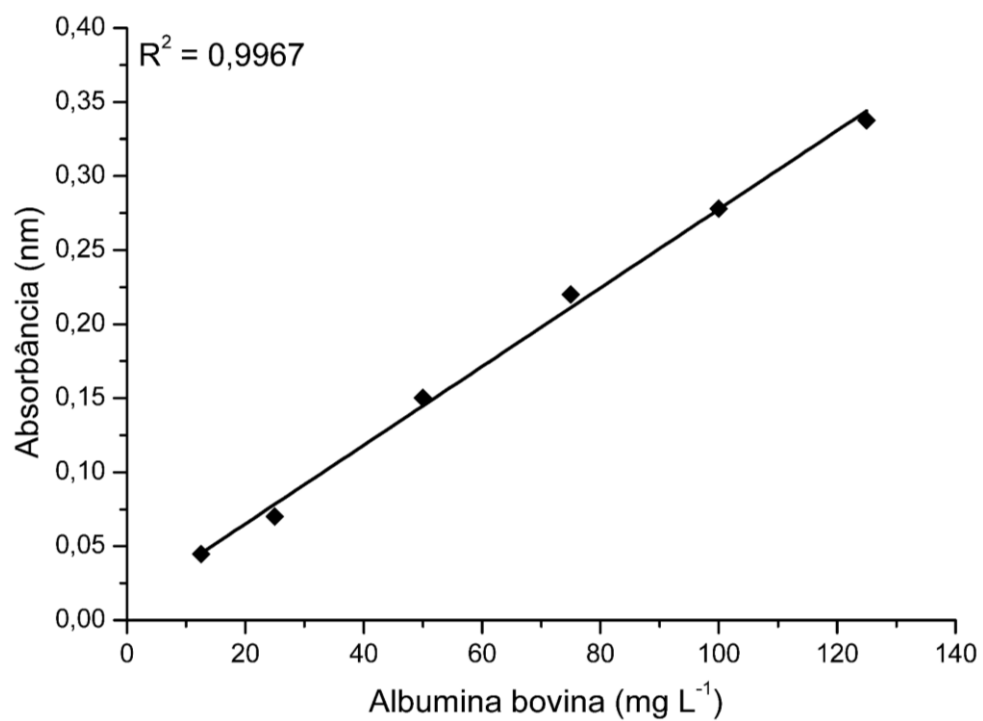
URBATZKA, R. et al. Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. **Chemosphere**, v. 67, pp. 1080–1087, jan. 2007.

VARGAS, Karina Colasso. **Estudo dos efeitos da radiação ultravioleta C e TFD em células de *Saccharomyces boulardii* e *Candida albicans***. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

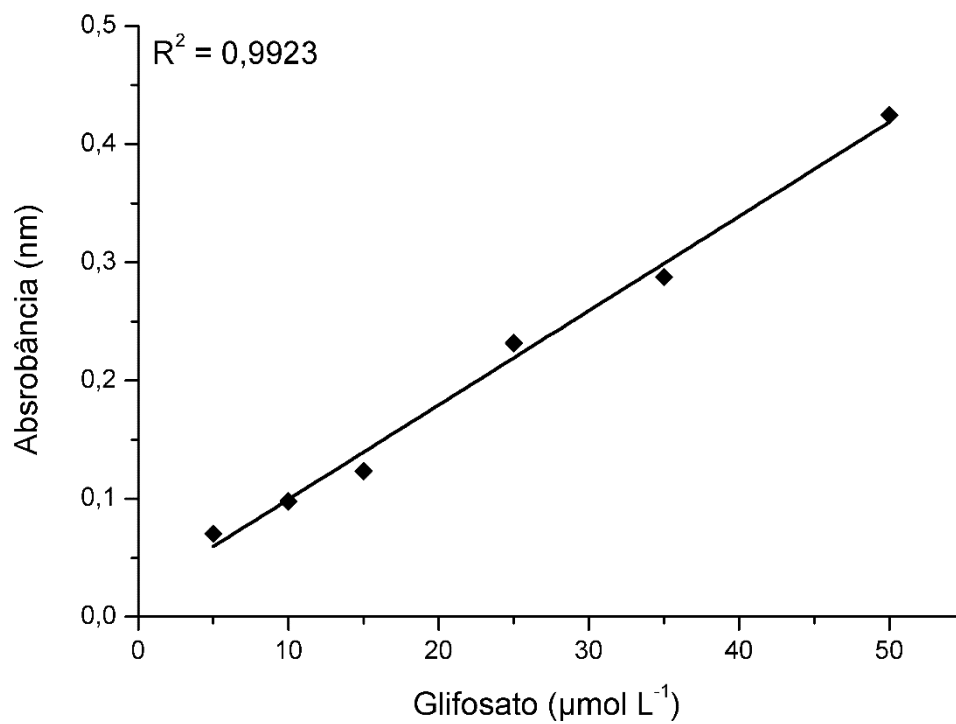
VERÍSSIMO, G.; MOREIRA, J. C.; MEYER, A. Paraquat Contamination in Surface Waters of a Rural Stream in the Mountain Region in the State of Rio De Janeiro Southeastern Brazil. **Journal of Enviromental and Toxicological Studies**, v. 2, pp. 1-6, mai. 2018.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, v. 5, pp. 51–66, jan. 2010.

## APÊNDICE A – Curva analítica da albumina bovina

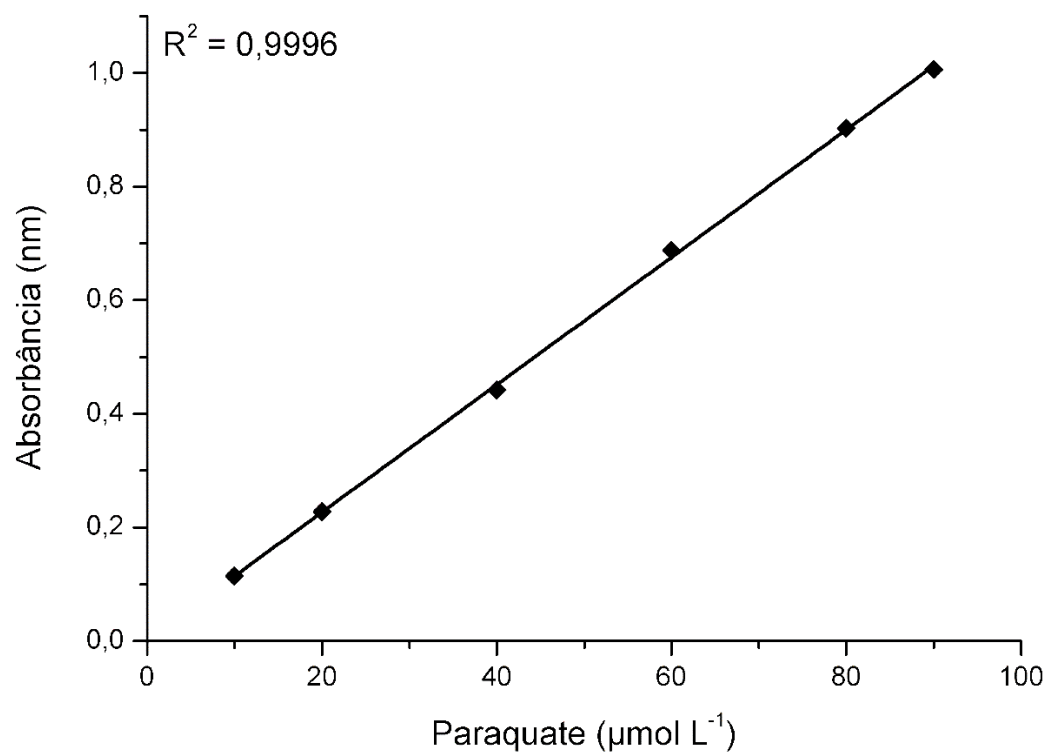


## APÊNDICE B – Curva analítica do glifosato





## APÊNDICE C – Curva analítica do paraquate



ANEXO A – Culturas para as quais o ingrediente ativo glifosato encontra-se autorizado, com seus respectivos limites máximos de resíduo

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Pós-emergência	3,0	(1)
Ameixa	Pós-emergência	0,2	17 dias
Aroz	Pós-emergência	0,2	(2)
Aveia preta	Dessecante	20,0	4 dias
Azevém	Dessecante	10,0	4 dias
Banana	Pós-emergência	0,02	30 dias
Cacau	Pós-emergência	0,1	30 dias
Café	Pós-emergência	1,0	15 dias
Cana-de-açúcar	Maturador	1,0	30 dias
Cana-de-açúcar	Pós-emergência	1,0	(2)
Citros	Pós-emergência	0,2	30 dias
Coco	Pós-emergência	0,1	15 dias
Eucalipto	Pós-emergência		U NA
Feijão	Pós-emergência	0,05	(2)
Fumo	Pós-emergência		U NA
Maçã	Pós-emergência	0,2	15 dias
Mamão	Pós-emergência	0,1	3 dias
Milho	Pós-emergência	1,0	(3)
Nectarina	Pós-emergência	0,2	30 dias
Pastagem	Pós-emergência	0,2	(2)
Pêra	Pós-emergência	0,2	15 dias
Pêssego	Pós-emergência	0,2	30 dias
Pinus	Pós-emergência		U NA
Seringueira	Pós-emergência		U NA
Soja	Dessecante	10,0	7 dias
Soja	Pós-emergência	10,0	(4)
Trigo	Pós-emergência	0,05	(2)
Uva	Pós-emergência	0,2	17 dias

UNA = Uso Não Alimentar

- (1) O intervalo de segurança para a cultura do algodão é não determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. O intervalo de segurança para a cultura do algodão geneticamente modificado, que expressa resistência ao glifosato, é de 130 dias, quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura.
- (2) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego.
- (3) O intervalo de segurança para a cultura do milho é não determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. O intervalo de segurança para a cultura do milho geneticamente modificado, que expressa resistência ao glifosato, é de 90 dias, quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura.
- (4) O intervalo de segurança para a cultura da soja é não determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. O intervalo de segurança para a cultura da soja geneticamente modificada, que expressa resistência ao glifosato, é de 58 dias, quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura.

Obs: LMRs para as culturas de algodão, milho e soja estabelecidos para a modalidade de aplicação em pós-emergência das plantas infestantes e das culturas geneticamente modificadas, que expressam resistência ao glifosato.

Fonte: Monografias de agrotóxicos - ANVISA

ANEXO B – Culturas para as quais o ingrediente ativo paraquate encontra-se autorizado, com seus respectivos limites máximos de resíduo

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Pós-emergência	0,2	7 dias
Algodão	Dessecante	0,2	7 dias
Arroz	Pós-emergência	0,5	7 dias
Arroz	Dessecante	0,5	7 dias
Banana	Pós-emergência	0,05	1 dia
Batata	Pós-emergência	0,2	(1)
Batata	Dessecante	0,2	7 dias
Café	Pós-emergência	0,05	7 dias
Cana-de-açúcar	Pós-emergência	0,1	7 dias
Cana-de-açúcar	Dessecante	0,1	7 dias
Citros	Pós-emergência	0,05	1 dia
Feijão	Pós-emergência	0,05	(1)
Maçã	Pós-emergência	0,05	1 dia
Milho	Pós-emergência	0,1	7 dias
Milho	Dessecante	0,1	7 dias
Soja	Pós-emergência	0,1	7 dias
Soja	Dessecante	0,1	7 dias
Trigo	Pós-emergência	0,01	(1)

(1) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego.

Obs: Os LMRs referem-se ao cátion de paraquate (disponível normalmente como dicloreto).

Fonte: Monografias de agrotóxicos - ANVISA

## ANEXO C – Formulação TROP®



Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 03495.

**COMPOSIÇÃO:**

N-(phosphonomethyl) glycine (GLIFOSATO) .....480 g/L (48,00% m/v)  
 Equivalente ácido .....355,67 g/L (35,56% m/v)  
 Outros Ingredientes .....683,9 g/L (68,39% m/v)

GRUPO	<b>G</b>	HERBICIDA
-------	----------	-----------

**CONTEÚDO:** VIDE RÓTULO.

**CLASSE:** Herbicida pós-emergente, sistêmico, de ação total, não seletivo, do grupo químico glicina substituída.

**TIPO DE FORMULAÇÃO:** Concentrado Solúvel

**TITULAR DO REGISTRO:****ADAMA BRASIL S/A**

Rua Pedro Antônio de Souza, 400 - Parque Rui Barbosa - CEP: 86031-610 - Londrina/PR

Tel.: (43) 3371-9000 - Fax: (43) 3371-9017 - CNPJ: 02.290.510/0001-7

Inscrição Estadual 601.07287-44 - Registro Estadual nº 003263 - ADAPAR/PR

**FABRICANTE DO PRODUTO TÉCNICO:**

**GLIFOSATO TÉCNICO MILENIA** – Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 03095.

**ADAMA BRASIL S/A**

Rua Pedro Antônio de Souza, 400 - Parque Rui Barbosa - CEP: 86031-610 - Londrina/PR

Tel.: (43) 3371-9000 - Fax: (43) 3371-9017 - CNPJ: 02.290.510/0001-7

Inscrição Estadual 601.07287-44 - Registro Estadual nº 003263 - ADAPAR/PR

**FORMULADORES:****ADAMA BRASIL S/A**

Rua Pedro Antônio de Souza, 400 - Parque Rui Barbosa - CEP: 86031-610 - Londrina/PR

Tel.: (43) 3371-9000 - Fax: (43) 3371-9017 - CNPJ: 02.290.510/0001-7

Inscrição Estadual 601.07287-44 - Registro Estadual nº 003263 - ADAPAR/PR

**ADAMA BRASIL S/A**

Av. Júlio de Castilhos, 2085 - CEP: 95860-000 - Taquari/RS

Tel.: (51) 3853-9400 - Fax: (51) 3853-1697

CNPJ: 02.290.510/0004-19 - Inscrição Estadual: 142/0047032

Registro Estadual nº 00001047/99 - SEAPA/RS

## ANEXO D – Formulação TOCHA®

**ATENÇÃO:** Esta BULA deverá obrigatoriamente acompanhar o produto.



# TOCHA®

Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 13208

**COMPOSIÇÃO:**

1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (DICLORETO DE PARAQUATE).....	276 g/L (27,6% m/v)
Equivalente em cátion PARAQUATE.....	200 g/L (20% m/v)
Outros Ingredientes.....	880 g/L (88% m/v)

GRUPO	<b>D</b>	HERBICIDA
-------	----------	-----------

**CONTEÚDO:** VIDE RÓTULO

**CLASSE:** Herbicida não seletivo, com ação de contato, do grupo químico Bipiridílio

**TIPO DE FORMULAÇÃO:** Concentrado Solúvel – SL

**TITULAR DO REGISTRO (\*):**

Stockton-Agrimor do Brasil Ltda.  
Rua dos Pinheiros nº 870, Conj. 113/114 – Pinheiros  
05422-001- São Paulo, SP - Tel.: (11) 3088-1919  
CNPJ: 09.468.367/0001-09 Registro CDA/SP nº 903

**(\*) IMPORTADOR DO PRODUTO FORMULADO**

**FABRICANTE DO PRODUTO TÉCNICO:**

Paraquat Técnico 500 (Reg. MAPA: 02108)  
HuBei XianLong Chemical Industry Co., Ltd.  
No. 36, YanJiang Ave, JiaoJiang District, XianTao City, HuBei Province - P. R. China

**Paraquat Técnico Stockton (Reg. MAPA: 22716)**

Nanjing Red Sun Biochemistry Co., Ltd.  
188, Fang Ting Road, Nanjing Chemical Industry Park, Nanjing High & New Technology  
Development Zone – 210061 Nanjing, Jiangsu – China.

**FORMULADOR:**

Hubei XianLong Chemical Industry Co., Ltd.  
No. 36, YanJiang Ave, JiaoJiang District,  
XianTao City, HuBei Province - P. R. China

**Agritec Indústria Brasileira de Herbicidas Ltda.**

Av. dos Marins, S/N - Bairro dos Marins  
13403-130 - Piracicaba, SP  
CNPJ 51.050.970/0001-01 - Reg. CDA/SP nº 029

**Fersol Indústria e Comércio S/A**

Rodovia Presid. Castello Branco, km 88,5  
18120-970 - Mairinque, SP  
CNPJ 47.226.493/0001-46 - Reg. CDA/SP nº 031

Fonte: BULA TOCHA® - STOCKTON