**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade das desidrogenases de leveduras como parâmetro em teste de
toxicidade**

Ana Paula Maria da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola.

**Piracicaba
2018**

Ana Paula Maria da Silva
Engenheira Agrônoma

Atividade das desidrogenases de leveduras como parâmetro em teste de toxicidade
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ HUMBERTO GOMES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola.

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Ana Paula Maria da

Atividade das desidrogenases de leveduras como parâmetro em teste de toxicidade / Ana Paula Maria da Silva. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2018.

56 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Levedura 2. Toxicidade 3. Metais pesados. 4. Solventes 5. Cloretotrifeniltetrazólio I. Título

AOS MEUS PAIS E MINHA IRMÃ,

*MARIA HELENA, ADEILTON VITOR E ANNE RAFAELE,
PELO AMOR, APOIO E POR SEMPRE ESTAREM PRESENTES EM MINHA VIDA,
QUE COMPARTILHAM OS MEUS IDEAIS E OS ALIMENTAM,
INCENTIVANDO-ME A PROSSEGUIR
QUAISQUER QUE SEJAM OS OBSTÁCULOS.
MINHA ETERNA GRATIDÃO E RECONHECIMENTO QUE SEM ELES NADA SERIA POSSÍVEL.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre ter me iluminado e me dado serenidade e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) pela oportunidade em ingressar na pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes (Beto), pela orientação, pela amizade, por sempre estar disposto a me ajudar e por todos os conselhos.

À Profa. Dra. Simone Possedente de Lira, pelas conversas, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Kamogawa e a Profa. Dra. Keila Maria Roncato Duarte pela colaboração e ensinamentos no trabalho.

Ao Me. Felipe, pela paciência e ensinamentos.

Ao Me. José Bruno Malaquias pela ajuda nas análises estáticas.

Aos amigos do Laboratório, Sérgio, Diana, Gislaine, Richtier, Rita, Jana, Lenita, Guilherme, Brasil, pelos momentos de descontração e risadas, e por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais pelo amor, confiança e pela educação que me proporcionaram. Agradeço por serem exemplos de dedicação e perseverança.

Ao Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior (Jupará), pelos ensinamentos, conselhos, durante todos os anos de graduação.

Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima e as Profas. Dras. Iraildes Pereira de Assunção e Sônia Maria Forti Broglio por todos os ensinamentos.

Aos amigos, Arthur, Gustavo, Paul, Maria Regina, Geovanny, Rodrigo, Wesley, Jacson, Yane, Felipe, Lígia, João, Luciana, Lucianne, Mariane, pela amizade, pelos ótimos momentos compartilhados, pelo apoio em momentos difíceis, pelo incentivo, por todas as lembranças maravilhosas que trago comigo, por sempre acreditarem na minha capacidade e me dar coragem para enfrentar as minhas dificuldades. Amizade para a vida toda!

Aos amigos que mesmo distantes me apoiaram durante essa jornada, Gerciano, Evanio, Kledson com suas amizades e palavras de incentivo.

À minha tia Cícera, a minha prima Marceliana e ao meu primo Marcelo pelo apoio, preocupação, amor e pelas orações.

À todas as pessoas que Piracicaba me proporcionou conhecer e amar, cada uma com sua particularidade.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para este trabalho e para minha formação e que eventualmente eu tenha esquecido de menciona-los, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
2.1. TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	13
2.1.1. ORGANISMOS UTILIZADOS COMO BIOINDICADORES AQUÁTICOS	16
2.1.1.1. <i>Algas</i>	16
2.1.1.2. <i>Bactéria luminescente</i>	16
2.1.1.3. <i>Invertebrados como os microcrustáceos</i>	17
2.1.1.4. <i>Peixe</i>	17
2.1.1.5. <i>Leveduras</i>	18
2.1.1.6. <i>Mecanismos de detoxificação</i>	18
2.1.1.7. <i>Uso do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) na avaliação de toxicidade</i>	19
2.1.1.8. <i>Extrator do TTF intracelular</i>	22
3. OBJETIVO GERAL	23
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO	25
4.2. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FERMENTOS LIOFILIZADOS DE PANIFICAÇÃO QUANTO A ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES	25
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES DOS FERMENTOS NA PRESENÇA DE SOLUÇÃO DE Cd ...	25
4.4. CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO METABÓLICA DE LEVEDURA LIOFILIZADA DE PANIFICAÇÃO E LEVEDURA FRESCA PE-2 APÓS A EXPOSIÇÃO A Cd	26
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES DE LEVEDURA LIOFILIZADA DE PANIFICAÇÃO EXPOSTA A DIFERENTES METAIS	27
4.5.1. ANÁLISE DE TAXAS DE INIBIÇÃO E CE50%	28
4.6. COMPLEXAÇÃO DE Cd	28
4.7. AVALIAÇÃO DA TAXA DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES COM SOLVENTES	29
4.8. TESTE COMPARATIVO: ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE DE PEPINO (<i>CUCUMIS SATIVUS</i>) QUANDO EXPOSTAS AS DIFERENTES SOLUÇÕES DE ELEMENTOS POSSIVELMENTE TÓXICOS	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FERMENTOS DE PANIFICAÇÃO QUANTO A ATIVIDADE DE DESIDROGENASES ...	31
5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES DOS FERMENTOS A, B E C NA PRESENÇA DE Cd	32
5.3. CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO METABÓLICA DE LEVEDURA LIOFILIZADA E LEVEDURA PE-2 FRESCA APÓS A EXPOSIÇÃO AO Cd	33
5.4. AVALIAÇÃO DA TAXA DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES DE LEVEDURA LIOFILIZADA APÓS A EXPOSIÇÃO A DIFERENTES ELEMENTOS POSSIVELMENTE TÓXICOS	35
5.5. COMPLEXAÇÃO DE METAIS	42
5.6. AVALIAÇÃO DA TAXA DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS DESIDROGENASES COM SOLVENTES	43
5.7. ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE DE PEPINO (<i>CUCUMIS SATIVUS</i>) EM SOLUÇÕES DE METAIS	46
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Atividade das desidrogenases de leveduras como parâmetro em teste de toxicidade

Devido à grande expansão das cidades e seu acelerado crescimento e industrialização, a contaminação d'águas vem aumentando rapidamente, resultado de despejos não controlados em rios e solos, oferecendo um grande risco à saúde. Sendo assim, neste trabalho foi realizada a medição da atividade das desidrogenases (envolvidas na respiração e/ou fermentação), por meio da conversão do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em 1,3,5-trifenil formazan (TPF), como parâmetro em teste de toxicidade. Para isto, foram utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, liofilizadas de panificação, como bioindicadoras da presença de elementos possivelmente tóxicos na água, através da medida da atividade metabólica pela conversão do TTC em TPF, sendo denominado de YTOX. No estudo da atividade das desidrogenases, os diferentes fermentos liofilizados de panificação não apresentaram distinção entre si, como também, não demonstraram diferença em relação a atividade das desidrogenases na presença de cádmio, sendo constatada a capacidade de recuperação metabólica da levedura após a exposição ao metal. Além disso, foi utilizada levedura PE-2 fresca para comprovar que o comportamento enzimático é similar, tanto em leveduras frescas como em liofilizadas. Acrescentando que o tempo de recuperação metabólica das leveduras é proporcional às concentrações de metais no meio. Os íons livres dos metais Al, Pb, Zn, Cr, Ba e o semimetal As, causam inibição da atividade das desidrogenases em suas respectivas concentrações, sendo este o primeiro relato da utilização de Ba em estudos com leveduras. No estudo de complexação, fica comprovado que metais complexados causam baixíssima ou nenhuma toxicidade à atividade das desidrogenases da levedura. Também foram testados solventes, como álcool butílico, ácido acético, isopropanol, acetona, cloreto de metila, clorofórmio, acetato de etila, hexano, álcool metílico, benzeno e peróxido de hidrogênio, apresentaram toxicidade por meio da inibição da atividade das desidrogenases em suas concentrações correspondentes. O teste comparativo foi a germinação de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) em soluções de metais com as mesmas concentrações que o YTOX, o que possibilitando comprovar que leveduras são excelentes bioindicadoras de contaminação, por apresentarem um alto grau de homologia com eucariotos superiores, permitindo assim, avaliar aspectos relevantes em relação aos efeitos tóxicos dos compostos avaliados com a biologia humana, além de ser de fácil manutenção e resistente às pequenas variações ambientais. Este trabalho apresenta contribuição no conhecimento sobre atividade das desidrogenases em relação à toxicidade de metais, semimetal e solventes estudados.

Palavras-chave: Levedura; Toxicidade; Metais pesados; Solventes; Cloretotriteniltetrazólio.

ABSTRACT

Yeast dehydrogenase activity as a parameter for toxicity test

Due to the great expansion of cities and their accelerated growth and industrialization, water contamination has been increasing rapidly, resulting from uncontrolled dumping in rivers and soils, posing a great risk to health. Thus, in this work the measurement of the activity of dehydrogenases (involved in respiration and / or fermentation) was carried out, by means of the conversion of 2,3,5-triphenyl chloride tetrazolium (TTC) to 1,3,5-triphenyl formazan (TPF) as a parameter in the toxicity test. *Saccharomyces cerevisiae*, freeze-dried baking yeast were used as bioindicators of the presence of possibly toxic elements in the water, through the measurement of metabolic activity by the conversion of TTC into TPF, being called YTOX. In the study of the activity of the dehydrogenases, the different lyophilized baking fermentations did not distinguish between themselves, nor did they show any difference in relation to the activity of the dehydrogenase in the presence of cadmium, being verified the metabolic recovery capacity of the yeast after exposure to the metal. In addition, fresh PE-2 yeast was used to demonstrate that the enzymatic behavior is similar in both fresh and freeze-dried yeast. Adding that the metabolic recovery time of the yeasts is proportional to the concentrations of metals in the medium. The free ions of metals Al, Pb, Zn, Cr, Ba and the semimetal As, cause inhibition of the activity of the dehydrogenases in their respective concentrations, being this the first report of the use of Ba in studies with yeasts. In the complexation study, it is proven that complexed metals cause very low or no toxicity to the activity of yeast dehydrogenase. Solvents such as butyl alcohol, acetic acid, isopropanol, acetone, methyl chloride, chloroform, ethyl acetate, hexane, methyl alcohol, benzene and hydrogen peroxide were also tested for toxicity by inhibiting the activity of the dehydrogenases in their concentrations correspondents. The comparative test was the germination of cucumber seeds (*Cucumis sativus*) in solutions of metals with the same concentrations as YTOX, which allows to prove that yeasts are excellent contamination bioindicators, because they have a high degree of homology with superior eukaryotes, allowing thus, to evaluate relevant aspects regarding the toxic effects of the compounds evaluated with human biology, besides being easy to maintain and resistant to small environmental variations. This work presents a contribution in the knowledge about the activity of the dehydrogenases in relation to the toxicity of metals, semimetal and studied solvents.

Keywords: Yeast; Toxicity; Heavy metals; Solvents; Chloro-triphenyltetrazolium.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da atualidade é a contaminação das águas em diversos níveis, ocasionado pelo desenvolvimento acelerado das cidades e consequentemente a sua rápida industrialização, resultando em despejos desordenados em locais inapropriados próximos a rios, lagos e solos, além do uso indiscriminado de pesticidas e fertilizantes nas atividades agrícolas (BELABED et al., 2017), bem como a exploração industrial do petróleo, que lida diariamente com problemas decorrentes de acidentes, derrames e vazamentos de petróleo e seus derivados, oferecendo um grande risco à saúde e ao ambiente (LIU et al., 2017).

O monitoramento desses elementos nas águas consumidas e nos solos utilizados para diversos fins é realizado por meio de testes ecotoxicológicos, que tem como objetivo avaliar as formas e níveis de contaminação do ambiente por poluentes naturais ou sintéticos, provenientes da atividade humana, bem como a compreensão dos seus efeitos sobre os organismos e seus mecanismos de ação. Baseando-se na resposta dos organismos quando expostos à uma certa quantidade do tóxico, no tempo de exposição, na idade e condições de saúde do organismo (GESSNER; TLILI, 2016).

A toxicidade das águas é frequentemente avaliada por meio de ensaios realizados com espécies de diferentes níveis tróficos do ecossistema em estudo, pois nenhum organismo possui todos os requisitos necessários para a realização destes testes de toxicidade, sendo essencial a utilização de um organismo do pertencente ao fitoplâncton e um do zooplâncton e outro do grupo dos peixes, níveis que representam um ambiente aquático (HASSAN et al., 2016). Os organismos mais utilizados são: as algas verdes, *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus subsicatus*, *Scenedesmus capricornutum*, bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, invertebrados como os microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* e os peixes *Danio rerio* (peixe zebra), *Poecilia reticulata* (Guppy) e o *Cyprinus carpio* (Carpa), *Leuciscus idus*, *Pimephales promelas* e *Poecilia reticulata*, dentre outros (COSTA et al., 2008; VALAVANIDIS, VLACHOGIANNI, 2010).

A diversidade e o número de micro-organismos nos ecossistemas naturais apresentam pequenas mudanças resultantes das alterações ambientais. Atualmente muitos micro-organismos são utilizados na remediação de águas e solos contaminados, denominando-se biorremediação, sendo utilizados também na biodegradação de contaminantes e como bioindicadores de contaminação. Os bioindicadores são fatores bióticos utilizados para a averiguação de condições passadas, presentes ou futuras de ecossistemas. As espécies se adaptam para sobreviver, reproduzir e realizar relações ecológicas em condições ambientais

específicas (SANTOS et al., 2016). Assim, a presença de cada tipo de ser vivo revela características físicas, químicas e estruturais do ambiente em que se encontra. Um bom bioindicador deve possuir as seguintes características: tolerância com limites reduzidos (perceptível a pequenas alterações ambientais), fácil e rápida identificação, ser bem conhecido biologicamente e ecologicamente, possuir pouca mobilidade e ciclo de vida curto (MAILA; CLOETE, 2005).

Devido os organismos usados nos testes serem de diferentes espécies, não é possível obtermos uma resposta absoluta a respeito do risco que uma amostragem específica pode causar à saúde humana, devido à complexidade de realizar extrapolações dos resultados de toxicidade obtidos em laboratórios e até mesmo comparação entre organismos de distintas espécies (RIBO, 1997). Surge a necessidade de encontrarmos novos micro-organismos bioindicadores de toxicidade, sendo sua biologia mais semelhante ao homem para facilitar as extrapolações, possibilitando o entendimento de até que ponto esses elementos possivelmente tóxicos podem causar danos. Dentre a bioprospecção de micro-organismos com essa finalidade, destaca-se a levedura.

O teste mais utilizado para detecção de contaminantes em ambientes aquáticos é com a bactéria *Vibrio fischeri*, contudo o uso de um organismo procarioto nestes ensaios não acarretam uma informação confiável, quando comparado ao uso de um organismo eucarioto como a *S. cerevisiae*, que também é vantajosa em relação a bioensaios toxicológicos com roedores.

A levedura (*S. cerevisiae*) têm sido considerada uma excelente alternativa como microrganismo a ser utilizada em testes ecotoxicológicos, por apresentar características desejáveis como bioindicadora, o seu alto grau de homologia com organismos celulares superiores permite o estudo de aspectos de toxicidade celular relevantes à biologia humana ao nível molecular, além de ser de fácil cultivo e manutenção, apresenta uma rápida resposta às alterações na presença de contaminantes, outra característica importante é a sua utilização como organismo modelo para estudos genéticos devido ao grande conhecimento de seu genoma e ao grande número de ferramentas associadas a manipulação de fungos unicelulares. Além de ser subproduto das fermentações, tornando-se uma fonte barata de biomassa, e por apresentar a capacidade de absorção de metais pesados, sendo utilizadas como biossorventes na detoxificação de ambientes contaminados com metais (NWEKE, 2010; RUMLOVA; DOLEZALOVA, 2012).

Por apresentar todas essas características desejáveis, a levedura torna-se um excelente bioindicador, sendo a hipótese desse trabalho: o desenvolvimento de um teste de toxicidade

prático, rápido, eficiente e de baixo custo, utilizando a levedura como bioindicadora de toxicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Testes ecotoxicológicos

Em decorrência das diversas guerras e revoluções, principalmente a revolução industrial, ocorreu o surgimento de vários elementos artificiais que antes não eram encontrados na natureza, dentre os mais diversos elementos (metais/semimetais e solventes orgânicos), os quais não são degradáveis mas sim acumulativos em tecidos, órgãos e sistemas, que ocasionam distúrbios metabólicos más-formações e o aumento das concentrações de elementos de ocorrência natural no ambiente, acrescendo capacidade de serem prejudiciais (HASSAN et al., 2016).

A ecologia estuda a relação dos seres vivos entre si e com o meio ambiente, já a toxicologia, trata da ciência que pretende compreender as diversas formas de efeitos ocasionados por substâncias químicas, bioquímicas e os sistemas biológicos responsáveis, sendo levada em consideração a sensibilidade expressa e as diferentes respostas à toxicidade dos diversos organismos submetidos a esses elementos químicos que se tornam possivelmente tóxicos (COSTA et al., 2008). Surgindo assim, a ecotoxicologia que tem por objetivo compreender e prever os efeitos ocasionados por tais substâncias em seres vivos e comunidades naturais. O termo ecotoxicidade encontra-se sendo bastante usado na atualidade devido a necessidade de conhecermos as sequelas ocasionadas pelos despejos de produtos químicos no meio ambiente, que refletem no indivíduo, na comunidade e nas populações, além das diversas formas de interação com o homem (CHAPMAN, 2002; COSTA et al., 2008).

Em decorrência de estudar todas essas interações, os testes ecotoxicológicos vêm sendo utilizados como parâmetros legais para a normatização da qualidade da água, efluentes e sedimentos, por meio de diversas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e órgãos internacionais, além de possibilitar que os estados tenham suas próprias legislações e orientem a utilização desses testes (CONAMA, 2005).

Os testes de toxicidade com organismos e micro-organismos, são denominados de bioensaios, os quais são conduzidos em laboratório, possibilitando a indicação do grau ou efeito biológico do elemento possivelmente tóxico testado ou do elemento desconhecido, sendo os resultados confrontados experimentalmente com efeitos de outra substância com efeitos já conhecidos, podendo ser uma cultura de células viáveis e/ou organismo teste, que atenda a necessidade de tempo e espaço. A principal diferença entre os bioensaios é o tempo de exposição que organismo testado fica em contato com o elemento possivelmente tóxico e as

respostas finais que são avaliadas, sendo classificados em agudo ou crônico (COSTA et al., 2008)

Os bioensaios agudos, são testes realizados em um pequeno período de tempo em relação ao tempo de vida do organismo (24 a 96 horas), normalmente são avaliados sintomas visíveis que podem ser mensuráveis, por exemplo, a imobilidade que antecede a letalidade, a imobilização ou a inibição do crescimento, entre outros, possibilitando a estimativa da dose ou concentração do elemento que é capaz de causar tais sintomas (DUFFUS, 1993; MAGALHÃES; FERRÃO, 2008), essas estimativas podem ser de Concentração Efetiva e/ou Concentração Letal, tais concentrações são definidas em relação a 50% dos organismos testados, os resultados apresentam uma maior reprodutibilidade nas respostas, um maior grau de confiança na sua estimativa e as extrapolações para uma população são mais expressivas. O parâmetro DL 50, é definido como a quantidade de substância tóxica que entra no organismo, sendo calculado em relação ao peso do organismo (mg de substância química por massa do organismo em kg) e expresso em mg Kg, utilizado nas áreas de farmacocinética e medicina (ABNT, 2009).

Em contrapartida, os testes de toxicidade crônica são realizados durante toda ou grande parte da vida do organismo testado. Se um elemento possivelmente tóxico não acarreta nenhum sintoma ou alteração no teste de toxicidade aguda, isso não implica que esses elementos não produzam efeitos tóxicos. Os efeitos de toxicidade crônica ocasionados por concentrações subletais desses elementos são constatados através de uma exposição de longo prazo, isto é, uma concentração que não cause a morte, mas prejudica as atividades biológicas, por exemplo, fecundação, anomalias, danos ao desenvolvimento, entre outros (BURATINI; BERTOLETTI, 2008; DUFFUS, 1993). Os resultados obtidos são expressos por CENO (alta concentração do elemento tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos) ou CEO (pequena concentração do elemento tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos), podendo também ser expresso por CE₅₀ (concentração que causa efeito agudo em 50 % dos organismos). Os parâmetros de CL₅₀, CE₅₀, CENO e CEO (tabela 1) são expressos em relação a função do ambiente em que os organismos são expostos (mg de substância por litro de solução preparada em água natural ou sintética apropriada (água de diluição)), sendo expressa em mg L⁻¹, sendo utilizado principalmente na ecotoxicologia aquática (ABNT, 2010).

Tabela 1. Glossário das concentrações avaliadas na ecotoxicologia aquática.

Nomenclatura	Abreviação	Descrição	Tempo de exposição
Concentração Efetiva Média	CE 50%	Concentração que causa efeito agudo (imobilidade e etc.) em 50 % dos organismos	24 ou 48 h
Concentração Letal Média	CL 50 %	Concentração que causa mortalidade em 50 % dos organismos	24 a 96 h
Dose Letal Média	DL 50%	Dose que causa mortalidade em 50 % dos organismos.	24 a 96 h
Concentração de Efeito não observado	CENO	Alta concentração do elemento tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos	7 dias
Concentração de Efeito Observado	CEO	Pequena concentração do elemento tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos	7 dias

Devido aos organismos apresentarem sensibilidades distintas aos diversos tipos de elementos possivelmente tóxicos é necessário utilizar organismos de diferentes níveis tróficos para a avaliação. Por ser difícil fazer extrapolações dos resultados para espécies diferentes, é necessário, sempre que possível, utilizar mais de uma espécie, o que possibilitará a estimativa mais precisa do impacto do contaminante, levando em consideração o organismo mais sensível. Em contrapartida, por economia e praticidade, diversas vezes, é utilizado apenas uma espécie para o teste (COSTA et al., 2008; HASSAN et al., 2016).

As características desejáveis em um organismo para serem usados nos testes de toxicidade é que eles apresentem seleção contínua aos agentes tóxicos; estar disponível e abundante no ambiente; as populações uniformes e estáveis geneticamente; representar com efetividade e qualidade seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial; fácil cultivo; adaptação às circunstâncias de laboratoriais; limites de tolerância estreito (sensíveis a pequenas mudanças ambientais); fácil

amostragem e fisiologia, genética e comportamento bem conhecidos, facilitando a análise dos resultados (COSTA et al., 2008).

Os testes são classificados de acordo com método de adoção das soluções-testes, podendo ser: **(1)** Os estáticos, que são realizados sem renovação das soluções-testes e são recomendados para amostras que não causam depleção de oxigênio, que não são voláteis e que são estáveis em meio aquoso. **(2)** Os semi-estáticos, nos quais as soluções-testes são renovadas periodicamente. Devido as substâncias serem instáveis ou voláteis, apresentando suas concentrações reduzidas ao longo do teste. **(3)** E o modo dinâmico, as soluções-testes são continuamente renovadas, sendo mais utilizado em testes de toxicidade crônica de longa duração (ABNT, 1993a, 1993b, 1993c; CETESB, 1990).

Diversos organismos podem ser utilizados nos ensaios cada um com sua particularidade e finalidade, facilitando assim a escolha.

2.1.1. Organismos utilizados como bioindicadores aquáticos

2.1.1.1. Algas

As algas são representantes dos níveis tróficos inferiores, servindo de fonte de alimento essencial para outras espécies aquáticas, podem ser uni ou pluricelulares, sendo facilmente encontradas em ambientes de água doce, nos mares, solos úmidos ou até sobre a neve, desde que esses ambientes ofertem a mínimo de luz e umidade necessária para o seu desenvolvimento, em condições temporárias ou permanentes. Os fatores ambientais (bióticos ou abióticos) regem as comunidades de algas, podendo ser afetados por contaminantes direta ou indiretamente, acarretando em mudanças na estruturação e funcionamento da comunidade (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Sendo as mais utilizadas em testes ecotoxicológicos, a *Chorella vulgaris*, a *Selenastrum capricornutum*, a *Scenedesmus subspicatus*, a *Skeletonema costatum* (ISO, 1987).

2.1.1.2. Bactéria luminescente

O uso de bactérias luminescentes como bioindicadoras de toxicidade, baseia-se na resposta de luminescência, que se dá por meio de uma reação de catalisação enzimática. Caso uma das etapas (O_2 , aldeído, flavina redutase, luciferase e NADPH) dessas equações seja alterada pelo agente tóxico, acarretará um desequilíbrio na equação, que refletirá na inibição da

luminescência, sendo assim calculado a taxa de inibição (YANG et al., 2016). As principais bactérias utilizadas em testes ecotoxicológicos são a *Vibrio fischeri* (HSIEH et al., 2004) e a *Photobacterium phosphoreum* (FULLADOSA; MURAT; VILLAESCUSA, 2005; VILLAESCUSA et al., 1997).

2.1.1.3. Invertebrados como os microcrustáceos

Os microcrustáceos de água doce conhecidos como pulgas d'água são encontrados em lagos e represas, pertencem a ordem Cladocera, gênero *Daphnia*, integrando o zooplankton, sendo consumidores primários e secundários, os quais são responsáveis pela conexão entre níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar. A avaliação de toxicidade de novas formulações químicas é por meio das espécies de *Daphnia similis* e/ou *Daphnia magna* (RUBINGER, 2009), enquanto que para avaliar a toxicidade crônica de amostras ambientais de água e efluentes líquidos é utilizado a espécie *Ceriodaphnia sp.* (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008). Devido à resistência dos ovos a longos períodos de secagem e estocagem, o microcrustáceo *Artemia salina* também é utilizado em testes de toxicidade (MATTHEWS, 1995). Em consequência do tamanho reduzido dos microcrustáceos, torna-se difícil a avaliação de mortalidade, sendo possível realizar a observação da imobilidade (KNIE; LOPES, 2004).

2.1.1.4. Peixe

Os peixes são organismos consumidores, fazem parte do nível superior da cadeia alimentar e constituem a comunidade que vivem no substrato de fundo de ecossistemas aquáticos. O parâmetro avaliado é a mortalidade dos peixes. Podemos destacar para os testes de toxicidade a curto prazo as espécies *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Pimephales promelas*, *Orizias latipes*; os teste de toxicidade aguda, as espécies *Brachydanio rerio*, *Pimephales promelas*, *Orizias latipes*, *Poecilia reticulata*, *Lepomis macrochirus* (ISO7346-1:1996; ISO7346-2:1996; ISO 7346-3: 1996(en)) e para os testes de toxicidade prolongada (14 dias) a espécie *Oncorhynchus mykiss*, (ISO10229:1994).

Contudo, é difícil fazer extrapolações para células humanas dos resultados obtidos por meio dos organismos mencionados acima. Por diversos motivos, a levedura *S. cerevisiae* destaca-se por apresentar características desejáveis em um organismo teste de toxicidade.

2.1.1.5. Leveduras

As leveduras *S. cerevisiae* são as mais estudadas morfofisiologicamente e geneticamente. Devido a sua importância para a humanidade, hieróglifos de mais de 5.000 anos, relatam que civilizações egípcias usavam leveduras e o processo fermentativo para fabricação de bebidas alcoólicas e pão. Desde a sua descoberta, o pão sempre esteve ligado à vida do homem tanto como alimento quanto como símbolo econômico, político, religioso, artístico e cultural (REINHARDT, 2002; SANTOS, 2005). Remetendo à célula, são classificadas como eucarióticas unicelulares, fungos pertencentes à classe dos ascomicetos, os quais fazem parte do filo Ascomycota, pois apresenta fungos que a produção de esporos ocorre em esporângios específicos (denominados de ascos), não apresentam a formação de filamentos, são imóveis, quimio-heterotróficos e aeróbios facultativos (metabolismos oxidativo e fermentativo), se reproduzem assexuada e/ou sexuadamente. Podem ser encontradas nos mais diversos locais, em solos, no ar, em plantas, em frutos e em diversos alimentos (TORTORA; FUNKE; CASE., 2010). As leveduras podem apresentar morfologia diferente e tamanhos distintos, respectivamente, a qual pode variar de acordo com o nutriente, as condições ambientais, o estado fisiológico, reprodução vegetativa, condições de cultivo ou a idade da cultura, variando de 1 a 5 μm de diâmetro e de 5 a 30 μm de comprimento (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Por ter a capacidade de sobreviver aos mais diversos ambientes, a levedura desenvolveu, durante a sua evolução, mecanismos de detoxificação contra fatores que prejudicam a sobrevivência, o crescimento e a sua reprodução.

2.1.1.6. Mecanismos de detoxificação

Na presença de elementos possivelmente tóxicos, as leveduras e quase todos os organismos vivos dispõem de mecanismos de detoxificação, que ocorre por meio de processos proteicos e enzimáticos.

Metalotioneínas é uma classe de proteínas muito presente em organismos (5 a 6% de cádmio e 2% de zinco), são ricas em resíduos do aminoácido cisteína (30%), sustentada por um alto teor de enxofre nesta proteína (8,5%). As metalotioneínas tem papel importante na desintoxicação de metais pesados, na homeostase de metais essenciais, na remoção de radicais livres, na estocagem, transporte e armazenamento do zinco, metabolismo de metais essenciais e a proteção contra radicais livres (ARIAS; SANTOS, 2008; KAGI; VALLEE B. L., 1961; LIU; THIELE, 1997; MARGOSHES; VALIEE, 1957).

As glutationas (GSH) são tripeptídeos lineares, sendo compostas por três aminoácidos (ácido glutâmico, L-cisteína e glicina). A cisteína contém grupos químicos de enxofre, funcionando como um aglutinante eficaz na captura de metais pesados, radicais livres e outras toxinas, com o objetivo de eliminá-los da célula, por desempenhar essa função de antioxidante torna-se proteção para a célula, também estando envolvidas em sistemas enzimáticos e não enzimáticos de defesa, atuando na proteção de diversos componentes celulares, como as membranas, o DNA, as proteínas e outras biomoléculas, contra perdas de oxidação geradas por espécies reativas do oxigênio (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008; KUMAR et al., 2011; LU, 2013; NOCTOR et al., 1998).

Em virtude de as leveduras apresentarem mecanismos de detoxificação contra diversos fatores, possibilita a utilização de reagentes que são reduzidos pelas células para observações de toxicidade.

2.1.1.7. Uso do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) na avaliação de toxicidade

Quando as leveduras acionam as metalotioneínas e as GSHs para a detoxificação do meio em que se encontram, possivelmente ocorre a diminuição do metabolismo (redução no processo respiratório e/ou fermentativo) tendo por consequência, a diminuição na produção das desidrogenases, que usam cofatores como NADH e FADH₂, os quais estão localizados também na cadeia transportadora de elétrons do complexo I, localizado na mitocôndria, figura 1 (POLICARPO, 2008).

Figura 1. (“Cadeia respiratória ocorrendo na membrana interna da mitocôndria”, [s.d.]). Fonte: <https://blogdoenem.com.br/biologia-enem-respiracao-celular-cadeia-respiratoria/>. Acessado: 26 de setembro de 2017.

O processo de desidrogenação é responsável pela transformação biológica em células vivas do reagente incolor TTC (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) em Formazan (1,3,5-trifenil formazan de tetrazólio), o qual após reduzido apresenta coloração variando do vermelho intenso até um rosa suave. Os sais de tetrazólio são substâncias orgânicas incolores na forma oxidada, que apresentam coloração na forma reduzida (FREDERIKS et al., 2006; KALINA; PALMER, 1968). Os sais de ditetrazólios (neotetrazólio, azul de tetrazólio e azul de nitrotetrazólio) são mais tóxicos para os micro-organismos que os monotetrazólios (trifeniltetrazólio e iodonitrotetrazólio)(MAY et al., 1960). Esses sais, por apresentarem a capacidade de serem reduzidos na presença de desidrogenases e alterar a cor, são utilizados nas mais diversas áreas do conhecimento, como na aplicação biológica, na viabilidade e germinação de sementes, como recursos histológico, na identificação e diferenciação de micro-organismos (fungos e bactérias), em pesquisas imunológicas, na presença de antibióticos, dentre outras aplicações (CREANGA; NADEJDE, 2014; FREDERIKS et al., 2006).

O mecanismo de ação dos sais de tetrazólio, é por meio da redução do sal para o seu respectivo formazano, através da absorção gradual de elétrons individuais. Primeiramente o elétron é retido em um anel de tetrazólio gerando um radical intermediário instável de tetrazolinilo, o qual não possui carga. Ocorre a absorção de um segundo elétron no anel quando

o formazano é formado por redução adicional, como também, dois radicais tetrazolinilo podem ser estabilizados pela troca de um elétron, formando assim um cátion de tetrazólio e uma molécula de formazano (SEIDLER, 1982). Bem como, uma cadeia lateral do anel é separada como cátion ligando-se a água ou ao álcool para gerar um fenol substituído, com formação simultânea de uma molécula neutra de tetrazole, o terceiro princípio de reação de estabilização de radicais de tetrazolinilo (NEUGEBAUER, 1973). O potencial redox do TTC é de aproximadamente -0,08V, característica que possibilita ao corante atuar comoceptor de elétrons na presença de muitas pírídino nucleotídeo desidrogenases, apresentando o maior poder de redução na fase exponencial de crescimento do micro-organismo, devido a velocidade de metabolização. Podendo assim ser reduzido pela luz (redução fotoquímica), principalmente pela radiação ultravioleta, resulta o trifenilformazano e uma substância oxidada incolor, denominada foto.TTC. Esta reação é dependente de pH, ocorrendo mais intensamente em pH alcalino. Nos organismos vivos, a redução do corante ocorre por sistemas enzimáticos (desidrogenases), mesmo em pH próximo de 7,0, a solução incolor de TTC reduzida a formazano, composto com coloração vermelha. A hipótese da ação dos compostos redutores foi descartada, pois os açúcares reduzem o corante em pH acima de 11 e outros compostos redutores como cisteína, glutatona e ácido ascórbico, em pH acima de 9. Nos organismos vivos, a redução do corante ocorre por sistemas enzimáticos (desidrogenases), mesmo em pH próximo de 7,0, a solução incolor de TTC reduzida a formazano (coloração vermelha) (MAY et al., 1960).

Alguns autores demonstraram que o formazano, produzido por bactérias e leveduras, localiza-se em grânulos vermelhos intracelulares e que a redução é mais vigorosa em células jovens pois está relacionado com o número de células viáveis e metabolicamente mais ativas (WEIBULL, 1952). Contudo, a espécie *Candida albicans* não tem a capacidade de reduzir o TTC (PAGANO; LEVIN; TREJO, 1957), enquanto que leveduras ascoporadas e anascosporadas apresentam a capacidade de reduzir o TTC, formando colônias coloridas (RIOUX; BASTIDE; GALZY, 1960).

Todos esses estudos comprovam a possibilidade de utilizar levedura juntamente com o TTC, como um parâmetro para a medição de toxicidade de diversos elementos que inibam a atividade das desidrogenases, sendo necessária a extração do TTF intracelular para a sua quantificação em espectrofotômetro a 483 nm.

2.1.1.8. Extrator do TTF intracelular

Visto a propriedade penetrante na membrana, o poder de ligação ao TTF reduzido e sendo realizada posteriormente a centrifugação, o Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para a extração. O químico Alexandre Saytzeff no século XIX sintetizou pela primeira vez o DMSO (BRAYTON, 1986) sendo um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO (ROSENBAUM; HERSCHLER; JACOB, 1965), peso molecular 78,13 (SCHWARTZ et al., 1994). Apresenta ponto de congelamento e fervura, respectivamente, de 18,5°C e 189,0°C e sua elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66-67% se for deixado exposto ao ar ambiente (BRAYTON, 1986). Por apresentar uma notória capacidade de solvente e reagir em reações de química orgânica, devido a sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (SOJKA et al., 1990), vem sendo utilizado nas mais diversas áreas, como na indústria de plásticos desde o início da década de 40 e posteriormente, em inseticidas, fungicidas, herbicidas, bem como em várias aplicações industriais e a partir de 1960 foi introduzido na medicina e na farmacologia. Por ser um subproduto da indústria de extração de celulose ou a partir da indústria do carvão e do petróleo, como ocorre na Europa (MADRUGA et al., 2017).

Em virtude dos fatos mencionados, a levedura (*S. cerevisiae*) têm sido considerada uma excelente alternativa como bioindicador por ser um organismo de fácil cultivo e manutenção e apresentar uma rápida resposta a alterações na presença de contaminantes, outra característica importante é a sua utilização como modelo para estudos genéticos devido ao grande conhecimento de seu genoma, e ao grande número de ferramentas associadas a manipulação de fungos unicelulares. O alto grau de homologia com organismos celulares superiores, permite o estudo de aspectos de toxicidade celular relevantes a biologia humana ao nível molecular, facilitando assim as extrapolações. Devido ao teste ser prático, rápido, eficiente e de baixo custo, possibilita que comunidades carentes possam realiza-lo de forma segura, para verificar a qualidade da água a ser consumida, exemplo, caso a água testada apresente a coloração vermelha após os procedimentos do teste, comprova-se que está apta ao consumo, contudo, se a água apresentar uma coloração variando entre o rosa até incolor, mostra que esta água não deva ser consumida e que alguma substância ali presente está causando a inibição da atividade das desidrogenases.

3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver bioensaio de toxicidade prático, rápido, eficiente e de baixo custo utilizando a levedura *S. cerevisiae* como bioindicadora.

3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Investigar se diferentes fermentos liofilizados de panificação apresentam distinção entre si na presença e ausência de Cd em relação a atividade das desidrogenases.
- 3.1.2. Averiguar se as leveduras apresentam capacidade de recuperação metabólica após a exposição a substâncias possivelmente tóxicas.
- 3.1.3. Comparar o comportamento enzimático de leveduras frescas e liofilizadas.
- 3.1.4. Verificar se existe uma relação entre concentrações de substâncias possivelmente tóxicas e o tempo necessário para recuperação metabólica das leveduras.
- 3.1.5. Investigar se íons livres de metais apresentam ação inibitória na atividade das desidrogenases da levedura.
- 3.1.6. Averiguar se elementos complexados podem causar toxicidade na atividade das desidrogenases.
- 3.1.7. Avaliar se solventes orgânicos causam toxicidade para levedura.
- 3.1.8. Teste comparativo: avaliar germinação de semente de pepino (*Cucumis sativus*) quando expostas as diferentes soluções de elementos possivelmente tóxicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais (Departamento de Ciências Exatas) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, na cidade de Piracicaba -SP.

4.2. Avaliação de diferentes fermentos liofilizados de panificação quanto a atividade das desidrogenases

Inicialmente foi realizado a reidratação de 600 mg de células dos fermentos A, B e C, em 30 mL de glicose 2% sob agitação de 800 rpm por 10 minutos cada, posteriormente foram realizadas 8 amostragens a cada 15 minutos, a partir daí o tempo de amostragem passou a ser de 1 em 1 hora, realizadas mais 5 coletas nesse período. Para cada coleta de 2 mL das leveduras foi adicionado um volume de 2 mL de solução de TTC (0,5 % de TTC em 2% de glicose) e incubados a 30°C por 15 minutos. Centrifugados por 1 minuto a 4000rpm e descartado os sobrenadantes. Ao precipitado de células foi adicionado 2mL de DMSO. Incubados a 30°C por 15 minutos em modo estático. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 4000rpm e os sobrenadantes foram lidos em Leitor de placa de ELISA Sunrise RC (Basic) TECAN, com o comprimento de onda de 483 nm.

4.3. Avaliação da atividade das desidrogenases dos fermentos na presença de solução de Cd

A princípio foi realizado a reidratação de 200 mg de células dos fermentos A, B e C, em 10 mL de glicose 2% sob agitação de 800 rpm por 10 minutos cada. Transferido 1 mL da suspensão celular para tubos de ensaio e centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm. Descartado os sobrenadantes. Foram numerados 9 tubos de ensaio e distribuído 2 mL de glicose 2% em cada um. Adicionado no primeiro tubo 2mL da solução de Cd na concentração de 60 mg L⁻¹ + 2 mL de solução nutritiva (glicose 2%), resultando em um volume final de 4 mL. Transferido 2 mL do primeiro para o segundo tubo e agitado. Repetido este procedimento até o tubo número 8. Após homogeneizado o oitavo tubo, descartado 2 mL excedente. O tubo 9 foi o controle que continha apenas glicose 2%. O conteúdo total dos tubos da diluição com o agente tóxico foi transferido para os tubos que continha as massas de leveduras hidratadas, uma leve

homogeneização nos tubos, os quais foram incubados a 30° C por 2 horas em modo estático. Após as 2 h de incubação, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm e descartado os sobrenadantes. Adicionado 2 mL de solução de TTC (0,5 % de TTC em 2% de glicose) e incubados a 30° C por 15 minutos. Centrifugados por 1 minuto a 4000rpm e descartado os sobrenadantes. Adicionado 2mL de DMSO. Incubados a 30° C por 15 minutos em modo estático. Centrifugados por 1 minuto a 4000rpm e os sobrenadantes foram lidos em leitor de placa de ELISA Sunrise RC (Basic) TECAN, com o comprimento de onda de 483 nm.

4.4. Capacidade de recuperação metabólica de levedura liofilizada de panificação e levedura fresca PE-2 após a exposição a Cd

Primeiramente foi realizado a reidratação de 600 mg de células leveduras de panificação liofilizadas em 30 mL de glicose 2% sob agitação de 800 rpm por 10 minutos. Após os 10 min de reidratação, a primeira amostra foi coletada, seguida de mais 20 amostragens feitas a cada 20 minutos, durante 380 minutos. A solução de cádmio (concentração final 4 mg L⁻¹Cd) foi adicionada 60 minutos após a reidratação. Após a coleta as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 4000rpm. Seguido a centrifugação e descarte do sobrenadante 2 mL de solução de TTC (0,5 % de TTC e 2% de glicose) foram adicionados aos tubos. As amostras foram incubadas a 30 ° C por 15 minutos em B.O.D em modo estático. Após os 15 min, foram centrifugadas por 1 minuto a 4000rpm e descartado o sobrenadante. Adicionado 2 mL de DMSO em cada amostra e incubadas a 30°C por 5 minutos. Posteriormente a adição do DMSO, pôde-se esperar o tempo necessário para finalização das análises, visto que, ele serve como um extrator do TTF formado no interior das células sem danifica-las. Os sobrenadantes foram lidos em leitor de placa de ELISA com o comprimento de onda 483 nm.

Já a levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi inoculada em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura YEPD (dextrose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 1%, meio líquido) e acondicionadas em B.O.D. a 30°C, em modo estático para o crescimento celular. Após as 24 h, alíquotas de 1 mL de solução contendo leveduras, foram transferidas para nove frascos contendo YEPD adicionadas diferentes concentrações de Cd, entre 0 a 12 mg L⁻¹, tais soluções de cádmio foram preparadas a partir de uma solução padrão Cd (1000 mg ± 3 µg/mL em 2% de HNO₃ - High-Purity Standards® - SpecSol). Foram realizadas coletas a cada 2 horas, totalizando 13 amostragens e lidas em Leitor de placa de ELISA Sunrise RC (Basic) TECAN a 600 nm.

4.5. Avaliação da atividade das desidrogenases de levedura liofilizada de panificação exposta a diferentes metais

Na tabela 2 estão expostos todas as soluções metálicas utilizadas neste trabalho, tanto com leveduras como na germinação de semente de pepino, foram a partir de padrões (1000 mg $\pm$ 3 μ g/mL em 2% de HNO₃) (High-Purity Standards® - SpecSol), sendo relacionadas as diluições para as concentrações desejadas:

Tabela 2. Soluções metálicas e suas respectivas concentrações utilizadas em todos os experimentos.

Metais	Concentrações testadas (mg L ⁻¹)	Forma química
Al	200	Al ³⁺
As	10	As ^{III}
Ba	7	Ba ²⁺
Cd	50	Cd ²⁺
Cr	50	Cr ³⁺
Pb	10	Pb ²⁺
Zn	50	Zn ²⁺

Inicialmente foi realizado a reidratação de 200 mg de fermento em 10 mL de glicose 2% sob agitação de 800 rpm por 10 minutos. Transferido 1 mL da suspensão celular para tubos de ensaio e centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm. Descartado os sobrenadantes. Foram numerados 9 tubos de ensaio e distribuído 2 mL de glicose 2% em cada um. Adicionado no primeiro tubo 2mL da solução “tóxica” na sua respectiva concentração a ser testada. + 2 mL de solução nutritiva (glicose 2%), resultando em um volume final de 4 mL. Foram transferidos 2 mL do primeiro para o segundo tubo e agitado. Repetindo este procedimento até o oitavo tubo e após homogeneização, foi descartado 2 mL do excedente. O tubo 9 foi o controle que continha apenas glicose 2%. O conteúdo total dos tubos da diluição com o agente possivelmente tóxico foi transferido para os tubos que continham as massas de leveduras hidratadas, realizando uma leve homogeneização nos tubos, os quais permaneceram incubados a 30°C por 2 horas em modo estático. Após as 2 h de incubação, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm e descartado os sobrenadantes. Adicionado 2 mL de solução de TTC (0,5 % de TTC em 2% de glicose) e incubados a 30°C por 15 minutos. Centrifugados por 1 minuto a 4000rpm e descartado os sobrenadantes. Adicionado 2mL de DMSO. Incubados a 30°C por 15 minutos em modo estático. Centrifugados por 1 minuto a 4000rpm e os sobrenadantes foram lidos em Leitor de placa de ELISA Sunrise RC (Basic) TECAN , com o comprimento de onda 483 nm.

4.5.1. Análise de taxas de inibição e CE50%

A atividade biológica do TTC foi avaliada após 2 horas de incubação considerando-se como critérios de resposta a concentração dos metais e a conversão de TTC em TTF. A porcentagem de inibição da atividade das desidrogenases é determinada em relação ao controle (100% de atividade das desidrogenases) com base nas absorbâncias medidas na equação 1. Triplicatas foram realizadas em cada concentração tóxica.

$$Inibição (\%) = \frac{C_A - T_A}{C_A} \times 100 \quad (1)$$

(NWEKE, 2010)

Onde, C_A é a absorbância do trifetil formazan produzido no controle (sem agente tóxico), T_A a absorbância do trifetil formazan produzido no teste inibido (com diferentes concentrações de agentes tóxicos).

Os cálculos de concentração efetiva 50 % (CE_{50}) foram determinados ajustando os dados experimentais em modelos concentração-resposta logísticos não-lineares (equação 2). Todas as regressões foram feitas iterativamente usando a média de dados e desvios padrão com limite de confiança de 95%. A partir dos dados de absorbância foi estimada a CE_{50} e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) usando o procedimento Probit no software SAS®(SAS INSTITUTE INC. 2000, 2000). O modelo logístico não-linear utilizado para o cálculo de CE_{50} foi o seguinte:

$$Modelo\ resp = \frac{CIO}{\left[1 + \left(\frac{conc.}{EC50}\right)^b\right]} \quad (2)$$

(adaptado de SIMS et al., 1996)

Onde **CI0**: TTF esperado na testemunha. **b**: parâmetro de inclinação, ângulo da função logística. **EC50**: concentração efetiva de redução da taxa respiratória. **Conc.**: Concentração do elemento.

4.6. Complexação de Cd

A levedura *S. cerevisiae* PE-2 foi crescida em YEPD por 24 h sob agitação. Após as 24 horas, foram coletadas 2 mL da solução de levedura e acrescido com 30 mL de YEPD, uma solução complexante com concentração final de 16 mM de EDTA- Na_2 (ácido etilenodiaminatetracético, sal dissódico) em pH 9 + uma solução de 8mg L^{-1} do metal. Em

outros 2 mL, adicionado 30 mL de YEPD + 8mg L⁻¹ de cádmio. Como controle, 2 mL da solução de levedura + 30 mL de YEPD.

4.7. Avaliação da taxa de inibição da atividade das desidrogenases com solventes

Os solventes testados foram Isopropanol, Álcool isopropílico, Álcool metílico, Ácido acético, Álcool butílico, Peróxido de hidrogênio, Clorofórmio, Acetato de etila, Cloreto de metila, Benzeno, Hexano e Acetona. As porcentagens dos solventes utilizados nas soluções testadas nos ensaios estão expressas na figura 2.

Figura 2. Relação de concentração dos solventes utilizados nos testes.

4.8. Teste comparativo: ensaio de germinação de semente de pepino (*Cucumis sativus*) quando expostas as diferentes soluções de elementos possivelmente tóxicos

Foram utilizadas 30 sementes de pepino caipira (Topseed Garden, lote: 023488) para germinação em placas de Petri com papel filtro Whattman, umedecido com 8 mL de solução do agente toxico com suas respectivas diluições seriais. Como controle, uma das placas recebeu apenas 8 mL de água destilada. Em seguida as placas foram incubadas em B.O.D a 25°C por 4 dias. Avaliadas após 96 horas de incubação, foi medido o peso úmido das sementes germinadas. Os bioensaios de germinação de sementes foram de acordo com (TAVARES, 2013), que seguiu as recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de diferentes fermentos de panificação quanto a atividade de desidrogenases

A atividade das desidrogenases foi avaliada pela redução do TTC em TTF essa metodologia descrita anteriormente foi utilizada para medir a atividade das desidrogenases em três diferentes fermentos biológicos comerciais, fermentos A, B e C, possibilitando a constatação de que independente da marca utilizada, a taxa de conversão de TTC em TTF apresenta a mesma intensidade para ambos (figura 3), todavia, é de extrema importância o uso do reagente TTC de ótima qualidade, que o mesmo apresente a coloração branca e que a reação de oxirredução aconteça em torno de 20 minutos, no máximo. Com este ensaio foi possível observar que, a fase latência (lag) se dá durante os 60 minutos iniciais, período que ocorre pouca ou ausência de divisão celular. Encontra-se em estado de repouso ou adaptando-se ao meio de glicose 2%, posteriormente, inicia-se a fase exponencial (log), onde as células iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento. Nesse período a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e com maior atividade metabólica, ocorrendo a maior oxirredução de TTC em TTF, em decorrência do aumento da produção das desidrogenases, as quais são responsáveis pelo processo de conversão. A fase estacionária inicia após as 2 horas de teste, em determinado momento a redução do TTC em TTF diminui, correspondendo ao declínio da atividade das desidrogenases, possivelmente em consequência da diminuição da concentração de glicose.

Figura 3. Avaliação de diferentes fermentos de panificação quanto a atividade de desidrogenases pela conversão de TTC em TTF.

5.2. Avaliação da atividade das desidrogenases dos fermentos A, B e C na presença de Cd

Após testarmos a atividade das desidrogenases dos fermentos biológicos, realizamos um segundo teste onde a taxa da atividade das desidrogenases dos fermentos A, B e C foi medida na presença de diferentes concentrações de Cd. Com esse teste constatamos que os fermentos são sensíveis para detectar diferenças entre as doses de cádmio, mas, não apresentam diferenças significativas dentro da mesma dose. Esses resultados podem ser observados na figura 4 e na tabela 3 podemos constatar a normalidade entre os fermentos.

Na figura 4 também podemos observar que em doses muito altas como 60 e 30mg L⁻¹, quanto a inibição da atividade das desidrogenases as diferenças se tornam praticamente, indetectáveis, na dose 60mg L⁻¹ temos para A=95,58, B=95,63 e C=98,05 por cento de taxa de inibição e para a dose 30mg L⁻¹, temos A=93,93, B=93,83 e C=94,05 por cento de taxa de inibição, mas para doses menores, como 15, 7,5, 3,75, 1,88, 0,94, 0,47 os valores são significativos.

Diversos trabalhos relatam os efeitos de cádmio nas células de leveduras. Brennan; Schiestl, 1996 comprovam que o cádmio não é essencial para a função biológica e é um forte inibidor do metabolismo microbiano mesmo em baixa concentração e Cd²⁺ desloca Ca²⁺ e Zn²⁺ em proteínas e causa estresse oxidativo. Os efeitos tóxicos incluem o bloqueio de grupos funcionais, deslocamento e substituição de íons metálicos essenciais ao metabolismo, causando a inativação de enzimas e desarranjo das membranas celulares (MOWLL; GADD, 1983).

Figura 4. Taxa de inibição da atividade das desidrogenases dos três fermentos em diferentes concentrações de Cd.

Na figura 5, temos uma representação ilustrativa da redução do TTC pelas desidrogenases de *S. cerevisiae* e sua conversão em TTF diante de diferentes doses de cádmio. A levedura foi exposta a diferentes concentrações de Cd em glicose 2%, as doses do metal variaram entre 50 mg L⁻¹ no primeiro tubo até a concentração de 0,3906 mg L⁻¹ no último tubo, o nono tubo continha apenas glicose 2% sem a adição do Cd (controle). Este ensaio mostra a correlação direta entre a intensidade de cor do formazan e a redução nas concentrações de Cd, possibilitando assim, a quantificação da toxicidade em leveduras, em referência à inibição da atividade das desidrogenases no processo respiratório.

Figura 5. Diluição serial de uma amostra “tóxica” em contato com leveduras. Visível a conversão do TTC em TTF por meio da ação das desidrogenases produzidas no processo respiratório.

Não houve diferença significativa entre os fermentos em relação a inibição da atividade das desidrogenases exposto na tabela 3.

Tabela 3. Teste T segundo o tratamento e comparações.

Fermentos	Médias	Comparações
A	59,01	a
B	64,80	a
C	58.53	a

5.3. Capacidade de recuperação metabólica de levedura liofilizada e levedura PE-2 fresca após a exposição ao Cd

Nas condições estudadas para levedura liofilizada de panificação, a captura do metal está associada ao processo respiratório e/ou fermentativo, o qual foi possivelmente pausado momentaneamente até que todo o metal fosse acumulado pela célula. Sendo constatado pela diminuição brusca da atividade das desidrogenases e consequentemente seus cofatores e demonstrando também o estudo, a capacidade de recuperação metabólica das leveduras desde que haja nutrientes essenciais no meio. Na figura 6, é observado que nos 20 minutos iniciais ocorre a reidratação e recuperação da atividade metabólica das células de leveduras liofilizadas, indicado pelo aumento da produção de desidrogenases. Após 60 minutos a levedura que está em fase exponencial é acrescida de 4 mg L⁻¹ de Cd e em seguida observamos o decaimento da

atividade metabólica acompanhada pela redução da atividade das desidrogenases medida pela baixa conversão de TTC em TTF.

Quando o cádmio é adicionado ao meio ocorre uma brusca queda da produção de desidrogenases devido a redução do metabolismo, causada pelo agente tóxico. Nesse momento a levedura recorre aos mecanismos de detoxificação através das GSHs, para bioacumular total ou parcialmente o cádmio ali presente. Após essa bioacumulação, a levedura reativa o seu metabolismo novamente, voltando a reduzir o TTC em TTF. Nesse caso a recuperação do metabolismo se dá a partir de 200 min, como o YTOX trabalha com 120 min de contato ele é capaz de medir os efeitos do cádmio sobre a levedura antes da retomada do crescimento mesmo em baixas concentrações do metal. Ainda na figura 6 notamos que após 260 minutos inicia-se a fase estacionária, possivelmente ocasionada pela escassez de glicose no meio.

Figura 6. Curva de recuperação metabólica de levedura liofilizada de panificação após a exposição ao Cd.

Metais como K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Co e Ni, são essenciais para várias funções metabólicas, contudo, diversos metais não desempenham funções essenciais aparentemente, sendo o caso de Al, Cd, Ag, Au, Hg e Pb. Entretanto, as células podem interagir e bioacumular por mecanismos físico-químicos e por meio de sistemas de transporte de especificidade de modo variado os metais mencionados (GADD, 2010). Diversos trabalhos relatam a capacidade de leveduras bioacumular diversos elementos, como Pb e Cr (ÖZER; ÖZER, 2003), Zn (BAKKALOGLU et al., 1998), Cd (GÖKSUNGUR; ÜREN; GÜVENÇ, 2005), As (NGUYÊN-NHU; KNOOPS, 2002), Al (SCHOTT; GARDNER, 1997). Este ensaio demonstra a capacidade das leveduras de absorver e voltar à normalidade em relação ao metabolismo.

Já nas condições estudadas para levedura PE-2 fresca, a concentração do metal e o tempo de recuperação metabólica das leveduras são proporcionais. Sendo demonstrado na figura 7, que quanto maior a concentração de metal no meio, mais tempo a levedura leva para voltar ao seu estado metabólico normal. Na concentração de 12 mg L^{-1} de cádmio a levedura PE-2 levou em torno de 16 h para voltar ao seu estado metabólico normal, visto que na concentração de 0 mg L^{-1} a levedura levou aproximadamente 2 horas. Este ensaio foi realizado com leveduras frescas para comprovar que não existe diferença entre células liofilizadas ou frescas, pois as mesmas apresentam o mesmo comportamento de atividade das desidrogenases. Na figura 7 podemos observar que sem a adição de Cd, a atividade metabólica da levedura PE-2 é normal desde o início, sendo que as demais concentrações apresentaram atividade metabólica reduzida desde o início, sendo assim, necessário um certo tempo para que as leveduras recorram aos seus mecanismos de detoxificação e retornarem ao estado normal de metabolismo.

Figura 7. Crescimento de levedura fresca PE-2 em diferentes concentrações de cádmio, resposta e horas.

5.4. Avaliação da taxa de inibição da atividade das desidrogenases de levedura liofilizada após a exposição a diferentes elementos possivelmente tóxicos

A levedura liofilizada de panificação apresentou diferentes graus de sensibilidade para cada elemento, devido os mesmos apresentarem modos de ação distintos na célula. Na presença de íons livres de metais pesados e semimetais ocorre nitidamente redução da atividade das desidrogenases interferindo na conversão do TTC em TTF. O intuito desses experimentos foi

comprovar a toxicidade de alguns metais e semimetal sobre a levedura, por ser um organismo modelo devido a apresentar semelhanças com as células de mamíferos nos níveis de macromolécula e organela, e várias proteínas, demonstraram ser funcionalmente intercambiáveis com os seus ortólogos humanos. Alguns metais estão envolvidos direta ou/e indiretamente em aspectos do crescimento, metabolismo e diferenciação. Na figura 8 é possível notar os efeitos dos íons metálicos de Zn, Cr, Pb, Al, Ba, As e Cd sobre a atividade das desidrogenases de levedura liofilizada de panificação.

Figura 8. Porcentagens de inibições e suas respectivas concentrações dos efeitos de íons metálicos na atividade de desidrogenases de levedura liofilizada de panificação, *S. cerevisiae*.

Portanto, é importante determinar os efeitos desses elementos na fisiologia das células de *S. cerevisiae*. No entanto, em excesso, esses metais estando além dos níveis necessários fisiologicamente, tornam-se tóxicos, prejudicando as atividades bioquímicas das células. É possível observar que na menor concentração de 0,39 mg L⁻¹ de Cd a inibição foi de 7,21 % da atividade das desidrogenases, enquanto que na maior concentração de 50 mg L⁻¹ ocorreu a inibição de 86,03% equivalendo a uma CE50 % de 5,275 (3,3423 - 7,2077), sendo a CE50% expressa em mg L⁻¹ (tabela 4). Os danos causados por cádmio já foram relatados anteriormente. Além disso, o Al na sua menor concentração de 1,56 mg L⁻¹ inibiu 26,09 % da atividade das desidrogenases, enquanto que na maior concentração de 200 mg L⁻¹ inibiu 86,34% correspondendo ao CE50% de 6,3003 (3,0227 - 9,5770). O Al é o terceiro elemento químico e o metal mais abundante da crosta terrestre, contudo, em concentrações elevadas, esse metal pode ser tóxico para as leveduras. Autores como Hamilton; Good; Taylor, (2001) comprovaram que na concentração de 15 µM AlCl₃ ocorre a inibição da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *S. cerevisiae*. O Al pode provocar também, o aumento ou ainda a inibição do crescimento, dependendo da concentração e do tempo de exposição, induz a apoptose dessas células (ZHENG et al., 2006), bem como, apresenta toxicidade na transcrição e tradução, na defesa do DNA e na toxicidade nas funções de Golgi, do mesmo modo que o estresse causado pelo Al afeta o metabolismo de energia e glicose das células RS1 (WANG et al., 2013). Além disso, o As apresentou inibição de 5,70% da atividade das desidrogenases na menor concentração de 0,08 mg L⁻¹ enquanto que na maior concentração de 10 mg L⁻¹ houve a inibição de 67,16% correspondendo a CE50% de 3,2927 (2,0240 - 4,5613). O As é um elemento químico que não tem as propriedades de metal, mas a ele se assemelha, sólido, cristalino, acinzentado e suas valências químicas dependem do pH e do potencial do meio. As toxicidades desse semimetal são variadas de acordo com as suas respectivas espécies (RODRIGUES, 2016), podendo manifestar ação inibitória sobre as enzimas que contêm grupos sulfidrilas, inibindo e bloqueando os processos celulares do indivíduo (síntese de ATP, o metabolismo energético, glicídico e lipídico) (SILVA, 2012), mau funcionamento da respiração celular, enzimas celulares e mitose (GORDON; QUASTEL, 1948), inativação de cerca de 200 enzimas, principalmente as envolvidas na produção de energia celular e as relacionadas à síntese e reparo do DNA (BORGES, 2009). Assim também o Zn na menor concentração de 0,39 mg L⁻¹ inibiu 7,92% da atividade das desidrogenases enquanto que com 50 mg L⁻¹ ocorreu a inibição de 90,08% correspondendo a CE50% de 6,9813 (5,3642 - 8,5984). Apresentando papel fundamental em diversas reações enzimáticas, o Zn pode ser um cofator estrutural e / ou catalítico para numerosas proteínas, sendo considerado elemento essencial em baixas

concentrações, como no caso das metaloproteases, carboxipeptidases são exemplos de proteínas associadas ao Zn (BLEACKLEY; MACGILLIVRAY, 2011). Contudo, esse metal em excesso pode afetar a integridade da membrana e induzir a liberação de K^+ e causar irregularidade na autofagia (processo de degradação/reciclagem celular) (MOWLL; GADD, 1983) acarreta ligação do cátion a locais inadequados em proteínas ou cofatores, prejudicando assim a respiração (GITAN et al., 2003). Com o intuito de prevenir a toxicidade e deficiência, as células armazenam o excedente no vacúolo (CYERT; PHILPOTT, 2013). Além disso, o Cr na menor concentração de $0,39 \text{ mg L}^{-1}$ inibiu 21,85% a atividade das desidrogenases enquanto que na concentração de 50 mg L^{-1} ocorreu 88,41 % de inibição correspondendo ao CE50% de 3,2770(2,0580 - 4,4961). Sendo esse metal o sétimo elemento mais abundante na Terra (CERVANTES et al., 2001). Apresenta diversos estados de oxidação no ambiente (Cr^{2+} a Cr^{6+}) (WATERS et al., 2016). Para determinar as atividades dos íons metálicos no meio ambiente, a especiação do metal é muito importante (GÜRKAN; ULUSOY; AKÇAY, 2017). Em alta concentração, porém, o Cr é reconhecido como um carcinógeno humano, produzindo 8-hidrosey-2-deoxyguanosina (8-OHdG) e quebras de cadeia de DNA (QI et al., 2000). O cromato ou as formas reduzidas apresentam toxicidade seletiva para as mitocôndrias agindo em diversos locais, consequentemente inibindo a respiração, outros efeitos são a indução de pequenas mutações, a predisposição a ligações cruzadas de DNA-DNA e as rupturas de DNA de uma única cadeia (HENDERSON, 1989), causando também graves lesões oxidativas nos constituintes celulares (POLJSK et al., 2010). Do mesmo modo o Pb na menor concentração de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ inibiu 27,76% da atividade das desidrogenases enquanto que na concentração 10 mg L^{-1} houve a inibição de 75,14% correspondendo ao CE50% de 1,3144 (0,1768 - 2,4519). O chumbo é um metal prateado brilhante, ligeiramente azulado em uma atmosfera seca, pesado e altamente toxico perturbando diversos processos fisiológicos, não desempenha nenhuma função biológica, sendo considerado um poluente prioritário pela US Environmental Protection Agency (US-EPA 2006). Esse metal provoca na levedura *S. cerevisiae*, a perda da capacidade proliferativa (CHEN; WANG, 2007; SAKAMOTO et al., 2010; SOARES; HEBBELINCK; SOARES, 2003; SUH; YUN; KIM, 1999), alteração da permeabilidade membranar (BUSSCHE; SOARES, 2011; VAN DER HEGGEN et al., 2010), inibe a atividade metabólica das leveduras, avaliada através da capacidade de processar a sonda fluorescente FUN-1 (VAN DER HEGGEN et al., 2010), impede a assimilação de cátion amônio, reduz a razão ADN/ARN (CHEN; WANG, 2007), provoca danos no DNA (YUAN; TANG, 1999), alterações morfológicas nucleares, stress oxidativo (acumulação de espécies reativas de oxigênio) o qual poderá ser o desencadeador da morte celular por apoptose (BUSSCHE; SOARES, 2011), reduz

a viabilidade (MATHEW; TIWARI; JATAWA, 2011; SOARES; HEBBELINCK; SOARES, 2003; SUH; YUN; KIM, 1999), crescimento celular, índice de DNA / RNA e prejudica a assimilação de amônio em células de levedura (CHEN; WANG, 2007). O Ba na sua menor concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ inibiu 1,87% da atividade das desidrogenases, enquanto que na concentração de 7 mg L^{-1} inibiu 64,98 % correspondendo ao CE50% de 3,8892 (2,2268 - 5,5516). Não existem na literatura trabalhos que relatem o efeito do Ba nas células de leveduras, contudo, trabalhos relatam o seu modo de ação em células humanas. Os compostos solúveis de bário (cloreto, nitrato e hidróxido) são extremamente tóxicos para humanos e animais, enquanto que os compostos insolúveis (os sulfatos) não apresentam toxicidade. Devido às suas propriedades muito similares às do cálcio (eles são da mesma família, 2A), ele tende a substituir o Ca em suas funções, de forma ineficiente, o que pode provocar sérios transtornos ao organismo. Ba absorvido causa toxicidade humana, que consiste no bloqueio dos canais celulares de fluxo passivo do potássio. Este bloqueio, adicionado da ausência de ação na bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, que permite o transporte de potássio para o meio intracelular e de sódio para o meio extracelular, leva a uma acentuada diminuição da concentração extracelular de potássio, causando hipocalemia (JACOBS et al., 2002), provavelmente seja uma explicação para a toxicidade de bário em leveduras, visto que, o bloqueio da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, a qual é responsável em manter o potencial elétrico da célula, sendo necessário para o controle de uma baixa concentração de íons de sódio e de uma elevada concentração de íons de potássio no seu interior (OU et al., 2017).

Tabela 4. Elementos e seus respectivos parâmetros de regressão logística não linear.

Elemento	Concentração (mg L ⁻¹)	⁽¹⁾ TTF0	⁽²⁾ b	⁽³⁾ EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	SS _{modelo}	ErrorSS	SS _{corrigido}	F-valor	P	R ²
Zinco	50	0,6412(0,5987 - 0,6837)	1,1891 (0,9159 - 1,4624)	6,9813 (5,3642 - 8,5984)	1,8478	0,00333	0,40771	1111,39	<0,0001	0,99183
Alumínio	200	0,6959 (0,6013 - 0,7905)	0,8098 (0,5504-1,0691)	6,3003 (3,0227 - 9,5770)	1,1922	0,00934	0,38841	255,24	<0,0001	0,97595
Cadmio	50	0,7782 (0,7011 - 0,8554)	0,9782 (0,6998-1,2565)	5,2750 (3,3423 - 7,2077)	2,3815	0,00821	0,53828	579,88	<0,0001	0,98475
Bário	7	0,8989 (0,8166 - 0,9811)	0,7660 (0,4477 - 1,0844)	3,8892 (2,2268 - 5,5516)	4,6437	0,0109	0,31126	850,67	<0,0001	0,96498
Arsênio	10	1,1537(1,0594 - 1,2481)	0,6819(0,4868 - 0,8770)	3,2927 (2,0240 - 4,5613)	6,5705	0,0116	0,32459	1135,53	<0,0001	0,97849
Cromo	50	0,6304 (0,5698 - 0,6910)	0,8432 (0,6435 - 1,0429)	3,2770(2,0580 - 4,4961)	1,287	0,00418	0,33578	615,26	<0,0001	0,98755
Chumbo	10	0,6317 (0,5377 - 0,7258)	0,4814 (0,2837 - 0,6791)	1,3144 (0,1768 - 2,4519)	1,4339	0,00912	0,18762	314,58	<0,0001	0,95139

⁽¹⁾ **TTF**: Medias da leitura da atividade das desidrogenases após a conversão de TTC em TTF em 483 nm.

⁽²⁾ **b**: parâmetro de inclinação, ângulo da função logística.

⁽³⁾ **EC50**: Concentração efetiva (mg do metal L⁻¹) que inibe 50% da atividade das desidrogenases da levedura quando expostas aos diversos elementos.

CI0: TTF esperado na testemunha.

5.5. Complexação de metais

Íons metálicos complexados apresentam baixíssima atividade inibitória sobre as desidrogenases das leveduras. Na figura 9, podemos observar que na concentração de 8 mg L⁻¹ de Cd ocorreu inibição de 87 % da atividade das desidrogenases, agora, esse metal complexado com 16 mM de EDTA-Na₂ (ácido etilenodiaminatetracético, sal dissódico) a atividade das desidrogenases é de 100%. Este ensaio, corrobora com estudos sobre complexação de metais, comprovando que metais complexados podem desempenhar ou não inibição em relação a atividade das desidrogenases. Mendes et al., (2015) comprova que agentes quelantes diminuíram com sucesso os efeitos de toxicidade de metais livres.

Figura 9. Efeitos da complexação de Cd com EDTA sobre a atividade das desidrogenases em levedura PE-2.

5.6. Avaliação da taxa de inibição da atividade das desidrogenases com solventes

Na tabela 5, podemos observar as menores concentrações de solventes com as suas respectivas taxas de inibição da atividade das desidrogenases. Tais solventes apresentam diversos efeitos maléficos a saúde humana (EMBRAPA, 2006).

Tabela 5. Inibição da atividade das desidrogenases causada por solventes e as suas respectivas concentrações.

Solvente	Porcentagem do solvente (%)	Porcentagem de inibição da atividade enzimática (%)
Ácido acético	0,4	61,1
Álcool butílico	0,4	39,4
Peroxido de hidrogênio	0,4	39
Benzeno	0,4	11
Cloreto de metila	0,8	17,6
Acetona	1,6	1,1
Clorofórmio	3,1	22,5
Acetato de etila	3,1	22,5
Hexano	6,3	10,1
Isopropanol	25	92,1
Álcool metílico	50	91,6

Já nas figuras 10 e 11, podemos observar as demais concentrações dos solventes e suas respectivas taxas inibitórias da atividade das desidrogenases.

Figura 10. Porcentagens de inibições e suas respectivas concentrações dos efeitos dos solventes na atividade de desidrogenases de *S. cerevisiae*.

Figura 11. Porcentagens de inibições e suas respectivas concentrações dos efeitos dos solventes na atividade de desidrogenases de *S. cerevisiae*.

5.7. Ensaaios de germinação de semente de pepino (*Cucumis sativus*) em soluções de metais

O teste de germinação de sementes de pepino em diferentes metais e concentrações apresentou menor ou nenhuma sensibilidade em comparação ao teste com leveduras pela inibição da atividade das desidrogenases em diferentes metais e concentrações (tabela 6), comprovando que o YTOX é mais eficiente para avaliar toxicidade, devido as leveduras serem um organismo eucarioto e apresentar todas as características desejáveis em um teste de ecotoxicidade. Nas menores concentrações dos metais o YTOX apresentou taxa de inibição enquanto que a germinação de pepino não reduziu a taxa germinativa. Na tabela 6 estão exposto os metais com suas respectivas concentrações máximas e mínimas, como também as taxas de germinações de pepino e as taxas de inibição enzimática de levedura, possibilitando a comparação de eficiência entre os testes, exemplo disso, a concentração de 200 mg L⁻¹ de Al houve uma taxa de germinação das sementes de pepino de 33,17%, sendo possível observar nas concentrações subsequentes redução da taxa germinativa, a partir da concentração de 6,3 mg L⁻¹ de Al a taxa de germinação passa a ser 100%, enquanto que na levedura na concentração de 200 mg L⁻¹ de Al ocorre uma inibição da atividade das desidrogenases de 86,35%, assim por diante.

Tabela 6. Comparação entre o teste de germinação de sementes de pepino e taxa de inibição da atividade das desidrogenases em leveduras com os seus respectivos metais e concentrações.

Metal	Concentração mg L⁻¹ (Máx. e Mín.)	Taxa de inibição da germinação de sementes de pepino (%)	Taxa de inibição da atividade das desidrogenases em leveduras (%)
Al	200	66,2	86,3
	1,6	0	26,1
Cd	50	45,1	86,3
	0,4	0	7,22
Cr	50	69,7	88,4
	0,4	2,6	21,8
As	10	31,5	67,2
	0,1	15,4	5,7
Zn	50	45,7	90,1
	0,4	0	7,9
Ba	7	0	65,1
	0,1	0	1,83
Pb	10	72,2	79,1
	0,1	1,2	27,8

Na figura 12 é possível notar os efeitos das demais concentrações de íons metálicos de Zn, Cr, Pb, Al, Ba, As e Cd sobre a taxa de germinação de sementes de pepino.

Figura 12. Porcentagens de inibições e suas respectivas concentrações dos efeitos do teste germinativo de sementes de pepino

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, leveduras liofilizadas de panificação da espécie *Saccharomyces cerevisiae* podem ser usadas como bioindicadora de toxicidade de elementos possivelmente tóxicos na água, através da medida da atividade das desidrogenases pela conversão do 2, 3, 5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em 1, 3, 5-trifenil formazan (TPF).

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas. **NBR12714. Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte I - Sistema estático**, 1993a.

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas. **NBR12716. Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte III - Sistema de fluxo contínuo**, 1993b.

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas. **NBR12715. Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte II - Sistema semi - estático**, 1993c.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia ssp (Crustacea, Cladocera)**, 2009.

ABNT. NBR 13373. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia ssp (Crustacea, Cladocera)**, 2010.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: **Zagatto, P.A. ; Bertoletti, E. Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008. p. 117–151.

ARIAS, A. R. L.; SANTOS, V. G. Metalotioneína: Processos celulares e moleculares. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 16, n. 4, p. 701–716, 2008.

BAKKALOGLU, I. et al. Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (ZN, CU, NI) by biosorption, sedimentation and desorption. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 269–277, 1 jan. 1998.

BELABED, B. E. et al. Modeling seasonal and spatial contamination of surface waters and upper sediments with trace metal elements across industrialized urban areas of the Seybouse watershed in North Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 6, 2017.

BLEACKLEY, M. R.; MACGILLIVRAY, R. T. A. Transition metal homeostasis: From yeast to human disease. **BioMetals**, v. 24, n. 5, p. 785–809, 2011.

BORGES, E. L. Arsênio e compostos. **Toxicologia no ambiente de trabalho**, v. 1, p. 1–2, 2009.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61–90, jan. 1986.

BRENNAN, R. J.; SCHIESTL, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 356, n. 2, p. 171–178, 1996.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Ensaios de toxicidade crônica. In: **Zagatto, P.A. ; Bertoletti, E. Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008. p. 232–249.

BUSSCHE, J. VANDEN; SOARES, E. V. Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 679–687, 2011.

Cadeia respiratória ocorrendo na membrana interna da mitocôndria. Disponível em: <<https://blogdoenem.com.br/biologia-enem-respiracao-celular-cadeia-respiratoria/>>. Acesso em: 26 set. 2017.

CERVANTES, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 335–347, 2001.

CETESB. **Avaliação de toxicidade crônica utilizando Ceriodaphnia dubia Richard, 1894(Cladocera, Crustacea).**SÃO PAULO, 1990.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: Putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7–15, 2002.

CHEN, C.; WANG, J. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 683–687, 2007.

CONAMA. **Resolução n 357, 18 de março de 2005.**Diário oficial, 2005.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CREANGA, D.; NADEJDE, C. Molecular modelling and spectral investigation of some triphenyltetrazolium chloride derivatives. **Chemical Papers**, v. 68, n. 2, p. 7–12, 2014.

CYERT, M. S.; PHILPOTT, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 677–713, 2013.

DUFFUS, J. H. Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 2003–2122, 1993.

FREDERIKS, W. M. et al. Improved Localization of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity in Cells with 5-Cyano-2, 3-ditolyl-tetrazolium Chloride as Fluorescent Redox Dye Reveals its Cell Cycle-dependent Regulation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 1, p. 47–52, 2006.

FULLADOSA, E.; MURAT, J. C.; VILLAESCUSA, I. Effect of cadmium(II), chromium(VI), and arsenic(V) on long-term viability- and growth-inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 299–306, 2005.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 609–643, 1 mar. 2010.

GESSNER, M. O.; TLILI, A. Fostering integration of freshwater ecology with ecotoxicology. **Freshwater Biology**, v. 61, n. 12, p. 1991–2001, 2016.

GITAN, R. S. et al. A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 39558–39564, 2003.

GÖKSUNGUR, Y.; ÜREN, S.; GÜVENÇ, U. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker’s yeast biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 1, p. 103–109, 2005.

GORDON, J. J.; QUASTEL, J. H. Effects of organic arsenicals on enzyme systems. **The Biochemical journal**, v. 42, n. 3, p. 337–50, 1948.

GÜRKAN, R.; ULUSOY, H. İ.; AKÇAY, M. Simultaneous determination of dissolved inorganic chromium species in wastewater/natural waters by surfactant sensitized catalytic kinetic spectrophotometry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S450–S460, fev. 2017.

HAMILTON, C. A.; GOOD, A. G.; TAYLOR, G. J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant physiology**, v. 125, n. 4, p. 2068–2077, 2001.

HASSAN, S. H. A. et al. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. **Environment International**, v. 92–93, p. 106–118, 2016.

HENDERSON, G. A comparison of the effects of chromate, molybdate and cadmium oxide on respiration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol Metals**, v. 2, p. 83–88, 1989.

HSIEH, C. Y. et al. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox® chronic toxicity test. **Science of the Total Environment**, v. 320, n. 1, p. 37–50, 2004.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

ISO. **Water quality-algal growth inhibition test ISO/DIS 8692**. Geneva, 1987.

ISO10229:1994. **Water quality -- Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish -- Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae))**, 1994.

ISO7346-1:1996. **Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 1: Static method**, 1996.

ISO7346-2:1996. **Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 2: Semi-static method**, 1994.

ISO 7346-3: 1996(EN). **Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 3: Flow-through method**, 1996.

JACOBS, I. A. et al. Poisoning as a result of barium styphnate explosion. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 41, n. 4, p. 285–288, 1 abr. 2002.

KAGI, J. H. R.; VALLEE B. L. Metallothionein: a Cadmium from Zinc-containing protein from Equine Renal Cortex. **Physicochemical properties. Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 9, p. 2435–2442, 1961.

KALINA, M.; PALMER, J. M. The reduction of tetrazolium salts by plant mitochondria. **Histochemie**, v. 14, n. 4, p. 366–374, 1968.

KNIE, J. L.; LOPES, E. W. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KUMAR, C. et al. Glutathione revisited: A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. **EMBO Journal**, v. 30, n. 10, p. 2044–2056, 2011.

- LIU, T. et al. Contamination of fresh water by petroleum sludge. **Petroleum Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 413–418, 2017.
- LIU, X.-D.; THIELE, D. J. Yeast Metallothionein Gene Expression in Response to Metals and Oxidative Stress. **Methods**, v. 11, n. 3, p. 289–299, 1997.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.
- MADRUGA, G. M. et al. Comparative use of dimethyl sulphoxide (DMSO) in different animal species. **Veterinarni Medicina**, v. 62, n. 4, p. 179–185, 2017.
- MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO, S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.
- MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants - Perspective for monitoring hydrocarbon contamination: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 1, p. 1–8, 2005.
- MARGOSHES, M.; VALIEE, B. L. A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 17, p. 4813–4814, 1957.
- MATHEW*, B. B.; TIWARI, A.; JATAWA, S. K. Free Radicals and Antioxidants : A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4340–4343, 2011.
- MATTHEWS, R. S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 5, p. 919–922, 1995.
- MAY, P. S. . et al. Effect of Tetrazolium Salts on Selected Bacterial Species. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 105, n. 2, p. 64–6, 1960.
- MENDES, L. F. et al. Toxicological effects of metal-EDTA/NTA complex formation in a synthetic medium on the macroalga *Gracilaria domingensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1307–1314, 2015.
- MOWLL, J. L.; GADD, G. M. Zinc Uptake and Toxicity in the Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 129, n. 11, p. 3421–3425, 1983.
- NEUGEBAUER, F. A. Hydrazidiny-Radikale: 1,2,3,5-Tetraazapentenyle, Verdazyle und Tetrazolinyle. **Angewandte Chemie**, v. 85, n. 11, p. 485–493, 1 jun. 1973.
- NGUYÊN-NHU, N. T.; KNOOPS, B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. **Toxicology Letters**, v. 135, n. 3, p. 219–228, 2002.
- NOCTOR, G. et al. Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 321, p. 623–647, 1998.
- NWEKE, C. O. Effects of Metals on Dehydrogenase Activity and Glucose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. v. 25, n. 2, p. 28–35, 2010.
- OU, Y. et al. Ouabain affects cell migration via Na,K-ATPase-p130cas and via nucleus-centrosome association. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183343, 17 ago. 2017.

ÖZER, A.; ÖZER, D. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: Determination of biosorption heats. **Journal of Hazardous Materials**, v. 100, n. 1–3, p. 219–229, 2003.

PAGANO, J.; LEVIN, J.; TREJO, W. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. **Antibiotics annual**, v. 5, p. 137–143, 1957.

PELCZAR, J. R. .; CHAN, E.; KRIEG, N. R. Microbiologia do Solo e do Ar. **Makron Books do Brasil Ed. LTDA**, p. 306–336, 1997.

POLICARPO, A. C. DE F. **Vias alternativas mitocondriais: clonagem e caracterização bioquímica do gene da NADH desidrogenase alternativa de *A. fumigatus***. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

POLJSK, B. et al. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 21–36, 2010.

QI, W. et al. Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: Comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 5, p. 399–403, 2000.

REINHARDT, J. C. **O pão nosso de cada dia**. [s.l: s.n.].

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 12, n. 4, p. 283–294, 1997.

RIOUX, J. A. .; BASTIDE, J. M. .; GALZY, P. La réduction des sels de tétrazolium par les levures: application a la détermination rapide de quelques espèces du genre *Candida*. **Trav. Pharm**, p. 41–46, 1960.

RODRIGUES, A. S. DE L. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO NA SAÚDE HUMANA. **Saúde.com**, v. 4, n. 2, 25 abr. 2016.

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W. Dimethyl Sulfoxide in Musculoskeletal Disorders. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 192, n. 4, p. 309, 26 abr. 1965.

RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

RUMLOVA, L.; DOLEZALOVA, J. A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 459–464, 2012.

SAKAMOTO, F. et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Heavy Element Stress: Lead vs. Uranium. **Geomicrobiology Journal**, v. 3, p. 240–244, 2010.

SANTOS, C. R. A. DOS. A alimentação e o seu lugar na história: Os tempos da memória gustativa. **Histórias Questões & Debates**, n. 42, p. 22, 2005.

SANTOS, I. G. S. DOS et al. Monitoring ecotoxicological and Environmental Testing Using with Biosurfactants Evaluation of Zone Water Quality Port. **GEAMA Journal**, v. 7, p. 124–132, 2016.

SAS INSTITUTE INC. 2000. **SAS/STAT: Statistical Analysis System: getting started with**

the SAS learning. Cary, NC: SAS Institute, 2000.

SCHOTT, E. J.; GARDNER, R. C. Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 254, n. 1, p. 63–72, 1997.

SCHWARTZ, I. et al. Dimethyl Sulfoxide Increases the Survival of Primarily Ischemic Island Skin Flaps. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 110, n. 2, p. 228–231, 1 fev. 1994.

SEIDLER, E. Zur Rolle der Superoxiddismutasen für den histochemischen Dehydrogenasenachweis. **Acta Histochemica**, v. 70, n. 1, p. 106–114, 1 jan. 1982.

SILVA, L. R. R. E. **Utilização do modelo experimental de leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* para estudos de metais pesados em doenças neurodegenerativas**. Portugal: Universidade de Portugal, 2012.

SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. **Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance**, v. 645, p. 229–242, 27 set. 1996.

SOARES, E. V; HEBBELINCK, K.; SOARES, H. M. V. M. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 5, p. 336–343, 2003.

SOJKA, J. E. et al. Dimethyl sulfoxide update: new applications and dosing methods. **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)**, v. 36, p. 683–690, 1990.

SUH, J. H.; YUN, J. W.; KIM, D. S. Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 5, p. 383–387, 1999.

TAVARES, A. C. L. B. **Leveduras como bioindicadores de cádmio no solo**. Piracicaba: Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE., C. L. **Microbiology an introduction**. 10. ed. [s.l: s.n.].

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T. Metal pollution in ecosystems. Ecotoxicology studies and risk assessment in the marine environment. **Science Advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology issues**, p. 1–9, 2010.

VAN DER HEGGEN, M. et al. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1355–1361, 2010.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.

VILLAESCUSA, I. et al. Chromium (Vi) Toxicity To Luminescent Bacteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 871–874, 1997.

WANG, C. et al. Proteomic analysis of a high aluminum tolerant yeast *Rhodotorula taiwanensis* RS1 in response to aluminum stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 10, p. 1969–1975, 2013.

WATERS, P. et al. Influence of the metabolic state on the tolerance of *Pichia kudriavzevii* to heavy metals. **Química Nova**, v. 16, n. 4, p. 1–4, 2016.

WEIBULL, C. OBSERVATIONS ON THE STAINING OF BACILLUS MEGATERIUM WITH TRIPIHENYLTETRAZOLIUM. **Stain Technol**, v. 24, n. 3, p. 165–170, 1952.

YANG, X. et al. Comparison of organics and heavy metals acute toxicities to *Vibrio fischeri*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 81, n. 6, p. 697–705, 2016.

YUAN, X.; TANG, C. DNA damage and repair in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells exposed to lead. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 34, n. 5, p. 1117–1128, maio 1999.

ZHENG, K. et al. Programmed Cell Death-Involved Aluminum Toxicity in Yeast Alleviated by Antiapoptotic Members with Decreased Calcium Signals. **Plant Physiology**, v. 143, n. 1, p. 38–49, 2006.