



**Ana Filipa Nunes Leitão Alegre**

Licenciada

***Saccharomyces cerevisiae* como biossensor  
de arsénio na água: caso de estudo da Ribeira  
do Bodelhão e do Rio Zêzere**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Regina Menezes, Doutora, ITQB/UNL  
Co-orientador: Nuno Lapa, Professor Doutor, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL  
Vogais: Doutor Nelson Saibo, ITQB/UNL  
Doutor João Cândido Barbosa Morais, FCT/UNL  
Doutora Regina Menezes, ITQB/UNL  
Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2012





**Ana Filipa Nunes Leitão Alegre**

Licenciada

***Saccharomyces cerevisiae* como biossensor  
de arsénio na água: caso de estudo da Ribeira  
do Bodelhão e do Rio Zêzere**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Regina Menezes, Doutora, ITQB/UNL  
Co-orientador: Nuno Lapa, Professor Doutor, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL  
Vogais: Doutor Nelson Saibo, ITQB/UNL  
Doutor João Cândido Barbosa Morais, FCT/UNL  
Doutora Regina Menezes, ITQB/UNL  
Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2012

*O trabalho aqui descrito foi desenvolvido no  
Laboratório de Genómica e Stress, Instituto de  
Tecnologia Química e Biológica, Universidade  
Nova de Lisboa e no Departamento de Ciências e  
Tecnologia da Biomassa, Faculdade de Ciências e  
Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa*

***Saccharomyces cerevisiae* como biossensor de arsénio na água: caso de estudo da Ribeira do Bodelhão e do Rio Zêzere**

***Copyright* ©**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Ana Filipa Nunes Leitão Alegre

Quando questionado como se sentia ao ter milhares de tentativas falhadas para a descoberta da lâmpada, Thomas Edison respondeu: “Eu não falhei milhares de vezes. Apenas descobri milhares de métodos que não funcionam.”

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Claudina Rodrigues-Pousada, por me ter proporcionado esta oportunidade de iniciar os primeiros passos enquanto aprendiz no seu laboratório.

À minha orientadora, Doutora Regina Menezes, por tudo o que me ensinou, pela sua paciência, perseverança e pela sua orientação.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Nuno Lapa e ao Rui Barbosa, pelo apoio, pela viagem fantástica ao Rio Zêzere, pelo trabalho elaborado no laboratório e pela excelente equipa que formam.

Aos meus colegas de laboratório, a todos eu agradeço, pelo companheirismo, apoio, atenção, humor, troca de ideias, amizade, a lista é interminável (Ana S., Rita F., Soraia C., Fábio S., Sofia S., Catarina A., Catarina P., Liliana N., Cátia S., Ana R., Cristina V.).

Agradeço especialmente à Catarina A., pelas nossas conversas científicas que me incentivavam e me davam força para continuar, e à Doutora Catarina Pimentel, pelos momentos de *brainstorming*.

À Liliana N., à Cátia S. e à Ana R. que me faziam sempre ver o lado leve da vida.

À Cristina V., por todos os disparates que me faziam rir às gargalhadas.

A todos os meus Professores deste Mestrado, pelo seu carinho, descontração, cooperação, interajuda, disponibilidade, apoio e incentivo.

À Katelene L., a minha grande amiga e confidente, que muitas vezes não respondia às minhas mensagens ou chamadas, mas aparecia sempre no *timing* certo, e com quem partilhei os melhores momentos que se tornavam ainda melhores pela sua presença.

À Rita C., por me ouvir incansavelmente.

À Rita R., à Sara S. e à Carlota D., pela solidariedade, pelos seus exemplos, mostrando-me que havia mais gente no mesmo barco onde, por vezes, os receios e as dúvidas podem ser comuns.

Agradeço a toda a minha família, pela atenção e curiosidade pelo meu trabalho.

Agradeço especialmente ao meu primo Pedro, que me ouvia e motivava, e ao meu tio Mário, pela sua compreensão e tranquilidade.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, os meus eternos companheiros e amigos.

A todos os meus amigos que não foram aqui mencionados, mas que de certa forma contribuíram para a conclusão do meu trabalho.



## Resumo

O metalóide arsénio encontra-se disperso na crosta terrestre. Porém, em Portugal encontram-se níveis elevados de arsénio na água pontualmente nalgumas cidades situadas a Norte, devido a processos geológicos. O arsénio é altamente tóxico para o organismo, sendo 10 µg/L a concentração máxima permitida por Lei para a água para consumo humano, o principal veículo através do qual o arsénio inorgânico se propaga no ambiente.

Os métodos químicos de detecção de arsénio na água são extremamente precisos, mas dispendiosos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada como organismo modelo, foi geneticamente manipulada com o objectivo de desenvolver um sistema biossensor para detectar arsénio na água. Testaram-se as estirpes mais sensíveis ao arsenito, BY4741*yap8* e BY4741*acr3yap8*, na presença de diferentes fontes de carbono: glucose, sacarose e galactose. Os plasmídeos recombinantes expressando os genes *HXT7* e *FPS1* (importadores de arsenito), controlados pelo gene promotor *GAL1*, foram transformados nas respectivas estirpes, desenvolvendo desta forma os sistemas de biodetecção.

As amostras de água colhidas no Rio Zezêre e na Ribeira do Bodelhão foram avaliadas físico-quimicamente e com os modelos biológicos construídos. Estes locais sofrem contaminação por águas de lixiviação de duas escombreyras pertencentes às minas da Panasqueira que contêm níveis elevados de arsénio e do efluente proveniente do tratamento deficitário da ETAM da mina. A Ribeira do Bodelhão revelou ser a mais contaminada (ecotoxicidade pouco significativa), com níveis elevados de condutividade, potencial redox e sólidos inorgânicos, entre eles, arsénio, cobre, manganês e zinco. Apenas as estirpes de levedura transformadas com o plasmídeo YEplac181*GAL1FPS1* revelaram sensibilidade a um elemento desconhecido nas amostras de água.

As estirpes transformadas com o plasmídeo YEplac195*GAL1HXT7* revelaram maior sensibilidade nos ensaios laboratoriais. No entanto, o facto de não ter demonstrado o mesmo resultado com as amostras de água revelou que os elementos se encontravam maioritariamente complexados dificultando a entrada através do transportador Hxt7.

Termos chave – *Saccharomyces cerevisiae*, arsénio, água, bio-detecção, transportadores.



## Abstract

The arsenic metalloid is widespread on earth. However in Portugal there are higher levels of arsenic in the water casually in some cities of northern of Portugal due to geological processes. The arsenic is very toxic to the organism, where 10 µg/L is the highest concentration permitted by law for drinking water which is the primary vehicle through which the inorganic arsenic spreads in the environment.

The chemical methods of detection of arsenic in the water are extremely accurate, but expensive. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is amply used as a model organism and it was manipulated genetically so that it could be used as bio-detector of arsenic in the water. The most sensitive strains to arsenite, BY4741*yap8* and BY4741*acr3yap8*, were tested in the presence of different carbon sources: glucose, sucrose, galactose and raffinose. The recombinant plasmids expressing the genes *HXT7* and *FPS1* (arsenite importers), controlled by the gene promoter *GAL1*, were transformed in the respective strains, developing thereby the biosensors systems.

These biological models were used to evaluate water samples from Zêzere River and Bodelhão Riverside which were physico-chemically evaluated too. These places are contaminated with water leaching from two mine waste tips with high levels of arsenic belonging to Panasqueira mine and from the effluent of the deficit treatment of ETAM mine. Bodelhão Riverside was the most contaminated (little significant ecotoxicity), with high levels of conductivity, redox potential and inorganic solids, such as arsenic, copper, manganese and zinc. Only the yeast strains transformed with the YEplac181*GAL1FPS1* plasmid revealed sensitivity to an unknown element present in the water samples.

The strains transformed with the YEplac195*GAL1HXT7* plasmid revealed greater sensitivity on the laboratorial tests. However, the fact that the result had been different with the water samples revealed that the elements were mainly in the complexed form, interfering with the entry through the Hxt7 transporter.

Keywords – *Saccharomyces cerevisiae*, arsenic, water, bio-detection, transporters.



# Índice Geral

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 O arsénio e o ambiente	1
1.2 O arsénio no mundo e os seus efeitos na saúde	3
1.3 Métodos químicos para detecção e tratamento de arsénio	6
1.4 Métodos biológicos para detecção e remediação de arsénio na água	7
1.5 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	8
1.6 Resposta ao stress induzido pelo arsénio em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.7 Objectivos	10
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>11</b>
2.1 Local de estudo	11
2.2 Colheita das amostras de água no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão	13
2.3 Quantificação de sólidos nas amostras de água	14
2.4 Quantificação de metais e metalóides nas amostras de água	16
2.5 Quantificação da toxicidade aguda nas amostras de água	16
2.6 Estirpes bacterianas e condições de crescimento	17
2.7 Preparação e transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	17
2.8 Extracção de DNA plasmídico de bactérias	18
2.9 Estirpes de levedura e condições de crescimento	18
2.10 Preparação e transformação de células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	19
2.11 Extracção de DNA genómico de levedura	20
2.12 Purificação de DNA	20
2.13 Construção de estirpes mutantes	21
2.14 Construção dos plasmídeos recombinantes	21
2.15 Ensaio fenotípicos	23
<b>3. Resultados e Discussão</b>	<b>24</b>
3.1 Caracterização dos locais de colheita das amostras de água do Rio Zêzere e da Ribeira do Bodelhão	24
3.1.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos determinados nos locais de colheita (temperatura do ar e da água, pH, condutividade e potencial redox)	25

3.1.2	Avaliação da presença de sólidos e metais (Fe, Mn, Cu, Zn e As) na água.....	26
3.1.3	Nível de toxicidade aguda da água.....	29
3.2	Modificação genética de <i>S. cerevisiae</i> para a construção do sistema de bio-deteção.....	30
3.2.1	Construção de mutantes simples e duplos.....	31
3.2.2	Análises fenotípicas em meio rico YPD.....	32
3.2.3	Optimização das fontes de carbono a serem utilizadas nos ensaios de sensibilidade....	33
3.2.4	Ensaio de sensibilidade nos mutantes da série BY4741 sobre-expressando os genes <i>HXT7</i> e <i>FPS1</i> .....	36
3.2.5	Análises fenotípicas das amostras de água do Rio Zêzere e Ribeira do Bodelhão.....	38
<b>4.</b>	<b>Conclusão e Perspectivas de trabalho futuro.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Diagrama Eh-pH das espécies aquosas de As.....	2
<b>Figura 1.2</b> Regiões do mundo mais afectadas pelo arsénio.....	4
<b>Figura 1.3</b> Regiões de Portugal afectadas pela contaminação com arsénio.....	5
<b>Figura 1.4</b> Representação esquemática dos transportadores de arsénio na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
<b>Figura 2.1</b> Representação dos quatro locais de colheita das amostras de água e dos locais das duas escombreiras.....	11
<b>Figura 2.2</b> Local a montante da escombreira das Minas da Panasqueira, próximo de Silvares.....	12
<b>Figura 2.3</b> Local junto à zona da escombreira das Minas da Panasqueira, junto a Cabeço do Pião..	12
<b>Figura 2.4</b> Local a jusante da escombreira das Minas da Panasqueira, junto a Barroca.....	13
<b>Figura 2.5</b> Local a jusante da escombreira situada na Barroca Grande, Ribeira do Bodelhão.....	13
<b>Figura 3.1</b> Parâmetros físico-químicos analisados nos diferentes locais de colheita das amostras de água.....	26
<b>Figura 3.2</b> Concentração de sólidos totais, fixos, voláteis, dissolvidos e suspensos totais nas amostras de água.....	27
<b>Figura 3.3</b> Concentração dos metais, total e dissolvido nas amostras de água.....	29
<b>Figura 3.4</b> Validação por PCR dos mutantes simples e duplos.....	32
<b>Figura 3.5</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes em meio suplementado com YPD.....	33
<b>Figura 3.6</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes em meio mínimo suplementado com glucose 2%.....	34
<b>Figura 3.7</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes em meio mínimo suplementado com sacarose 2%.....	35
<b>Figura 3.8</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes em meio mínimo suplementado com galactose 2%.....	35
<b>Figura 3.9</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes transformados com o plasmídeo YEplac195GAL1HXT7.....	37
<b>Figura 3.10</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes transformados com o plasmídeo YEplac181GAL1FPS1.....	37
<b>Figura 3.11</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes transformados com os plasmídeos YEplac195GAL1HXT7 e YEplac181GAL1FPS1.....	38

<b>Figura 3.12</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes, com as amostras de água.....	39
<b>Figura 3.13</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes, transformados com o plasmídeo YEplac195 <i>GAL1HXT7</i> , com as amostras de água.....	40
<b>Figura 3.14</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes, transformados com o plasmídeo YEplac181 <i>GAL1FPS1</i> , com as amostras de água.....	40
<b>Figura 3.15</b> Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes, transformados com os plasmídeos YEplac195 <i>GAL1HXT7</i> e YEplac181 <i>GAL1FPS1</i> , com as amostras de água.....	41

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.....	19
<b>Tabela 2.2</b> Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	22
<b>Tabela 2.3</b> Oligonucleótidos utilizados neste trabalho.....	23
<b>Tabela 3.1</b> Nível de toxicidade aguda das amostras de água.....	30
<b>Tabela 3.2</b> Peso molecular esperado dos produtos de PCR.....	31



## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AAS (EAA) – espectrometria de absorção atômica  
ACR – Arsenic Compounds Resistance  
Amp – ampicilina  
ArsR – proteína metalo-quelante  
As – arsénio  
As(III) – arsenito  
As(V) – arsenato  
Cdk8 – proteína cinase dependente de ciclina  
Cu – cobre  
DDA – dose diária admissível  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
dNTP – mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (Adenina, Timina, Citosina, Guanina)  
EC<sub>50</sub> (CE50) – concentração efectiva de uma amostra/substância, a qual inibe 50% de luminescência das bactérias *Vibrio fischeri*, no caso do ensaio Microtox  
Eh – potencial redox  
EPS – exopolissacarídeos  
ETA – estação de tratamento de água  
Fe – ferro  
fMT – metalotionina da alga marinha *Fucus vesiculosus*, transportador de arsénio em *E. coli*  
Fps1 – proteína transportadora aquagliceroporina  
g – grama  
*g* ( $\times g$ ) – unidades de gravidade  
GAL – família de genes *GAL* com função reguladora ou estrutural  
GFP – proteína verde fluorescente  
GlpF – transportador de As(III)  
GPS – geo-posicionamento por satélite  
h – hora  
HGAAS – espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos  
His – histidina  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência  
Hxt – proteínas transportadoras de hexoses  
IARC – International Agency for Research on Cancer, avalia o risco de carcinogenicidade para o Homem de agentes usados no mercado  
ICP-MS – espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo  
kan – canamicina  
KCl – cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio  
L – litro

LB – meio Luria-Bertani  
Leu – leucina  
LOQ – limite de quantificação  
Lys – lisina  
M – molar  
MEL – conjunto de genes *MEL* que codificam a enzima  $\alpha$ -galactosidase que degrada a melibiose  
Met – metionina  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
Mn – manganês  
mQ – água mili-Q  
mV – milivolt  
NAE – National Academy of Engineering-Grainger Challenge Prize for Sustainability  
NaCl – cloreto de sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – fosfato de sódio  
ng – nanograma  
nm – nanómetros  
OD<sub>600</sub> – densidade óptica a 600 nm  
ORF – *Open Reading Frame*  
pb – pares de base  
PBS – tampão, solução salina com fosfato (Phosphate Buffered Saline)  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
pH – potencial hidrogénico, indicador da acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa  
Pho – transportadores de fosfato  
Pol II – RNA polimerase II  
pb – pares de base  
ppt – parte por trilião  
rcf – força centrífuga relativa  
rpm – rotações por minuto  
s – segundo  
Sb – antimónio  
SOB – super optimal broth, meio de crescimento bacteriano  
TB – meio de crescimento bacteriano (Terrific Broth)  
Trp – triptofano  
U – unidade  
Ura – uracilo  
UV – ultra-violeta  
VIS – visível  
VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – valor máximo recomendado

YAP – yeast AP-1 like proteins

Ycf1 – proteína transportadora de metais conjugados com a glutathione para o interior do vacúolo da levedura

YNB – yeast nitrogen base

YPD – yeast peptone dextrose

Zn – zinco

<LQ – menor que o limite quantificável

°C – grau Celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

µS/cm – micro Siemens por centímetro, unidade da condutividade

ϕ – controlo

### **Legenda**

Yap – proteína

*YAP* – gene

*yap* – mutante, gene *YAP* eliminado

MAT – mating-type

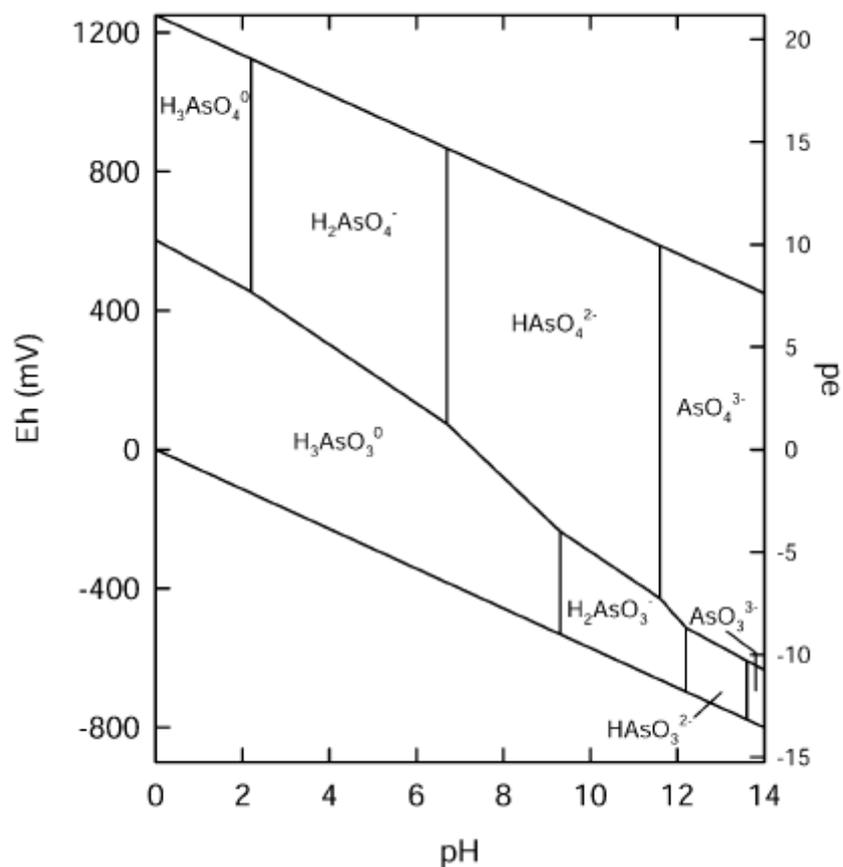


# 1. Introdução

## 1.1 O arsénio e o ambiente

O arsénio (As) é um metalóide, isto é, um elemento com propriedades intermédias entre as dos metais e não-metais, que se encontra nas rochas e no solo. As elevadas concentrações de compostos de arsénio encontradas em determinadas áreas devem-se, em grande parte, à sua presença em rochas ígneas e rochas sedimentares, assim como, à exploração mineira, indústria metalúrgica, fundição e a utilização de herbicidas e pesticidas nos campos agrícolas. Por outro lado, o arsénio também é utilizado em processos industriais, como por exemplo no tratamento da madeira, como dessecante, em ligas metálicas e na produção de vidro, produtos farmacêuticos e semi-condutores (Chilver & Peterson, 1987). Ainda hoje, o arsénio tem diversas aplicações medicinais: o arsénio inorgânico é utilizado no tratamento de leucemia, psoríase e bronquite crónica asmática, enquanto que o arsénio orgânico é utilizado em antibióticos para o tratamento de doenças provocadas por espiroquetas e protozoários (Bosch & Rosich, 2008; Rahman & Axelson, 1995).

O elemento químico arsénio pode ser encontrado na natureza em quatro estados oxidativos,  $As^{5+}$ ,  $As^{3+}$ , As e  $As^{3-}$  (Lièvreumont *et al.*, 2009; M. Mateos *et al.*, 2006), quer seja na forma elementar ou complexada, sendo a última a forma mais abundante (Futuro Silva & Fiúza, 2011). No solo, pode estar associado a diversos minerais, tais como, com o enxofre na forma de arsenopirite ( $FeAsS$ ) e realgar ( $AsS$ ), na forma de óxidos, como por exemplo a arsenolite ( $As_2O_3$ ), ou arsenetos, como por exemplo a niquelite ( $NiAs$ ) e também com o ferro, alumínio, cálcio, zinco, magnésio, chumbo, entre outros (Futuro Silva & Fiúza, 2011; Lièvreumont *et al.*, 2009). O solo contaminado contém principalmente as formas inorgânicas As(III) e As(V), para além do As orgânico que é gerado durante o metabolismo de microorganismos específicos. Geralmente, a forma mais comum nas águas naturais é o arsenato, sendo as espécies metiladas (monometil-arsénio e dimetil-arsénio) encontradas apenas em circunstâncias de elevada actividade biológica (Lièvreumont *et al.*, 2009). O estado de oxidação do arsénio e, conseqüentemente, a sua mobilidade são controlados pelas condições redox (Eh), pelo pH e pela actividade biológica (Futuro Silva & Fiúza, 2011; Lièvreumont *et al.*, 2009) (Figura 1.1). As transformações entre as formas orgânicas e inorgânicas ocorrem através de reacções de oxidação-redução, processos de precipitação/adsorção e biometilação e volatilização de arsina ou hidreto de arsénio ( $AsH_3$ ) (EPA, 2005; Lièvreumont *et al.*, 2009). O diagrama apresentado na Figura 1.1 sumariza o efeito do pH e do potencial redox no meio aquático, a 25°C e a uma pressão total de 1 bar, na conversão das diferentes formas de arsénio. As formas representadas no diagrama traduzem a espécie predominante nas diferentes condições de pH e Eh, onde o termo *pe* (ou *pE*) reflecte a tendência de oxidação ou redução (K. Lower, 1998). Por exemplo, para um potencial redox 200 mV e um pH 6-6,5, a espécie predominante neste meio oxidativo é  $H_2AsO_4^-$  [anião de As (V)].



**Figura 1.1** – Diagrama Eh-pH das espécies aquosas de As no sistema As-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O a 25°C, a uma pressão total de 1 bar (adaptado de Smedley & Kinniburgh, 2002).

De uma maneira geral, o arsênio presente nos alimentos encontra-se nas formas orgânicas metilada, arsenobetaina ou arseno-açúcares, sendo a toxicidade destas espécies relativamente baixa. No entanto, as espécies inorgânicas tóxicas, como As(III) e As(V), também podem ser encontradas nos alimentos (Schoof *et al.*, 1999). De entre os alimentos que contêm arsênio, quer seja orgânico ou inorgânico, estão o leite e derivados, óleos e gorduras, frutos e vegetais, cereais e produtos de padaria, carne e miúdos, bivalves, cefalópodes e crustáceos, ovos, bebidas, adoçantes, sal e especiarias. O peixe é aquele que normalmente apresenta níveis mais elevados, variando consoante o seu *habitat*, comparativamente com os alimentos mencionados (EFSA, 2004). A contaminação da água para consumo humano, ocorre geralmente através do arsênio inorgânico, a forma mais tóxica, sendo este então o principal veículo de contaminação e propagação deste metalóide (EFSA, 2009).

## 1.2 O arsénio no mundo e seus efeitos na saúde

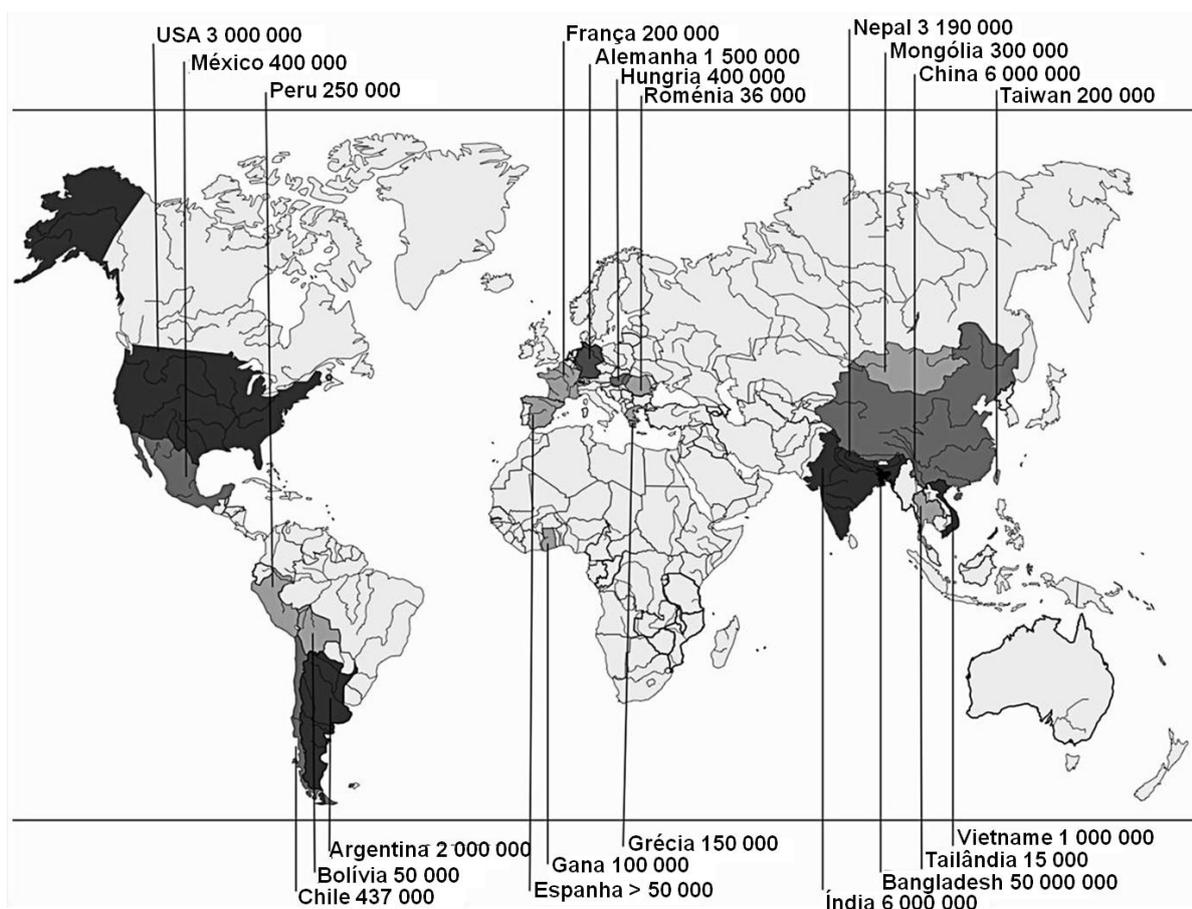
De entre os sintomas mais comuns provocados pela exposição crónica ao arsénio, destacam-se a fraqueza, debilidade, perda de cabelo, rouquidão e perda de peso. Este metal é neurotóxico, nefrotóxico, genotóxico e cancerígeno, podendo originar, face a uma exposição prolongada, doenças cardiovasculares e neurológicas, diabetes tipo 2 e vários tipos de cancro (Navas-Acien *et al.*, 2006; Thorsen *et al.*, 2009). Segundo a classificação IARC<sup>1</sup>, as diferentes formas do arsénio estão classificadas nas seguintes categorias: arsénio inorgânico e compostos de arsénio inorgânico pertencem ao Grupo 1, isto é, são *cancerígenos para os humanos*; compostos metilados de arsénio são *possivelmente cancerígenos para os humanos* (Grupo 2B); e arsenobetaína e outros compostos orgânicos de arsénio não metabolizados no Homem pertencem ao Grupo 3, ou seja, *não estão classificados quanto à sua carcinogenicidade para os humanos* (IARC, 2006).

Em países como o Bangladesh, a Índia e a Tailândia, a exposição crónica ao As é uma das principais causas de elevada taxa de mortalidade infantil e de aborto, devido à sua capacidade de atravessar a placenta, afectando assim o desenvolvimento do feto (Fängström *et al.*, 2008). Nestes países, onde os níveis de As são muito elevados tanto na água como no solo, as terras de cultivo são muitas vezes afectadas, como o caso dos arrozais, que consistem na principal fonte de alimento das populações que habitam aquelas regiões.

A nível global, mais de 100 milhões de pessoas encontram-se expostas ao As, sendo o Bangladesh a região mais afectada (Fängström *et al.*, 2008; Navas-Acien *et al.*, 2006). Para além deste, existem também outros países em desenvolvimento que se encontram em condições similares, tais como a Argentina, a Bolívia, o Chile, a China, a Índia, o México, o Nepal, o Paquistão e o Peru (Frisbie *et al.*, 2005; Lièvreumont *et al.*, 2009) (Figura 1.2).

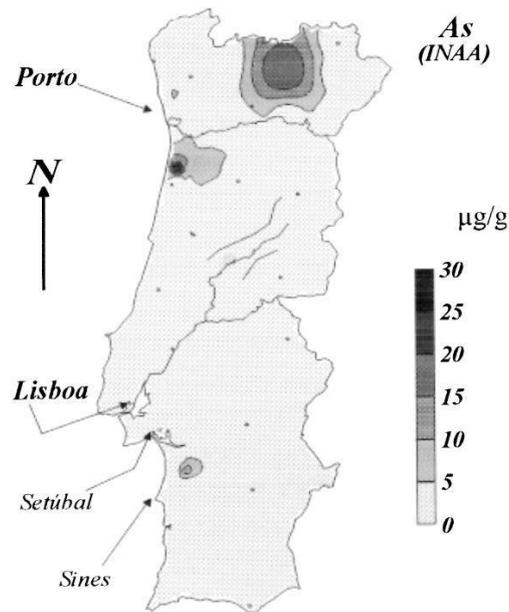
---

<sup>1</sup> IARC – International Agency for Research on Cancer.



**Figura 1.2** – Regiões do mundo mais afectadas pelo arsénio. O mapa mostra o número de pessoas expostas ao consumo diário de água contaminada com arsénio em níveis superiores a 10 µg/L. As colorações mais intensas indicam as zonas mais afectadas (adaptado de Lièvreumont *et al.*, 2009).

Portugal não é uma excepção. Segundo a Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998, o valor máximo permitido de arsénio na água é de 10 µg/L, enquanto que a dose diária admissível (DDA) é de 0,0104 mg As/Kg massa corporal/dia, quer provenha dos alimentos quer da água (EPA, 2005). Contudo, de acordo com o Relatório Anual do Sector de Águas e Resíduos em Portugal (RASARP, 2008), diversas regiões portuguesas apresentaram níveis de As na água muito acima do permitido, como por exemplo no Concelho de Pombal, na Freguesia Vieira de Leiria, no Concelho de Vila Flor (540 µg/L), em Benlhevai (330 µg/L), em Ponte de Sôr (76 µg/L), Alpiarça, Évora, Vila Franca de Xira, Barcelos, Concelho de Baião, entre outros. No Relatório Anual do Sector de Águas e Resíduos em Portugal de 2010 também foram registados incumprimentos no Distrito de Santarém, Concelho de Alandroal e Concelho de Ponte de Sôr. A Figura 1.3 evidencia a concentração de arsénio detectada nos líquenes *Parmelia sulcata* localizados em árvores de oliveira, em Portugal (Freitas *et al.*, 1999). A presença de arsénio nestes líquenes traduz, indirectamente, a sua disponibilidade no solo, que por sua vez pode afectar os aquíferos. De acordo com os autores, a contaminação de arsénio na área de Bragança teve uma origem natural, enquanto que no Sul do Porto ocorreu como consequência da indústria química de Estarreja.



**Figura 1.3** – Regiões de Portugal afectadas pela contaminação com arsénio. A disponibilidade de arsénio foi inferida através da monitorização do arsénio presente nos líquenes *Parmelia sulcata*. (adaptado de Freitas *et al.*, 1999).

Em Portugal, um dos casos mais flagrantes é o das minas da Panasqueira, situadas no Cabeço do Pião e Barroca Grande, no Concelho do Fundão, que foram sujeitas aos efeitos da acumulação de mais de 400 toneladas de arseno-pirite (FeAsS), ao longo de pelo menos 30 anos. Esta acumulação de arseno-pirite, proveniente da extracção de volfrâmio, constitui um risco elevado para a população residente naquela região, face ao perigo existente não só de contacto directo ou indirecto mas principalmente pela contaminação da água utilizada para consumo humano. De facto, o Rio Zêzere é um dos locais mais afectados pelas escombrelas das minas da Panasqueira e a sua água abastece a Albufeira de Castelo do Bode que por sua vez fornece os sistemas do Concelho de Abrantes e da Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL), fornecedora de 34 Municípios da região da Grande Lisboa.

Deste modo, é importante implementar medidas que contrariem estes factos, sendo que na sequência da introdução da Directiva de Responsabilidade Ambiental da União Europeia, transposta para o Decreto-Lei 147/2008 de 29 de Julho, as empresas portuguesas terão que pagar por qualquer dano que causem ao ambiente, implementado desde Janeiro de 2010. Esta directiva estabelece um quadro comum de responsabilidade ambiental baseado no princípio do «poluidor-pagador», com vista a prevenir e reparar os danos ambientais, tais como, danos causados aos animais, plantas, *habitats* naturais, recursos hídricos e ao solo.

### 1.3 Métodos químicos para detecção e tratamento de arsénio

Dado que em Portugal a incidência de arsénio inorgânico se encontra restrita à água, os métodos aqui abordados são referentes à detecção e tratamento de arsénio na água.

Os métodos de detecção do arsénio na água hoje em dia utilizados baseiam-se em métodos químicos precisos, porém muito dispendiosos. Em Portugal, os métodos analíticos de referência para detecção de arsénio na água são a espectrometria de absorção atómica (AAS) e a espectrometria de absorção molecular (Decreto-Lei nº 236/98), que apresentam um limite de detecção de 0,002 mg/L e 0,01 mg/L, respectivamente. A espectrometria de absorção atómica permite identificar os elementos químicos de uma amostra, em solução aquosa ou gasosa, através da sua decomposição térmica em átomos que absorvem energia nas zonas do visível e ultravioleta, no comprimento de onda característico de cada elemento (EFSA). O método de AAS com geração de hidretos (HGAAS) é o mais adequado à quantificação de arsénio na água, pois evita a formação de óxidos e permite uma quantificação mais exacta. A espectrometria de absorção molecular (UV/VIS) consiste na absorção de radiação visível ou ultra-violeta por parte de uma molécula numa amostra aquosa, através do equipamento espectrofotométrico.

A detecção de arsénio pode ser realizada ao nível total ou podem ser determinadas as diferentes espécies de arsénio, este último através do método de espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), em conjunto com HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). O método ICP-MS é altamente sensível e dispendioso, chegando a detectar na ordem de partes por trilião (ppt), e dispensa a geração de hidretos, embora a sua combinação potencie o limite de quantificação (LOQ). A quantificação das diferentes espécies de arsénio é de especial importância nos alimentos marinhos, pois nestes alimentos são encontradas diversas espécies orgânicas não-tóxicas de arsénio. Deste modo, a avaliação do arsénio total nestes alimentos nem sempre reflecte o potencial tóxico da amostra em termos de quantidade máxima permitida (EFSA, 2009).

Os métodos de tratamento existentes aplicam-se, principalmente, à água para consumo, dando-se menos importância aos efluentes ou resíduos provenientes das explorações. Os métodos utilizados até hoje baseiam-se, por exemplo, em filtros de carbono activado, permuta iónica, coagulação/filtração, oxidação/filtração, amaciamento pela cal e, mais recentemente, através dos filtros SONO. Estes filtros conseguem remover As(III) e As(V) sem pré-tratamento químico e sem produção de resíduos tóxicos. São constituídos por diferentes camadas de areia de rio, matrizes de ferro, tijolos lascados e carvão vegetal. Esta metodologia recebeu o maior prémio da <sup>2</sup>NAE, pela sua acessibilidade, fiabilidade, fácil manutenção, aceitação social, por não ser poluente e por conseguir remover o As da água até um valor bastante abaixo do máximo permitido por Lei (Hussam & Munir, 2007).

---

<sup>2</sup> NAE – National Academy of Engineering-Grainger Challenge Prize for Sustainability.

#### 1.4 Métodos biológicos para detecção e remediação de arsénio na água

Devido ao elevado custo dos métodos químicos de detecção do arsénio na água, actualmente, tem-se investido no desenvolvimento de biossensores específicos para a sua detecção. A maioria destes bio-detectores utiliza a bactéria *Escherichia coli* que, em resposta à disponibilidade de arsénio, induz a expressão dos genes que codificam para a luciferase, a proteína fluorescente GFP, a  $\beta$ -galactosidase e proteínas envolvidas na produção de carotenóides (Stocker *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2008). Após 24 h de incubação das culturas celulares em tubos de ensaio, através destes procedimentos é possível avaliar a presença de arsenito numa determinada amostra, numa gama entre 10 e 75  $\mu\text{g/L}$ .

Em contrapartida, vários organismos têm sido geneticamente modificados visando o desenvolvimento de estratégias de biorremediação alternativas aos métodos químicos de tratamento da água contaminada com arsénio. Esta tecnologia utiliza microorganismos e plantas para reduzir, eliminar, reter ou transformar contaminantes em substâncias inócuas, quer se encontrem no solo, sedimentos, água ou no ar (Lièvremon *et al.*, 2009; NABIR, 2003). Por exemplo, a produção de ácidos orgânicos por organismos heterotróficos pode auxiliar na extração de arsénio do meio (Lovley, 2001). Muitas espécies de fungos, como *Gliocladium sp.*, *Candida humicola* e *Penicillium sp.* conseguem converter ácido monometilarsénio em trimetilarsina (Lovley, 2001), podendo ser utilizados para remover arsénio em locais contaminados industrialmente.

Também as bactérias são alvo de modificações genéticas para potenciar a sua capacidade de remover o arsénio do meio. São muitas as bactérias capazes de metabolizar arsénio com potencial aplicabilidade em biorremediação, como por exemplo: *Herminiimonas arsenicoxydans*, com a capacidade de acumular o arsénio numa matriz de exopolissacarídeos (EPS) (Lièvremon *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2007); *Desulfitobacterium spp.*, capaz de degradar fenóis clorados por redução, reduzir metais ou metalóides e intervir na precipitação de sulfuretos de arsénio (Niggemyer *et al.*, 2001); e *Escherichia coli* (Jing *et al.*, 2007; Kostal *et al.*, 2004; Silver & Phung, 2005; Singh *et al.*, 2008). Tem sido também relatada a utilização de plantas (mais de 400 espécies), algas e outros microorganismos como bio-absorventes de metais pesados presentes em água contaminada (Haque *et al.*, 2008; Jing *et al.*, 2007; Lone *et al.*, 2008; Mendez & Maier, 2008; Silver & Phung, 2005).

Também a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido alvo de modificações genéticas com o objectivo de potenciar a sua capacidade de armazenamento de arsénio. Shah e colaboradores desenvolveram uma estirpe que sobre-expressa os genes *FPS1* e *HXT7* (transportadores celulares) que, em conjunto com a sobre-expressão de fitoquelatinas ou ArsRp bacteriano (sequestradores de arsénio citosólicos), permitem uma acumulação de arsénio quatro vezes superior ao da estirpe selvagem (Kostal *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008).

## 1.5 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada como organismo modelo em várias áreas da Biologia, por ser o organismo eucarionte mais simples e melhor estudado, sendo a sua arquitectura celular e os principais mecanismos celulares, como a destoxificação de elementos tóxicos, bem conhecidos (Kemmer *et al.*, 2009; Wysocki & Tamás, 2010). Para além de ser um microorganismo de fácil manipulação ao nível genético, apresenta uma série de características que fundamentam a sua utilização como organismo modelo, tais como a facilidade em propagar e conservar com poucos recursos e ter uma taxa de crescimento elevada em meios de crescimento definidos, possibilitando o controlo absoluto dos parâmetros utilizados em condições de laboratório (Kemmer *et al.*, 2009).

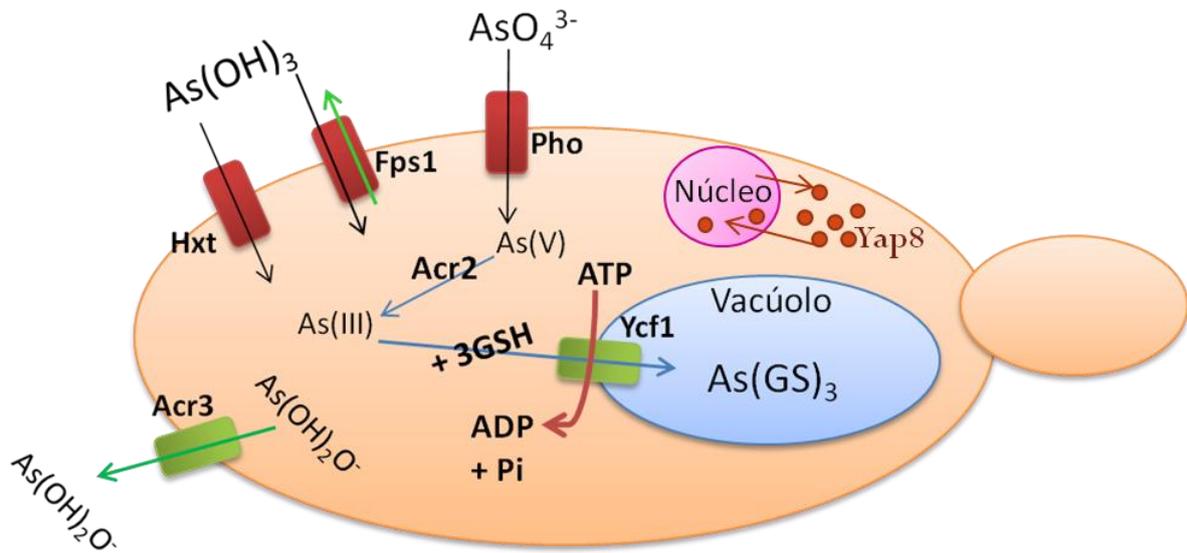
## 1.6 Resposta ao stress induzido pelo arsénio em *Saccharomyces cerevisiae*

Quando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é exposta a ambientes contaminados, o arsénio entra na célula de uma maneira fortuita utilizando sistemas de importe celulares. Devido à sua semelhança estrutural com o fosfato, o arsenato entra na célula através dos transportadores de fosfato Pho84, Pho87 e Pho89 (Bun-ya *et al.*, 1996; Rosen, 2002; Wysocki & Tamás, 2010). Em contrapartida, a associação de várias moléculas de arsénio no seu estado trivalente ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ) mimetiza um anel de seis membros tal como o anel das hexoses, sendo por este motivo transportado pelos transportadores de hexoses Hxt (Bhattacharjee & Rosen, 2007; Liu *et al.*, 2004; Wysocki & Tamás, 2010). Os vários transportadores de hexoses codificados pelo genoma da levedura *S. cerevisiae* são activados diferentemente, consoante o tipo de fonte de carbono disponível no meio e a sua respectiva concentração (Greatrix & van Vuuren, 2006; Liu *et al.*, 2004). Na presença de galactose, a captação de arsenito pelos Hxts é superior do que em meios ricos em glucose, dado que a galactose é maioritariamente importada através do transportador Gal2 (Diderich *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004), não havendo portanto competição pela entrada através dos mesmos transportadores.

Na presença de glucose, a entrada de arsenito na célula é maioritariamente catalisada pela aquagliceroporina Fps1 (Bhattacharjee & Rosen, 2007; Rosen, 2002; Thorsen *et al.*, 2006). As aquagliceroporinas são canais bidireccionais que permitem a passagem de glicerol,  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  e  $\text{As}(\text{OH})_3$  (principal forma de As(III) em solução) que são estruturalmente semelhantes entre si (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010; Wysocki & Tamás, 2010).

Quando o arsénio se acumula no citoplasma, são activados vários mecanismos celulares específicos para a sua destoxificação. De entre estes mecanismos, o principal é composto pelas proteínas codificadas pelos genes pertencentes ao grupo *ACR* (*Arsenic Compounds Resistance*), designadamente *ACR1*, *ACR2* e *ACR3* (Wysocki *et al.*, 1997). O gene *ACR1/YAP8* codifica para a proteína Yap8, o principal regulador transcripcional envolvido na resposta ao stress induzido pelos compostos de arsénio. Uma vez activado pelo As, o Yap8 é retido no núcleo e induz a expressão dos genes *ACR2* e *ACR3* (Menezes *et al.*, 2004). O primeiro codifica para uma arsenato-redutase, cuja função é catalisar a reacção de redução do arsenato para produzir arsenito. O gene *ACR3* codifica

para uma proteína de membrana de efluxo de arsenito, responsável pela extrusão de arsenito na forma de anião ( $\text{As(OH)}_2^-$ ) para o meio extracelular (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010; Menezes *et al.*, 2004). Simultaneamente, o arsenito pode ser também armazenado no vacúolo após conjugação com a glutatona,  $\text{As(GS)}_3$ , através da proteína Ycf1 (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010; Menezes *et al.*, 2008) (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Representação esquemática dos transportadores de arsênio na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.7 Objectivos

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a qualidade da água do Rio Zêzere e da Ribeira do Bodelhão, quanto à presença de metais e metalóides, através de métodos convencionais e através de um biossensor desenvolvido a partir da modificação genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para tal, as seguintes etapas foram realizadas:

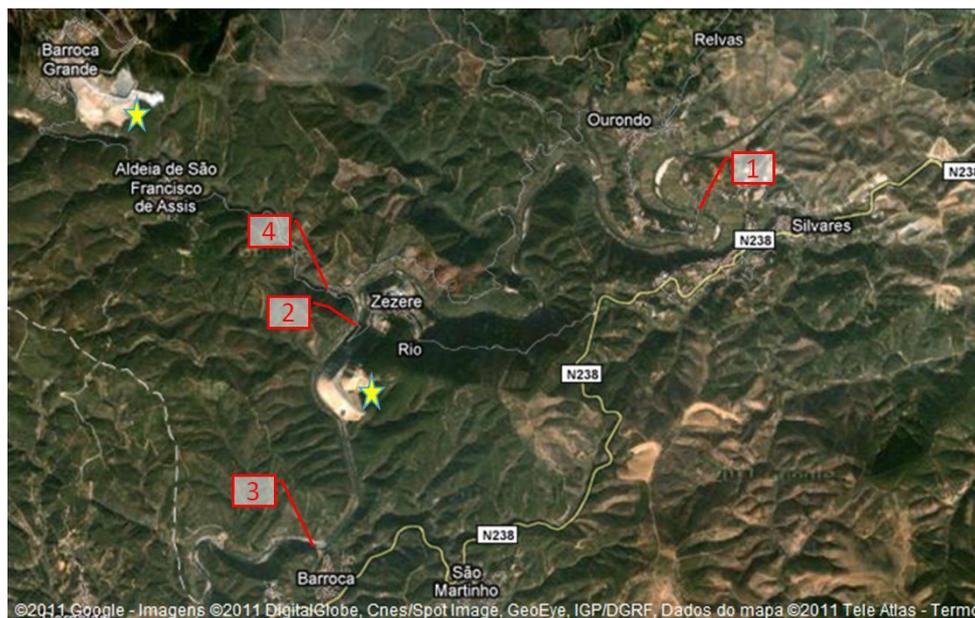
- 1- Caracterização físico-química das amostras de água colhidas em diversos locais do Rio Zêzere e da Ribeira do Bodelhão;
- 2- Avaliação da toxicidade das amostras de água através do ensaio de toxicidade aguda Microtox;
- 3- Modificação genética da levedura *S. cerevisiae* para o desenvolvimento do sistema biossensor;
- 4- Avaliação da eficácia do sistema biossensor com amostras laboratoriais;
- 5- Investigação da biodisponibilidade e toxicidade do arsénio nas amostras ambientais.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Local de estudo

Na zona onde foram colhidas as amostras de água encontram-se duas escombrelas de grandes dimensões, situadas em Barroca Grande e Cabeço do Pião. Estas escombrelas resultaram da exploração mineira das minas da Panasqueira, a qual se iniciou em 1896 e se mantém actualmente activa (Bussink, 1984; Reis, 1971; Roteiro das Minas e Pontos de Interesse Mineiro e Geológico de Portugal, 2012). Estas minas localizam-se na vertente sul da cordilheira montanhosa da Serra da Estrela e nelas se explora essencialmente volfrâmio (ou tungsténio), mas também cobre e estanho.

As amostras de água foram colhidas na Ribeira do Bodelhão e em três locais do Rio Zêzere, situados entre Ourondo e Barroca, no Concelho do Fundão (Figura 2.1). Os locais de colheita das amostras de água e as respectivas coordenadas GPS são apresentados com maior detalhe nas Figuras 2.2 a 2.5.



**Figura 2.1** – Representação dos quatro locais de colheita das amostras de água (1, 2 e 3, no Rio Zêzere, e 4, na Ribeira do Bodelhão) e dos locais das duas escombrelas (Barroca Grande e Rio-Cabeço do Pião), marcadas com uma estrela. Imagem obtida no *google earth*.

A)

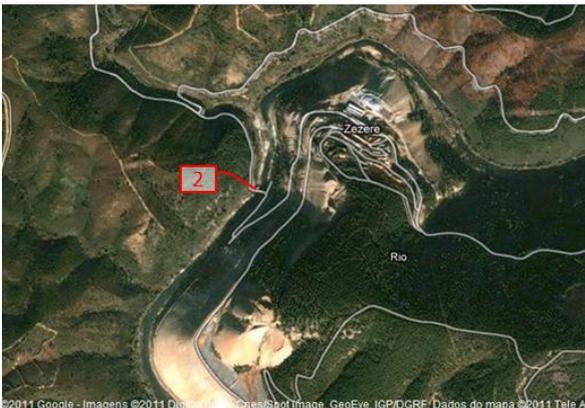


B)



**Figura 2.2** – Local a montante da escombreira das Minas da Panasqueira, próximo de Silvares (Local 1). Coordenada GPS 40° 8'26.18"N; 7°40'30.24"W. A) Imagem obtida no *google earth*. B) Fotografia tirada no local, no momento da colheita.

A)



B)



**Figura 2.3** – Local junto à zona da escombreira das Minas da Panasqueira, junto a Cabeço do Pião (Local 2). Coordenada GPS 40° 7'50.30"N; 7°42'50.49"W. A) Imagem obtida no *google earth*. B) Fotografia tirada no local, no momento da colheita.

A)

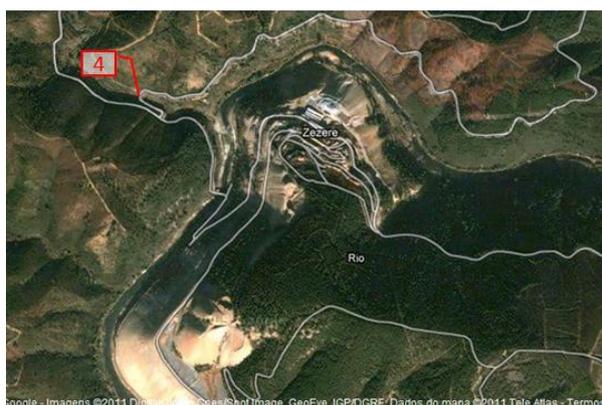


B)



**Figura 2.4** – Local a jusante da escombreira das Minas da Panasqueira, junto a Barroca (Local 3). Coordenada GPS 40° 6'39.31"N; 7°43'1.93"W. A) Imagem obtida no *google earth*. B) Fotografia tirada no local, no momento da colheita.

A)



B)



**Figura 2.5** – Local a jusante da escombreira situada em Barroca Grande, Ribeira do Bodelhão (Local 4). Coordenada GPS 40° 8'01.96"N; 7°43'02.30"W. A) Imagem obtida no *google earth*. B) Fotografia tirada no local, no momento da colheita.

## 2.2 Colheita das amostras de água no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão

As amostras de água foram colhidas nos quatro locais descritos na secção 2.1 da presente dissertação. Em cada local, as amostras foram colhidas com a ajuda de um recipiente de polipropileno e uma corda de *nylon* com 30 m de comprimento, ou uma vara telescópica com um copo de polipropileno. As amostras foram divididas em sub-amostras com diferentes volumes, tendo sido submetidas a diferentes procedimentos de conservação no local de colheita: as sub-amostras com um volume de 50 mL foram conservadas através da adição de 2 mL de ácido nítrico (65% v/v HNO<sub>3</sub>, PANREAC) e foram guardadas no frio, em malas térmicas arrefecidas com termoacumuladores; as amostras de 250 mL e 2,5 L foram apenas guardadas no frio, em malas

térmicas arrefecidas com termoacumuladores, não tendo sido adicionada nenhuma substância de conservação. Em cada local, mediram-se as temperaturas da água e da atmosfera, a 1,70 m do solo (termopar da marca Checktemp1), o pH das amostras de água (eléctrodo específico de pH da marca Pocket pH-Meter ad 110 pH), a condutividade dessas mesmas amostras (eléctrodo de condutividade da marca Milwaukee, modelo CD601 WP) e o seu potencial redox (eléctrodo de vidro com padrão interno e com compensação de temperatura, da marca ORION).

### 2.3 Quantificação de sólidos nas amostras de água

Amostras de água com um volume entre 15 e 25 mL foram colocadas em cadinhos, previamente tarados a  $105\pm 2^\circ\text{C}$  e a  $550\pm 50^\circ\text{C}$ . As amostras foram evaporadas no interior dos cadinhos, em banho de água fervente, tendo depois sido incubadas numa estufa (Mettler) a  $105\pm 2^\circ\text{C}$ , durante uma hora, para secagem. Os cadinhos contendo as amostras secas foram arrefecidos num exsiccador com sílica-gel, tendo sido em seguida pesados numa balança (Denver Instrument Company, TR-204) com uma precisão de  $\pm 0,0001$  g. Os Sólidos Totais (ST) foram calculados através da equação (2.1):

$$ST = \frac{(P_2 - P_{1,105})}{V_a} \times 10^6 \quad (2.1)$$

em que:

$ST$ : Concentração de sólidos totais na amostra (mg/L);

$P_{1,105}$ : Tara do cadinho a  $105\pm 2^\circ\text{C}$  (g);

$P_2$ : Peso do cadinho com a amostra seca após secagem a  $105\pm 2^\circ\text{C}$  (g);

$V_a$ : Volume da amostra (mL).

Os cadinhos contendo as amostras secas foram posteriormente calcinados na mufla (Heraeus-electronic), a  $550\pm 50^\circ\text{C}$ , durante duas horas. Os cadinhos contendo as cinzas das amostras foram depois arrefecidos num exsiccador com sílica-gel, tendo sido em seguida pesados numa balança (Denver Instrument Company, TR-204) com uma precisão de  $\pm 0,0001$  g. Os Sólidos Fixos (SF) foram calculados através da equação (2.2):

$$SF = \frac{(P_3 - P_{1,550})}{V_a} \times 10^6 \quad (2.2)$$

em que:

$SF$ : Concentração de sólidos fixos na amostra (mg/L);

$P_{1,550}$ : Tara do cadinho a  $550\pm 50^\circ\text{C}$  (g);

$P_3$ : Peso do cadinho com cinzas após calcinação a  $550\pm 50^\circ\text{C}$  (g);

$V_a$ : Volume da amostra (mL).

Os Sólidos Voláteis foram calculados através da equação (2.3):

$$SV = ST - SF \quad (2.3)$$

em que:

*SV*: Concentração de sólidos voláteis na amostra (mg/L);

*ST*: Concentração de sólidos totais na amostra (mg/L);

*SF*: Concentração de sólidos fixos na amostra (mg/L).

Os Sólidos Suspensos Totais (SST) e os Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) foram quantificados após filtração de 50 mL das amostras de água, em filtros de nitrato de celulose com uma porosidade de 0,45 µm (Whatman – Schleicher & Schuell), previamente tarados a 105±2°C. Os filtros, contendo os sólidos suspensos, foram secos numa estufa (Mettler), a 105±2°C, durante uma hora. Foram depois arrefecidos num exsiccador contendo sílica-gel e foram posteriormente pesados numa balança (Denver Instrument Company, TR-204) com uma precisão de ±0,0001 g. Os SST foram determinados através da equação (2.4):

$$SST = \frac{(P_2 - P_{1,105})}{V_a} \times 10^6 \quad (2.4)$$

em que:

*SST*: Concentração de sólidos suspensos totais na amostra (mg/L);

*P<sub>1,105</sub>*: Tara do filtro a 105±2°C (g);

*P<sub>2</sub>*: Peso do filtro com sólidos após secagem a 105±2°C (g);

*V<sub>a</sub>*: Volume da amostra (mL).

Os SDT foram calculados através da equação (2.5):

$$SDT = ST - SST \quad (2.5)$$

em que:

*SDT*: Concentração dos sólidos dissolvidos totais (mg/L);

*ST*: Concentração dos sólidos totais (mg/L);

*SST*: Concentração dos sólidos suspensos totais (mg/L).

## 2.4 Quantificação de metais e metalóides nas amostras de água

Para se quantificar os teores totais dos metais e metalóides Mn, Cu, Zn, Fe e As nas amostras de água colhidas no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão, efectuou-se uma digestão prévia de um volume de 45 mL de cada uma das amostras de água conservadas com ácido nítrico. A digestão foi realizada com uma mistura de 4 mL de ácido nítrico (65% v/v HNO<sub>3</sub>, PANREAC) e 1 mL de ácido clorídrico (37% v/v HCl, PANREAC) (*aqua regia*). A digestão foi efectuada num digestor micro-ondas (Milestone, Ethos 1600), de acordo com o seguinte programa: rampa – atingiu-se a temperatura de 170°C, em 10 min; digestão – manteve-se a temperatura de 170°C, durante 10 min. Os digeridos foram depois filtrados por membranas filtrantes de *nylon* com uma porosidade de 0,2 µm (Whatman) e o volume foi corrigido para 50 mL com água ultra-pura (Millipore, Mili-Q Academic). Os metais acima indicados foram posteriormente quantificados por espectroscopia de absorção atómica (Thermounicam, Série M). A quantificação dos metais Mn, Cu, Zn e Fe foi efectuada com chama, alimentada por uma mistura de ar/acetileno. O metalóide As foi quantificado por geração de hidretos (Thermounicam, VP90), após reacção com uma solução de ácido clorídrico (10% v/v HCl) e borohidreto de sódio (1% v/v NaBH<sub>4</sub>), com chama alimentada por uma mistura de ar/acetileno.

Para se quantificar as fracções dissolvidas dos metais acima indicados, efectuou-se uma filtração de um volume de 45 mL de cada uma das amostras de água conservadas no frio, com membranas filtrantes de *nylon* com uma porosidade de 0,2 µm (Whatman) e adicionou-se uma mistura de 4 mL de ácido nítrico e 1 mL de ácido clorídrico para que a matriz fosse idêntica à dos padrões. O procedimento da quantificação dos metais realizou-se de modo idêntico ao que foi indicado anteriormente para as amostras digeridas.

## 2.5 Quantificação da toxicidade aguda das amostras de água

Para se quantificar o nível de toxicidade aguda das amostras de água colhidas no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão utilizou-se o ensaio Microtox (Microbics, Modelo 500). Este ensaio tem como princípio a utilização da bactéria *Vibrio fischeri*, a qual tem como característica principal a emissão de luz (bioluminescência). Assim, é monitorizada a luminescência desta bactéria, antes e após o seu contacto com a amostra, cuja toxicidade se pretende avaliar.

A redução da bioluminescência após um determinado período de tempo de contacto com a amostra indica uma inibição metabólica deste organismo, evidenciando a toxicidade da amostra. Este ensaio é bastante sensível, permitindo avaliar níveis de toxicidade muito reduzidos (qualquer alteração provocada na actividade metabólica da bactéria é geralmente registada como uma alteração da intensidade de bioluminescência) (EN ISO 11348-3:2008).

O ensaio Microtox foi realizado em meio salino (2% NaCl), dado que a bactéria habita ambientes salobros e marinhos. A percentagem de inibição da bioluminescência, obtida com diferentes concentrações de cada amostra, foi calculada pela comparação com um controlo negativo (água bidestilada e sal). A partir da relação dose-resposta, calculou-se a concentração da amostra que provoca uma redução de 50% na emissão de luz pela bactéria, a qual se designa por

Concentração Efectiva da amostra para 50% de efeito, relativamente a um período de exposição de 30 min ( $CE_{50} - 30$  min). De acordo com esta metodologia, quanto menor for o valor de  $CE_{50} - 30$  min, maior será o nível de toxicidade aguda da amostra.

## 2.6 Estirpes bacterianas e condições de crescimento

Para os procedimentos de clonagem e amplificação dos plasmídeos foram utilizadas as células bacterianas *Escherichia coli* XL1-Blue (genótipo: *recA1endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac1 [F'proAB lacIqZDM Tn10 (Tet<sub>r</sub>)]*, Stratagene). Estas foram incubadas a 37°C por 16 h em meio líquido Luria-Bertani (LB) (triptona 1% [Merck], extracto de levedura 0,5%, NaCl<sub>2</sub> 0,5% [Merck], pH 7,5). A selecção dos plasmídeos foi realizada na presença de ampicilina (Sigma) com uma concentração final de 100 µg/mL.

## 2.7 Preparação e transformação de células competentes de *E. coli*

A preparação de células competentes de *E. coli* iniciou-se com a incubação de uma colónia isolada, proveniente de um riscado em placa de LB (LB líquido, ágar 2%), em 10 mL de meio SOB (*Super Optimal Broth*, 2% triptona [Bacto™], 0,5% extracto de levedura, 2,5 mM KCl [Merck], 100 mM NaCl [Merck], 10 mM MgCl<sub>2</sub> [Merck], 10 mM MgSO<sub>4</sub> [AMRESCO]) durante 16 h a 37°C e com agitação 4 g. As células, em fase estacionária, foram diluídas em 300 mL de SOB e incubadas a 24°C (4 g) por aproximadamente 16 h, até à obtenção de uma densidade óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,6. As células foram incubadas no gelo durante 10 min e foram centrifugadas a 900 g durante 10 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 96 mL de meio TB (*Terrific Broth*, 10 mM PIPES [Sigma], 15 mM CaCl<sub>2</sub> [Merck], 250 mM KCl [Merck], pH ajustado a 6,7 com KOH [Riedel-de Haën], 55 mM MnCl<sub>2</sub> [Sigma]) e incubado no gelo durante 10 min. As células foram centrifugadas a 900 g durante 10 min a 4°C e novamente ressuspenso o *pellet* em 24 mL de TB refrigerado. Adicionou-se 3,36 mL de DMSO (dimetilsulfóxido, Baker) e, após incubação no gelo durante 10 min e congelamento rápido com azoto líquido, as células competentes foram aliquoteadas e armazenadas a -80°C.

Para a transformação das bactérias, a cada alíquota de 250 µL de células competentes de *E. coli*, adicionou-se 0,2-0,4 µg de DNA plasmídico. A mistura foi incubada no gelo durante 30 min e as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C durante 45 s. Adicionou-se 800 µL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolic repressor*, constituído por SOB suplementado com 20 mM de glucose) e incubou-se a cultura durante 1 h a 37°C com agitação. As células foram centrifugadas durante 10 min a 900 g e plaqueadas em LB suplementado com ampicilina, 40 µL de X-Gal (40 µg/mL) e 100 µL de IPTG (100 mM) espalhado, homogeneamente, à superfície da placa para selecção dos plasmídeos recombinantes. Após incubação das placas a 37°C durante 16 h, as colónias (brancas) seleccionadas foram incubadas em meio líquido LB suplementado com ampicilina (LBamp) a 37°C durante 16 h. Procedeu-se então ao isolamento do DNA plasmídico (secção 2.8) e os

clones foram analisados através da digestão com enzimas de restrição específicas e posterior separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose.

## **2.8 Extracção de DNA plasmídico de bactérias**

A extracção de DNA plasmídico de células bacterianas foi realizada com o *kit ZR Plasmid Miniprep Kit-Classic* (ZYMO RESEARCH). As células de *E. coli* foram ressuspensas em 200 µL do “Tampão 1”, em seguida foram adicionados 200 µL de “Tampão 2”, misturou-se e acrescentou-se de seguida 400 µL do “Tampão 3”, misturando-se novamente. A mistura foi centrifugada durante 2 min, transferiu-se o sobrenadante para colunas de filtração e foi centrifugado novamente durante 30 s. Adicionou-se 200 µL de “Tampão de Lavagem”, foi centrifugado durante 30 s e acrescentou-se 400 µL de “Tampão de Lavagem” de plasmídeo, centrifugando-se durante 1 min. Para eluir o DNA, adicionou-se 40 µL de água mQ e centrifugou-se durante 30 s, num tubo de 1,5 mL.

## **2.9 Estirpes de levedura e condições de crescimento**

As estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas e construídas no presente estudo estão listadas na Tabela 2.1. Para o crescimento em meio líquido, as leveduras foram inoculadas em meio completo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (extracto de levedura 1% [BD Biosciences], bacto-peptona 2% [BD Biosciences], glucose 2% [VWR]) ou em meio mínimo (*Yeast Nitrogen Base* [YNB] 6,85 g/L [BD Biosciences) suplementado com diferentes fontes de carbono (glucose 2%, sacarose 2% [VWR], galactose 2% [VWR], galactose 1% ou rafinose 2% [VWR]) e com os aminoácidos (Sigma) apropriados, de acordo com as auxotrofias das respectivas estirpes. As culturas foram incubadas por um período de 16 h a 30°C.

**Tabela 2.1** – Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fonte</b>
BY 4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY <i>yap8</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPR199c::kanMX4</i>	Menezes <i>et al.</i> , resultados não publicados
BY <i>acr3</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; acr3Δ::HIS3</i>	O presente trabalho
BY <i>acr3 yap8</i>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; acr3Δ::HIS3; YPR199c::kanMX4</i>	O presente trabalho
SEY 6210	<i>MATa; leu2-3; 112 ura3-52; his3Δ200; trp1Δ901; lys2-801; suc2Δ9; Mel<sup>r</sup></i>	Shahi <i>et al.</i> , 2010
SEY <i>cdk8</i>	<i>MATa; leu2-3; 112 ura3-52; his3Δ200; trp1Δ901; lys2-801; Mel<sup>r</sup>; cdk8Δ::TRP1</i>	Shahi <i>et al.</i> , 2010
SEY <i>yap8</i>	<i>MATa; leu2-3; 112 ura3-52; his3Δ200; trp1Δ901; lys2-801; suc2Δ9; Mel<sup>r</sup>; yap8::kanMX4</i>	O presente trabalho
SEY <i>cdk8 yap8</i>	<i>MATa; leu2-3; 112 ura3-52; his3Δ200; trp1Δ901; lys2-801; Mel<sup>r</sup>; cdk8Δ::TRP1; yap8::kanMX4</i>	O presente trabalho

## 2.10 Preparação e transformação de células competentes de *S. cerevisiae*

Uma cultura de *S. cerevisiae* em fase estacionária foi diluída para uma OD<sub>600</sub> de 0,15 em 20 mL de meio para a preparação de células competentes. As culturas foram incubadas até OD<sub>600</sub> de 0,7 a 30°C com agitação a 4 g. As células foram centrifugadas a 2.500 g durante 1 min e o *pellet* (sedimento) foi lavado duas vezes com 5 mL de água bidestilada estéril. As células foram transferidas para tubos *ependorf* e foram lavadas com 1 mL de solução LiAc/TE (Tris Base 10 mM [Roche], EDTA 1 mM [Merck], Acetato de Lítio 0,1 M [Sigma]). O *pellet* (sedimento) foi ressuscitado em 400 µL de LiAc/TE e as células competentes foram incubadas a 4°C pelo menos durante 2 h antes da sua utilização.

Para a transformação das células competentes, a 50 µL destas células foram adicionados 1 µg de DNA plasmídico ou 4 µg de cassete de disrupção purificada, 50 µg de DNA de esperma de salmão (Sigma) previamente desnaturado (5 min a 100°C e 2 min no gelo) e 300 µL de solução PEG3350 40% (Sigma). Após a homogeneização da amostra, estas foram incubadas a 30°C, durante 30 min a 4 g e foram submetidas a um choque térmico em banho-maria a 42°C, durante 15 min. Adicionou-se às amostras 800 µL de água bidestilada estéril e estas foram centrifugadas, a 2.500 g durante 1 min. As células foram plaqueadas em meio selectivo e incubadas a 30°C durante 48 h. No caso das cassetes de disrupção, após a lavagem das células com água, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de YPD e as células foram incubadas a 30°C com agitação durante 3 h. Após a recuperação das células, as culturas foram centrifugadas e as células foram plaqueadas em meio selectivo (YPD-geneticina [100 µg/µL, Sigma] ou meio sintético sem histidina). Neste caso, as placas foram

incubadas durante 3 dias a 30°C. A correcta inserção da cassette de disrupção no genoma de levedura foi confirmada por PCR, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.13.

### 2.11 Extração de DNA genómico de levedura

A extração de DNA genómico a partir de células de levedura foi realizada utilizando-se o *kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep<sup>TM</sup>* (ZYMO RESEARCH). Em resumo, entre 50-100 mg de células de *S. cerevisiae* foram ressuspensas em 200 µL de água, às quais foram adicionadas 750 µL de “Solução de Lise” e esferas de vidro. Para lisar as células, os tubos foram colocados num agitador automático durante 5 min, na velocidade máxima. Após centrifugação durante 1 min a 10.000 g, transferiu-se o sobrenadante para uma coluna de filtração e centrifugou-se novamente durante 1 min a 7.000 g. Após a adição de 1.200 µL de “Tampão de Ligação” ao filtrado no tubo colector, a mistura foi transferida para uma nova coluna de filtração e foi centrifugada a 10.000 g durante 1 min. Foram adicionados 200 µL de “Tampão de Pré-lavagem de DNA”, as amostras foram centrifugadas e lavadas com 500 µL de “Tampão de Lavagem de DNA”. Por fim, adicionou-se 50 µL de “Tampão de Eluição” e o DNA foi eluído mediante centrifugação a 10.000 g durante 30 s.

### 2.12 Purificação de DNA

Para a purificação de DNA utilizou-se o *kit DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5* (ZYMO RESEARCH). A 50 µL de solução contendo o DNA foram adicionados 250 µL de “Tampão de Ligação”, a mistura foi transferida para colunas de filtração e centrifugada a 13.000 g por 30 s. O DNA imobilizado na coluna foi lavado com 200 µL de “Tampão de Lavagem” e procedeu-se a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após a segunda lavagem, o DNA foi eluído da coluna com 10 µL de água mQ e mediante centrifugação a 13.000 g por 60 s.

Para extração de DNA a partir de géis de agarose, utilizou-se o *kit Zymoclean<sup>TM</sup>, Gel DNA Recovery* (ZYMO RESEARCH). Em resumo, o fragmento de agarose contendo o DNA foi cortado com o auxílio de uma lâmina e transferido para um tubo de 1,5 mL. Ao fragmento de agarose foram adicionados três vezes o volume de amlodipina besilato (ADB) (ex.: 300 µL de ADB para um fragmento de agarose de 100 mg). A mistura foi incubada a 55°C, durante 5-10 min, para liquefazer completamente o gel. Seguidamente, a mistura foi centrifugada a 13.000 g, por 30 s e transferida para uma coluna de filtração de DNA. Após centrifugação nas mesmas condições, foram adicionados 200 µL de solução “Tampão de Lavagem” de DNA e centrifugou-se novamente, repetindo-se este passo duas vezes. Por fim, o DNA foi eluído da coluna após a adição de 10 µL de água mQ e centrifugação a 13.000 g, por 30 s.

### 2.13 Construção de estirpes mutantes

Para a obtenção das estirpes mutantes foram utilizadas cassetes de histina e canamicina. As respectivas cassetes de disrupção foram amplificadas por PCR utilizando-se os plasmídeos pUG6 e pFA6a-His3MX6 (Tabela 2.2) e os oligonucleótidos listados na Tabela 2.3. As reacções de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 50 ng de DNA molde, 25 pmol de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da reacção contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Nzytech) num volume final de 50 µL. Os ciclos de PCR foram realizados no termociclador Trio-Thermoblock (Biometra) conforme se segue: 3 min a 95°C, 35 ciclos [30 s a 95°C, 30 s a 52°C, 2 min a 72°C] para amplificação da cassette de histidina ou [30 s a 95°C, 30 s a 54°C, 1 min 30 s a 72°C] para amplificação da cassette de canamicina, e uma extensão final de 10 min a 72°C. Após monitorização em gel de agarose, os produtos de PCR foram purificados de acordo com o procedimento descrito na secção 2.12 e o DNA foi utilizado para transformar células competentes de levedura (secção 2.10). Para selecção dos clones positivos, foi extraído o DNA genómico de colónias com crescimento em meio selectivo (secção 2.11) e o DNA foi utilizado para validação dos clones por PCR, utilizando-se as mesmas condições descritas acima e os oligonucleotídeos específicos listados na Tabela 2.3.

### 2.14 Construção dos plasmídeos recombinantes

Para a construção dos plasmídeos recombinantes YEplac195GAL1HXT7 e YEplac181GAL1FPS1, os vectores clonagem YEplac195 e YEplac181 foram linearizados por digestão dupla com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII* (Fermentas), durante 16 h e o DNA foi purificado de acordo com a secção 2.12. O promotor *GAL1* foi obtido a partir do plasmídeo pJG4-5, através da digestão com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII*. Os produtos de digestão foram separados por electroforese em gel de agarose e o fragmento correspondente a uma massa molecular de 528 pb foi purificada (secção 2.12). Todos os fragmentos foram quantificados utilizando-se o equipamento Epoch (BioTek) e a reacção de ligação foi preparada como se segue: 70 ng de vector linearizado, o fragmento correspondente ao promotor *GAL1* purificado e 1U da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs). As reacções foram incubadas por 1 h a 22°C, 14 h a 16°C e 10 min a 65°C. Os produtos de ligação foram transformadas em *E. coli* e os clones positivos foram seleccionados em meio LB sólido contendo ampicilina/X-Gal/IPTG, utilizando-se o procedimento descrito na secção 2.7. O DNA plasmídico dos clones positivos foi isolado (secção 2.8) e submetido a digestão com enzimas de restrição específicas e a electroforese em gel de agarose para confirmação dos clones.

Para clonagem dos genes *HXT7* e *FPS1* a jusante do promotor *GAL1*, procedeu-se à amplificação das respectivas *ORFs* (*Open Reading Frames*) e regiões terminadoras por PCR de acordo com as seguintes condições: 50 ng de DNA genómico, 25 pmol de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da reacção e 0,5 U da enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes), num volume final de 25 µL. Os ciclos de PCR foram realizados no termociclador Trio-

Thermoblock (Biometra), conforme se segue: 2 min a 98°C, 35 ciclos [10 s a 98°C, 20 s a 55°C (*HXT7*) ou 51°C (*FPS1*), 60 s a 72°C], com uma extensão final de 5 min a 72°C. Após confirmação do peso molecular dos fragmentos amplificados em gel de agarose, os produtos de PCR foram purificados, digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e foram novamente purificados (secção 2.12). Os plasmídeos que codificam a promotora *GAL1* (YEplac195-GAL1 e YEplac181-GAL1) foram linearizados com *HindIII*. O DNA foi purificado e procedeu-se com a ligação dos fragmentos nas mesmas condições citadas anteriormente. Os produtos de ligação foram transformados em *E. coli* (secção 2.7), foi isolado o DNA plasmídico dos clones recombinantes e a correcta orientação dos fragmentos foi monitorizada através da digestão com enzimas de restrição específicas seguida da monitorização electroforética, conforme descrito acima. Os clones com padrão de restrição esperado foram sequenciados para monitorizar a integridade da sequência da região promotora *GAL1* e das sequências codificantes e regiões terminadoras dos genes *FPS1* e *HXT7*.

**Tabela 2.2** – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

<b>Plasmídeo</b>	<b>Utilização</b>	<b>Fonte</b>
pUG6	Molde para amplificação do módulo <i>kanMX</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pFA6a-His3MX6	Molde para amplificação do módulo <i>HISMX</i>	Longtine <i>et al.</i> , 1998
YEplac195	Vector de clonagem (2 µm, <i>URA3</i> )	Gietz and Sugino, 1988
YEplac181	Vector de clonagem (2 µm, <i>LEU2</i> )	Gietz and Sugino, 1988
pJG4-5	Plasmídeo que codifica o promotor <i>Gal1</i>	Gyuris <i>et al.</i> , 1993
YEplac195GAL1HXT7	<i>Gal1-Hxt7</i>	O presente trabalho
YEplac181GAL1FPS1	<i>Gal1-Fps1</i>	O presente trabalho

**Tabela 2.3** – Oligonucleótidos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência	Utilização
<i>HXT7</i>	5' cccaagcttatgtcacaagacgctgc 3' 5' cccaagcttagtttcttctccgctc 3'	Construção <i>GAL1-HXT7</i>
<i>FPS1</i>	5' ctaaagcttatgagtaacctcaaa 3' 5' catagcttaacctaggaaagctt 3'	Construção <i>GAL1-FPS1</i>
<i>S1 YAP8</i> <i>S2 YAP8</i>	(* ) 5' gttgaaaaaacatgtcaaacggaagataag <b>gcagctgaagcttcgtacgc</b> 3' (* ) 5' caataagaaagacaatgttgcgctgtgcttag <b>cataggccactagtgatctg</b> 3'	Amplificação da cassete de canamicina para disrupção do <i>YAP8</i>
<i>A1 YAP8</i> <i>A4 YAP8</i>	5' cctactacaagaagaag 3' 5' ctgcctccaatttg 3'	PCR para confirmação da integração da cassete de canamicina no <i>locus</i> do <i>YAP8</i>
<i>S1 ACR3</i> <i>S2 ACR3</i>	(* ) 5' attcaagagaacccaaccaacaaatcatcaggttagtaga <b>atcgctacgctgcagg</b> 3' (* ) 5' gtattattcattgggtcccaagtaatttttggtagtca <b>attaggaggacccggcagat</b> 3'	Amplificação da cassete de histidina para disrupção de <i>ACR3</i>
<i>A1 ACR3</i> <i>A4 ACR3</i>	5' cgaggatgcaactctcaaac 3' 5' tgctattccatcgggcttac 3'	PCR para confirmação da integração da cassete de histidina no <i>locus</i> do <i>ACR3</i>

(\* ) Os oligonucleótidos a negrito são complementares aos oligonucleótidos da cassete a ser amplificada, enquanto que os oligonucleótidos iniciais são complementares àqueles situados imediatamente antes do codão de iniciação e depois do codão *stop* do gene a ser eliminado no genoma da levedura.

## 2.15 Ensaios fenotípicos

As estirpes foram inoculadas em 2 mL de meio mínimo, com diferentes fontes de carbono, e incubadas durante 16 h a 30°C com agitação (4 g). Os pré-inóculos foram diluídos para uma OD<sub>600</sub> de 0,15 em 2 mL de meio de cultura fresco e as culturas foram incubadas nas mesmas condições até atingir uma OD<sub>600</sub> entre 0,4-0,5. As culturas foram serialmente diluídas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM [Merck], KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM [Merck]), de modo que cada alíquota de 5 µL a ser plaqueada contivesse 10.000, 2.000, 1.000, 200, 100 e 20 células. As diluições de células foram plaqueadas em meio mínimo contendo concentrações de arsenito (NaAsO<sub>2</sub>, Merck) entre 0,133 e 16 µM ou em meio preparado com água colhida nos vários locais de colheita da Ribeira do Bodelhão e do Rio Zêzere. Após o plaqueamento das células, as placas foram incubadas a 30°C e o crescimento celular foi analisado após um período entre 40 h e 85 h.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização dos locais de colheita das amostras de água do Rio Zêzere e da Ribeira do Bodelhão

Os minerais de onde provêm os metais explorados nas Minas da Panasqueira (volfrâmio, cobre e estanho) são a volframite, calcopirite e cassiterite. Como resultado destas extracções, as escombreliras contêm partículas de quartzo, xistos, grauvaques e algum granito. Para além destas partículas, as escombreliras contêm ainda os metais cádmio e arsénio. As concentrações médias de cádmio e arsénio nos materiais depositados nas escombreliras são de 40-1.500 mg/kg e 4.000-130.000 mg/kg, respectivamente (Cavalheiro *et al.*, 2011). Como termo de comparação, os limites dos metais cádmio e arsénio para os solos industriais não devem exceder 22 mg/kg e 12 mg/kg, respectivamente (Regulamento Europeu – EUR 22805 EN - 2007). A diferença entre estes limites e aquelas concentrações destes metais nas escombreliras mostra claramente o risco potencial que estas representam para os solos e para os sistemas hídricos da região, em particular porque as medidas de controlo ambiental da contaminação gerada por estas escombreliras são muito reduzidas e antigas.

A água proveniente do interior da mina é aquela que apresenta maior caudal, podendo ser superior a 1000 m<sup>3</sup>/h, no Inverno, e cerca de 250 a 300 m<sup>3</sup>/h, no Verão. A Estação de Tratamento de Águas de Minas (ETAM), que existia até à data das colheitas das amostras de água para o presente trabalho (14 de Julho de 2011), e para a qual é encaminhada a água do interior da mina e das barragens de lama semi-impermeabilizadas, tinha uma capacidade de tratamento de 300 m<sup>3</sup>/h (Gonçalves, 2010). Deste modo, a ETAM não apresentava capacidade suficiente para tratar toda a água, principalmente na estação de Inverno, sendo o excesso encaminhado para a Ribeira do Bodelhão, sem qualquer tratamento. Contudo, em Janeiro do corrente ano (2012), foi inaugurada uma ETAM com maior capacidade para o tratamento daquelas águas residuais (Rádio Cova da Beira, Fundão, 2012). Para além desta informação ter sido veiculada por diversos órgãos de comunicação social, a empresa mineira Sojitz Beralt Tin & Wolfram Portugal SA, a actual empresa concessionária, informou que apenas o excesso do efluente produzido é tratado na nova instalação, com uma capacidade de 500 m<sup>3</sup>/h, o qual é descarregado para a Ribeira do Bodelhão e que a instalação antiga se mantém em funcionamento apenas para o tratamento da água necessária ao processo produtivo, realizado em circuito fechado, e o qual não é descarregada nessa mesma ribeira.

Apesar destes novos investimentos no controlo do impacte ambiental das minas, a falta de vegetação em torno das escombreliras e os declives acentuados propiciam a contaminação directa da Ribeira do Bodelhão e, conseqüentemente, do Rio Zêzere, através das águas de percolação e de escorrência.

Neste enquadramento, este local de estudo foi escolhido devido aos impactes ambientais químicos, físicos e paisagísticos que tem associados. O solo e a água são os compartimentos ambientais mais afectados, para além dos potenciais riscos para as populações que vivem nas povoações vizinhas e do facto do Rio Zêzere, onde a Ribeira do Bodelhão descarrega o seu caudal,

alimentar a barragem de Castelo do Bode, que é a principal fonte abastecedora de água de Lisboa (Ávila *et al.*, 2007).

As amostras de água foram colhidas no dia 14 de Julho de 2011. Deste modo, é necessário ter em conta que o caudal de água foi menor do que aquele que seria registado num mês da estação de Inverno, quando a precipitação deverá ser mais acentuada. Para além disso, a colheita de apenas uma amostra de água em cada local é apenas representativa das condições no momento da colheita, servindo estas colheitas como um primeiro exercício para o estudo biológico que foi realizado.

Com o objectivo de se avaliar o efeito das escombreyras das Minas da Panasqueira na qualidade da água do Rio Zêzere e da Ribeira do Bodelhão, foram colhidas amostras de água nos pontos indicados na secção 2.1. A avaliação dos parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, pH, condutividade e potencial redox, foi realizada no próprio local de colheita. No laboratório, as amostras de água, colhidas nos diferentes locais, foram processadas com o objectivo de se quantificar os teores de sólidos, os teores de metais e do metalóide As, assim como o nível de toxicidade aguda para a bactéria *V. fischeri*.

### 3.1.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos determinados nos locais de colheita (temperatura do ar e da água, pH, condutividade e potencial redox)

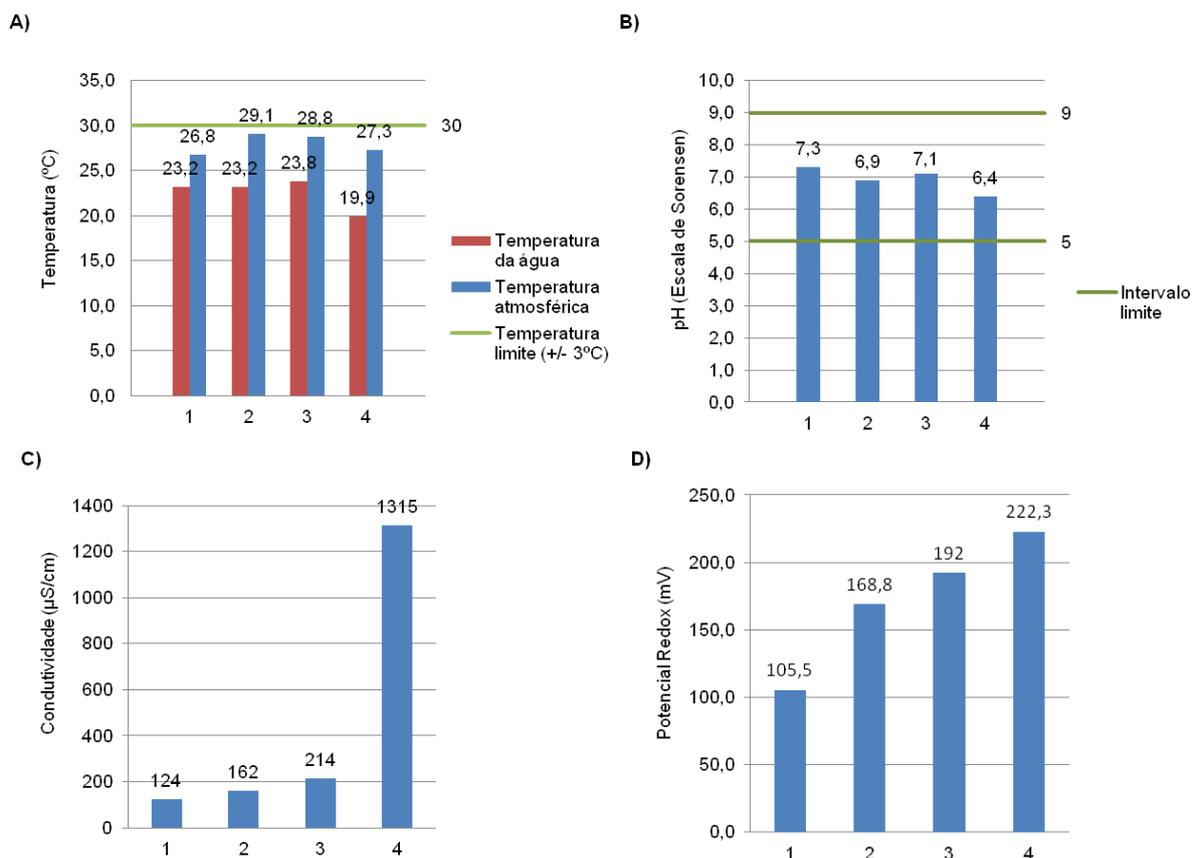
A temperatura atmosférica nos locais de colheita variou entre 27°C e 29°C. Como se pode verificar na Figura 3.1A, a temperatura da água na Ribeira do Bodelhão (local 4) apresentou a menor temperatura (19,9°C) comparativamente com os outros locais de recolha. Todos os valores de temperatura da água foram inferiores ao valor máximo para a qualidade mínima de uma água superficial (30°C), tal como é definido no Decreto-Lei nº236/98, Anexo XXI.

Na Ribeira do Bodelhão (local 4), o pH da água encontrava-se ligeiramente ácido (pH 6,4), Figura 3.1B. As amostras de água do Rio Zêzere apresentaram pH neutro (entre 6,9 e 7,1). Apesar da ligeira acidez da água no local 4, todos os valores de pH encontravam-se dentro do intervalo estipulado (pH 5,0-9,0) pelo Decreto-Lei nº236/98, Anexo XXI, relativo à qualidade mínima das águas doces superficiais (Figura 3.1B).

A amostra de água da Ribeira do Bodelhão (local 4) apresentou valores de condutividade significativamente mais elevados (1315 µS/cm) do que nos três locais de colheita do Rio Zêzere (entre 124 e 214 µS/cm) (Figura 3.1C). Considerando que a condutividade de uma amostra está normalmente associada à presença de espécies químicas dissolvidas na mesma (Batista & Filipe, 2007; Godinho, 2009), este resultado apresenta a primeira evidência de que a amostra do local 4 possuía provavelmente quantidades elevadas de sais, eventualmente sais de metais e sais sulfatados, uma vez que estes são característicos de águas de minas de volfrâmio. Para este parâmetro não se encontra definido qualquer limite no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98.

Como se pode verificar na Figura 3.1D, qualquer uma das amostras apresentava um potencial oxidante. O valor mais elevado de potencial redox, observado na amostra de água da Ribeira do Bodelhão, é possivelmente uma consequência da presença de substâncias fortemente

oxidantes na água dessa Ribeira. Para este parâmetro não está também definido qualquer valor limite no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98.



**Figura 3.1** – Parâmetros físico-químicos analisados nos diferentes locais de colheita das amostras de água no Rio Zêzere (1 - a montante do aterro, 2 - junto ao aterro, 3 - a jusante do aterro) e na Ribeira do Bodelhão (4): **A)** Temperatura atmosférica e temperatura da água; **B)** pH das amostras de água; **C)** Condutividade das amostras de água. **D)** Potencial redox das amostras de água. As linhas a verde correspondem aos valores limites correspondentes a qualidade mínima de águas superficiais como indicado no Decreto-Lei nº 236/98, Anexo XXI.

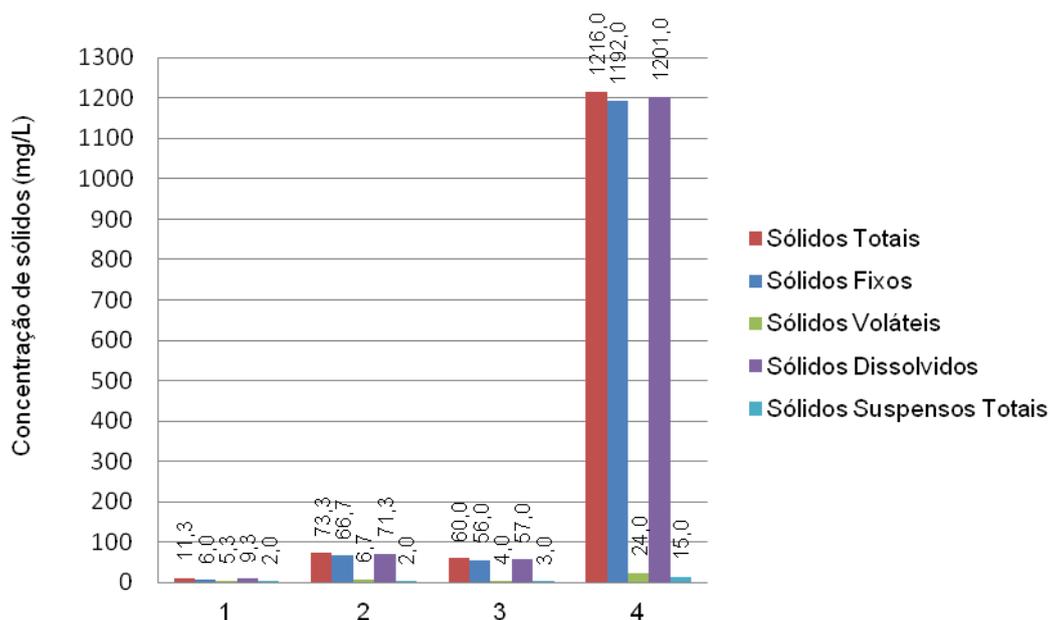
A amostra de água do local 4 foi aquela que apresentou os valores mais elevados de condutividade e potencial redox e o mais baixo de pH. Estes resultados são devido, provavelmente, a contaminação da água com substâncias provenientes da mina e podem ser explicados pelo tratamento deficitário da água proveniente desta mina, pelo próprio efluente da ETAM e/ou da água de lixiviação da escombreira situada em Barroca Grande.

### 3.1.2 Avaliação da presença de sólidos e metais (Fe, Mn, Cu, Zn e As) na água

Adicionalmente, as amostras de água recolhidas nos diferentes locais foram analisadas quanto ao teor de sólidos presente nas mesmas. Conforme evidenciado na Figura 3.2, a amostra de água da Ribeira do Bodelhão (local 4) apresentou uma maior concentração de sólidos relativamente às amostras colhidas no Rio Zêzere, provavelmente devido à grande quantidade de minerais

provenientes da água tratada na ETAM e da água lixiviada da escombreira em Barroca Grande. Estes resultados eram previsíveis, considerando-se o pH ligeiramente ácido e os valores elevados de condutividade e potencial redox obtidos para esta amostra.

O teor de sólidos totais presente na amostra de água colhida na Ribeira do Bodelhão (local 4) era constituída principalmente por sais dissolvidos de origem inorgânica, uma vez que os teores de sólidos fixos e dissolvidos eram muito elevados, enquanto que o teor de sólidos voláteis era muito reduzido (Figura 3.2). De acordo com os dados anteriores, estes sais devem ser provenientes dos efluentes da ETAM e das águas de lixiviação da escombreira de Barroca Grande. Relativamente aos sólidos, não estão definidos quaisquer valores limite no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98.



**Figura 3.2** – Concentração de sólidos totais, fixos, voláteis, dissolvidos e suspensos totais nas amostras de água colhidas no Rio Zêzere (1 - a montante do aterro, 2 - junto ao aterro, 3 - a jusante do aterro) e na Ribeira do Bodelhão (4).

Tal como foi referido na secção 3.1, além dos diversos minerais contidos nas escombreyras, estas também são constituídas por vários metais e metalóides, presentes em quantidades elevadas, tais como, ferro, manganês, cobre, zinco e arsénio. Dado que a quantificação dos sólidos demonstrou que as amostras de água continham maioritariamente sais inorgânicos dissolvidos, procedeu-se à quantificação dos metais possivelmente representados em maior concentração nas amostras de água colhidas nos quatro locais. A concentração de cada um destes metais foi analisada por espectroscopia de absorção atómica (secção 2.4) e os resultados obtidos foram confrontados com os valores máximos admissíveis (VMA), quando disponíveis (Figura 3.3). Relativamente aos metais Cu, Zn e As, estes valores encontram-se definidos no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98, relativo aos objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas doces superficiais.

Embora não exista um limite definido para os valores máximos admissíveis de Fe, referente à qualidade mínima para águas doces superficiais, os valores quantificados em todos os locais, 0,314 a

0,740 mg/L (Figura 3.3A), diferem relativamente a valores obtidos noutra estudo (Gonçalves, 2010). Este autor estudou o impacto ambiental das Minas da Panasqueira na Ribeira do Bodelhão e no Rio Zêzere, tendo realizado colheitas de água semanalmente, durante o mês de Dezembro de 2009, e obteve as seguintes concentrações de Fe: 0,21 mg/L a montante do Rio Zêzere; 0,25 mg/L junto ao aterro; 0,30 mg/L a jusante do Rio Zêzere; e 0,65 mg/L na Ribeira do Bodelhão. Os resultados obtidos por Gonçalves (2010), os quais foram um pouco inferiores aos que foram obtidos na presente dissertação, podem dever-se ao maior caudal no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão, durante o mês de Dezembro quando aquele autor efectuou as suas colheitas.

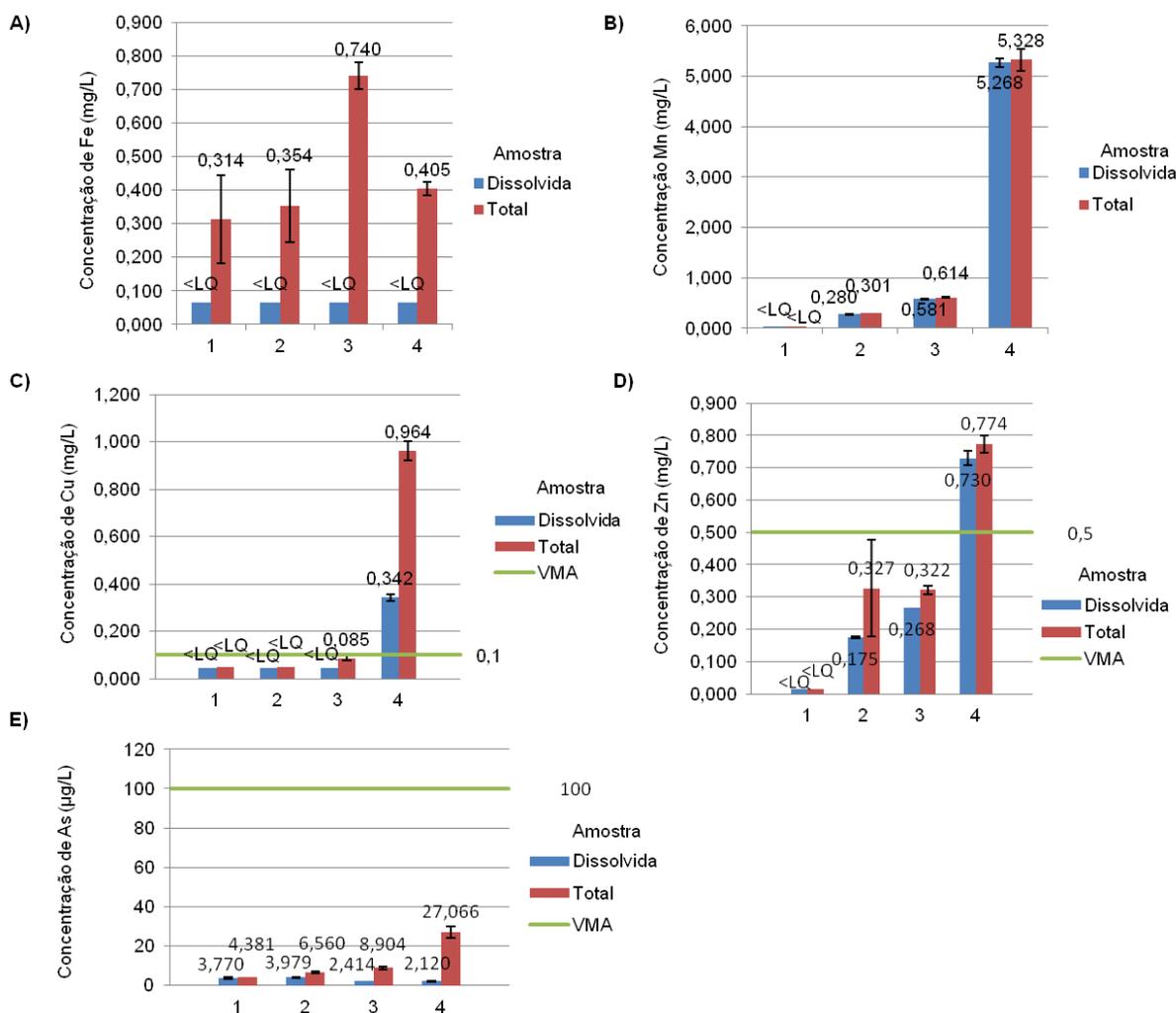
As concentrações de manganês obtidas na Ribeira do Bodelhão (local 4) foram muito mais elevadas do que nos restantes locais de colheita (Figura 3.3B), provavelmente devido às águas provenientes das minas, da ETAM e da lixiviação da escombreira. A concentração de 5,328 mg/L, registada na amostra da Ribeira do Bodelhão, foi superior à registada por Gonçalves (2010) (4,68 mg/L). Além disso, relativamente aos outros locais, este autor encontrou concentrações de Mn 10 vezes inferiores às concentrações obtidas no presente trabalho, talvez devido a um maior caudal do Rio Zêzere no mês de Dezembro. Tal como acontece com o Fe, para este parâmetro não está definido qualquer valor limite no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98.

Na Figura 3.3C estão indicadas as concentrações de Cu determinadas em todos os locais de colheita de amostras. As concentrações de Cu determinadas na amostra da Ribeira do Bodelhão (local 4) foram as mais elevadas, tanto na fracção dissolvida (0,342 mg/L) como na fracção total (0,964 mg/L), tendo excedido amplamente o valor máximo admissível (VMA) (0,1 mg/L) indicado no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98. O valor obtido por Gonçalves (2010) não ultrapassou 0,69 mg/L para o mesmo local.

As concentrações de Zn, determinadas na amostra da Ribeira do Bodelhão (local 4), foram superiores ao VMA (0,5 mg/L) definido no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98, tanto na fracção total (0,774 mg/L) como na fracção dissolvida (0,730 mg/L) (Figura 3.3D). Os resultados obtidos por Gonçalves (2010) são inferiores nos locais 2 e 3, enquanto que o valor obtido na Ribeira do Bodelhão foi de 6,20 mg/L, cerca de 8 vezes superior ao valor obtido no presente trabalho. Neste caso, o tipo de extracção mineira poderia ter variado para cobre e estanho.

Na Figura 3.3E estão apresentadas as concentrações de As obtidas nas amostras de água colhidas no Rio Zêzere e na Ribeira do Bodelhão. Em todos os locais, a concentração de As, na fracção dissolvida e na fracção total, foi inferior ao VMA (100 µg/L) definido no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98. Contudo, a Ribeira do Bodelhão (local 4) foi aquela que apresentou a maior concentração de As na fracção total (27,07 µg/L). Além disso, grande parte do arsénio encontra-se fundamentalmente na fracção suspensa, isto é, associado a partículas em suspensão existentes na água. A amostra colhida no local 3 (Rio Zêzere) apresentou a segunda maior concentração de As total (8,90 µg/L), o que poderia indicar a influência da descarga da Ribeira do Bodelhão no Rio Zêzere e/ou a influência da proximidade da escombreira localizada a algumas centenas de metros a montante, junto à povoação de Cabeço do Pião. Comparativamente aos resultados obtidos por Gonçalves (2010), os valores aqui apresentados são significativamente superiores nos locais 1 e 2 (7 vezes) e 3 (5 vezes). Em contrapartida, os resultados obtidos para a Ribeira do Bodelhão (local 4)

foram similares (27,1 µg/L no presente trabalho e 32 µg/L obtido por Gonçalves, 2010). Estes valores podem ser justificados pela pluviosidade ocorrida durante o mês de Dezembro, quando Gonçalves (2010) efectuou as suas colheitas de água.



**Figura 3.3** – Concentração dos metais, total e dissolvido nas amostras de água colhidas no Rio Zêzere (1 - a montante do aterro, 2 - junto ao aterro, 3 - a jusante do aterro) e na Ribeira do Bodelhão (4). Os valores máximos admissíveis (VMA) aplicados aos metais Cu, Zn e As encontram-se definidos no Anexo XXI do Decreto-Lei nº 236/98, relativo aos objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas doces superficiais e estão assinalados por uma linha verde. **A)** [Fe] mg/L; **B)** [Mn] mg/L; **C)** [Cu] mg/L; **D)** [Zn] mg/L; **E)** [As] µg/L.

### 3.1.3 Nível de toxicidade aguda da água

De acordo com os resultados apresentados nas secções 3.1.1 e 3.1.2, pode concluir-se que vários parâmetros, relacionados com a qualidade da água, apresentavam concentrações superiores às correntemente encontradas em sistemas hídricos sem perturbação ou com reduzida perturbação antrópica, principalmente na Ribeira do Bodelhão (local 4). Neste contexto, decidiu-se avaliar a toxicidade aguda inerente de cada amostra de água através do ensaio de toxicidade aguda Microtox.

Para se caracterizar o nível ecotoxicológico das amostras de água, utilizou-se o sistema TCS (*Toxicity Classification System*), desenvolvido pelo Professor Persoone (1999). Neste sistema são apresentadas quatro classes para classificar o nível de ecotoxicidade (adaptado de Lapa, 2004): **Classe 1** – Nível de ecotoxicidade não significativo. Nesta classe, os valores de CE<sub>50</sub> são superiores a 100%; **Classe 2** – Nível de ecotoxicidade pouco significativo. Nesta classe, os valores de CE<sub>50</sub> situam-se no intervalo ]10%; 100%]; **Classe 3** – Elevado nível de ecotoxicidade. Nesta classe, os valores de CE<sub>50</sub> situam-se no intervalo ]1%; 10%]; e **Classe 4** – Nível de ecotoxicidade muito elevado. Nesta classe, os valores de CE<sub>50</sub> são iguais ou inferiores a 1%.

A CE<sub>50</sub> das amostras de água, nos locais 1, 2 e 3, foi superior a 99% (v/v), não tendo sido registado qualquer efeito nas amostras 1 e 3 (Tabela 3.1). No entanto, houve uma redução de emissão de luz de 8,58%, após 30 min de exposição, na amostra 2, para uma concentração de amostra de 99% (v/v). Estas amostras foram classificadas na **Classe 1** (Nível de ecotoxicidade não significativo). Somente a amostra da Ribeira do Bodelhão (local 4) apresentou um nível detectável de toxicidade aguda, com um valor de CE<sub>50-30 min</sub> de 32,16% (v/v), tendo sido classificada na **Classe 2** (Nível de ecotoxicidade pouco significativo) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** – Nível de toxicidade aguda das amostras de água colhidas no Rio Zêzere (locais 1-3) e na Ribeira do Bodelhão (local 4) inferido através do ensaio Microtox.

Local de colheita	CE <sub>50</sub> – 30 min	Observações
1		Não se observou qualquer efeito
2	> 99% (v/v)	A maior percentagem de efeito foi de 8,58% (aos 30 min), para uma concentração de amostra de 99% (v/v)
3		Não se observou qualquer efeito
4	32,16% (v/v)	Efeito tóxico observado

### 3.2 Modificação genética de *S. cerevisiae* para a construção do sistema de bio-deteção

Com o objectivo de desenvolver um sistema biológico simples de detecção de arsénio na água com sensibilidade para detectar concentrações de arsénio na ordem de 10 µg/L, a quantidade máxima permitida por Lei (Decreto-Lei nº 236/98) numa água para consumo humano, foi utilizada a levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. A escolha deste microorganismo baseou-se no facto de que os mecanismos celulares de entrada e destoxificação do arsénio inorgânico estão bem caracterizados nesta levedura (Menezes *et al.*, 2004; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010), permitindo a utilização e/ou construção de inúmeros mutantes com reconhecida sensibilidade a estes compostos. Outras vantagens da utilização de *S. cerevisiae* para esta finalidade são a facilidade da sua manipulação genética, permitindo a construção de mutantes simples e duplos num curto espaço de tempo, e a simplicidade do sistema de detecção, baseado no crescimento em meios de cultura definidos contendo diferentes concentrações de arsénio.

O desenvolvimento do modelo biológico de detecção de arsénio iniciou-se com a selecção das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mais sensíveis a esse elemento, conforme já foi referido no capítulo da Introdução.

### 3.2.1 Construção de mutantes simples e duplos

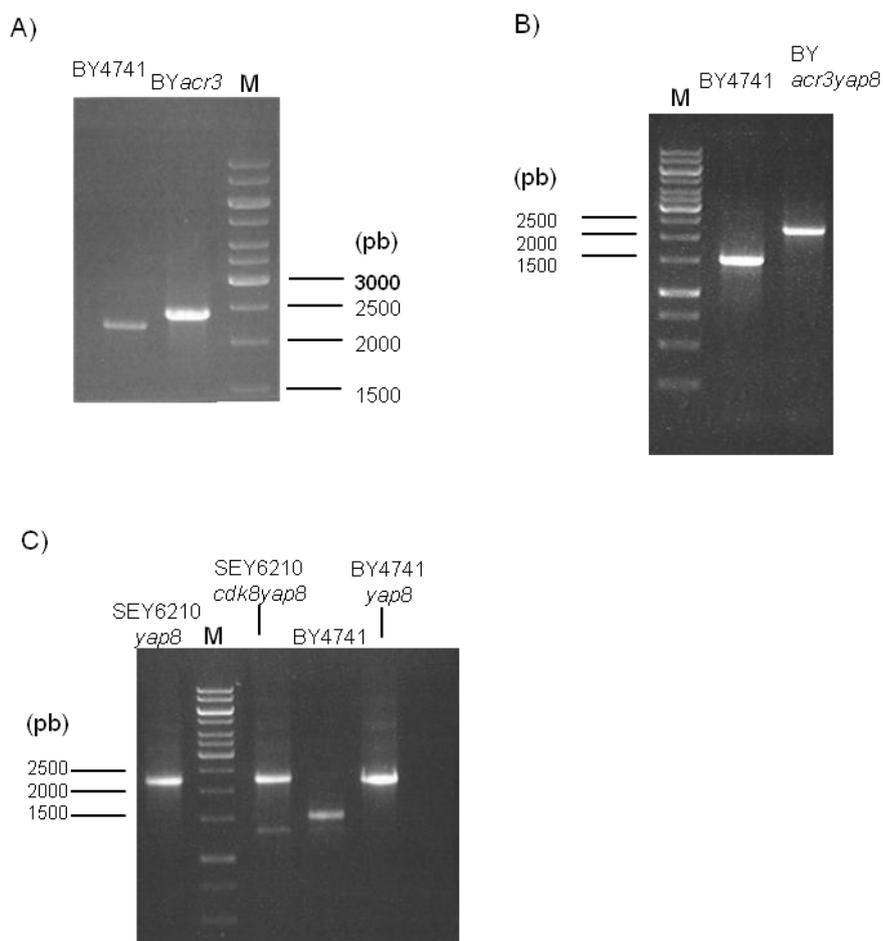
Conforme descrito na literatura (Bouganim *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004) e de acordo com resultados obtidos no nosso laboratório, as estirpes BY4741*yap8* e SEY6210*cdk8* são extremamente sensíveis aos compostos de arsénio e portanto as mais indicadas para a construção de um sistema de bio-deteção de arsenito na água. No entanto, a sensibilidade destas estirpes em meio mínimo contendo glucose não alcança a concentração de 0,133 µM (10 µg/L) (Figura 3.6), a concentração máxima permitida por lei estipulada pelo Decreto-Lei nº 236/98.

Com o objectivo de construir uma série de mutantes isogénicos, com diferentes níveis de sensibilidade ao arsenito, o gene *YAP8* foi eliminado nas estirpes SEY, SEY*cdk8* e, posteriormente, em BY4741*acr3*. Paralelamente, o gene *ACR3*, o qual codifica um exportador membranar de arsenito e cuja eliminação confere sensibilidade a este composto (Bouganim *et al.*, 2001; Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2011; Wysocki *et al.*, 1997), foi eliminado na estirpe BY4741. Para tal, foram utilizadas as cassetes de canamicina e histidina descritas no capítulo Materiais e Métodos (secção 2.13). A confirmação dos mutantes baseou-se na diferença de peso molecular dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genómico da estirpe selvagem e das respectivas estirpes mutantes (Tabela 3.2), utilizando-se oligonucleótidos específicos.

**Tabela 3.2** – Peso molecular esperado dos produtos de PCR nas respectivas estirpes selvagens e mutantes.

Gene	Tamanho pretendido no gel
<i>ACR3/ACR3::HIS</i>	2169/2357 pb
<i>YAP8/YAP8::KAN</i>	1559/2284 pb

Na Figura 3.4A está indicado o gel de agarose analítico referente à eliminação do gene *ACR3* na estirpe BY4741 para construção do mutante simples BY4741*acr3*, o qual foi posteriormente utilizado para construir o mutante duplo BY4741*acr3yap8*, através da eliminação do gene *YAP8* (Figura 3.4B). O gel correspondente à eliminação do gene *YAP8* nas estirpes SEY e SEY*cdk8*, para construção dos mutantes SEY*yap8* e SEY*cdk8yap8*, está indicado na Figura 3.4C.



**Figura 3.4** – Validação por PCR dos mutantes simples e duplos. As estirpes foram transformadas com as respectivas cassetes de eliminação, o DNA genómico das estirpes mutantes foi utilizado para amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos, e os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose. **A)** Construção do mutante BY4741*acr3*; **B)** Construção do mutante duplo BY4741*acr3yap8*; **C)** Construção dos mutantes SEY*yap8* e SEY*cdk8yap8*. M – marcador de peso molecular.

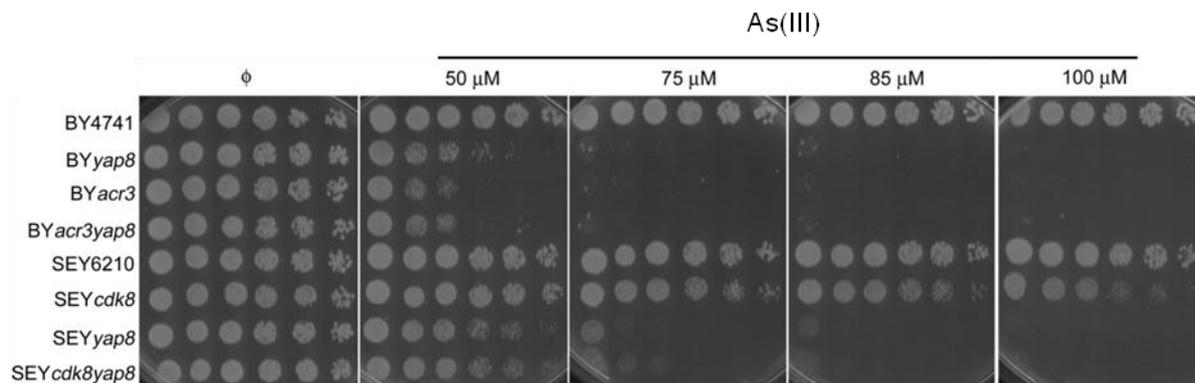
### 3.2.2 Análises fenotípicas em meio rico YPD

Uma vez confirmadas as eliminações dos genes *ACR3* e *YAP8*, todas as estirpes mutantes e as respectivas estirpes selvagens foram submetidas a ensaios fenotípicos em meio rico YPD, na presença de várias concentrações de arsenito. Como se pode observar na Figura 3.5 e de acordo com dados descritos na literatura (Menezes *et al.*, 2004), o mutante *yap8* é extremamente sensível ao arsenito. A eliminação do gene *ACR3* torna a estirpe BY4741 ainda mais sensível que o mutante *yap8*, sugerindo que na ausência do Yap8, outro regulador active parcialmente a expressão do gene *ACR3*. Resultados referenciados na literatura, assim como dados obtidos no nosso laboratório, sugerem que este regulador seja o Yap1, outro membro da família Yap (Yeast activator protein), o qual tem capacidade de se ligar à sequência de reconhecimento do Yap8, localizada no promotor do *ACR3* (Bhattacharjee & Rosen, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). O duplo

mutante *acr3yap8* é igualmente sensível ao mutante *acr3*, sendo estes os mutantes mais sensíveis nas condições estudadas.

Relativamente aos mutantes da estirpe SEY, o *yap8* foi aquele que demonstrou maior sensibilidade ao arsenito, embora este mutante seja ligeiramente mais resistente que o mutante *yap8* da estirpe BY4741 em meio rico YPD (Figura 3.5). Provavelmente, este facto é devido ao diferente genótipo das duas estirpes (Tabela 2.1). Curiosamente, o mutante *cdk8* apresentou um padrão de crescimento semelhante ao da estirpe selvagem, mostrando uma leve sensibilidade a uma concentração de arsenito igual ou superior a 100  $\mu\text{M}$ . O duplo mutante *cdk8yap8* apresentou um padrão de sensibilidade semelhante ao mutante *yap8*, ambos exibindo sensibilidade a 50  $\mu\text{M}$  de arsenito.

De acordo com os resultados preliminares de sensibilidade, obtidos em meio rico YPD, os mutantes *acr3* e *acr3yap8* evidenciaram ser os mais promissores para a construção do sistema de bio-deteção. Até então, a sensibilidade destes mutantes não alcançava a concentração alvo de 0,133  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/L}$ ).

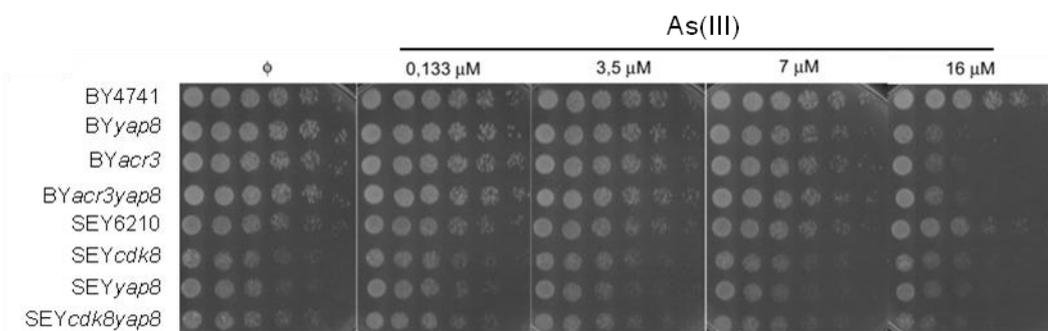


**Figura 3.5** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio YPD contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 40 h de incubação das placas a 30°C.

### 3.2.3 Optimização das fontes de carbono a serem utilizadas nos ensaios de sensibilidade

Conforme referido anteriormente, a fonte de carbono influencia o modo como o arsénio entra na célula e portanto pode alterar significativamente o padrão de crescimento das diferentes estirpes. Além disso, os mecanismos de tolerância da célula aos compostos de arsénio são reconhecidamente menos eficientes em meios sintéticos. Deste modo, após a avaliação do padrão de crescimento das diversas estirpes em YPD, foram realizados ensaios fenotípicos em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono, nomeadamente glucose 2%, sacarose 2%, galactose 2% ou galactose 1%. Dado que as células apresentam padrões de crescimento diferentes de acordo com cada fonte de carbono, foram utilizados diferentes tempos de incubação das placas, os quais foram determinados de acordo com o crescimento óptimo das colónias na placa controlo (sem arsenito).

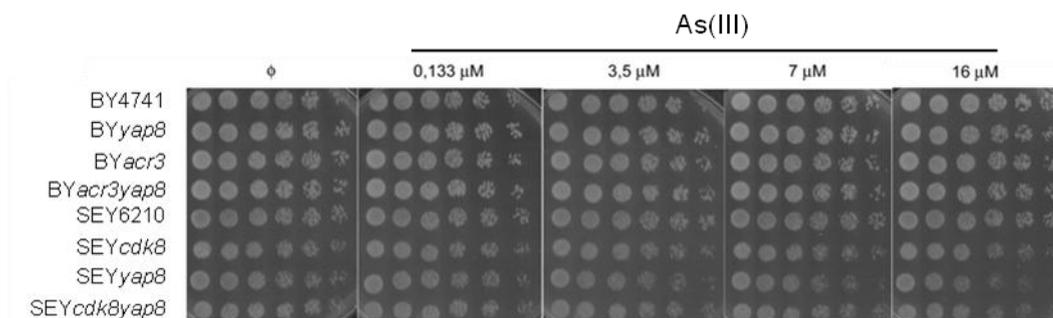
Da comparação dos padrões de crescimento das diferentes estirpes em meio rico YPD e em meio mínimo, pode-se concluir que a simples substituição do meio de cultura foi suficiente para reduzir drasticamente a sensibilidade de todas as estirpes ao arsenito (comparar Figuras 3.5 e 3.6). As estirpes do conjunto SEY apresentaram um crescimento pouco eficiente em meio mínimo suplementado com glucose. Relativamente a estas estirpes, foi possível observar um deficiente crescimento das estirpes mutantes em concentrações superiores a 16  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados), não tendo sido observada nenhuma diferença de crescimento significativa entre elas. Em relação às estirpes do conjunto BY4741, os mutantes também apresentam um padrão de sensibilidade similar que é visível a partir da concentração de 7  $\mu\text{M}$ . Em concentrações mais elevadas, o mutante *yap8* foi aquele que apresentou a maior sensibilidade (Figura 3.6).



**Figura 3.6** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com glucose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 40 h de incubação das placas a 30°C.

Para evitar a competição entre a glucose e o arsenito, pela entrada através dos transportadores de hexose, e desta forma aumentar a entrada de arsenito na célula e conseqüentemente a sensibilidade das células, os ensaios fenotípicos foram realizados em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono. Nestes ensaios observou-se uma diferença flagrante no crescimento das células, tanto na placa controlo como nos meios suplementados com baixas concentrações de arsénio, relativamente aos ensaios realizados na presença da glucose (comparar Figuras 3.6 e 3.7). Portanto, apesar do aumento da taxa de internalização do arsenito, as células não mostraram uma maior sensibilidade a este composto. Uma explicação para este resultado pode ser o facto de que, sendo a sacarose um dissacarídeo constituído por glucose e frutose, após a sua entrada nas células através da permease *Agt1* e posterior hidrólise enzimática pela invertase (Stambuk *et al.*, 2000), são disponibilizadas duas fontes de carbono que podem favorecer o crescimento das mesmas.

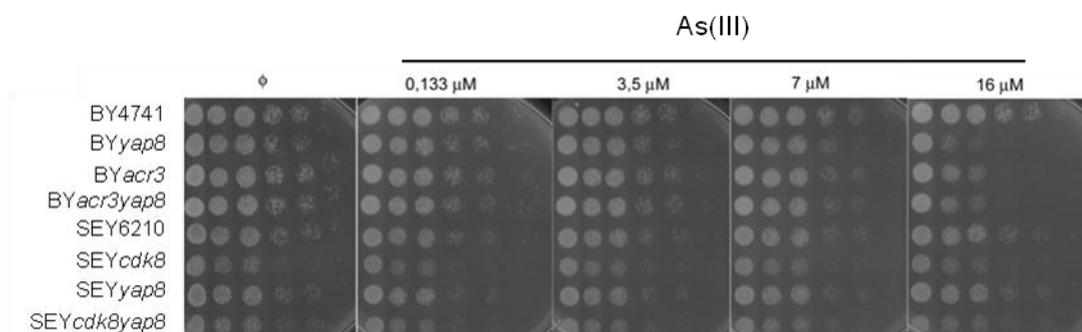
Em meio mínimo contendo sacarose como fonte de carbono, a estirpe *SEYyap8* foi a que apresentou maior sensibilidade ao arsénio (7  $\mu\text{M}$ ). Porém, em termos de aumento da sensibilidade das diferentes estirpes, estes resultados não superam aqueles observados em meio suplementado com glucose, onde os mutantes do conjunto BY4741 eram tolerantes a concentrações de arsenito inferiores a 7  $\mu\text{M}$ .



**Figura 3.7** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com sacarose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 40 h de incubação das placas a 30°C.

Dado que os ensaios utilizando-se o dissacarídeo sacarose não apresentaram os resultados desejados, como abordagem seguinte decidiu-se utilizar a galactose como fonte de carbono no meio de cultura, uma vez que esta é importada maioritariamente através do transportador Gal2 (Tschopp *et al.*, 1986; Wiczorke *et al.*, 1999). De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.8, o crescimento da estirpe BYyap8 em meios contendo galactose a uma concentração final de 2%, foi aquela que apresentou maior sensibilidade entre todas as condições testadas (3,5 μM de arsenito). Para tentar aumentar ainda mais a sensibilidade do mutante BYyap8, estes mesmos ensaios foram realizados na presença de concentrações reduzidas de galactose (1%). Porém verificou-se que, embora a sensibilidade do mutante BYyap8 fosse ligeiramente mais evidente nestas condições, esta concentração de galactose não era suficiente para sustentar um crescimento celular normal, ou seja, era necessário um maior tempo de incubação das placas (65 h) para se obter um crescimento celular óptimo (dados não mostrados).

Relativamente às estirpes do conjunto SEY, o deficiente crescimento das estirpes com mutações no gene *CDK8* dificulta a interpretação dos resultados e portanto foram excluídos nas análises subsequentes.



**Figura 3.8** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com galactose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 40 h de incubação das placas a 30°C.

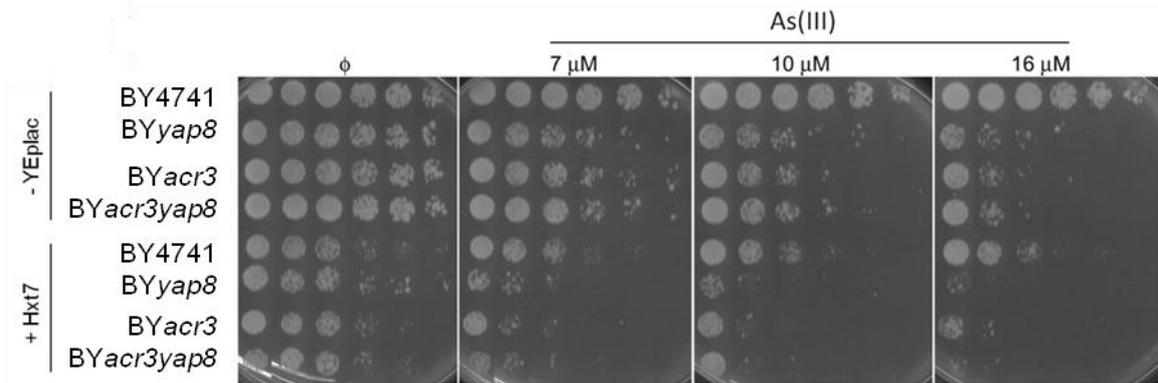
### 3.2.4 Ensaio de sensibilidade nos mutantes da série BY4741 sobre-expressando os genes *HXT7* e *FPS1*

Como já foi referido, na ausência de glucose o As(III) é transportado principalmente através dos transportadores de hexose, sendo Hxt7 aquele que apresenta maior afinidade pelo arsenito (Liu *et al.*, 2004). Por outro lado, 25% do arsenito que entra na célula na ausência da glucose é importado via Fps1 (Bhattacharjee & Rosen, 2007). De acordo com os ensaios fenotípicos utilizando meios de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono, o maior nível de sensibilidade foi observado em meio contendo galactose. Com base nestes resultados, e com o objectivo de aumentar a sensibilidade das estirpes do conjunto BY4741, decidiu-se então sobre-expressar os genes *HXT7* e *FPS1*, através da utilização do promotor indutível *GAL1* e de vectores de clonagem de múltiplas cópias.

Para tal, a estirpe selvagem e os respectivos mutantes foram primeiro transformados, individualmente com cada construção, e os ensaios fenotípicos foram realizados com o objectivo de verificar a contribuição de cada um dos plasmídeos recombinantes para o incremento da sensibilidade das estirpes. Para cada ensaio, as células foram incubadas em meio líquido contendo rafinose (2%) / galactose (1%) como fontes de carbono. A utilização de galactose, conjugada com baixas concentrações de rafinose, é importante para manter a promotora do gene *GAL1* num estado de pré-indução, estado este que permite uma rápida resposta ao aumento da concentração de galactose (2%) nas placas.

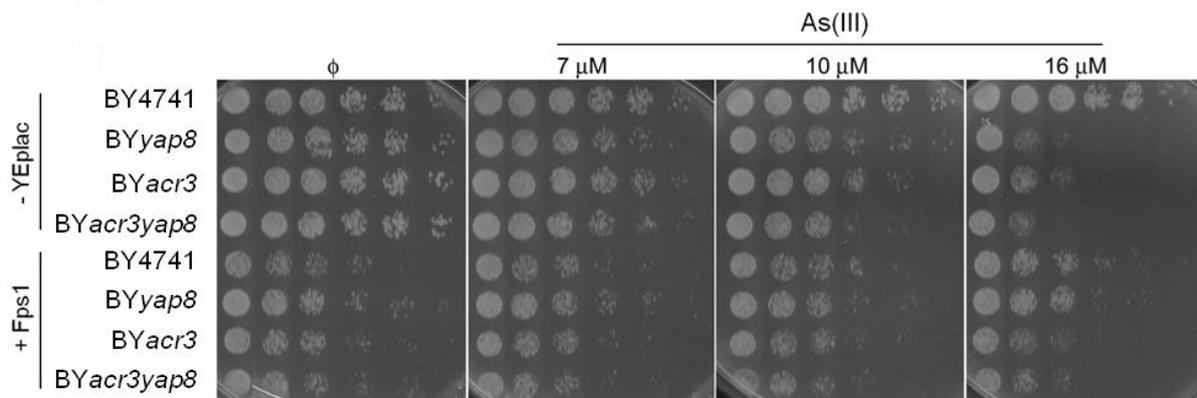
Na Figura 3.9 estão representados os fenótipos das estirpes do conjunto BY4741 transformadas com o plasmídeo YEplac195*GAL1HXT7* e os respectivos controlos negativos, obtidos pela transformação das mesmas estirpes com o plasmídeo YEplac195. Os pré-inóculos foram realizados em meio mínimo, contendo os aminoácidos necessários de acordo com a auxotrofia das estirpes e a marca de selecção do plasmídeo YEplac195 (*URA*), suplementado com rafinose 2% e galactose 1% como fonte de carbono. Após as diluições, as células foram plaqueadas em meio contendo galactose (2%) como única fonte de carbono.

Como se pode verificar nas placas sem arsénio ( $\phi$ ), as estirpes que codificam o plasmídeo recombinante apresentam um crescimento reduzido quando comparadas com as estirpes que codificam o plasmídeo controlo (sem o gene *HXT7*) (Figura 3.9). A expressão, em grandes quantidades, da permease Hxt7 pode estar a provocar stress osmótico, reduzindo a taxa de crescimento e de sobrevivência das estirpes (Greatrix & van Vuuren, 2006). Na presença de arsénio, a sobre-expressão do *HXT7* levou a um aumento significativo da sensibilidade das estirpes mutantes, tornando evidente a sensibilidade de todas as estirpes, principalmente do *yap8*, a 7  $\mu$ M de arsenito.



**Figura 3.9** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com galactose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 85 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam o plasmídeo YEplac195; (+ Hxt7) – células que codificam o plasmídeo YEplac195GAL1HXT7.

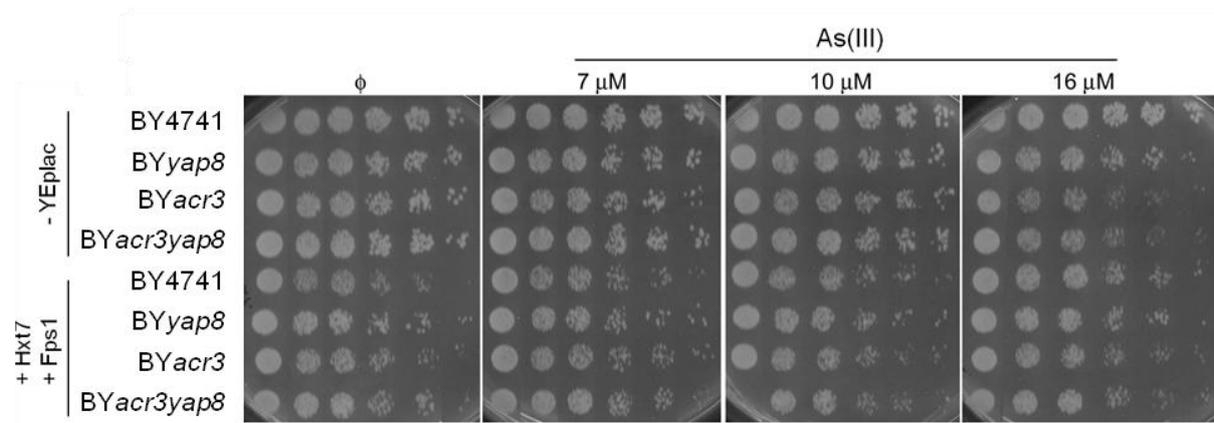
Os resultados da avaliação da sobre-expressão de gene *FPS1* no aumento da sensibilidade das estirpes do conjunto BY4741 demonstram que não há uma alteração significativa da sensibilidade das estirpes mutantes em meios contendo arsenito (Figura 3.10). Como transportador bidireccional, o Fps1 possivelmente favorece a exportação de arsenito quando a concentração intracelular alcança níveis elevados (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010; Wysocki & Tamás, 2010).



**Figura 3.10** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com galactose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 65 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam o plasmídeo YEplac181; (+ Fps1) – células que codificam o plasmídeo YEplac181GAL1FPS1.

Posteriormente, as mesmas estirpes foram co-transformadas com os plasmídeos que codificam os genes *HXT7* e *FPS1*. Como se pode verificar, não houve uma diferença significativa de sensibilidade entre os mutantes expressando os plasmídeos controle e os recombinantes (Figura 3.11), de tal forma que a leve sensibilidade do mutante *yap8* a 7 μM de arsenito (ver Figura 3.8) não é evidente nestas condições. Provavelmente, a estimulação da sensibilidade mediada pela expressão

do *HXT7*, que é facilitar a entrada de arsenito na célula, está a ser anulada pelo efeito da sobre-expressão do *FPS1*, que nas condições parece antes facilitar a exportação deste elemento.



**Figura 3.11** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado com galactose 2%, contendo concentrações crescentes de arsenito. As imagens foram obtidas após 65 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam os plasmídeos YEplac195 e YEplac181; (+ Hxt7/+ Fps1) – células que codificam os plasmídeos YEplac195 *GAL1HXT7* e YEplac181 *GAL1FPS1*.

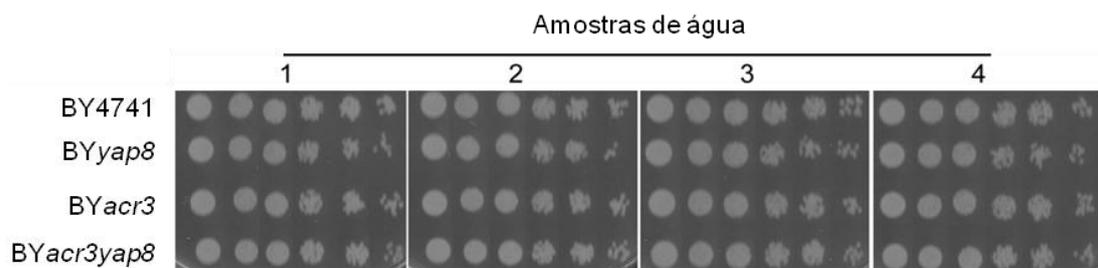
### 3.2.5 Análises fenotípicas das amostras de água do Rio Zezêre e Ribeira do Bodelhão

Após a realização dos testes de sensibilidade em condições de laboratório, ou seja, com meios de cultura contendo concentrações pré-estabelecidas de arsenito (secções 3.2.3 e 3.2.4), procedeu-se à aplicação do sistema biossensor às amostras de água colhidas nos três locais do Rio Zêzere (locais 1 a 3) e na Ribeira do Bodelhão (local 4).

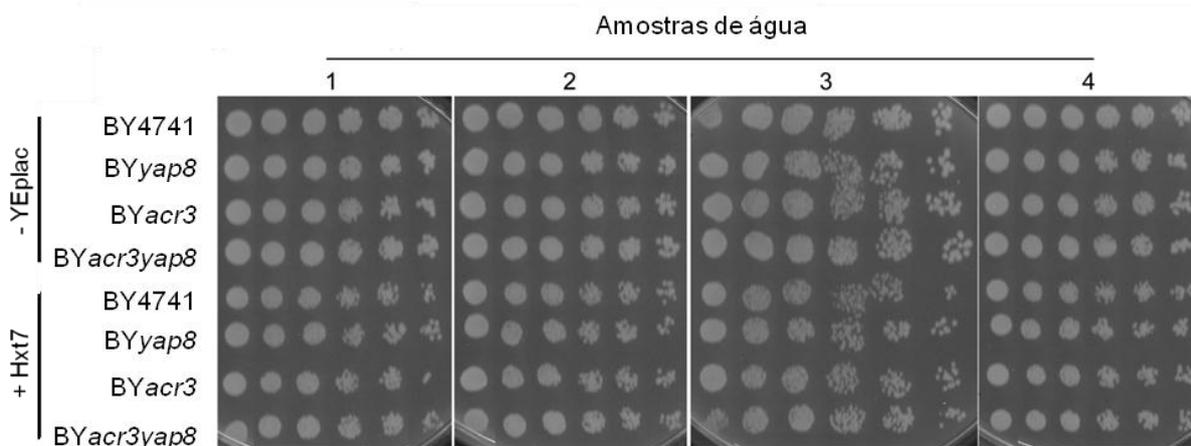
Os resultados apresentados nas Figuras 3.12 e 3.13, que representam a avaliação da sensibilidade das estirpes do conjunto BY4741 originais e aquelas transformadas com os plasmídeos YEplac195, respectivamente, não mostram nenhuma diferença de sensibilidade entre a estirpe selvagem e os diferentes mutantes, em qualquer uma das amostras de água, o que indica que a quantidade de arsénio contida nestas amostras é inferior ao limite de sensibilidade do método (7 μM de arsenito). De facto, os resultados apresentados na Figura 3.3E indicam que a concentração de arsénio dissolvido nas diferentes amostras de água não ultrapassa o valor de 4 μg/L, o equivalente a 0,05 μM. Por outro lado, o arsénio presente nas amostras de água pode estar complexado com outros elementos e desta forma não está disponível para ser internalizado pelas células.

O crescimento de todas as estirpes parece ser mais eficiente nos meios de cultura preparados com amostras de águas doces superficiais do que nos meios de cultura utilizados em condições de laboratório, nos quais se emprega água bi-destilada (resultados não mostrados). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de que as amostras de águas superficiais contêm provavelmente outros nutrientes, como por exemplo sais minerais, que podem favorecer o crescimento das leveduras num meio tão restrito como o meio mínimo. Por outro lado, sabe-se que a

levedura apresenta cerca de 282 transportadores de solutos identificados até agora, dos quais pelo menos 125 se localizam na membrana plasmática (Boles & Krämer, 2004). Estas proteínas são continuamente sintetizadas e encontram-se numa forma estável e activa à superfície da célula. São cada vez mais os transportadores identificados como sendo alvo de uma regulação relacionada com as condições ambientais. Nos últimos dez anos, tem sido estudada a regulação dos transportadores de levedura ao nível do tráfego membranar. Foram descritos pelo menos três tipos de controlo: o modo de eliminar um transportador, o destino de uma proteína acabada de ser sintetizada e, aquele que poderá explicar a rapidez com que uma célula se adapta a uma mudança repentina de meio, alguns transportadores podem ser armazenados em membranas intracelulares e reciclados para a membrana plasmática em resposta a sinais específicos. As situações fisiológicas típicas que induzem estes mecanismos de controlo são, por exemplo, a mudança de concentração de substracto, a disponibilidade de nutrientes alternativos ou a transferência das células para situações de condições adversas (Boles & Krämer, 2004). Esta dinâmica celular poderia explicar os resultados obtidos na Figura 3.12, isto é, a presença de nutrientes alternativos nas amostras de água poderiam propiciar um melhor crescimento das células nos meios de cultura preparados com água das amostras ambientais.

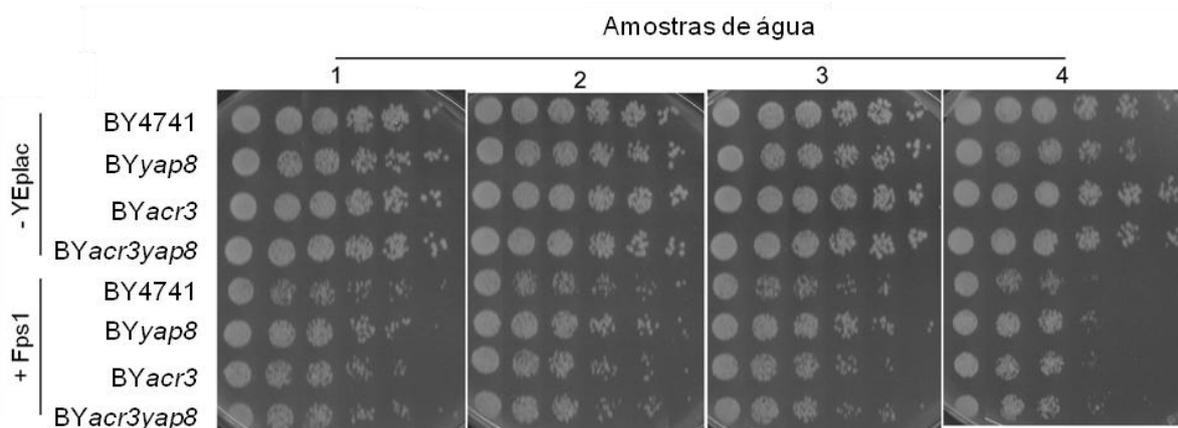


**Figura 3.12** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo, preparado com as amostras de água e suplementado com galactose 2%. As imagens foram obtidas após 65 h de incubação das placas a 30°C. (1,2,3) – diferentes locais no Rio Zezêre; (4) – Ribeira do Bodelhão.



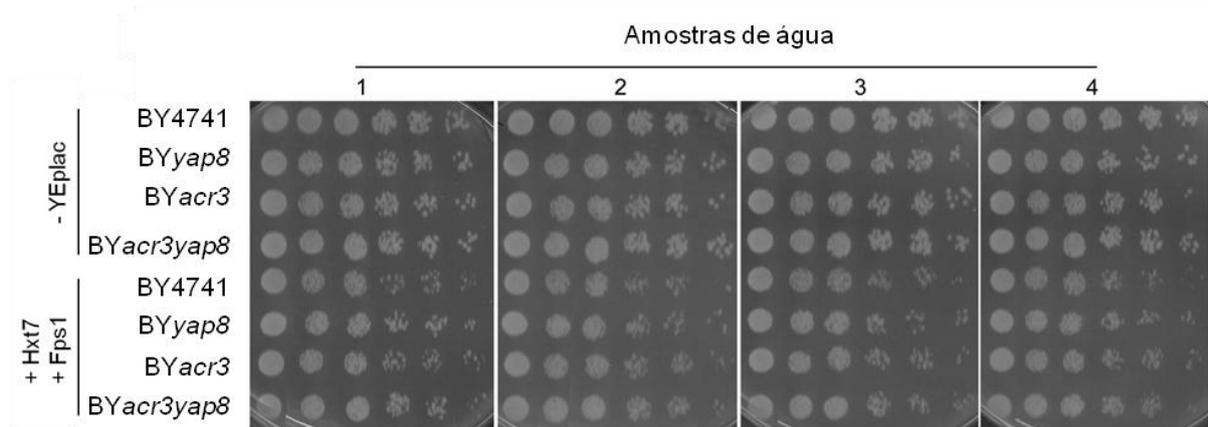
**Figura 3.13** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo, preparado com as amostras de água ambientais e suplementado com galactose 2%. As imagens foram obtidas após 85 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam o plasmídeo YEplac195; (+Hxt7) – células que codificam o plasmídeo YEplac195GAL1HXT7.

Como se pode verificar na Figura 3.14, a sobre-expressão do gene *FPS1* afecta o crescimento das estirpes selvagem e mutantes, em todas as amostras, especialmente na amostra de água da Ribeira do Bodelhão (local 4). Ao comparar estes resultados com os resultados apresentados na Figura 3.10, e tendo em consideração os metais detectados pelo método de espectroscopia de absorção atómica (Figura 3.3), provavelmente a sensibilidade aqui verificada não se deve à presença de arsénio na água das amostras de águas superficiais. É possível que a aquagliceroporina Fps1 esteja a transportar para o interior da célula qualquer elemento tóxico em excesso, originando um meio hipertónico que provoca a lise celular.



**Figura 3.14** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo, preparado com as amostras de água ambientais e suplementado com galactose 2%. As imagens foram obtidas após 85 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam o plasmídeo YEplac181; (+ Fps1) – células que codificam o plasmídeo YEplac181GAL1FPS1.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.15, o modelo biossensor representado pela co-expressão dos genes *HXT7* e *FPS1* não parece ser suficientemente sensível para detectar diferenças entre as diferentes amostras de água ambientais. Em comparação com os resultados apresentados anteriormente, nos modelos que expressam os genes *HXT7* e *FPS1* individualmente, a sensibilidade aqui verificada dever-se-à à sobre-expressão do *FPS1*. A sobre-expressão do gene *HXT7* favorece o crescimento celular, já atrás verificado nos resultados com as amostras, embora não se saiba ao certo que elemento ou composto esta permease esteja a transportar.



**Figura 3.15** – Análise fenotípica das estirpes selvagens e respectivos mutantes. Células em fase de crescimento exponencial foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio mínimo, preparado com as amostras de água ambientais e suplementado com galactose 2%. As imagens foram obtidas após 85 h de incubação das placas a 30°C. (- YEplac) – células que codificam os plasmídeos YEplac195 e YEplac181; (+ Hxt7/+ Fps1) – células que codificam os plasmídeos YEplac195GAL1HXT7 e YEplac181GAL1FPS1.

#### 4. Conclusão e Perspectivas de trabalho futuro

No presente trabalho, verificou-se que a amostra de água da Ribeira do Bodelhão (local 4) foi aquela que apresentou uma maior concentração de sais inorgânicos e aquela que provocou algum efeito tóxico no ensaio de toxicidade aguda. Contudo, nesta amostra, apenas uma pequena fracção de arsénio se encontrava biodisponível para ser captada pela levedura.

Foi demonstrado que as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* BYacr3 e BYacr3yap8 apresentam uma maior sensibilidade ao arsénio. Mostrámos também que, após a sobre-expressão dos genes que codificam para o transportador Hxt7, nestes mutantes, se observa um aumento da sensibilidade destas estirpes ao arsenito. A amostra da Ribeira do Bodelhão (local 4) continha diversos metais numa maior concentração em relação às amostras colhidas noutros locais, o que afectou o crescimento das estirpes transformadas com o plasmídeo YEplac181GAL1FPS1 (Figura 3.14). Contudo, os resultados obtidos com as estirpes transformadas com o plasmídeo YEplac195GAL1HXT7, onde se utilizaram as amostras de águas doces superficiais (Figura 3.13), não revelaram a mesma sensibilidade observada nos ensaios onde os meios de cultura foram preparados com água bidestilada e com concentrações de arsenito pré-determinadas (Figura 3.9). Uma das possíveis explicações para tal facto pode ser devido a que a maioria dos elementos encontrados na amostra da Ribeira do Bodelhão (local 4), que revelou maior toxicidade pelo método Microtox (Tabela 3.1), podem estar numa forma complexada, formando uma estrutura química de dimensões tais que não possam ser internalizadas nas células de levedura. Por outro lado o meio mínimo preparado com as amostras obtidas nos vários locais foram autoclavadas a altas temperaturas podendo levar à precipitação dos vários elementos e por isso diminuir o efeito do As. Os testes deverão ser repetidos usando em vez da autoclavagem um método de filtração para esterilizar as amostras recolhidas.

As diferenças de sensibilidade dentro de cada grupo de estirpes (SEY e BY) variaram com a fonte de carbono. Por exemplo, a sensibilidade entre BYyap8 e BYacr3 não é tão evidente em meios contendo sacarose 2% como quando comparado com os resultados obtidos em meios com galactose 2%, sensivelmente com o mesmo tempo de incubação. É necessário ter em conta cinco factores: a fonte de carbono, a concentração da fonte de carbono, o tempo de incubação, a concentração de arsénio e a estirpe mutante. Consoante a fonte de carbono e a sua concentração, diferentes transportadores são activados. A utilização de uma fonte de carbono simples como a glucose permite um melhor crescimento da levedura, necessitando de um menor tempo de incubação para obter os resultados. Para a mesma concentração de arsénio, o resultado varia com o tipo e concentração da fonte de carbono.

Como perspectiva de trabalho futuro, tal como com a bactéria *Vibrio fischeri*, a levedura *S. cerevisiae* poderá ser geneticamente manipulada de forma a aumentar a sensibilidade a diferentes elementos, podendo ser usada como um organismo medidor de toxicidade de ambientes poluídos. Este modelo terá que ser testado ao nível de detecção de substâncias na sua forma elementar ou salina e por outro lado no seu conjunto, construindo várias tabelas-padrão de detecção para as diferentes substâncias e os diferentes conjuntos.

## 5. Referências Bibliográficas

- Ávila, P., Silva, E., & Farinha, J. (2007). Distribuição de metais pesados em sedimentos de corrente e aluviões na vizinhança da mina da Panasqueira (pp. 290-293). XV Semana – VI Congresso Ibérico de Geoquímica, Vila Real (Portugal): Environmental Geochemistry.
- Batista, E., & Filipe, E. (2007). A influência da variação da condutividade e densidade da água na calibração gravimétrica. Paper presented at the Metrologia e Inovação, 2ª Conferência Nacional.
- Bhattacharjee, H., & Rosen, B. (2007). Arsenic Metabolism in Prokaryotic and Eukaryotic Microbes Molecular Microbiology of Heavy Metals. In D. Nies & S. Silver (Eds.), (Vol. 6, pp. 371-406): Springer Berlin / Heidelberg.
- Boles, E., & Krämer, R. (2004). Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport: Springer.
- Bosch, F., & Rosich, L. (2008). The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology*, 82(3), 171-179.
- Bouganim, N., David, J., Wysocki, R., & Ramotar, D. (2001). Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant ycf1 by activating ACR3 expression. *Biochemistry and Cell Biology*, 79(4), 441-448.
- Bun-ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S., & Oshima, Y. (1996). Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 29(4), 344-351.
- Bussink, R. W. (1984). *Geochemistry of the Panasqueira tungsten-tin deposit, Portugal*: Instituut voor Aardwetenschappen de Rijksuniversiteit te Utrecht.
- Cavalheiro, A., Leite, A., Fiuza, A., Fonseca, A. V., Futuro, A., Madureira, C. N., et al. (2011). Parecer sobre a realização de actividades *todo o terreno* nas escombrelas da mina da Panasqueira.
- Chilver, D. C., & Peterson, P. J. (1987). *Global Cycling of Arsenic*. In T. C. H. a. K. M. Meema (Ed.), *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment* (pp. 279-301): John Wiley & Sons Ltd.
- Diderich, J. A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttkik, M. A. H., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., et al. (1999). Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXTGenes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15350-15359.
- EFSA. (2004). European Food Safety Authority (EFSA), Report on tasks for scientific cooperation (SCOOP) 3.2.11, *Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*.
- EFSA. (2009). European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), *Scientific Opinion on Arsenic in Food*. (Vol. 7, pp. 199): EFSA Journal.
- EPA. (2005). Ecological Soil Screening Levels for Arsenic (Eco-SSL), Environmental Protection Agency (EPA). Washington.
- Freitas, M. C., Reis, M. A., Alves, L. C., & Wolterbeek, H. T. (1999). Distribution in Portugal of some pollutants in the lichen *Parmelia sulcata*. *Environmental Pollution*, 106(2), 229-235.
- Frisbie, S. H., Mitchell, E. J., Yusuf, A. Z., Siddiq, M. Y., Sanchez, R. E., Ortega, R., et al. (2005). The Development and Use of an Innovative Laboratory Method for Measuring Arsenic in Drinking Water from Western Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1196-1204.
- Futuro Silva, A., & Fiúza, A. (2011). Distribuição e comportamento do arsénio em ambientes naturais. Universidade do Porto.
- Fängström, B., Moore, S., Nermell, B., Kuenstl, L., Goessler, W., Grandér, M., et al. (2008). Breast-feeding Protects against Arsenic Exposure in Bangladeshi Infants. *Environmental Health Perspectives*, 116(7), 963-969.
- Godinho, B. R. C. (2009). *Avaliação da qualidade ambiental da envolvente das Minas da Panasqueira. Vertente solo-água-Arbutus unedo. Um caso de estudo com orientação ambiental e social*. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Gonçalves, A. C. R. (2010). Impactes Ambientais Em Áreas Mineiras Activas – O Caso da Ribeira do Bodelhão Minas da Panasqueira, VI Seminário Latino-Americano de Geografia Física, II Seminário Ibero-Americano de Geografia Física. Universidade de Coimbra.
- Greatrix, B., & van Vuuren, H. (2006). Expression of the HXT13, HXT15 and HXT17 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the HXT1 gene transcript by sugar-induced osmotic stress. *Current Genetics*, 49(4), 205-217.
- Haque, N., Peralta-Videa, J. R., Jones, G. L., Gill, T. E., & Gardea-Torresdey, J. L. (2008). Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. *Environmental Pollution*, 153(2), 362-368.

- Hussam, A., & Munir, A. K. M. (2007). A simple and effective arsenic filter based on composite iron matrix: Development and deployment studies for groundwater of Bangladesh. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(12), 1869-1878.
- IARC. (2006). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France.
- Jing, Y.-d., He, Z.-l., & Yang, X.-e. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University - Science B*, 8(3), 192-207.
- K. Lower, S. (1998). Redox equilibria in natural waters *Environmental Chemistry*. Simon Fraser University.
- Kemmer, D., McHardy, L., Hoon, S., Reberieux, D., Giaever, G., Nislow, C., *et al.* (2009). Combining chemical genomics screens in yeast to reveal spectrum of effects of chemical inhibition of sphingolipid biosynthesis. [10.1186/1471-2180-9-9]. *BMC Microbiology*, 9(1), 9.
- Kostal, J., Yang, R., Wu, C. H., Mulchandani, A., & Chen, W. (2004). Enhanced Arsenic Accumulation in Engineered Bacterial Cells Expressing ArsR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4582-4587.
- Lapa dos Santos, N. C. (2004). Contributo para a Avaliação da Ecocompatibilidade de Novos Materiais para a Construção Civil, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Doutoramento.
- Liu, Z., Boles, E., & Rosen, B. P. (2004). Arsenic Trioxide Uptake by Hexose Permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17312-17318.
- Lièvreumont, D., Bertin, P. N., & Lett, M.-C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*, 91(10), 1229-1237.
- Lone, M., He, Z.-l., Stoffella, P., & Yang, X.-e. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University - Science B*, 9(3), 210-220.
- Lovley, D. R. (2001). Anaerobes to the Rescue. *Science*, 293(5534), 1444-1446.
- M. Mateos, L., Ordóñez, E., Letek, M., & A. Gil, J. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*, 9, 207-215.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migdal, I., Migocka, M., Bocer, T., & Wysocki, R. (2010). The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Letters*, 584(4), 726-732.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migocka, M., & Wysocki, R. (2011). Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H<sup>+</sup> and Sb(III)/H<sup>+</sup> exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(7), 1855-1859.
- Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments—An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 278–283.
- Menezes, R. A., Amaral, C., Batista-nascimento, L., Santos, C., Ferreira, R. B., Devaux, F., *et al.* (2008). Contribution of Yap1 towards *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to arsenic-mediated oxidative stress. *Biochemical Journal*, 414(2), 301-311.
- Menezes, R. A., Amaral, C., Delaunay, A., Toledano, M., & Rodrigues-Pousada, C. (2004). Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS Letters*, 566(1–3), 141-146.
- Muller, D., Médigue, C., Koechler, S., Barbe, V., Barakat, M., Talla, E., *et al.* (2007). A Tale of Two Oxidation States: Bacterial Colonization of Arsenic-Rich Environments. *PLoS Genet*, 3(4), e53.
- NABIR. (2003). Natural and Accelerated Bioremediation Research (NABIR), Program, Office of Biological and Environmental Research, Office of Science, *What is Bioremediation*: U.S. Department of Energy.
- Navas-Acien, A., K. Silbergeld, E., A. Streeter, R., M. Clark, J., A. Burke, T., & Guallar, E. (2006). Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environmental Health Perspectives*, 114(5), 641-648.
- Niggemeyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E., & Rosenzweig, R. F. (2001). Isolation and Characterization of a Novel As(V)-Reducing Bacterium: Implications for Arsenic Mobilization and the Genus *Desulfitobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5568-5580.
- Rahman, M., & Axelson, O. (1995). Diabetes mellitus and arsenic exposure: a second look at case-control data from a Swedish copper smelter. *Occupational and Environmental Medicine*, 52(11), 773-774.
- RASARP. (2008). Relatório Anual do Sector de Águas e Resíduos em Portugal (2007) (Vol. Volume 4 – Controlo da qualidade da água para consumo humano).

- Reis, A. C. d. (1971). As Minas da Panasqueira (Vol. 8, pp. 3-44). Boletim de Minas: Direcção-Geral de Minas e Serviços Geológicos.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A., & Pimentel, C. (2010). The Yap family and its role in stress response. [10.1002/yea.1752]. *Yeast*, 27(5), 245-258.
- Rosen, B. P. (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3), 689-693.
- Roteiro das Minas e Pontos de Interesse Mineiro e Geológico de Portugal. Retrieved 13 Set, 2012, from <http://www.roteirodeminas.pt/>
- Rádio Cova da Beira, Fundação. Retrieved 13 Set, 2012, from <http://www.rcb-radiocovadabeira.pt/pag/12590>
- Schoof, R. A., Yost, L. J., Eickhoff, J., Crecelius, E. A., Cragin, D. W., Meacher, D. M., et al. (1999). A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food. *Food and Chemical Toxicology*, 37(8), 839-846.
- Shah, D., Shen, M. W. Y., Chen, W., & Da Silva, N. A. (2010). Enhanced arsenic accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing transporters Fps1p or Hxt7p. *Journal of Biotechnology*, 150(1), 101-107.
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 599-608.
- Singh, S., Lee, W., DaSilva, N. A., Mulchandani, A., & Chen, W. (2008). Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. [10.1002/bit.21577]. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(2), 333-340.
- Singh, S., Mulchandani, A., & Chen, W. (2008). Highly Selective and Rapid Arsenic Removal by Metabolically Engineered *Escherichia coli* Cells Expressing *Fucus vesiculosus* Metallothionein. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2924-2927.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517-568.
- Stambuk, B. U., Batista, A. S., & De Araujo, P. S. (2000). Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(2), 212-214.
- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., et al. (2003). Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for Quantitative and Rapid Measurements of Arsenite and Arsenate in Potable Water. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4743-4750.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., et al. (2006). The MAPK Hog1p Modulates Fps1p-dependent Arsenite Uptake and Tolerance in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10), 4400-4410.
- Thorsen, M., Perrone, G., Kristiansson, E., Traini, M., Ye, T., Dawes, I., et al. (2009). Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. [10.1186/1471-2164-10-105]. *BMC Genomics*, 10(1), 105.
- Tschopp, J. F., Emr, S. D., Field, C., & Schekman, R. (1986). GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 166(1), 313-318.
- Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria (ISO 11348-3:2007) (EN ISO 11348-3:2008).
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464(3), 123-128.
- Wysocki, R., Bobrowicz, P., & Ul/aszewski, S. a. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 Gene Encodes a Putative Membrane Protein Involved in Arsenite Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30061-30066.
- Wysocki, R., & Tamás, M. J. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. [10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x]. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 925-951.
- Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., Isoda, K., Yagi, K., et al. (2008). Novel Carotenoid-Based Biosensor for Simple Visual Detection of Arsenite: Characterization and Preliminary Evaluation for Environmental Application. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6730-6738.