



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

***SACCHAROMYCES CEREVISAE: COMO MODELO CELULAR  
EUCARIÓTICO***

**Fúlvio Vieira da Silva**

**dezembro, 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

**Orientador:** Prof Dr.Welington de Oliveira Cruz

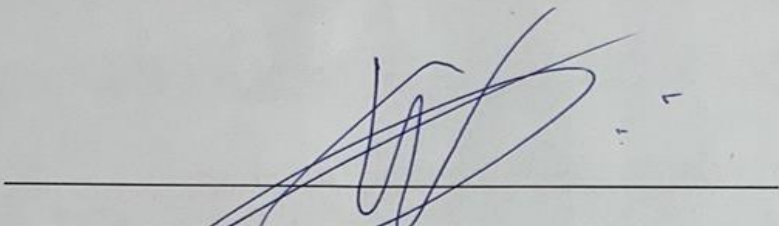
**Co-Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

**UBERLÂNDIA, 2019**

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado a chegar até aqui. A minha família e especial meus pais e meu irmão por toda dedicação e paciência contribuindo diariamente para que pudesse ter um caminho mais fácil e prazeroso durante a jornada da graduação, a minha namorada que sempre esteve presente com palavras de incentivo, e aos meus amigos de graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

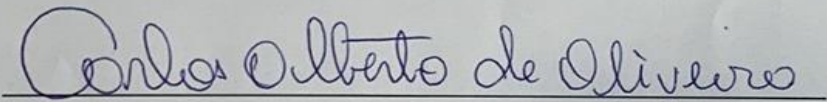
Agradeço ao Professor Doutor Carlos Alberto de Oliveira que esteve disposto a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado, e aos demais professores que estiveram presentes durante essa jornada. Aos meus pais Sebastião Vieira Nunes Sobrinho e Sueleide Martins da Silva Vieira por me apoiar e está sempre com uma palavra de incentivo pronta para continuar a caminhada, e ao meu irmão Farley Vieira da Silva por está sempre me apoiando e ajudando durante a graduação.

**COMPOSIÇÃO DA BANCA**

---

**Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz**

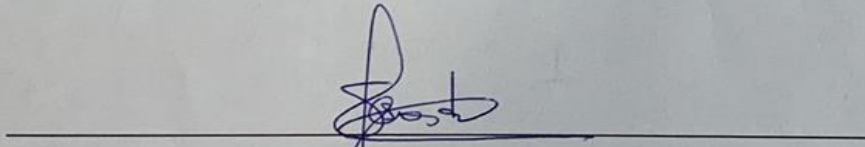
**(Orientador)**



---

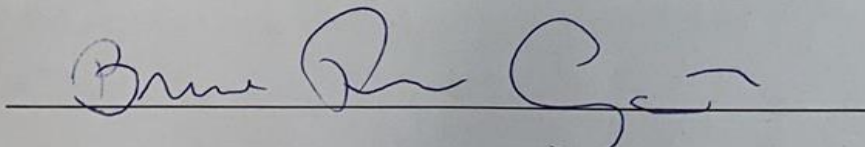
**Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira**

**(Co- Orientador)**



---

**Prof. Dr. Bruno Elias Dos santos Costa**



---

**Prof. Dr. Bruno Pereira Garcês**

## RESUMO

Neste trabalho fizemos um breve levantamento teórico sobre a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na história da humanidade, desde a sua utilização para produção de pão e destilados, passando pelo desenvolvimento da Bioquímica e sua utilização como pró- bióticos. Ressaltamos também a utilização do *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo celular adequado para testes de citotoxicidade de produtos naturais ou sintéticos, complexos inorgânicos metálicos e outros fármacos. O metabolismo energético desta levedura é similar ao de células tumorais, apresentado um grande consumo de açúcar na presença de oxigênio (efeito Warburg) e um segundo fenômeno denominado “efeito Crabtree” que se caracteriza pela capacidade de realizar mudanças reversíveis em suas condições metabólicas. Serão discutidos alguns resultados experimentais obtidos no Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia (LABIOFOT), utilizando o *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de ilustrar a importância desta levedura em ensaios de inativação fotodinâmica de micro-organismo Finalmente serão apresentadas novas estratégias de utilização do *Saccharomyces cerevisiae* através do melhoramento genético

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, metabolismo energético, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

In this work we have made a brief theoretical study on the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the history of mankind, from its use for the production of bread and distillates, through the development of biochemistry and its use as probiotics. We also emphasize the use of *Saccharomyces cerevisiae* as a suitable cellular model for cytotoxicity testing of natural or synthetic products, inorganic metal complexes and other drugs. The energetic metabolism of this yeast is similar to that of tumor cells, presented a high sugar consumption in the presence of oxygen (Warburg effect) and a second phenomenon called "Crabtree effect" characterized by this ability to make reversible changes in its metabolic conditions. We will discuss some experimental results obtained in the Laboratory of Biochemistry and Photobiology (LABIOFOT), using *Saccharomyces cerevisiae*, in order to illustrate the importance of this yeast in photodynamic inactivation tests of microorganisms. Finally, new strategies for the utilization of *Saccharomyces cerevisiae* will be presented through genetic improvement.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, energetic metabolism, antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Probiótico Florax.....	13
<b>Figura 2:</b> Próbótico com <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	14
<b>Figura 3:</b> Alce embriagado.....	14
<b>Figura 4:</b> Elefantes embriagados pela ingestão de frutos da amarula.....	15
<b>Figura 5:</b> Estrutura do <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	18
<b>Figura 6:</b> Meio ágar Sabouraud apresentando o crescimento homogêneo de colônias da levedura <i>Saccharomyces. cerevisiae</i> espalhados sobre o ágar com uma alça de platina. A fonte das leveduras foi o probiótico Florax.....	19
<b>Figura 7:</b> Unidades Formadoras de Colônias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidas pela deposição de 20 µL de uma suspensão Mc farland 0,5 diluída 1000 vezes, em ágar Sabouraud.....	20
<b>Figura 8:</b> Probiótico funcional a base de parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
<b>Figura 9:</b> Estrutura do colesterol (a) e ergosterol (b).....	22
<b>Figura 10:</b> Louis Pasteur.....	23
<b>Figura 11:</b> Eduard Buchner.....	25
<b>Figura 12:</b> Intermediários bioquímicos de alta energia encontrados na glicólise. A) 1,3 BPG B) PEP.....	26
<b>Figura 13:</b> Produção de etanol para regenerar a coenzima NAD <sup>+</sup> (14).....	27
<b>Figura 14:</b> Destinos metabólicos do piruvato .....	28
<b>Figura 15:</b> Estrutura da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD <sup>+</sup> e NADH) .....	28
<b>Figura 16:</b> Diagrama do catabolismo da glicose em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
<b>Figura 17:</b> Formação do ATP mitocondrial.....	30
<b>Figura 18:</b> Otto Heinrich Warburg.....	32



<b>Figura 19:</b> Ensaio de citotoxicidade empregando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando o método de deposição de 50 µL em várias gotas na superfície do ágar Sabouraud.....	33
<b>Figura 20:</b> Coloração de Gram de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
<b>Figura 21:</b> Estruturas do AT e AM.....	34
<b>Figura 22:</b> A) Suspensão de células de <i>Saccharomyces</i> isoladas de UFC's formadas em ágar Sabouraud. B) Suspensão de células de <i>Saccharomyces</i> incubadas com AT (100 µmol/L) por 4 horas e dializadas quatro vezes com água destilada.....	35
<b>Figura 23:</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> corados com AT (100 µmol/L) em lâmina de microscópio.....	35
<b>Figura 24:</b> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> corados com AM (100 µmol/L) em lâmina de microscópio.....	36
<b>Figura 25:</b> Lâmina de microscopia contendo um esfregaço de DNA e corada com AT.....	37
<b>Figura 26:</b> Lâmina contendo um esfregaço de DNA e corada com AM.....	37
<b>Figura 27:</b> A) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> corados com rosa de bengala (100 µmol/L) em lâmina de microscópio. B) estrutura da RB.....	38
<b>Figura 28:</b> Estrutura do equipamento de irradiação desenvolvido no LABIOFOT.....	39
<b>Figura 29 A:</b> Crescimento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> em várias diluições seriadas (nº 1= 10 <sup>-1</sup> ; nº2 = 10 <sup>-2</sup> ; nº 3= 10 <sup>-22</sup> ; nº 4= 10 <sup>-3</sup> ; nº 5=10 <sup>-4</sup> e nº 6= 10 <sup>-5</sup> ). As células foram incubadas na ausência de luz e na ausência de fotossensibilizadores.....	39
<b>Figura 29 B:</b> Crescimento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> em várias diluições seriadas (nº 1= 10 <sup>-1</sup> ; nº2 = 10 <sup>-2</sup> ; nº 3= 10 <sup>-22</sup> ; nº 4= 10 <sup>-3</sup> ; nº 5=10 <sup>-4</sup> e nº 6= 10 <sup>-5</sup> ). As células foram incubadas na de luz e na presença de 100 µmol/L de AT...	40
<b>Figura 30:</b> Inibição do crescimento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> por 50 µmol de AT. As células foram pré-incubadas como fotossensibilizador por 20 minutos, no escuro e, depois irradiadas por 20 minutos com o LED 600.....	41
<b>Figura 31 A:</b> Diluição em série de uma solução de AT (62,5 µmols/L) em água destilada, seguida pela adição de igual volume de ouro coloidal e	

incubação por 24 horas na geladeira (4 <sup>0</sup> C). A seta indica a coloração roxa das partículas de ouro coloidal agregadas pelo AT a 7,81 umols/L.....	42
<b>Figura 31 B:</b> Agregação do ouro coloidal com AT diluído. A figura ilustra com mais detalhes a forte agregação das partículas de ouro coloidal pelo AT. A cor vermelho tijolo das partículas de ouro coloidal mudou para roxo.....	42
<b>Figura 32:</b> Método utilizado no LABIOFOT para avaliar a viabilidade celular das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Seta= diluição 10 <sup>-4</sup> .....	43
<b>Figura 33:</b> RED <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
<b>Figura 34:</b> <i>Trichopyton rubrum</i> .....	44

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES**

**AM** – Azul de Metileno

**AT** – Azul de Toluidina

**ATP** – Trifosfato de Adenosina

**ATPase** – Trifosfato de Adenosina sintase

**EMP** – Via de Embelen – Meyerhof – Parnas

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**LABIOFOT** – Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia

**LED** – Light Emitting Diode

**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada

**NADH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida

**PEP** – Fosfoenolpiruvato

**RB** – Rosa de Bengala

**UFe/mL** – Unidades formadoras de colônias/mL

**UV** – Ultra Violeta

**1.3 BPE** – 1.3 Bifosfoglicerato

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGIA.....	17
4. MORFOLOGIA DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISAE</i> .....	17
5- O SURGIMENTO DA BIOQUÍMICA.....	22
6. O METABOLISMO ENERGÉTICO DO <i>SACCHAROMYCES CEREVISAE</i> .....	25
7. O ORGANISMO MODELO <i>SACCHAROMYCES CEREVISAE</i> .....	30
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
9. REFERÊNCIAS.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

O nome *Saccharomyces* foi utilizado em 1837 para definir fungos provenientes do açúcar fermentado. O gênero *Saccharomyces* contém as espécies de leveduras mais utilizadas pelo homem nas atividades de panificação e produção de etanol, seja para bebidas ou combustíveis. Destaca-se também o seu uso como probiótico, utilizado para recompor a flora intestinal prejudicada, por exemplo, pelo uso excessivo de antibióticos por via oral (1). O termo *cerevisae* é um termo antigo francês que significa cerveja (2).

A figura 1 ilustra uma medicação próbiótica contendo *Saccharomyces cerevisiae* em suspensão em pequenas ampolas com 5 mL. O probiótico Florax (produzido pelos laboratórios Hebron) tem sido utilizado no LABIOFOT (Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia – Instituto de Química – Universidade Federal de Uberlândia) para o isolamento de cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas em experimentos de inativação fotodinâmica utilizando corantes sintéticos e naturais.

**Figura1:** Probiótico Florax



**Fonte:** <https://www.farmadelivery.com.br/florax-sm-adulto-sabor-framboesa-c-5-flaconetes-de-5ml-cada> Acessado em 06/04/2019

Outros probióticos disponíveis no mercado farmacêutico contém outras espécies de leveduras, como o *Saccharomyces boulardii* (Figura 2), e esse modelo celular foi também utilizado em experimentos no LABIOFOT.

**Figura 2:** Próbiotico com *Saccharomyces boulardii*.



**Fonte:** OptiBac Probiotics Acessado em 06/04/2019

A descoberta de que a ingestão de frutos fermentados causava entorpecimento e prazer, já era conhecida pelos animais (Figuras 3 e 4), antes que os seres humanos descobrissem como controlar o processo fermentativo e qual a sua natureza molecular.

**Figura 3:** Alce embriagado



**Fonte:** <https://www.mdig.com.br/index.php?itemid=21101>

**Figura 4:** Elefantes embriagados pela ingestão de frutos da amarula



**Fonte:** <https://awebic.com/animais/alguns-elefantes-ficaram-bebados-com-fermentado-de-fruta-de-marula-e-o-resultado-foi-esse/>

Com relação à fruta amarula, com o calor ocorre um processo natural de fermentação da fruta, ocasionando uma concentração de álcool muito grande. A fermentação adicional que acontece no estômago dos animais, deixam eles embriagados com as mesmas sensações de um ser humano bêbado, com sinais e sintomas que possam aparecer em casos de bebedeira.

A descoberta do processo fermentativo pelo homem, data da antiguidade, desde os tempos dos habitantes das cavernas, pelos sumérios, egípcios antigos, assírios, chineses e babilônios (2).

Acredita-se que a humanidade tornou-se agrícola para dominar esses processos fermentativos feitos por leveduras, consideradas como “as plantas mais antigas cultivadas pelo homem”. Hoje as leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae* pertencem ao reino dos fungos (2).

O primeiro relato da produção da cerveja data de 7000 a c, porém a natureza do processo fermentativo alcoólico não era compreendida, até que o cientista francês Louis Pasteur em 1857 descobriu que o processo fermentativo alcoólico não depende de

oxigênio, necessitando de células organizadas e integras. Porém se as leveduras forem oxigenadas, ocorre produção de gás carbônico e biomassa que faz crescer o pão (3).

O trabalho de Pasteur para cervejeiros e produtores de vinhos da época levou a identificação das leveduras certas que produziam vinho e pão e não vinagre. Pasteur demonstrou que o processo fermentativo depende de células vivas, não sendo possível extrair os componentes intracelulares responsáveis pela fermentação (3).

Em 1897 foi possível extrair os componentes intracelulares da levedura e promover fermentação na ausência de células vivas. Esse trabalho feito pelo químico alemão Eduard Buchner, recebeu o prêmio Nobel em 1907 e é considerado o início da Bioquímica (4).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais importante levedura utilizada para fins fermentativos, conhecida como levedura do pão, do vinho, da cerveja (1). A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* em panificação e bebidas fermentadas teve um grande avanço com o isolamento de cepas puras isoladas por Christian Hansen em 1888 (1).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter seu genoma totalmente sequenciado em 1996 (6). É um modelo celular eucariótico ideal para estudos biológicos, possuindo um mecanismo de regulação do ciclo celular similar ao de células eucarióticas humanas (7).

Desta forma a levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada para a descoberta de novos produtos naturais ou sintéticos com propriedades anticancerígenas e antifúngicas (8).

A facilidade e segurança de seu cultivo em ágar Sabouraud, permitiu ao LABIOFOT utilizar este modelo celular em ensaios de viabilidade celular *in vitro*, utilizando diferentes fotosensibilizadores e outros compostos. O ágar Sabouraud<sup>1</sup> contém uma alta concentração de glicose e pH 5,6, pH esse que se mantém inalterado o que dificulta o crescimento de bactérias contaminantes. A composição do Ágar Sabouraud é de 10g/l de peptona que consiste em uma mistura de aminoácidos e polipeptídios resultantes da quebra de proteínas por ação de uma enzima proteolítica, 40g/l de glicose e 20g/l de ágar esses que são carboidratos.

---

<sup>1</sup> Composição do Ágar Sabouraud: Peptona 10 g/L; Glicose 40g/L; àgar 20g/L.



## 2. OBJETIVOS

A proposta deste trabalho foi fazer uma breve revisão teórica sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua importância para o homem. Serão enfatizados a morfologia estrutural da levedura, seu metabolismo energético e oncogênico, inativação por fármacos naturais e sintéticos, bem como a capacidade tintorial do *Saccharomyces cerevisiae* frente a fotossensibilizadores e sua utilização como modelo celular para ensaios de inativação fotodinâmica.

## 3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada neste trabalho envolveu inicialmente uma pesquisa bibliográfica em sites de consulta, como o Google, de artigos e revistas sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram também consultadas monografias e dissertações produzidas no LABIOFOT utilizando esta levedura, bem como alguns experimentos práticos realizados.

A observação do crescimento das colônias típicas da levedura em estudo foi feita em ágar Sabouraud.

As características tintoriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, frente ao corante fenotiazínico azul de toluidina, foram observadas em solução e em esfregaços feitos diretos em lamínas de microscopia ótica. Foram feitas também colorações dos esfregaços com a coloração de Gram e azul de metileno e rosa de bengala.

Todos os materiais utilizados foram lavados e secos. Posteriormente sofreram desinfecção utilizando etanol 70%, exposição à radiação UV e autoclavação.

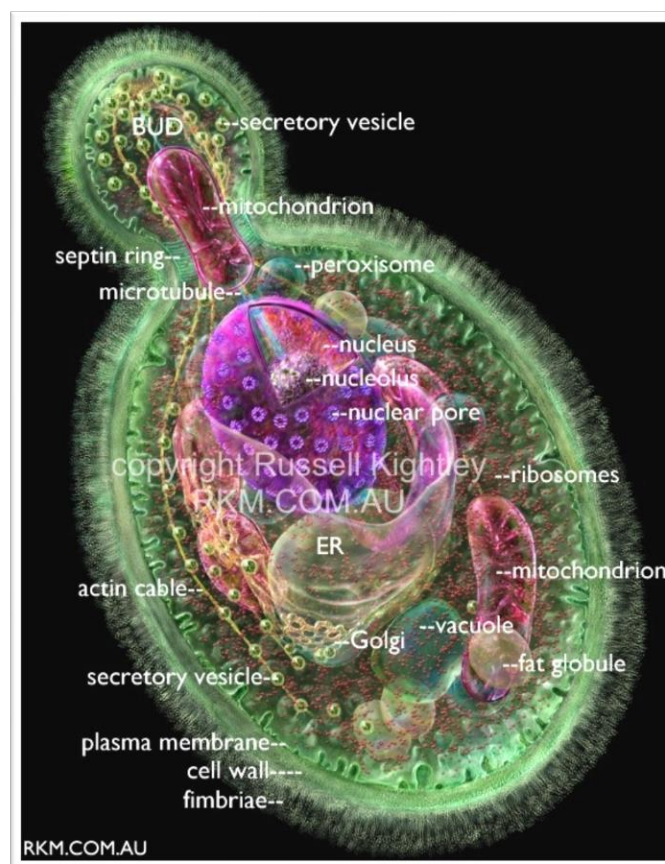
## 4. MORFOLOGIA DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é um micro-organismo eucarioto unicelular, pertence ao reino dos fungos. Por ter similaridade com células vegetais era antigamente pertencente ao reino das plantas.

O gênero *Saccharomyces* incluem muitas espécies de fungos, sendo a espécie *cerevisiae* a mais importante para o homem (9). Estas leveduras possuem uma forma oval

ou elíptica com dimensões de 4 a 6  $\mu\text{m}$  dependendo da forma existente da levedura (Figura 5).

**Figura 5:** Estrutura do *Sacharomyces cerevisiae*



**Fonte:** [www.rkm.com.au](http://www.rkm.com.au)

O crescimento do *Sacharomyces cerevisiae* em àgar Sabouraud leva de 24 a 48 horas em câmara úmida a 30<sup>0</sup> C. As colônias resultantes são brancas, cremosas, lisas e de bordas uniformes (Figura 6).

**Figura 6:** Meio ágar Sabouraud apresentando o crescimento homogêneo de colônias da levedura *Saccharomyces. cerevisiae* espalhados sobre o ágar com uma alça de platina. A fonte das leveduras foi o probiótico Florax (vide Figura 1).

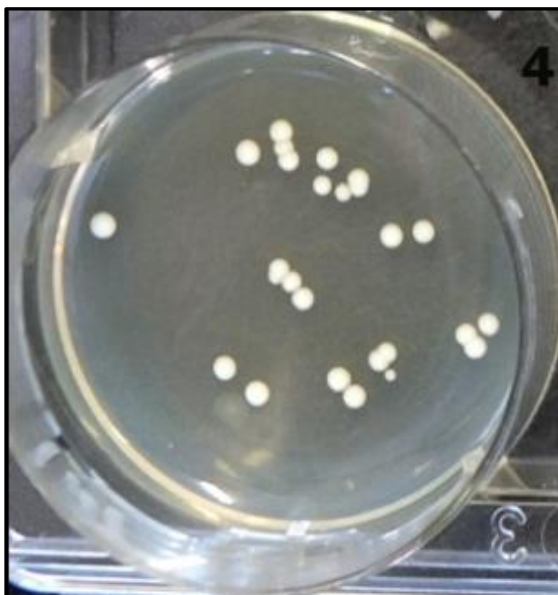


**Fonte:** LABIOFOT

As colônias isoladas da placa da Figura 6 foram diluídas na escala Mac Farland 0,5 que é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura, e diluídas adicionalmente 1000 vezes. Exatamente 20  $\mu\text{L}$  dessa suspensão de leveduras foram depositados em várias gotas na superfície do ágar Sabouraud (Figura 7).

Esse procedimento pode ser utilizado para obtenção de clones puros da levedura para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC's/mL) em ensaios de viabilidade celular.

**Figura 7:** Unidades Formadoras de Colônias de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas pela deposição de 20  $\mu$ L de uma suspensão Mac Farland 0,5 diluída 1000 vezes, em ágar Sabouraud.



**Fonte:** LABIOFOT

A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é um microrganismo extremamente importante para o estudo de células eucarióticas superiores. Possui similaridades estruturais com células eucarióticas (animais e vegetais) e procarióticas (10).

Como células eucarióticas as leveduras possuem várias organelas delimitadas por membranas como o núcleo, mitocôndrias, peroxissomas, vacúolos e outras organelas. Similarmente as células eucarióticas possuem um citoesqueleto organizado constituído de actina disposta em filamentos no citoplasma e associada à membrana celular. O citoesqueleto está diretamente relacionado à movimentação, adesão e brotamento dessas leveduras (9).

O processo de produção de energia utiliza a mitocôndria durante a respiração celular e a via glicolítica em condições de anaerobiose (fermentação).

Diferente das bactérias o *Saccharomyces cerevisiae* não possui peptidoglicana em sua parede celular e sim um alto teor de  $\beta$ -glicanas e quitina. Possuem um retículo

endoplasmático e um aparelho de Golgi envolvidos na síntese de proteínas e transporte de lipídeos (9).

O alto teor de polissacarídeos  $\beta$ -glicanas (>75%) presente na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* faz desta levedura um probiótico funcional que auxilia na regulação da glicemia e tem propriedades imunomoduladoras (Figura 8).

**Figura 8:** Probiótico funcional a base de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

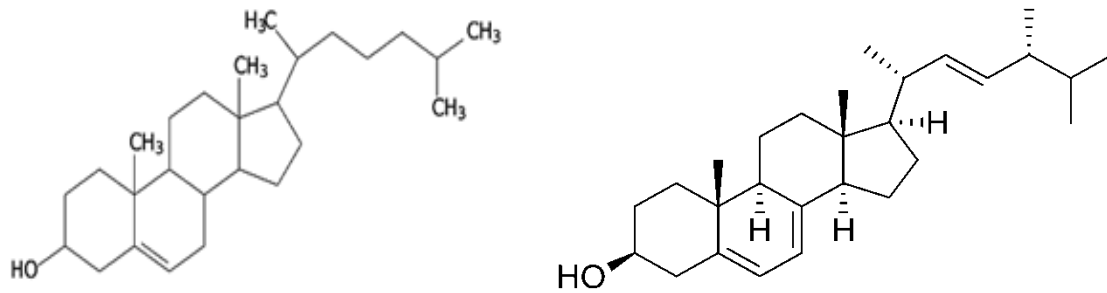


**Fonte:** [www.semsfarmaceutica.com.br](http://www.semsfarmaceutica.com.br)

Similarmente as células procarióticas o *Saccharomyces cerevisiae* possui uma parede celular, responsável pela forma celular que confere resistência a variações de pressão osmótica, temperatura e outras formas de estresse. Em vez de ser formada por peptidoglicana como nas bactérias, a parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* é constituída principalmente de quitina, manoproteínas e outras glicanas. Na parede celular existem também várias enzimas envolvidas na regulação do metabolismo das leveduras, transporte e sinalização (5).

Os lipídeos encontrados na membrana plasmática são similares aos encontrados em células eucarióticas de organismos superiores, porem em vez de colesterol a membrana plasmática das leveduras contém ergosterol (Figura 9).

**Figura 9:** Estrutura do colesterol (a) e ergosterol (b)



**Fonte:** [www.researchgate.net/figure/figura-2-estrutura-molecular-plana-do-colesterol-1-e-ergosterol-2\\_fig18\\_296195078](http://www.researchgate.net/figure/figura-2-estrutura-molecular-plana-do-colesterol-1-e-ergosterol-2_fig18_296195078)

Na ausência de oxigênio, ou seja, em anaerobiose ocorre um aumento de ácidos graxos saturados presentes nos lipídeos de membrana e diminuição do ergosterol. Já em aerobiose ocorre mudança nesse perfil lipídico, implicando a importância do oxigênio na síntese de alguns lipídeos complexos insaturados e esteroides (5).

## 5. O SURGIMENTO DA BIOQUÍMICA

A pesquisa com leveduras, principalmente as envolvidas com o processo de fermentação (*Baker's yeast*) permitiu um grande avanço na microbiologia, possibilitando a associação de micro-organismos a algumas doenças humanas (3).

Apesar dos trabalhos de Pasteur (Figura10) terem proporcionado um grande avanço na química das fermentações e na microbiologia, a sua convicção de que a fermentação somente poderia ser realizada por um organismo vivo, organizado com várias organelas, levou a teoria do vitalismo, que por muito tempo atrasou o entendimento da natureza química do processo de fermentação (11).

**Figura10:** Louis Pasteur



**Fonte:** <https://brasilescola.uol.com.br/biologia/louis-pasteur.htm>

Em 1860 Pasteur declara que a fermentação alcoólica é um processo fisiológico:

*“The chemical changes of fermentation are associated with a vital activity, beginning and ending with the latter. I believe that alcoholic fermentation never occurs without either the simultaneous organization, development and multiplication of cells or the continued life of cells already formed”* (11).

Vários pesquisadores tentaram, sem sucesso, extrair os componentes intracelulares de leveduras para ver se era possível ocorrer fermentação alcoólica *in vitro*. Destacam-se, por exemplo, os trabalhos de Maria Manaseina que em 1870 afirmou ter conseguido, por aquecimento de *Saccharomyces cerevisiae*, um extrato livre de células capaz de realizar de fermentar açúcar em álcool (12). Entretanto seus resultados não foram reproduzidos por outros pesquisadores.

Vários pesquisadores tentaram romper a parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes procedimentos, como o uso de detergentes, a maceração das leveduras com digestão química, e outros procedimentos desnaturantes de proteínas, mas sem sucesso porque os extratos obtidos não eram capazes de realizar a fermentação alcoólica (13).

Em 1897 Eduard Buchner, um químico alemão pouco conhecido, faz uma publicação preliminar que abalaria a teoria vitalista de Pasteur e abriria as portas para a investigação intracelular dos mecanismos moleculares da fermentação alcoólica (11).

Eduard Buchner inicia a sua comunicação científica com a seguinte frase:

*“Separation of fermentative action of living yeast cells has never previously been achieved; in what follows, a procedure is described that accomplishes this task”* (12).

No final de 1986, Eduard Buchner estava de férias trabalhando com seu irmão Hans Buchner, professor do Instituto de Munich cujo interesse científico era em imunologia e terapêutica (12).

Hans Buchner sabia que o soro humano tinha propriedades antissépticas contra bactérias e postulou junto com Eduard Buchner se o extrato de leveduras tinha também esta propriedade (12).

Através da colaboração de um técnico (Martin Hall), foi desenvolvido uma nova metodologia para obtenção de um extrato de leveduras livres de células vivas. O procedimento, publicado por Eduard Buchner em seu artigo, descrevia uma metodologia de maceração mecânica das leveduras com areia de quartzo e terra de diatomácea, seguida de prensagem mecânica e hidráulica (13).

Desta forma obtiveram um caldo verde, rico em proteínas, que era facilmente contaminado pelo crescimento de bactérias. No intuito de evitar essa contaminação bacteriana Eduard Buchner fortuitamente adicionou sacarose a esse extrato. Tamanha foi sua surpresa ao perceber que essa mistura era capaz de realizar a fermentação da sacarose produzindo etanol e  $\text{CO}_2$ .

Embora esse experimento não fosse direcionado ao estudo da fermentação, Eduard Buchner percebeu de imediato a grandeza de sua descoberta. Não foi uma descoberta acidental baseada apenas na sorte, pois Eduard Buchner já trabalhava com fermentação e sabia dos acontecimentos da época, sendo até desencorajado pelos seus superiores em tentar abrir a levedura e extrair seus componentes intracelulares (11,12).

Como o próprio Pasteur disse: “*Chance favours the prepared mind*” e Eduard Buchner, considerado um pesquisador sem talento para a química por seu orientador de doutorado Adolf von Baeyer, era o “homem certo na hora certa” (11).

Sua descoberta abalou os conhecimentos químicos e biológicos da época, introduzindo uma nova era, levando ao desenvolvimento da bioquímica moderna de hoje. Pela primeira vez o impossível se tornava possível, permitindo a realização de estudos do processo de fermentação *in vitro*, ou seja, no tubo de ensaio.

Em 1907, aos 47 anos de idade, Eduard Buchner (Figura 11) recebeu o prêmio Nobel por suas investigações bioquímicas e sua descoberta da fermentação livre de leveduras viáveis (5).

**Figura 11:** Eduard Buchner





**Fonte:** Eduard Buchner – Facts. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Wed. 17 Apr 2019.  
<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/facts/>>

Eduard Buchner chamou de zimase o componente extraído da levedura responsável pela fermentação *in vitro*. Os enzimologistas posteriormente vieram a descobrir que o processo de fermentação alcoólica envolvia 14 reações químicas, cada uma delas catalisada por uma enzima diferente. A rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica foi denominada de glicólise, via glicolítica ou via EMP (Emben-Meyerhof-Parnas) (5).

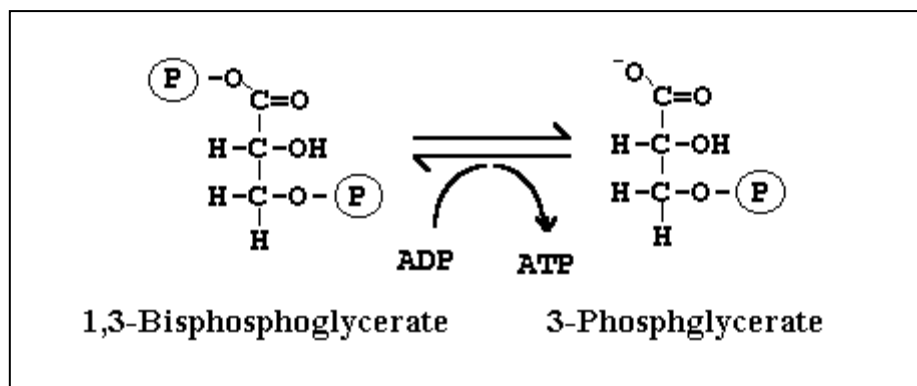
## **6. O METABOLISMO ENERGÉTICO DO *SACCHAROMYCES CEREVISAE***

O sucesso de Eduard Buchner em obter, o que é hoje algo muito simples, foi usar condições de extração que preservaram as atividades das enzimas envolvidas na glicólise, sensíveis ao aquecimento, detergentes ou outras condições desnaturantes de proteínas.

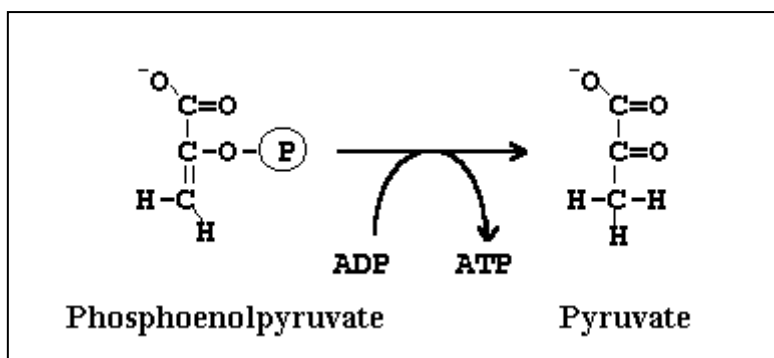
A via glicolítica detalhada em 1940 envolve a lise da molécula de glicose contendo seis carbonos, em duas moléculas de três carbonos denominadas de piruvato. Durante a lise e oxidação da molécula de glicose, ocorre inicialmente uma preparação da glicose com o gasto inicial de duas moléculas de ATP. A produção de dois intermediários bioquímicos de alta energia, o 1-3 bifosfoglicerato e o fosfoenolpiruvato permite a síntese de quatro moléculas de ATP (Figura 12 A e B) no citossol (5).

**Figura 12:** Intermediários bioquímicos de alta energia encontrados na glicólise. A) 1,3 BPG B) PEP.

A) Formação citossólica de ATP via 1,3BPG



B) Formação citossólica de ATP via PEP

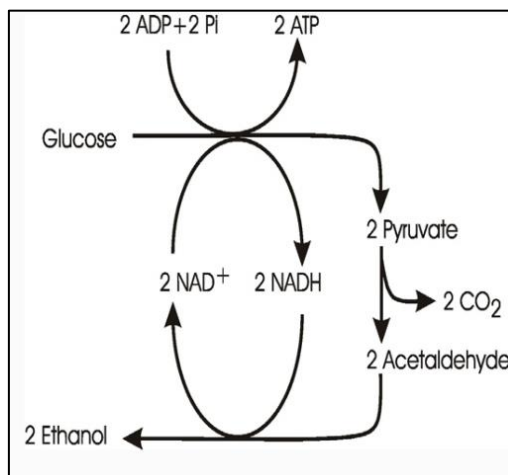


Fonte: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupof/13bis.html>

Este processo de produção de energia, denominado de fosforilação ao nível do substrato, não envolve oxigênio e ocorre no citossol das leveduras e células eucarióticas de organismos superiores. A via glicolítica é um mecanismo primitivo de obtenção de energia que ocorre sem consumo de oxigênio e que foi conservado em organismos superiores, que utilizam o oxigênio como receptor final de elétrons extraídos das substâncias alimentares (14).

O destino metabólico do piruvato depende das condições oferecidas às células. A redução do piruvato seja para etanol, ácido láctico,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  ou outros produtos da fermentação, ocorre pela necessidade de converter a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) para sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) (Figura 13).

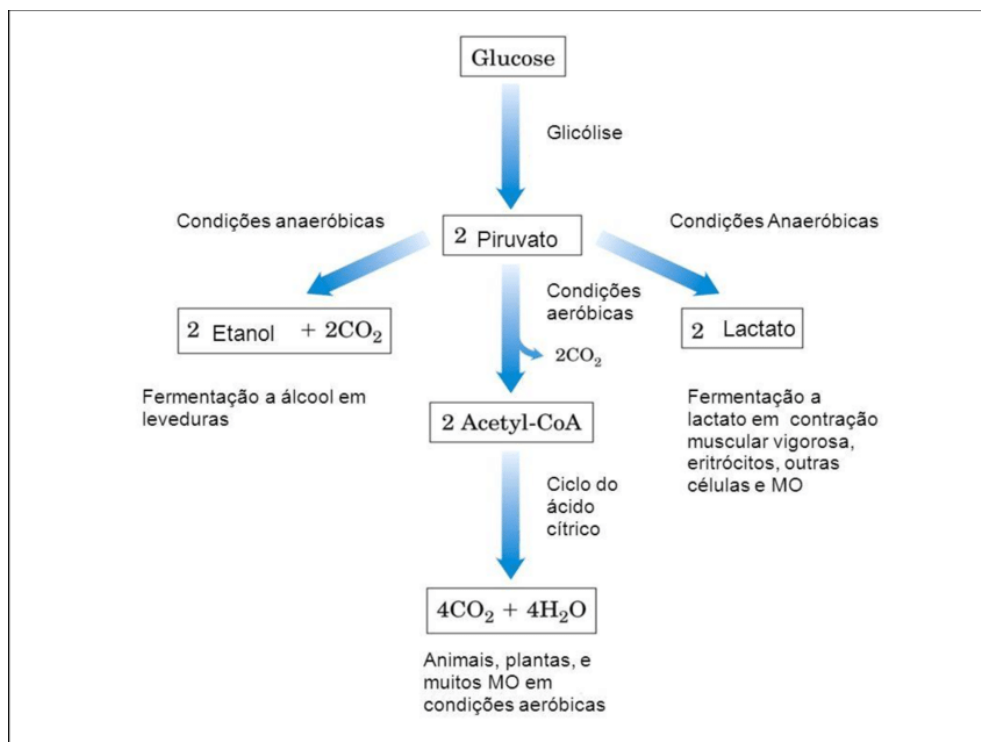
**Figura13:** Produção de etanol para regenerar a coenzima NAD<sup>+</sup> (14).



**Fonte:** James Theoga Raj Cand Lin SJ. Cross-talk in NAD<sup>+</sup> metabolism: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2019 Apr 16: 4-16.

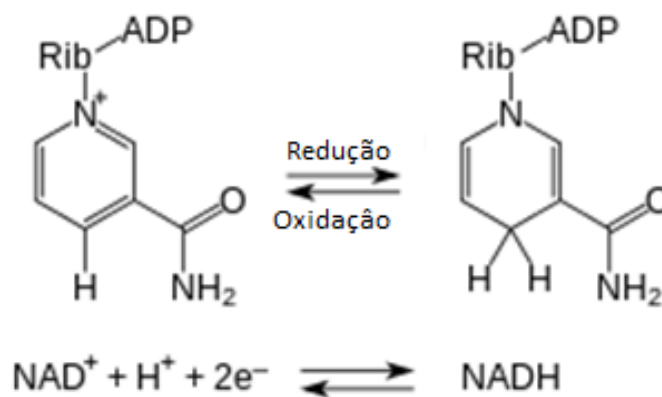
Neste processo uma molécula de glicose é convertida a duas moléculas de piruvato (um cetoácido). O piruvato sofre posteriormente uma descarboxilação produzindo CO<sub>2</sub> e acetaldéido, o qual por sua vez é reduzido a etanol, regenerando a coenzima NAD<sup>+</sup>. O piruvato pode sofrer várias reações diferentes (Figura 14), mas sempre com o mesmo objetivo, regenerar a coenzima NAD<sup>+</sup> (Figura 15).

**Figura 14:** Destinos metabólicos do piruvato



**Fonte:** David L. Nelson and Michael M. Cox. Lehninger: Principles of Biochemistry, 2013. Editora: Macmillan.

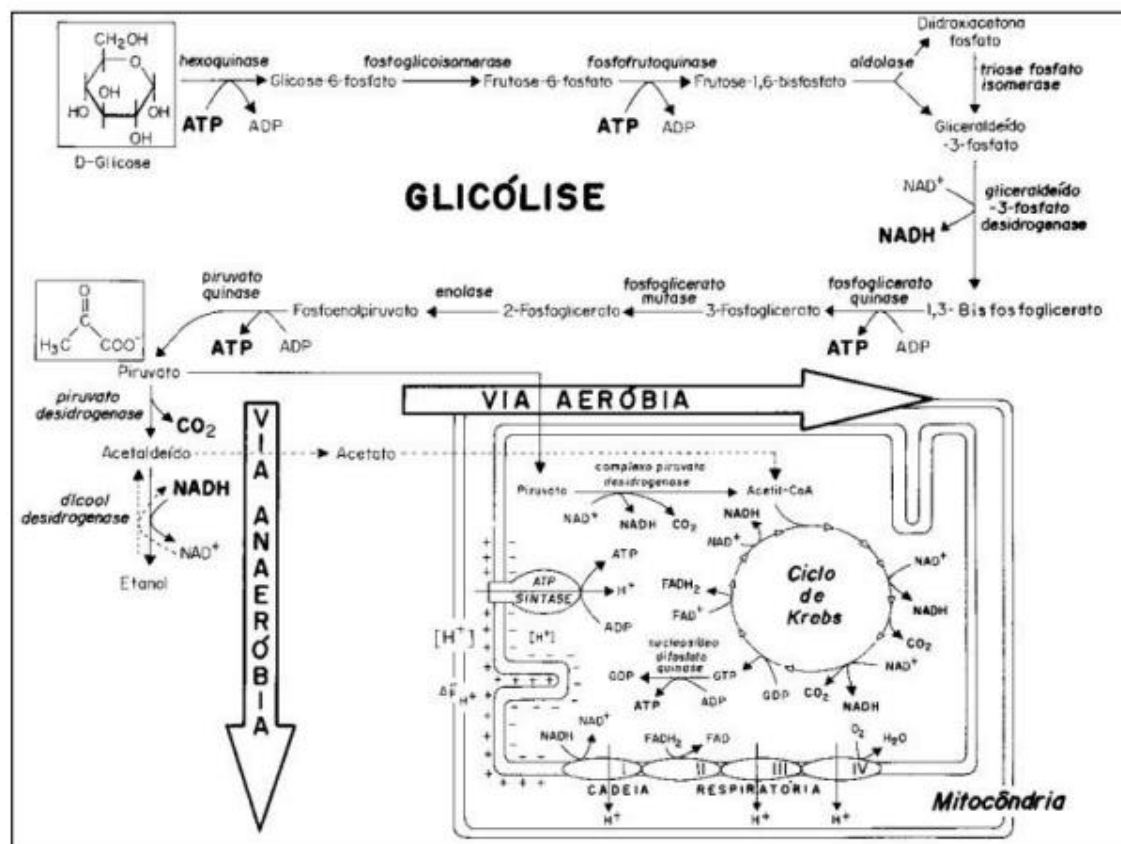
**Figura 15:** Estrutura da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup> e NADH)



**Fonte:** [https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide\\_adenine\\_dinucleotide](https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um micro-organismo aeróbio facultativo, podendo crescer também na presença de oxigênio, onde o açúcar é transformado em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Figura 16). O destino metabólico do piruvato e seus produtos finais, depende da presença ou ausência de oxigênio (15).

**Figura 16:** Diagrama do catabolismo da glicose em células de *Saccharomyces cerevisiae*.



**Fonte:** Fermentação alcoólica: proposta do ensino das vias bioquímicas através da destilação fracionada Mariana Rezende Pires, Pedro Gomes Peixoto, Renato Ventresqui Oliveira. *Eclética Química*, vol. 40, 166-172, 2015.

Neste processo denominado de respiração celular, o piruvato é transportado para o interior das mitocôndrias, onde é convertido em acetil coenzima A e oxaloacetato. Esses metabólitos reabastecem o ciclo de Krebs, o qual direciona elétrons para cadeia de transporte de elétrons. Estes elétrons, transportados por coenzimas e proteínas específicas tem comoceptor final o oxigênio que é reduzido para água (Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, comunicação pessoal).

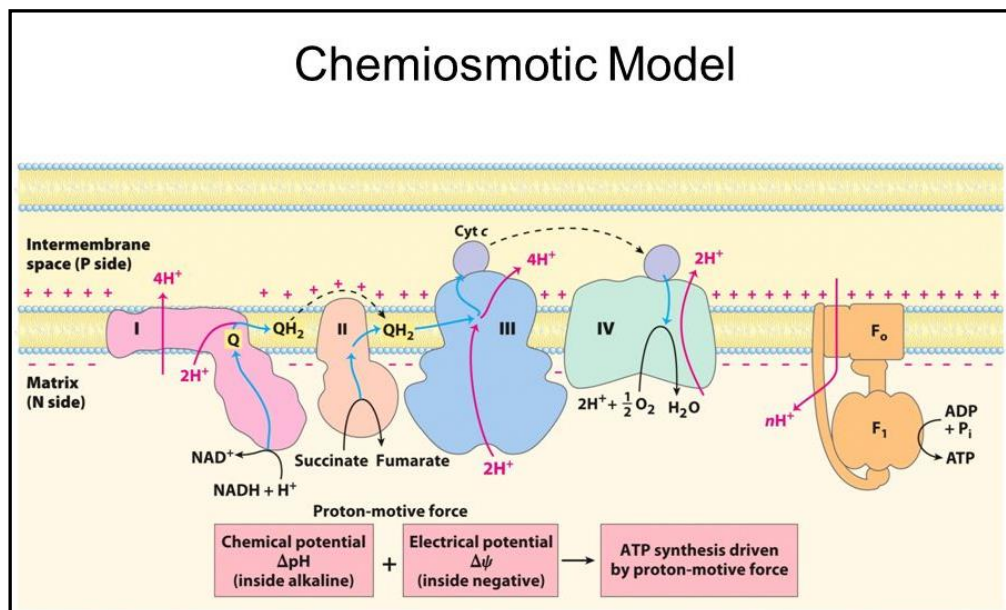
O transporte de elétrons cria um gradiente de prótons na mitocôndria, que direcionados para a enzima ATPase promovem a síntese do ATP, processo esse denominado de fosforilação oxidativa (Figura 17).

Ao contrário da glicólise, na respiração celular mitocondrial não existe a formação de intermediários químicos de alta energia como o 1-3BPG e o PEP, mas sim uma condição energética da própria mitocôndria, criada pelo gradiente de prótons

formados durante o transporte de elétrons. Este processo ficou conhecido como modelo quimiosmótico de produção do ATP (16).

O mecanismo de formação do ATP mitocondrial foi palco de inúmeros “embates científicos”, com a proposição de várias teorias diferentes (Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, comunicação pessoal).

**Figura 17:** Formação do ATP mitocondrial.



**Fonte:** David L. Nelson and Michael M. Cox. Lehninger: Principles of Biochemistry, 2013. Editora: Macmillan.

A regulação da produção e regeneração do NAD<sup>+</sup> em células eucaróticas superiores é um processo complexo e difícil de ser estudado. Entretanto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarótico celular adequado a estes estudos possibilitando o entendimento de doenças relacionadas à idade, onde existe uma perturbação na homeostasia da nicotinamida adenina dinucleotídeo (17).

## 7. O ORGANISMO MODELO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

As questões éticas e as restrições experimentais levaram os pesquisadores a encontrar modelos unicelulares de células eucaróticas que sejam de fácil propagação e manipulação. Neste sentido as leveduras têm se destacado, principalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, antigamente chamada de *Candida robusta*, devido ao seu uso histórico pela humanidade e por ter um genoma totalmente seqüenciado (6).

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo de células eucarióticas superiores apresenta uma série de vantagens, tais como (18):

- capacidade de desenvolvimento em substrato barato e facilmente disponível;
- facilidade de obtenção e de multiplicação;
- utilização de nutrientes nas suas formas mais simples;
- possibilidade de cultivo independente do ambiente;
- pequena exigência de água e de área;
- formação de produtos de valor nutritivo e medicamentos;
- possuem vias de sinalização e ciclo de vida similar às células humanas;
- realizam um metabolismo energético similar ao de células tumorais, etc.

Desta forma esta levedura tem sido utilizada como modelo celular para estudar mecanismos moleculares e celulares de eucariotos superiores. Destacam-se, por exemplo, a utilização desta levedura para entender os mecanismos de envelhecimento, regulação da expressão gênica, transdução de sinal, distúrbios neurodegenerativos, assim como, ciclo e morte celular através por apoptose e outras vias de morte celular (19).

Outros trabalhos utilizaram este modelo celular para avaliar situações de estresse químico, osmótico, nutricional e térmico (20). O estudo da viabilidade desta levedura frente a alguns metais como o cobre, zinco e outras nanopartículas inorgânicas, tem propiciado o desenvolvimento de novos compostos com propriedades antifúngicas e antitumoral (20).

O alto grau de conservação de processos básico celulares entre *Saccharomyces cerevisiae* e eucariotos superiores faz desta levedura uma ferramenta adequada para a descoberta de novas drogas. Por ser também relacionada a um importante patógeno humano, a *Candida albicans*, o *Saccharomyces cerevisiae* (*Candida robusta*) é também muito utilizado para a descoberta de novas drogas antifúngicas, sejam oriundas de produtos naturais ou sintéticas (21).

Através de estudos do metabolismo do *Saccharomyces cerevisiae* foi constatado que estas células apresentam também semelhanças em relação ao metabolismo de células tumorais. Isto propiciou considerar esta levedura um modelo metabólico favorável para o rastreamento de alvos de drogas para aplicações em terapias anticâncer (21).

Células tumorais e de *Saccharomyces cerevisiae* possuem um crescimento rápido e precisam de grandes quantidades de energia utilizando a glicose como substrato principal. Da mesma forma que as células tumorais, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consome grandes quantidades de glicose mesmo na presença de oxigênio. Este efeito foi constatado

em 1924, por um pesquisador alemão Otto Warburg (Figura 18) que recebeu o prêmio Nobel em medicina em 1931. O efeito Warburg, também chamado de “glicólise aeróbia” caracteriza-se pela não utilização mitocondrial do piruvato proveniente da glicólise em condições de aerobiose (22, 23, 24).

**Figura 18:** Otto Heinrich Warburg



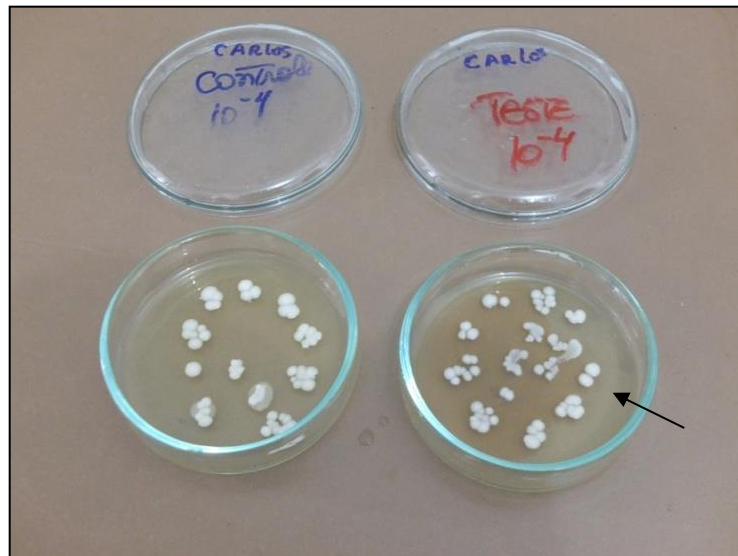
**Fonte:** [https://en.wikipedia.org/wiki/Otto\\_Heinrich\\_Warburg](https://en.wikipedia.org/wiki/Otto_Heinrich_Warburg)

Além do efeito Warburg, as células tumorais exibem um segundo fenômeno metabólico, chamado de “efeito Crabtree” (25, 26), onde a adição de glicose inibe a respiração celular, favorecendo a glicólise. Esse comportamento foi também observado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que em condições de aerobiose e na presença de alta concentração de glicose produz etanol ao invés de biomassa e CO<sub>2</sub>. Tal fenômeno está relacionado com o transporte de piruvato para dentro da mitocôndria, bem como inibição do ciclo de Krebs e respiração celular, sendo uma área de bastante interesse para a descoberta de novas drogas com propriedades antitumorais (26).

O modelo *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado com sucesso no LABIOFOT para testes de viabilidade de complexos inorgânicos de zinco, cobre e europium (Figura19). As unidades formadoras de colônias (UFC's) foram visualizadas e quantificadas na diluição 10<sup>-4</sup> de uma diluição serial da levedura, após tratamento.



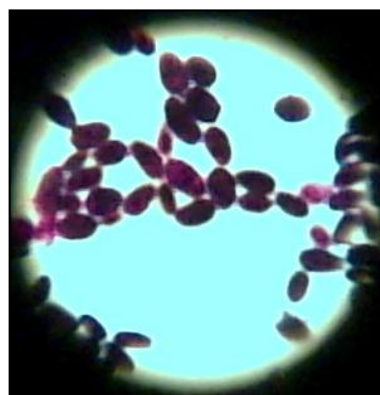
**Figura 19:** Ensaios de citotoxicidade empregando *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o método de deposição de 50  $\mu$ L em várias gotas na superfície do ágar Sabouraud.



**Fonte:** LABIOFOT

A seta acima mostra uma colônia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* removida com uma alça metálica e espalhada em uma lamina de microscópio para fazer a coloração de Gram. Observa-se na figura 20 que as células de *Saccharomyces cerevisiae* são Gram positivas.

**Figura 20:** coloração de Gram de *Saccharomyces cerevisiae*

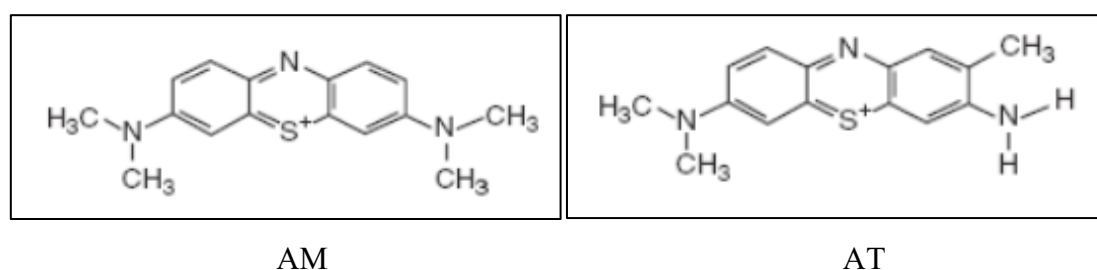


**Fonte:** LABIOFOT FOTO TIRADA 28/05/2019

No LABIOFOT estudamos também os efeitos de fotossensibilizadores, como o azul de metileno (AM), o azul de toluidina (AT) e a rosa de bengala (RB) em células de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de fermentos comerciais e probióticos farmacêuticos.

Existem fotossensibilizadores utilizados especificamente para matar células cancerígenas que têm sido efetivos na morte de células fúngicas e vice-versa. No LABIOFOT foram feitos estudos da interação dos corantes catiônicos AT e AM com as leveduras em estudo (Figura 21).

**Figura 21:** Estruturas do AT e AM.



**Fonte:** <https://slideplayer.com.br/slide/3265716/>

As células de *Saccharomyces cerevisiae* quando ressuspensas na diluição 1,0 de Mac Farland interagem fortemente com o corante azul de toluidina em solução que permanece aderido as células, mesmo após várias diálises (em água destilada) para remover o corante não ligado (Figura 22).

**Figura 22:** A) Suspensão de células de *Saccharomyces* isoladas de UFC's formadas em ágar Sabouraud. B) Suspensão de células de *Saccharomyces* incubadas com AT (100 µmol/L) por 4 horas e dializadas quatro vezes com água destilada.

A

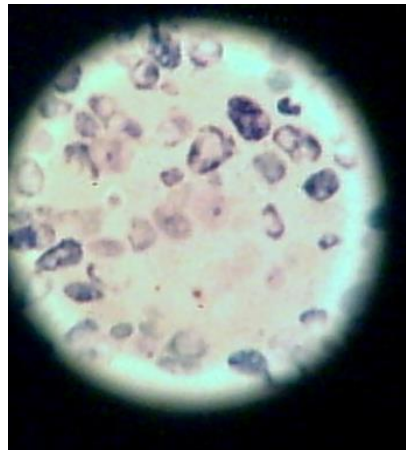
B



**Fonte:** LABIOFOT FOTO TIRARA DIA 28/05/2019

Quando as células de *Saccharomyces cerevisiae* são coradas através de um esfregão feito com alça metálica em lâmina de microscópio, as células ficam avermelhadas e não azuis. Esta coloração diferente, da original, é decorrente da metacromasia do AT quando em contato com moléculas aniônicas da levedura (Figura 23).

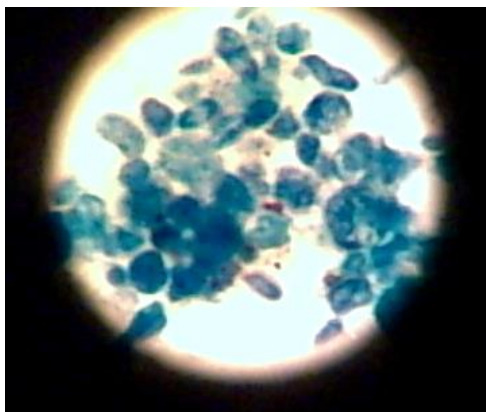
**Figura 23:** *Saccharomyces cerevisiae* corados com AT (100  $\mu\text{mol/L}$ ) em lâmina de microscópio.



**Fonte:** LABIOFOT LABIOFOT FOTO TIRARA DIA 28/05/2019

A coloração das leveduras com azul de metileno (AM), um corante catiônico fenotiazínico, não apresentou metacromasia e as células foram coradas em azul (Figura 24).

**Figura 24:** *Saccharomyces cerevisiae* corados com AM (100  $\mu\text{mol/L}$ ) em lâmina de microscópio.



**Fonte:** LABIOFOT LABIOFOT FOTO TIRARA DIA 28/05/2019

A interação dos corantes fenotiazínicos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como o AT e AM, ocorre por interação eletrostática entre os corantes catiônicos e grupamentos aniônicos presentes nas células, como polifosfatos, polissacarídeos e DNA.

Quando se faz um esfregão das células de *Saccharomyces cerevisiae* em uma lâmina de microscópio, ocorre a lise de muitas células liberando para o meio exterior grupamentos aniônicos, que interagem fortemente com o AT, como o DNA. No intuito de avaliar a interação do AT com DNA puro, foi feito um esfregão do DNA em uma lâmina de microscópio e depois corada com AT 100  $\mu\text{mol/L}$  (ou AM) 40 minutos.

Os resultados obtidos evidenciaram que o AT interage com o DNA, sofre metacromasia e as lâminas são coradas em um tom rosa e não azul, como é a cor original do AT (Figura 25).

**Figura 25:** Lâmina de microscopia contendo um esfregaço de DNA e corada com AT.



*Fonte:* LABIOFOT

O AM, embora tenha similaridades estruturais com o AT não apresentou metacromasia (Figura 26).

**Figura 26:** Lâmina contendo um esfregaço de DNA e corada com AM.

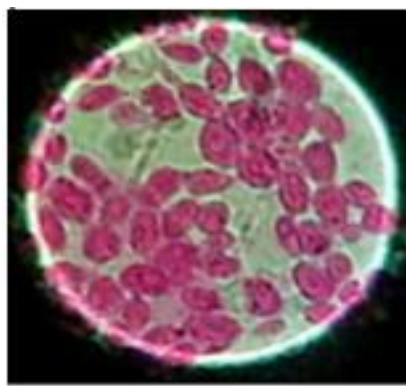


*Fonte:* LABIOFOT

O fotosensibilizador RB apesar de ser um corante aniônico (Figura 27) também cora fortemente as leveduras e não apresentou metacromasia.

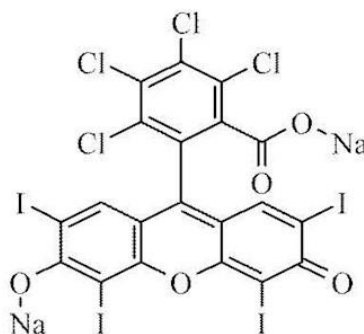
**Figura 27:** A) *Saccharomyces cerevisiae* corados com rosa de bengala (100  $\mu\text{mol/L}$ ) em lâmina de microscópio. B) estrutura da RB.

(A)



**Fonte:** LABIOFOT

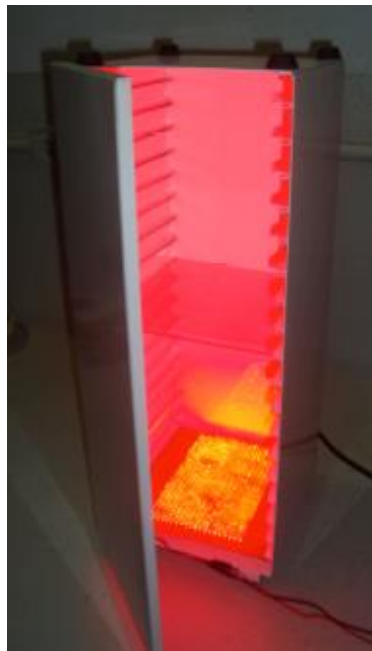
(B)



**Fonte:** [https://en.wikipedia.org/wiki/Rose\\_bengal](https://en.wikipedia.org/wiki/Rose_bengal)

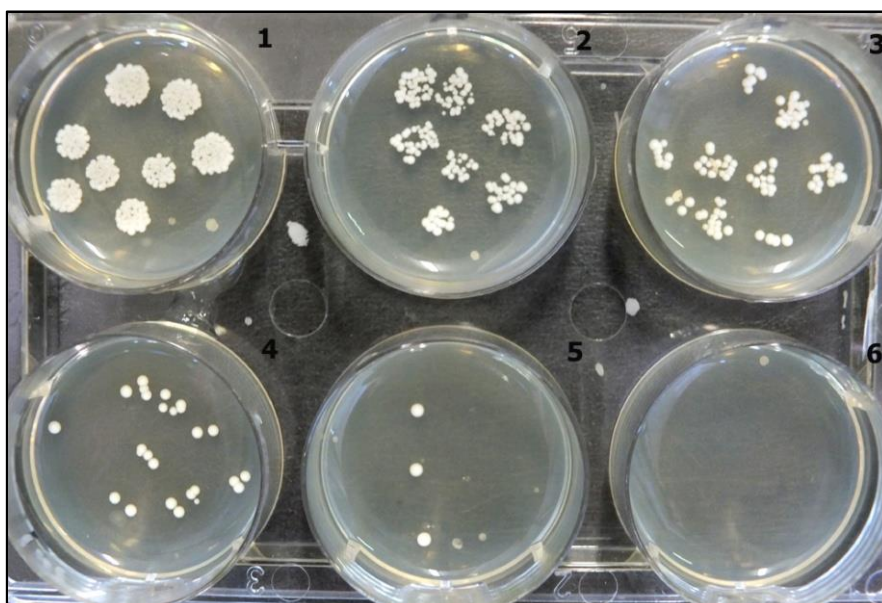
No LABIOFOT quando as células de *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas com AT à 100  $\mu\text{mol/L}$  (30<sup>o</sup>C e 20 minutos), irradiadas por 20 minutos com um sistema feito com 600 LED em série (Figura 28), a viabilidade celular caiu drasticamente, indicando que o AT é um excelente fotosensibilizador (Figura 29 A e B).

**Figura 28:** Estrutura do equipamento de irradiação desenvolvido no LABIOFOT.



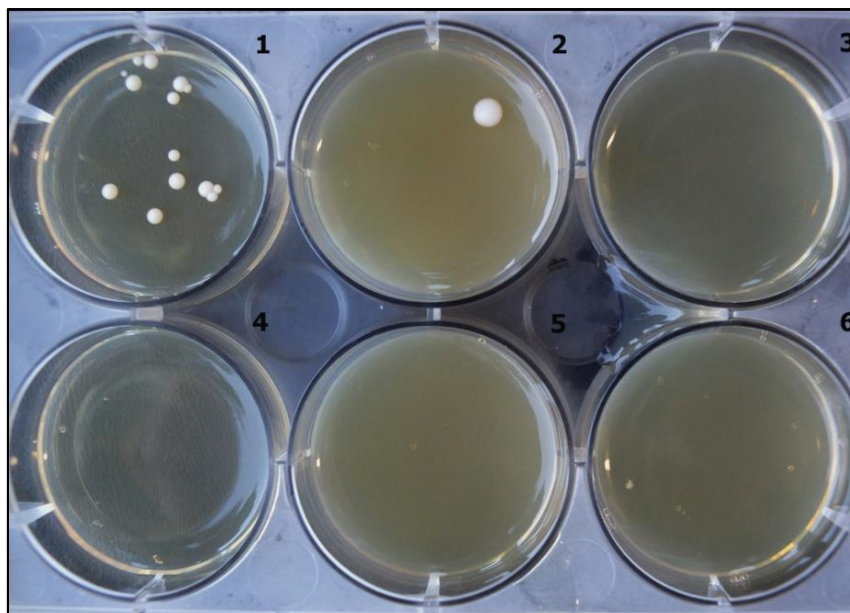
**Fonte:** Paula, Lucas Ferreira de. Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* E *Trichophyton rubrum*. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

**Figura 29 A:** Crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* em várias diluições seriadas (nº 1=  $10^{-1}$ ; nº2 =  $10^{-2}$ ; nº 3=  $10^{-22}$ ; nº 4=  $10^{-3}$ ; nº 5= $10^{-4}$  e nº 6=  $10^{-5}$ ). As células foram incubadas na ausência de luz e na ausência de fotossensibilizadores.



**Fonte:** LABIOFOT

**Figura 29 B:** Crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* em várias diluições seriadas (nº 1=  $10^{-1}$ ; nº2 =  $10^{-2}$ ; nº 3=  $10^{-22}$ ; nº 4=  $10^{-3}$ ; nº 5= $10^{-4}$  e nº 6=  $10^{-5}$ ). As células foram incubadas na presença de luz e na presença de  $100 \mu\text{mol/L}$  de AT.

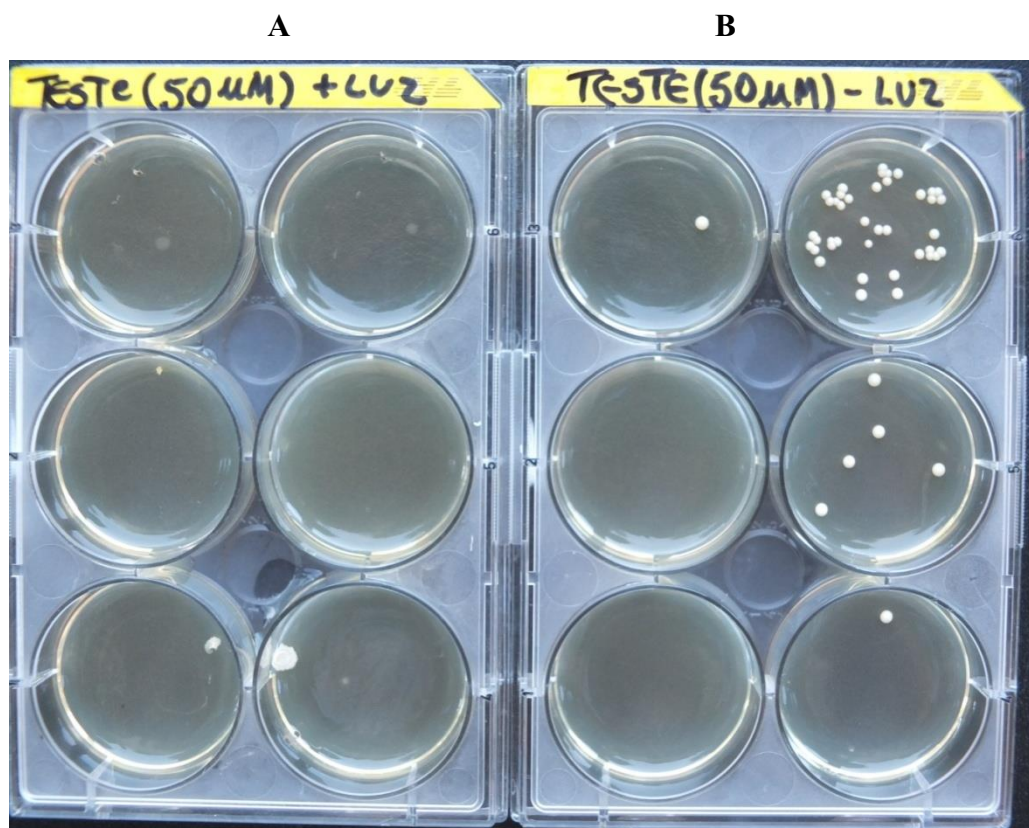


**Fonte:** Cassiana Maurer De Carli. Inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*: utilização dos corantes azul de metileno e azul de toluidina como fármacos fotossensibilizadores; 2016; Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia.

A figura 30 evidencia os resultados da inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae* com AT  $50 \mu\text{mol/L}$ . Observa-se a forte inibição do crescimento das leveduras (Figura 30 A e B).



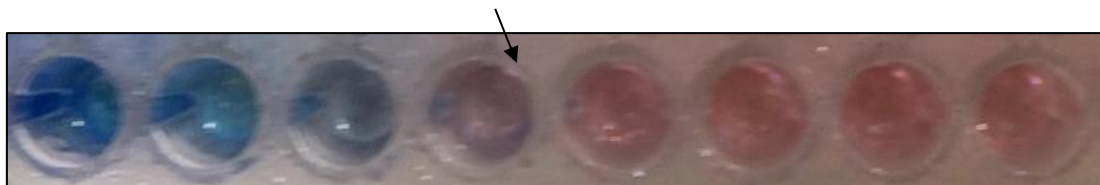
**Figura 30:** Inibição do crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* por 50  $\mu\text{mol}$  de AT. As células foram pré-incubadas como fotossensibilizador por 20 minutos, no escuro e, depois irradiadas por 20 minutos com o LED 600.



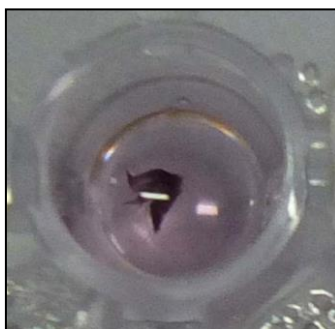
**Fonte:** LABIOFOT

A habilidade do corante AT em interagir com componentes aniônicos da levedura pôde ser também mimetizada *in vitro*, utilizando ouro coloidal como superfície aniônica. Nota-se que o AT é capaz de agregar e precipitar as moléculas de ouro coloidal. Também houve agregação das partículas de ouro coloidal mudando sua cor original vermelho tijolo para roxo (Figura 31 A e B).

**Figura 31 A:** Diluição em série de uma solução de AT (62,5  $\mu\text{mol/L}$ ) em água destilada, seguida pela adição de igual volume de ouro coloidal e incubação por 24 horas na geladeira (4 $^{\circ}\text{C}$ ). A seta indica a coloração roxa das partículas de ouro coloidal agregadas pelo AT a 7,81  $\mu\text{mol/L}$ .



**Figura 31 B:** Agregação do ouro coloidal com AT diluído. A figura ilustra com mais detalhes a forte agregação das partículas de ouro coloidal pelo AT. A cor vermelho tijolo das partículas de ouro coloidal mudou para roxo.



**Fonte:** LABIOFOT

A viabilidade celular de células de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada pela contagem de micro-organismos replicantes (UFC's) utilizando o método desenvolvido por Thomas e colaboradores (29) e denominado *single plate-serial dillution spotting* (SP-SDS). Esta metodologia é mais confiável do que a utilização da redução da resazurina para avaliar a viabilidade celular.

Esta metodologia foi padronizada no LABIOFOT com sucesso, sendo a diluição  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  adequadas para a contagem das UFC's. Observa-se na figura 32 o crescimento das UFC's após deposição de 50  $\mu\text{L}$  das células (no ágar Sabouraud) em diferentes diluições seriadas.

**Figura 32:** Método utilizado no LABIOFOT para avaliar a viabilidade celular das células de *Saccharomyces cerevisiae*. Seta= diluição  $10^{-4}$ .



**Fonte:** LABIOFOT

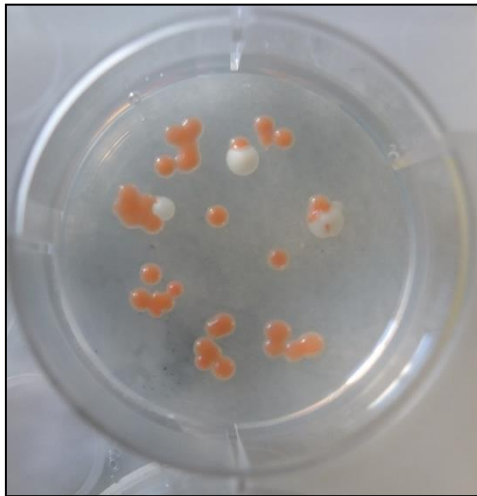
## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Experimentos de engenharia genética permitiram a obtenção de diferentes mutantes, estudo de genes e produtos genéticos para avaliação de diferentes patologias humanas, bem como para aumentar a resistência ao etanol, ou também para produção de biodiesel (30, 31, 32).

O genoma do *Saccharomyces cerevisiae* contendo apenas 6000 genes é uma ferramenta mais atrativa para o estudo da ação de drogas ou aumento da capacidade fermentativa. Células eucarióticas de organismos superiores contem muito mais genes (25000 genes codificadores) e uma organização celular mais complexa, sendo sua manipulação mais difícil e dispendiosa, pois a manutenção dos clones de células tumorais necessita de mais infraestrutura laboratorial (31).

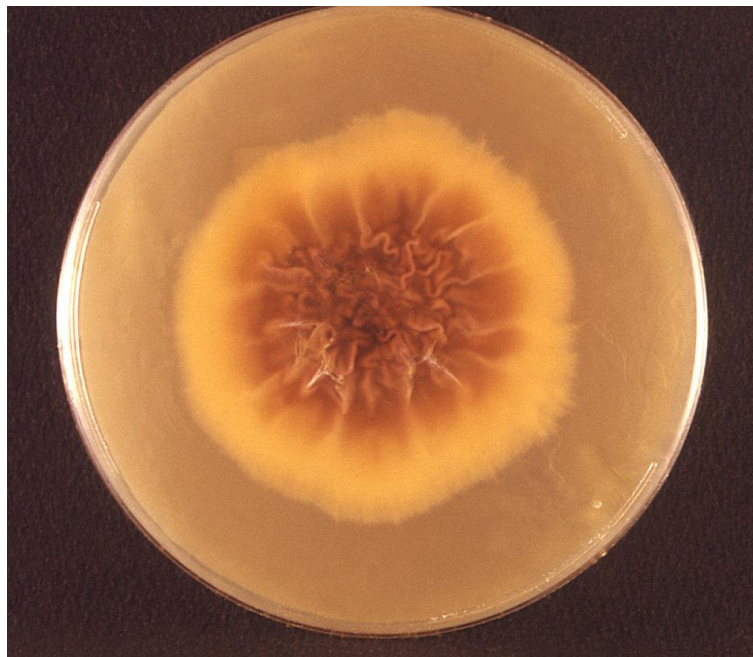
No LABIOFOT, estudando os efeitos de uma mistura 1:1 de AT e AM (25  $\mu\text{mol/L}$ ) no processo de inativação fotodinâmica, encontramos um mutante diferente da levedura, denominada de RED *Saccharomyces cerevisiae* contendo uma coloração diferente das células (33, 34). Infelizmente, devido a problemas na autoclave perdemos o mutante vermelho (Figura 33).

**Figura 33:** RED *Saccharomyces cerevisiae*



**Fonte:** LABIOFOT

**Figura 34:** Colônia *Trichopyton rubrum*



**Fonte:** [http://www.publicdomainfiles.com/show\\_file.php?id=13545967819889](http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13545967819889)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* sempre esteve associada ao progresso da humanidade. É sem dúvida um micro-organismo extraordinário que permitiu o desenvolvimento da microbiologia e da bioquímica, e permitirá a descoberta de novos medicamentos para combater doenças humanas porque é um modelo bioquímico excelente, cujas rotas metabólicas são similares às de células eucarióticas superiores.

## 9. REFERÊNCIAS

- 1) P. Saranraj, P. Sivasakthivelanand K. Suganthi Baker's Yeast: Historical Development, Genetic Characteristics, Biochemistry, Fermentation and Downstream Processing. Journal of Academia and Industrial Research (JAIR); Volume 6, Issue 7, December 2017, pg 111-119.
- 2) Robert K. Mortimer. Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. Genome Research, 2000 (10): 403-409.
- 3) James A. Barnett<sup>1</sup> and Frieder W. Lichtenthaler, A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880±1900. Yeast 2001; 18: 363±388
- 4) James A. Barnett. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. Microbiology, 2003, 149: 557-567.
- 5) James A. Barnett and Karl-Dieter Entian. Yeast Review, A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. Yeast 2005; 22: 835–894.
- 6) Goffeau A., Barrel, B. G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. "Life with 6000 genes." Science. 1996. Volume 274. p. 546 – 567.
- 7) Dujon B. The yeast genome project: what did we learn? Trends Genet. 1996 Jul;12(7):263-70.

8) Bouchra Qaddouri, Abdelkarim Guaadaoui, Ahmed Bellirou, Abdellah Hamal, Ahmed Melhaoui, GrantW. Brown, and Mohammed Bellaou. The Budding Yeast “*Saccharomyces cerevisiae*” as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2011, pg 1-5.

9) Katz, S.H. and F. Maytag. 1991. Brewing and ancient beer. *Archaeology* pp. 24–31.

10) Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16: 2091–2102.

11) Manchester, K. L. Biochemistry comes of age: a century of endeavour. *Endeavour* vol 24(1) 2000, pg 22-30.

12) Athel Cornish-Bowden (1999). "The Origins of Enzymology." *The Biochemist* 19(2), 36–38.

13) Centenary of the Award of a Nobel Prize to Eduard Buchner, the Father of Biochemistry in a Test Tube and Thus of Experimental Molecular Bioscience. Lothar Jaenicke. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 6776 – 6782.

14) Fermentação alcoólica: proposta do ensino das vias bioquímicas através da destilação fracionada Mariana Rezende Pires, Pedro Gomes Peixoto, Renato Ventresqui Oliveira. *Eclética Química*, vol. 40, 166-172, 2015).

15) Daniel Rettori e Pedro L. O. Volpe. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*. 23, 2000: 257-261.

16) David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 2013. Editora: Macmillan.

17) James Theoga Raj Cand Lin SJ. Cross-talk in NAD<sup>+</sup> metabolism: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2019 Apr 16: 4-16.

- 18) Nielsen J. Yeast Systems Biology: Model organism and Cell Factory. Biotechnol J. 2019, pg 1-22.
- 19) Hughes TR. Yeast and drug discovery. Funct Integr Genomics. 2002 Sep;2(4-5):199-211.
- 20) In Vivo-In Vitro Comparative Toxicology of Cadmium Sulphide Quantum Dots in the Model Organism *Saccharomyces cerevisiae* Luca Pagano, Marina Caldara, Marco Villani, Andrea Zappettini, Nelson Marmiroli and Marta Marmiroli. *Nanomaterials* 2019, 9: 2-17.
- 21) Sturgeon CM<sup>1</sup> Kemmer D, Anderson HJ, Roberge M. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnological journal*, 2006:289-298.
- 22) Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 123: 309-314.
- 23) Lu J The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2019 Apr 17:1-8.
- 24) Slobodan Devic. Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? Review. *Journal of Cancer* 2016, Vol. 7: 816-822.
- 25) Crabtree, HG (1929). "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours". *The Biochemical Journal.* 23 (3): 536-45.
- 26) Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta* 1807:568-576(2011).
- 27) Paula, Lucas Ferreira de. Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* E *Trichophyton rubrum*. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

- 28) Cassiana Maurer De Carli. Inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*: utilização dos corantes azul de metileno e azul de toluidina como fármacos fotossensibilizadores; 2016; Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia.
- 29) Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45–55.
- 30) Turner TL, Kim H<sup>1</sup>, Kong II, Liu JJ, Zhang GC, Jin YS Engineering and Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to Produce Biofuels and Chemicals. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2018;162:175-215.
- 31) Andrea A. Duina, Mary E. Miller and Jill B. Keeney. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. GENETICS May 1, 2014 vol. 197 no. 1, 33-48.
- 32) Nandy SK and Srivastava RK. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. Microbiol Res. 2018 Mar;207:83-90.
- 33) M.N.Smirnov V.N.Smirnov E.I.Budowsky S.G.Inge-Vechtomov N.G.Serebrjakov. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications. Volume 27, Issue 3, 5 May 1967, Pages 299-304.
- 34) T. R. Amen; E. V. Mikhailova; V. V. Alenin; A. V. Artyomov; P. A. Dementyev; M. A. Khodorkovskii; T. O. Artamonova; I. M. Kuznetsova; T. R. Soidla; O. V. Nevzglyadova. Structural and functional characteristics of various forms of red pigment of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its synthetic analog. *Cell and Tissue Biology* January 2013, Volume 7, Issue 1, pp 86–94
- 35) Jenna N. Queller 1 and Neal Bhatia. The Dermatologist's Approach to Onychomycosis. Review. *J. Fungi* 2015, 1, 173-184.