



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Físico-Química

***Bioenergética do processo de biorredução da cetona pró-
quiral acetoacetato de etila. Um estudo Calorimétrico.***

CARLOS EDUARDO PERLES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: PEDRO LUIZ ONÓFRIO VOLPE

Campinas, fevereiro de 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

P421b Perles, Carlos Eduardo.
Bioenergética do processo de biorredução da cetona
pró-quiral acetoacetato de etila. Um estudo calorimétrico
/ Carlos Eduardo Perles. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientador: Pedro Luiz Onófrío Volpe.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Calorimetria. 2. Redução química.
3. Bioenergética. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Volpe,
Pedro Luiz Onófrío. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Bioenergetic of bioreduction process of the prochiral ketone ethyl acetoacetate. A calorimetric study.

Palavras-chaves em inglês: Calorimetry, Chemical reduction, Bioenergetic, *Saccharomyces cerevisiae*

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Pedro Luiz Onófrío Volpe (Orientador); Paulo José Samenho Moran, Maricilda Palandi de Mello

Data de defesa: 21/02/2006

Aos meus pais, José e Aparecida, que me deram todas as oportunidades e incentivos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo.

À minha namorada Paula pelo carinho, apoio e compreensão...enfim, por estar sempre ao meu lado em grande parte dos momentos ao longo destes 2 anos de caminhada.

Aos colegas de laboratório que passaram pelo nosso grupo ao longo desses 2 anos ou que ainda encontram-se por lá.

Aos amigos de turma e de corredor os quais sempre estiveram dispostos que sempre me apoiaram. Em especial a Bio, Jean, Bob, Marcos, Marco, Betinho, Denise e Jucelio.

Dedico este trabalho.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe pela oportunidade que me ofereceu e pela confiança que depositou em mim ao longo de quase quatro anos de convivência.

Agradeço pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos e por me introduzir nesse maravilhoso mundo da Termodinâmica aplicada a sistemas biológicos.

Agradeço também pela amizade, pela dedicação e pela liberdade que tive no desenvolvimento do meu trabalho, característica que considero essencial para a formação de profissionais criativos e com espírito crítico.

Ao professor Dr. Paulo José Samenho Moran pelos conselhos e observações que foram de extrema importância no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também pelo incentivo, apoio e amizade.

Currículo Acadêmico

- **Formação acadêmica**

Graduação: Bacharelado em Química

Instituição: Instituto de Química / UNICAMP

Conclusão: Dezembro de 2003

- **Trabalhos apresentados em Congresso**

Título: Estudo da atividade antibacteriana de uma série homóloga de n-alquilsulfatos utilizando microcalorimetria de fluxo

Evento: 27º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química e 26º Congresso Latino Americano de Química - Salvador, Bahia, **2004**

Título: Efeito da micelização sobre a toxicidade de n-alquilsulfatos por microcalorimetria de fluxo

Evento: 28º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas, Minas Gerais, **2005**

Título: Estudo Microcalorimétrico de processos de biorredução por *Saccharomyces cerevisiae*

Evento: 28º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química - Poços de Caldas, Minas Gerais, **2005**

Título: Estudos experimentais e teóricos sobre a influência biológica dos surfactantes n-alquilsulfatos frente à bactéria *Chromobacterium violaceum*

Evento: 28º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química - Poços de Caldas, Minas Gerais, **2005**

Título: Real time flow microcalorimetric study of the antibacterial activity of anionic surfactants (sodium alkylsulfates) on the respiration of *Chromobacterium violaceum*

Evento: 29th International Conference on Solution Chemistry – Portoroz, Slovenia, **2005**

- **Trabalhos Publicados ou submetidos para Publicação**

Calorimetric Study of the Antibacterial Activity of Sodium n-Alkylsulfates on the Metabolism of *Chromobacterium violaceum*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* (**2005**), 16(5), p.1085

Theoretical and Calorimetric Investigations of the Bioactivity of a Homologous Series of Anionic Surfactants on the Metabolism of *Chromobacterium violaceum*, *Journal of Solution Chemistry* (no prelo).

An Experiment of Kinetics of Mutarotation of D-Glucose Using an Inexpensive Blood Glucose Meter, *Journal of Chemical Education*, submetido

- **Monitoria**

Curso QG-102, “*Química Geral Experimental*”, Turma J, 2º Semestre de 2003. Disciplina sob responsabilidade de Roberto Rinaldi Sobrinho (Instrutor Graduado), supervisionado por Prof. Dr. José de Alencar Simoni

Resumo

BIOENERGÉTICA DO PROCESSO DE BIORREDUÇÃO DA CETONA PRÓ-QUIRAL ACETOACETATO DE ETILA. UM ESTUDO CALORIMÉTRICO.

Investigou-se neste trabalho o processo de biorredução do acetoacetato de etila promovido por *Saccharomyces cerevisiae*. Para este estudo utilizou-se a técnica de calorimetria de fluxo aliada ao monitoramento de outras propriedades associadas ao metabolismo celular. Observou-se que, através dos experimentos aeróbicos e anaeróbicos na presença de excesso de glicose, a biorredução pode ocorrer tanto no citoplasma quanto na matriz mitocondrial, dependendo das condições de aeração do meio. Verificou-se que quando o processo é realizado em condições anaeróbicas, este ocorre no citossol associado aos cofatores NADPH, regenerados na via pentose fosfato. Já em condições aeróbicas, este processo se mostrou associado ao consumo dos cofatores NADH na matriz mitocondrial. Observou-se, também, que a biorredução ocorre associada ao catabolismo da glicose (fermentativo ou respiratório). Estudou-se também o processo de biorredução na presença de lactato como única fonte de energia exógena e também na ausência de fonte de energia exógena. Desses experimentos não foi possível chegar a muitas conclusões sobre este processo de redução, visto que parte do acetoacetato parece ter sido consumido pela *S. cerevisiae* como fonte de energia. Assim, na ausência de glicose, a qual é uma fonte de energia de fácil assimilação pela *s. cerevisiae* ou na presença de uma fonte de energia de difícil assimilação (lactato), o microorganismo pode utilizar parte do acetoacetato de etila como fonte de energia.

Abstract

BIOENERGETIC OF BIOREDUCTION PROCESS OF THE PRO-CHIRAL KETONE ETHYL ACETOACETATE. A CALORIMETRIC STUDY.

The main objective of this work was to investigate the ethyl acetoacetate bioreduction process by *Saccharomyces cerevisiae*. Flow calorimetric technique associated with other properties directly related to the cellular metabolism was used to monitoring the bioreduction process energetics. Aerobic and anaerobic experiments demonstrated that the bioreduction process can occur into both cytoplasm and mitochondrial matrix, depending on aeration conditions. Under anaerobic conditions, the bioreduction process occurs in the cytosol associated with the NADPH cofactors consumed from the pentose phosphate pathway. Under aerobic conditions with the presence of glucose this process appears to occur in the mitochondrial matrix associated with NADH cofactor consumption. It was also observed that the bioreduction process is directly associated either fermentative or respiratory glucose catabolism. This bioreduction process was also studied in the presence of lactate as the only exogenous energy source and also in the complete absence of exogenous energy source. Under those conditions, it was not possible to conclude about the bioreduction process, since part of ethyl acetoacetate seems to be consumed by the microorganism as an energy source. Thus, in the absence of glucose, an energy source easily assimilable by *S. cerevisiae* or in the presence of an energy source of a more difficult assimilation (lactate), the microorganism can use part of ethyl acetoacetate as an energy source.

Índice

Algumas Siglas e Abreviações	xiii
Índice de Tabelas	xv
Índice de Figuras	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leveduras	1
1.1.1 Estrutura Celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.1.2 Crescimento Celular: Condições Gerais	3
1.2 Sistema de Transporte de fontes de energia em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.2.2 Transporte de Glicose	5
1.2.3 Transporte de Lactato	8
1.3 Metabolismo Celular	10
1.3.1 Metabolismo da Glicose	10
1.3.2 Metabolismo de Lactato	13
1.4 Fontes de Energia Endógenas (Glicogênio e trealose)	15
1.5 Biorredução	16
1.6 Calorimetria	21
1.6.2 Descrição Termodinâmica de Uma Célula	23
1.6.3 Calorimetria Aplicada a Sistemas Biológicos	28
2. OBJETIVOS	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 Construção de Curva de Calibração em Cromatógrafo Gasoso para o Acompanhamento Cinético do Consumo do Substrato Acetoacetato de Etila	32

3.2	<i>Construção de Curva de Calibração em Cromatógrafo Gasoso para o Acompanhamento Cinético da Produção do 3-Hidróxibutirato de Etila (Produto da Biorredução do Acetoacetato de Etila)</i>	33
3.3	<i>Experimentos Microcalorimétricos</i>	33
3.3.1	Calibração Química do Canal de Fluxo do Microcalorímetro	34
3.3.2	Monitoramento Microcalorimétrico - Estabelecimento da Condição Controle	35
3.3.3	Monitoramento Microcalorimétrico do Processo de Biorredução do Acetoacetato de Etila	36
3.4	<i>Monitoramento do Consumo de Glicose por Método Enzimático</i>	36
3.5	<i>Quantificação de Etanol por Método Enzimático</i>	37
3.6	<i>Quantificação Espectrofotométrica de Lactato por Método Enzimático (Visível)</i>	38
3.7	<i>Monitoramento do Processo de Biorredução do Acetoacetato de Etila por Cromatografia Gasosa</i>	38
4.	<i>RESULTADOS</i>	39
4.1	<i>Evidência Calorimétrica da Repressão Catabólica</i>	39
4.2	<i>Experimentos Aeróbicos com Glicose (C-AG e B-AG)</i>	41
4.3	<i>Experimentos Anaeróbicos com Glicose (C-AnG e B-AnG)</i>	42
4.4	<i>Experimentos Aeróbicos com Lactato (C-AL e B-AL)</i>	43
4.5	<i>Experimentos Aeróbicos na Ausência de Fonte de Energia Exógena (C-ASG e B-ASG)</i>	44
4.6	<i>Dados Numéricos Relativos aos Experimentos</i>	45
5.	<i>DISCUSSÃO</i>	49
5.1	<i>Aspectos Gerais</i>	49
5.2	<i>Evidência Calorimétrica do Efeito de Repressão Catabólica</i>	53
5.3	<i>Experimentos Aeróbicos na Presença de Glicose (AG)</i>	55

5.4	<i>Experimentos Anaeróbicos na Presença de Glicose (AnG)</i>	59
5.5	<i>Experimentos Aeróbicos na Presença de Lactato (AL)</i>	63
5.6	<i>Experimentos Aeróbicos na Ausência de Fonte de Energia Exógena</i>	68
<hr/>		
6.	CONCLUSÃO	73
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Algumas Siglas e Abreviações

ADP: Adenosina difosfato

AG: Experimentos aeróbicos com Glicose

AL: Experimentos Aeróbicos com Lactato

AnG: Experimentos Anaeróbicos com Glicose

ASG: Experimentos Aeróbicos Sem Glicose

ATP: Adenosina trifosfato

B-AG: Experimento de Biorredução Aeróbico com Glicose

B-AL: Experimentos de Biorredução com Lactato

B-AnG: Experimento de Biorredução Anaeróbico com Glicose

B-ASG: Experimento de Biorredução Aeróbico sem Glicose

C-AG: Experimento Controle Aeróbico com Glicose

C-AL: Experimento Controle Aeróbico com Lactato

C-AnG: Experimento Controle Anaeróbico com Glicose

C-ASG: Experimento Controle Aeróbico Sem Glicose

Gluc.: Glicose

h: Hora

3-HB: 3-Hidróxibutirato de etila

i: Corrente (Ampéres, A)

J: Unidade de energia, Joule

K_M: Constante de Michaelis-Menten

L: Litro

min.: Minuto (tempo)

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

n_{3-HB}: Número de moles de 3-HB

n_{gluc}: Número de moles de glicose

P: Potência

PFK: Fosfofrutocinase

Pi: Fosfato inorgânico

pO₂: Concentração de O₂ dissolvido

P-t: Potência-tempo

Q: Calor referente a um efeito térmico

R: Coeficiente de Correlação

rev.: Reversível

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono

RMN ¹H: Ressonância Magnética nuclear de hidrogênio

rpm: Rotações por minuto

T: Temperatura

UV: Ultravioleta, região do espectro eletromagnético

Vis.: Visível, região do espectro eletromagnético

VPF: Via Pentose Fosfato

W: Unidade de potência, Watts

w: Trabalho termodinâmico

ΔG: Variação da energia de Gibbs

ΔH: Variação de entalpia

ΔS: Variação de entropia

ΔU: Variação de energia

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores de Q liberado para o processos controle anaeróbico (Fermentação) e aeróbico (Respiração)	40
Tabela 2: Dados experimentais dos processo controle e biorredução nas diferentes condições experimentais estudadas no período de 20 horas de experimento	46
Tabela 3: Valores numéricos relativos dos controle e biorredução para cada processo estudado, obtidos a partir dos valores absolutos da tabela 1	47
Tabela 4: Valores de conversão dos processos de biorredução	48
Tabela 5: Eficiência do processo de biorredução para os processos B-AG e BAnG	48

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática dos processos ativos e passivos de difusão através da membrana plasmática	7
Figura 2: Representação esquemática dos transportes enzimaticamente mediados, simporte, antiporte e uniporte.....	9
Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de bombeamento de prótons para o meio extracelular por intermédio da ATPase de membrana	10
Figura 4: Representação das vias catabólicas da glicose	13
Figura 5: Representação do processo de oxidação do lactato a piruvato na superfície da membrana mitocondrial interna.....	14
Figura 6: Representação das estruturas sintetizadas a partir do precursor 3 hidroxibutirato de etila, produto da redução do acetoacetato de etila: 1) (R,R)-(-)-grahamimicina, 2) (R,R)-pirenoforina, 3) (R)-(+)-recifeiolídeo, 4) (S)-(+)-sulcatol, 5) (R)-lavandulol, 6) carbomicina B e 7) coletodiol.....	18
Figura 7: Representação esquemática simplificada do catabolismo da glicose acoplada a regeneração do cofator NADH, que serão utilizados no processo de biorredução, conforme representado pela equação 3.....	20
Figura 8: Representação esquemática dos tipos de calorímetros apresentados. a) Calorímetro isoperibólico (adiabático real), b) Calorímetro isotérmico.....	22
Figura 9: Representação esquemática simplificada de um sistema termodinâmico aberto.....	24
Figura 10: Representação gráfica do registro térmico de um processo biológico	30
Figura 11: Representação esquemática do sistema em “loop” reator-calorímetro reator, com fluxo mantido por uma bomba peristáltica.....	34
Figura 12: Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}); a) Curva Potência-tempo b) Curva de consumo de O_2 ; c) Produção de etanol; d) Curva de monitoramento de pH; e) Curva de monitoramento de consumo de glicose; f) Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidroxibutirato de etila.	42
Figura 13: Gráficos obtidos a partir dos experimentos anaeróbicos na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}); a) Curva Potência-tempo b) Produção de	

etanol; c) Curva de monitoramento de pH; d) Curva de monitoramento de consumo de glicose; e) Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.	43
Figura 14: a) Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos com lactato como fonte de energia (400 mmol L^{-1}); a) Curva Potência-tempo b) Curva de consumo de O_2 ; c) Curva de monitoramento de pH; d) Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.	44
Figura 15: Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos na ausência de fonte de energia exógena: a) Curva Potência-tempo b) Curva de consumo de O_2 ; c) Curva de monitoramento de pH; d) Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.	45
Figura 16: Representação esquemática da competição entre acetoacetato de etila e acetaldeído pelo cofator NADH.....	60
Figura 17: Representação parcial da via glicolítica e a entrada dos intermediários da VPF na via glicolítica.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leveduras*

Leveduras são fungos predominantemente unicelulares. Os fungos constituem uma espécie de microorganismos de extrema importância, pois atuam como decompositores primários, constituem a maioria dos patógenos de plantas (grande impacto econômico), oferecem sistemas geneticamente bem desenvolvidos para estudos de transmissão de caracteres e são de extrema importância para a indústria de fermentação e biotecnologia (Kreger van Rij, 1980; Bruns e col., 1991).

As leveduras, na qualidade de organismos vivos, são taxonomicamente* classificadas em reinos, grupos, famílias, subfamílias, etc, segundo diversas características que vão de morfológicas a genéticas. Nesse trabalho focaremos atenção na *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada no estudo realizado.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de panificação) é taxonomicamente definida como pertencente ao *Reino Fungi*, domínio *Eucariota*, gênero *Ascoporogenous*, subfamília *Saccharomycodeae* (juntamente com mais 22 gêneros) e família *Saccharomycetaceae* (Kreger-Van Rij, 1980; Miles e col, 1987).

A morfologia celular varia entre os gêneros existentes, podendo ser ovais, circulares, cilíndricas, etc. (Kreger-Van Rij, 1980).

1.1.1 Estrutura Celular da *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras constituem a classe dos organismos **eucariotos** mais simples existentes na natureza. Devido a sua semelhança em alguns aspectos metabólicos com as células de organismos superiores, como as dos seres humanos, foram e ainda são extensivamente utilizadas em estudos metabólicos, dando uma enorme contribuição para o conhecimento dos processos metabólicos e de transporte, adquiridos ao longo de décadas de pesquisa.

* *Taxonomia é uma subárea das Ciências Biológicas na qual é realizado o trabalho de classificação dos organismos vivos.*

Sua estrutura básica não difere muito das células constituintes dos organismos eucariotos superiores. São constituídas basicamente por: parede celular, membrana plasmática, vacúolos, retículo endoplasmático, núcleo, carioteca e organelas (mitocôndria, peroxissomos, lisossomos). A seguir são apresentadas as funções básicas de cada um desses constituintes celulares (Barnett, 1976).

A **parede celular** é responsável pela morfologia celular, garantindo rigidez estrutural e a sobrevivência da *S. cerevisiae* em diferentes condições osmóticas, sem que ocorra a ruptura das células. A parede celular também tem a função de filtro, limitando a entrada de moléculas grandes. Sua espessura pode variar entre 70 e maior que 200 nm e constituem, aproximadamente, 30% do peso seco da célula. São basicamente constituídas por moléculas de **β -D-glucana** ou **manana** entrelaçadas e embebidas em polissacarídeos ou em glicoproteínas (Barnett, 1976).

A **membrana plasmática** encontra-se interior à parede celular (espaço periplasmático de ~10nm) constituindo uma barreira protetora cujas principais funções são o rigoroso controle da entrada e saída de nutrientes e metabólitos e a manutenção das condições intracelulares. Sua espessura é de, aproximadamente, 8 nm, e é composta por uma bicamada de lipídeos associados a proteínas intrínsecas e extrínsecas, responsáveis por reações na superfície da membrana e pelo transporte, ativo e/ou passivo mediado, de metabólitos e nutrientes (Barnett, 1976; Voet e Voet, 1995).

O **vacúolo** é um espaço preenchido com um fluído delimitado por uma simples membrana conhecida como **tonoplasto**. É a maior organela celular, a qual são atribuídas funções de regulação osmótica, estoque de aminoácidos, purinas, açúcares, etc. (Barnett, 1976; Voet e Voet, 1995).

O **retículo endoplasmático** é um sistema complexo de duplas membranas que encontram-se, provavelmente, associadas a todas as organelas, possuindo conexões com a membrana celular, com a carioteca e mitocôndrias. A maior parte desta organela, chamada de retículo endoplasmático rugoso, é repleto de ribossomos para a síntese de proteínas. Já o restante deste sistema, conhecido como retículo endoplasmático liso, encontra-se sem ribossomos e é responsável pela síntese de lipídeos (Barnett, 1976; Voet e Voet, 1995).

O **núcleo** é composto, entre outras espécies, por fitas de ácido desoxiribonucléico (DNA) as quais são responsáveis por transferir as células suas características hereditárias. No caso dos organismo eucariotos, como a *S. cerevisiae*, o núcleo encontra-se isolado do citoplasma por uma membrana conhecida como **carioteca** (Voet e Voet, 1995).

Os **lisossomos** são organelas que possuem de 0,1 - 0,8 μm . São bolsas membranosas essenciais pois contêm uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. Sua função é digerir materiais ingeridos por endocitose e reciclagens de componentes celulares como proteínas, ácido nucléicos, açúcares, etc (Voet e Voet, 1995).

A **mitocôndria** é uma organela com tamanho que pode variar de 0,3 a 1 μm de diâmetro, podendo atingir até 5 μm de comprimento. Mitocôndrias possuem DNA próprio e podem se replicar de acordo com a demanda energética celular. Nessa organela ocorre transferência da energia livre das reações oxidativas para moléculas de ATP. Esse processo ocorre pelo acoplamento de um sistema de reações enzimáticas de oxidação (ciclo de Krebs) e um sistema de transferência de elétrons (cadeia transportadora de elétrons) associado ao processo de fosforilação oxidativa (Voet e Voet, 1995).

Os **peroxissomos** são organelas frágeis que possuem cerca de 0,5 μm de diâmetro, reproduzem-se por fissão e contêm enzimas oxidativas. Seu nome é derivado de algumas reações oxidativas peroxissomais que geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que permitem certas compartimentalizações metabólicas (Voet e Voet, 1995).

1.1.2 Crescimento Celular: Condições Gerais

O crescimento celular da *S. cerevisiae* ocorre em condições definidas de parâmetros físico-químicos e composição do meio (fontes de carbono e energia, fonte de nitrogênio, pH, vitaminas, micronutrientes, temperatura e aeração).

As condições ótimas de crescimento desse microorganismo encontram-se em pH ácido (entre 3,5 e 6,5), o qual acredita-se ser a faixa de pH ótimo para uma atividade adequada das proteínas de transporte e enzimas localizadas na membrana plasmática

e também na geração de uma força motriz útil responsável pelo transporte mediado de substratos através da membrana (Davenport, 1980).

Leveduras em geral são capazes de utilizar íons amônio e aminoácidos como fonte de nitrogênio, que serão utilizados pelas vias anabólicas, principalmente na biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos. Algumas espécies de leveduras, entre as quais não se encontra a *S. cerevisiae*, são capazes de utilizar também íons nitrato e/ou nitrito inorgânicos como fonte de nitrogênio, entretanto não há informações sobre espécies de leveduras capazes de fixar nitrogênio gasoso (N₂) (Davenport, 1980; Rose, 1987).

Os carboidratos utilizados como fontes primárias de energia e/ou carbono, são principalmente, glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e maltose. Além destas fontes de carbono em condições aeróbicas, as leveduras são geralmente capazes de utilizar os ácidos acético, láctico, oxaloacético e o α – cetoglutárico (Miles e col., 1987).

As vitaminas essenciais ao crescimento das leveduras são as pertencentes ao grupo B e os fatores de crescimento mais comuns são biotina, ácido pantotênico, inositol, tiamina, ácido nicotínico e pirodoxina (Davenport, 1980; Miles e col., 1987).

Deve ser dito que o crescimento de leveduras, geralmente, ocorre em condições aeróbicas mesmo nas espécies anaeróbicas facultativas, visto que o crescimento depende da presença de oxigênio molecular para biossíntese de moléculas essenciais ao crescimento (Rose, 1987).

No caso de algumas leveduras, entre elas a *S. cerevisiae*, em presença de glicose mesmo em condições estritamente aeróbicas, o metabolismo é do tipo respiratório fermentativo. Esse comportamento metabólico é provocado por um efeito conhecido como efeito *Crabtree* ou **repressão catabólica**. Esse efeito se pronuncia em condições onde a concentração de glicose ultrapassa um determinado valor limite. O mecanismo responsável pela repressão catabólica pode ser bastante complexo, mas estudos mostram que ocorre principalmente através de forte efeito repressivo da glicose sobre a atividade de enzimas respiratórias e também, possivelmente, pela inibição da expressão genética de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato que não pode ser oxidada pelo ciclo de Krebs seja reduzida a etanol, pelo processo fermentativo. (Fiechter e col., 1981; Bakker e col., 2001).

1.2 Sistema de Transporte de fontes de energia em *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.2 Transporte de Glicose

A membrana plasmática constitui uma ótima barreira contra a permeação de açúcares, o que torna a simples difusão um processo cineticamente desfavorável, embora seja um processo espontâneo do ponto de vista termodinâmico. Portanto, é necessário a intermediação de algum tipo de transportador específico e eficiente, que possibilite a entrada de glicose a uma taxa favorável ao metabolismo celular (Fiechter e col., 1981).

O tipo de mecanismo de transporte envolvido no processo de permeação de monossacarídeos para o citossol da célula provocou muitas discussões entre pesquisadores em meados do século XX, momento de maior atividade de pesquisa nessa área, conforme descrito por Barnett (1976).

Conforme descrito por James (1976) e Eddy (1982) em suas revisões, o grupo de pesquisa de Steveninck defendia a idéia de que o transporte de glicose ocorria por um mecanismo conhecido como translocação de grupo, onde a glicose deveria ser fosforilada na membrana plasmática e transportada para o citossol. O processo ocorreria pela formação de um complexo entre a glicose, o carreador e um grupo polifosfato, ocorrendo a transferência de um grupo fosfato para a glicose, e sua liberação no citossol. Esse mecanismo foi postulado baseado na observação de que a 2-desoxi-D-glicose, nos estudos realizados, foi encontrada na forma fosforilada no interior celular e, por analogia, postulou-se que a D-glicose sofreria o mesmo processo de transporte. No entanto, não foi encontrado na *S. cerevisiae* nenhuma evidência concreta de que esse seja o mecanismo de transporte de glicose. Esse tipo de transporte é muito comum em espécies bacterianas (Barnett, 1976; Fiechter e col., 1981; Eddy, 1982).

Já os grupos de Kotyk e de Cirillo, conforme descrito por James (1976) e Eddy (1982), baseados em evidências mais concretas defendiam a idéia de que o transporte de glicose ocorreria por um mecanismo conhecido como difusão facilitada, um tipo de

transporte mediado por enzimas carreadoras intrínsecas às membranas celulares. Esse tipo de transporte ocorre a favor do gradiente de concentração, sem a necessidade do consumo de energia metabólica, sendo um processo de difusão passiva. Essa é a teoria mais aceita atualmente.

Foram descritos três carreadores para o processo de transporte passivo da glicose:

- um carreador com baixa seletividade, que transporta uma ampla variedade de monossacarídeos;
- um carreador que transporta com alta seletividade, glicose e açúcares estruturalmente semelhantes à glicose;
- um carreador responsável pelo transporte ativo dos açúcares D-glicose, D-arabinose, D-ribose, e D-xilose. O transporte ativo é utilizado pela *S. cerevisiae* para o transporte de glicose quando as concentrações externas são muito baixas, geralmente abaixo de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fiechter e col., 1981).

A *figura 1* representa esquematicamente os sistemas de transporte de difusão simples, difusão facilitada (transporte mediado) e transporte ativo, sendo os dois últimos os mecanismos de transporte mais aceitos atualmente para a descrição do processo de transporte de glicose.

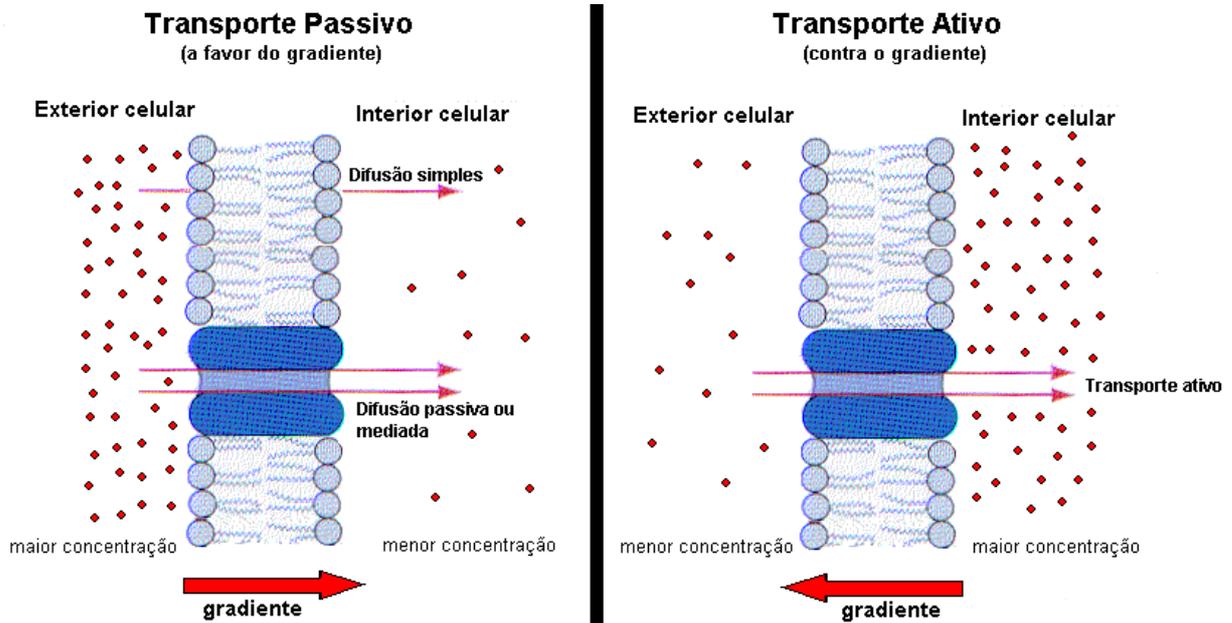


Figura 1: Representação esquemática dos processos ativos e passivos de difusão através da membrana plasmática

O transporte de glicose para o citossol mostrou-se, em vários estudos, ser uma etapa limitante do processo de metabolismo da glicose, visto terem sido observados que não há acúmulo de glicose no citossol da *S. cerevisiae*, fornecendo fortes indícios de que a glicose é metabolizada pela via glicolítica tão rapidamente quanto à velocidade com que ela chega ao citossol. A taxa de influxo de glicose para o citossol pode ser matematicamente descrita pela equação 1 (Fiechter e col., 1981), que é uma representação matemática para o processo de transporte de glicose por difusão facilitada.

$$V_{global} = V_{ent} - V_{saida} = V_{max1} \frac{S_{ext}}{S_{ext} + K_{cs1}} - V_{max2} \frac{S_{int}}{S_{int} + K_{cs2}} \quad (1)$$

Nesta equação, V_{global} representa o fluxo global para dentro da célula, V_{ent} e V_{saida} representam os fluxos de entrada e saída da célula, V_{max1} e V_{max2} representam a velocidade máxima da enzima para a entrada (1) e para a saída (2) da célula e K_{cs1} e K_{cs2} são as constantes de dissociação do complexo substrato carreador (Fiechter e col., 1981).

O chamado efeito Pasteur, o qual relata uma menor taxa de consumo de glicose em condições aeróbicas em relação às anaeróbicas é, pelo menos em parte, decorrente da regulação das enzimas carreadoras de forma que estas apresentem um menor valor de K_M (constante de Michaelis-Menten) em condições aeróbicas, enfatizando o papel de etapa limitante do transporte sobre o metabolismo da glicose (Fiechter e col., 1981; Eddy, 1982).

1.2.3 Transporte de Lactato

A *S. cerevisiae* é um tipo de microorganismo bastante versátil no que diz respeito à fonte de energia/carbono, podendo utilizar inclusive monocarboxilatos como fonte de energia/carbono, na ausência de glicose ou outra fonte de energia de fácil metabolização. Entre os monocarboxilatos mais comuns encontra-se o lactato que, embora não seja um metabólito desse microorganismo, este pode utilizá-lo como fonte de energia/carbono em condições exclusivamente aeróbicas (Casal e col., 1995).

O lactato é a base conjugada de um ácido fraco, o ácido láctico, portanto, independente das condições experimentais, o lactato sempre irá coexistir em equilíbrio com seu ácido conjugado, o ácido láctico. No entanto, esperava-se que o ácido láctico, enquanto molécula neutra, pudesse permear a membrana plasmática através de um processo de difusão simples. Casal e col. (1999) demonstraram que na ausência do gene JEN1, que acredita-se ser o gene responsável pela síntese da permease lactato próton-simporte, não ocorre o transporte do ácido láctico.

Muitos estudos foram realizados até que se chegasse a conclusão de que o mecanismo responsável pelo transporte do lactato através da membrana plasmática é um processo enzimaticamente mediado conhecido como próton-simporte. A enzima carreadora é intrínseca à membrana plasmática e pertence à classe das permeases. Acredita-se que a permease responsável pelo transporte de lactato também realize o transporte de outros monocarboxilatos tais como acetato, piruvato e propionato. No entanto, há relatos de que essa enzima só exista em culturas crescidas na presença de

lactato, ou seja, a permease parece ser geneticamente regulada por estes nutrientes (Casal e col., 1995, 1998, 1999).

O mecanismo de próton-simporte, pelo qual o lactato é transportado para o citossol, é classificado como transporte ativo secundário, pois o transporte acontece mediante o consumo de energia, que nesse caso não se trata de ATP (como no transporte ativo primário), mas de energia referente ao gradiente protônico entre os meios intra e extracelular, através da membrana celular (Voet e Voet, 1995; Bonato e col., 1998). O mecanismo próton-simporte é representado esquematicamente na *figura 2* (Bonato e col., 1998).

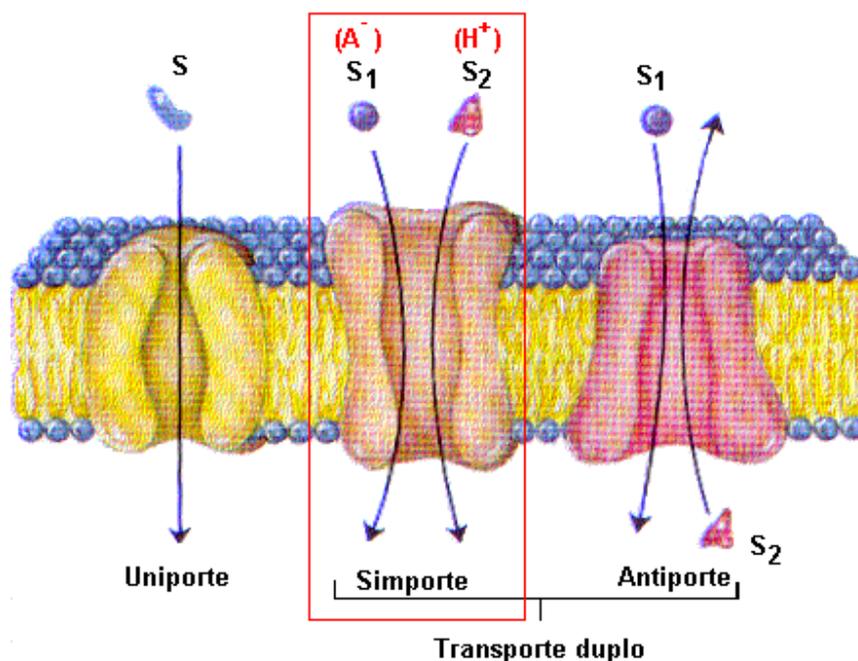


Figura 2: Representação esquemática dos transportes enzimaticamente mediados, simporte (destacado em vermelho), antiporte e uniporte.

Conforme representado na *figura 2*, o transporte pelo mecanismo próton-simporte (em destaque) é caracterizado pela passagem concomitante de dois íons, um deles o lactato (nesse caso, representado por A^-) e o outro necessariamente um próton (H^+) ambos na mesma direção. A atividade do mecanismo próton-simporte mostrou ser fortemente reprimida por glicose (Cássio e col., 1987; Casal e col., 1995, 1999).

Em meio neutro ou básico, esse gradiente protônico, responsável por impulsionar o lactato para o interior celular, pode ser gerado pelas **ATPases** de membrana (**M-**

ATPases) acopladas ao catabolismo da glicose. As **M-ATPases**, também conhecidas como bombas de próton, são enzimas intrínsecas da membrana celular, essenciais para o crescimento, assim como para um funcionamento adequado das vias glicolítica e gliconeogênica do microorganismo (Imai e Ohno, 1995; de la Fuente e col., 1997).

As ATPases de membrana além de serem responsáveis pela manutenção do pH intracelular e, conseqüentemente, pela regulação das enzimas chave da via glicolítica e gliconeogênese, o gradiente protônico gerado por elas também é a força motriz responsável pelo transporte de nutrientes como maltose, aminoácidos e ácidos monocarboxílicos, como o lactato. A *figura 3* representa o funcionamento da **M-ATPase** no bombeamento de prótons do meio intra para o extracelular (Imai e Ohno, 1995).

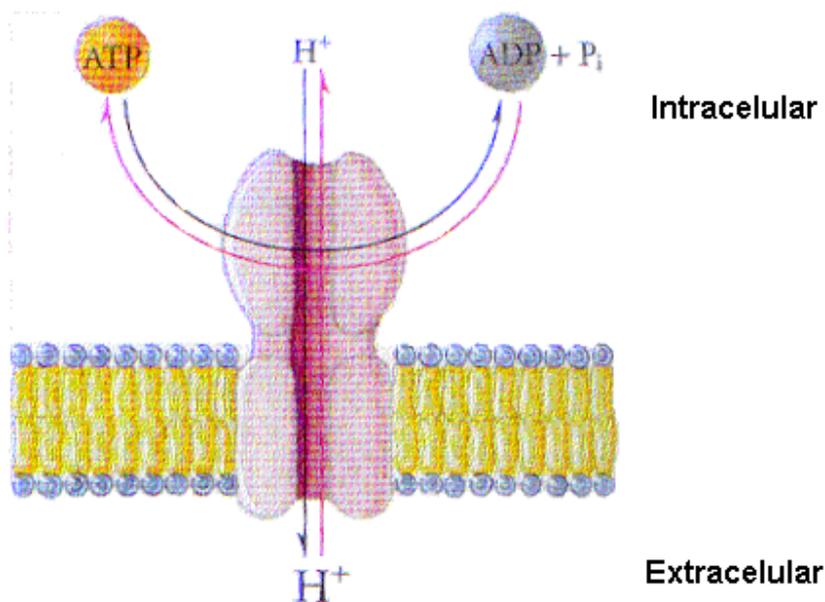


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de bombeamento de prótons para o meio extracelular por intermédio da ATPase de membrana

1.3 Metabolismo Celular

1.3.1 Metabolismo da Glicose

O metabolismo celular é constituído por uma grande quantidade de reações químicas enzimaticamente catalisadas, que ocorrem seqüencialmente e de forma coordenada cujo objetivo é a obtenção de um ou mais produtos específicos

(metabólitos e ATP), que serão utilizados subseqüentemente nas etapas de biossíntese. O processo metabólico é tradicionalmente dividido em duas etapas conhecidas como **catabolismo** e **anabolismo**.

O catabolismo ou metabolismo oxidativo é a via pela qual os nutrientes e constituintes celulares (carboidratos, lipídeos, fontes de nitrogênio, etc) são oxidativamente degradados com o objetivo de produzir energia química (na forma de ATP) e intermediários metabólicos para processos biossintéticos.

O anabolismo ou metabolismo redutivo, também conhecido como via biossintética, é o processo pelo qual as biomoléculas são sintetizadas a partir de moléculas mais simples e energia (ATP), que são em grande parte oriundos das vias catabólicas (Voet e Voet, 1995).

Na maioria das espécies de levedura o catabolismo ocorre por duas vias principais, fermentação e/ou respiração. Em algumas espécies de leveduras esses dois processos podem ocorrer concomitantemente, como no caso da *S. cerevisiae*. Esse fenômeno depende das condições do meio, principalmente da concentração de glicose e da limitação de oxigênio do meio (Hoorgerheide, 1975; Davenport, 1980; Rose, 1987).

Algumas espécies de leveduras, entre elas a *S. cerevisiae*, são anaeróbicas facultativas, ou seja, preferem utilizar oxigênio se este estiver disponível no meio, devido ao maior rendimento energético na forma de ATP produzido no processo respiratório. No caso de ausência completa de oxigênio, o metabolismo oxidativo ocorre exclusivamente através da fermentação. O rendimento energético pode ser medido em termos do total de ATP's produzidos ao final de cada uma destas vias oxidativas, sendo um total de 38 moles de ATP's/ mol de glicose pela respiração (2 na via glicolítica e 36 no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa) e na fermentação são obtidos apenas 2 ATP's/ mol de glicose provenientes da via glicolítica. Conseqüentemente, o consumo de glicose em condições anaeróbicas ocorre em uma taxa mais elevada em relação à observada em condições aeróbicas. Essa menor taxa de consumo de glicose em condições aeróbicas recebeu o nome de efeito Pasteur, pois foi primeiramente observado e relatado por Louis Pasteur em 1867 (Barnett, 1976; Fiechter e col., 1981). Embora a *S. cerevisiae* seja um microorganismo anaeróbico facultativo ela, geralmente, não é apta a crescer em anaerobiose, visto necessitar de pelo menos três constituintes

celulares (resíduos de ácidos graxos insaturados, esteróis e ácido nicotínico) biossintetizados pelas vias anabólicas exclusivamente na presença de oxigênio molecular (Davenport, 1980; Rose, 1987; Miles e col., 1987).

O catabolismo da glicose inicia-se na via glicolítica gerando-se como produto final desta via 2 moles de piruvato/ mol de glicose consumida. Neste estágio, havendo disponibilidade de oxigênio no meio, este piruvato é transportado do citossol para o espaço intermembrânico mitocondrial através de poros e, do espaço intermembrânico para a matriz mitocondrial por um processo de difusão facilitada (Pronk e col., 1996). Na matriz mitocondrial o piruvato é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase e, consumido oxidativamente pelo ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, gerando-se como produtos finais da via CO_2 , água e NADH, além de intermediários que poderão ser utilizados nas vias anabólicas para processos biossintéticos. O cofator NADH é reoxidado a NAD^+ pela cadeia transportadora de elétrons acoplada ao processo de fosforilação oxidativa, gerando 38 moles de ATP/ mol de glicose. A cadeia transportadora de elétrons é composta por complexos enzimáticos localizados na superfície da membrana mitocondrial interna (Pronk e col., 1996).

Na completa ausência de oxigênio molecular, o cofator NAD^+ utilizado como acceptor de elétrons na oxidação de glicose a piruvato, pela via glicolítica, precisa ser regenerado para que possa haver continuidade no fluxo da via glicolítica. Neste caso, a regeneração do cofator NAD^+ ocorre pela via fermentativa, responsável pela conversão de piruvato em etanol e CO_2 e o ATP é produzido na via glicolítica (Lamprecht, 1980; Voet e Voet, 1995).

Uma terceira alternativa para o catabolismo da glicose é a via pentose fosfato (VPF) ou hexose monofosfato, que na realidade trata-se apenas de um desvio da via glicolítica. Esta via utiliza-se apenas da primeira etapa da via glicolítica, onde a glicose é convertida a glicose-6-fosfato. A partir deste ponto há um desvio da via glicolítica pela via pentose fosfato, responsável pela regeneração dos cofatores NADPH, geralmente utilizados nos processos anabólicos (metabolismo reductivo). Além da regeneração deste cofator, a via pentose fosfato também gera como intermediários ribose-5-fosfato (R5P), gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e frutose-6-fosfato (F6P) entre outros. O R5P é

utilizado na biossíntese de nucleotídeos, F6P e GAP retornam a via glicolítica como seus intermediários (Voet e Voet,1995).

As vias catabólicas mencionadas acima são esquematicamente apresentadas na *figura 4*.

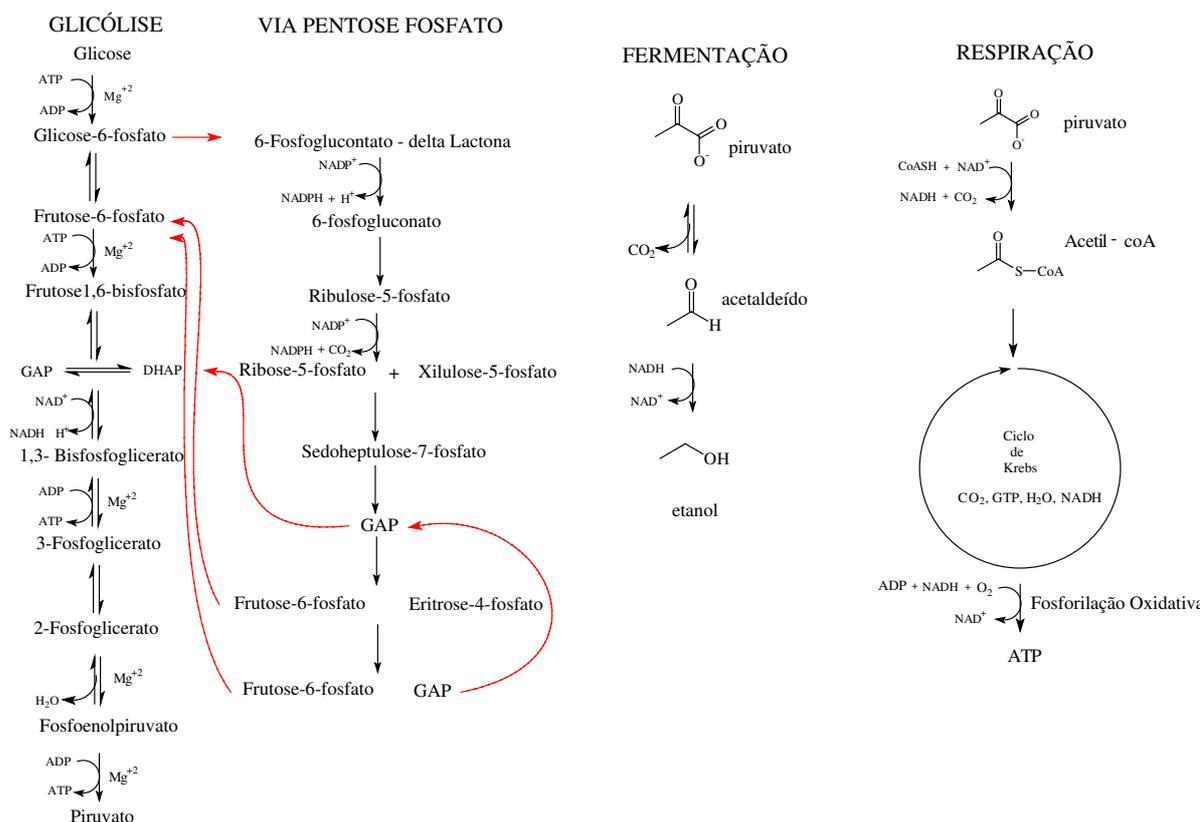


Figura 4: Representação das vias catabólicas da glicose

1.3.2 Metabolismo de Lactato

Saccharomyces cerevisiae é um microorganismo bastante versátil no que diz respeito a substratos que podem ser consumidos como fonte de energia/carbono (Casal e col., 1995, 1999)

Ácidos monocarboxílicos, como o lactato, é um desses substratos, podendo ser metabolizado em condições exclusivamente aeróbicas (Hoogerheide, 1975; Casal e col., 1995, 1999; Lodi e col., 2002; Rigoulet e col., 2004).

Segundo Rigoulet e col. (2004), o lactato é convertido em piruvato, através da sua oxidação por enzimas intrínsecas à membrana mitocondrial interna, D-lactato

ferricitocromo c oxirredutase (EC 1.1.24) e L-lactato ferricitocromo c oxirredutase (citocromo b2, EC 1.1.23), estando associado ao processo respiratório, cada uma com sua respectiva estereosseletividade. O piruvato, de maneira análoga ao obtido pela glicólise, é consumido via ciclo de Krebs.

A representação esquemática do processo de oxidação do lactato é apresentada na *figura 5*.

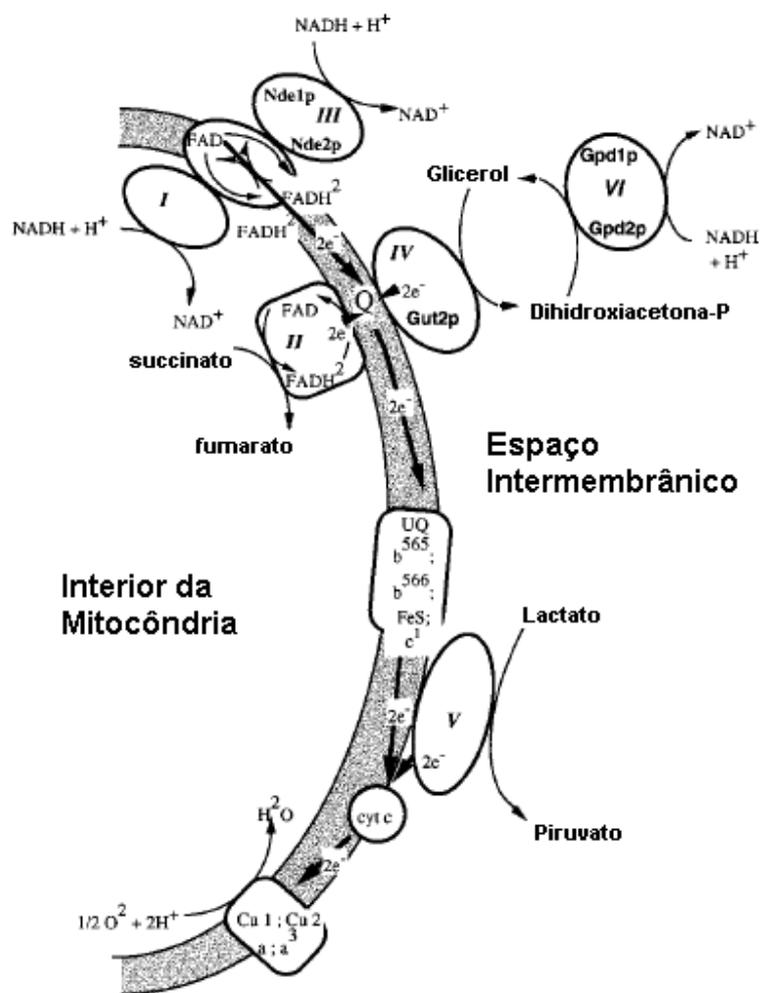


Figura 5: Representação do processo de oxidação do lactato a piruvato na superfície da membrana mitocondrial interna (Rigoulet e col.,2004).

Hoogerheide (1975) em seu trabalho sobre bioenergética apresentou uma provável equação da oxidação metabólica do lactato pela *S. cerevisiae* (equação 2). Neste trabalho, demonstrou que a energia liberada na forma de calor, em condições

nutricionalmente pobres, é bastante semelhante ao valor termodinamicamente previsto pela equação 2.



1.4 Fontes de Energia Endógenas (Glicogênio e trealose)

A *S. cerevisiae* é capaz de armazenar e degradar os polissacarídeos glicogênio e trealose dependendo das condições do meio e do estágio do ciclo de vida do microorganismo. A quantidade desses polissacarídeos pode variar de menos de 1% a mais de 23% do peso seco do microorganismo, constituindo as reservas endógenas de energia/carbono. O acúmulo de glicogênio ocorre em condições de restrição de crescimento (Lillie e Pringle, 1980; François e col., 1988). Atualmente acredita-se que a trealose não seja apenas uma fonte de energia/ carbono, mas também possua uma função de proteção celular, quando esta se encontra em condições estressantes como altas temperaturas, choque osmótico, etc., mantendo a integridade funcional das membranas (Lillie e Pringle, 1980; Belluco, 2001). Diante desse comportamento apresentado pela trealose, o glicogênio parece ser a principal fonte de energia/carbono endógena.

Verificou-se que a síntese desses polissacarídeos é afetada pela disponibilidade de fontes de nitrogênio e, a atividade da glicogênio sintase é controlada por glicose-6-fostato e adenina nucleotídeos, enquanto que a trealase parece ser inibida por D-glicose e trealose-6-fostato (Elbein, 1974; Lillie e Pringle, 1980; François e col., 1988).

A quantidade de glicogênio e trealose pode variar entre 10% e 80%, respectivamente, da quantidade total de carboidratos existente na *S. cerevisiae* (Belluco, 2001).

1.5 Biorredução

1.5.1 Leveduras como reatores biológicos em reações de redução química

As leveduras, entre elas a *Saccharomyces cerevisiae*, são, há muito tempo, conhecidas como “biorreatores” capazes de promover transformações químicas em substratos orgânicos adicionados ao meio de cultura (Harrison, 1970).

As biotransformações mais investigadas, e as que mais atraem o interesse dos químicos orgânicos sintéticos, são as reações de redução química de compostos carbonílicos e sistemas insaturados, que foram e continuam sendo extensivamente estudados. O grande interesse nesta área de pesquisa não está simplesmente na redução do substrato, mas principalmente na estereosseletividade da redução destes compostos pró-quirais e, conseqüentemente, em seu grande potencial de aplicação na síntese de compostos farmacêuticos, que em sua maioria possui centros quirais cuja configuração, geralmente, precisa ser definida (Pereira e Durán, 1996).

Atualmente, fármacos somente podem ser comercializados na sua forma racêmica se comprovado que ambos enantiômeros possuem atividade farmacológica ou que o enantiômero farmacologicamente inativo seja inócuo à saúde.

Além da estereosseletividade das reações de redução promovidas por leveduras, outras características secundárias atraem o interesse dos pesquisadores na tentativa de aplicá-los em escalas industriais. Essas características são o baixo custo, disponibilidade (fermento de pão) e, principalmente, o fato de não gerar resíduos tóxicos, visto que as sínteses quirais utilizam catalisadores que possuem metais pesados em seus sítios catalíticos (Temba e col., 2003).

O substrato estudado neste trabalho foi o acetoacetato de etila, uma substância com boa solubilidade em água cujo processo de biorredução é razoavelmente conhecido, tornando-o, portanto, um ótimo substrato modelo no estudo energético do metabolismo da *S. cerevisiae* durante a biorredução. A equação 3 traz uma representação do processo de redução do acetoacetato de etila utilizando os cofatores NAD(P)H regenerados em associação ao processo catabólico da glicose. Com produto desse processo é obtido um álcool quiral, o 3-hidroxiacetato de etila, que é utilizado na

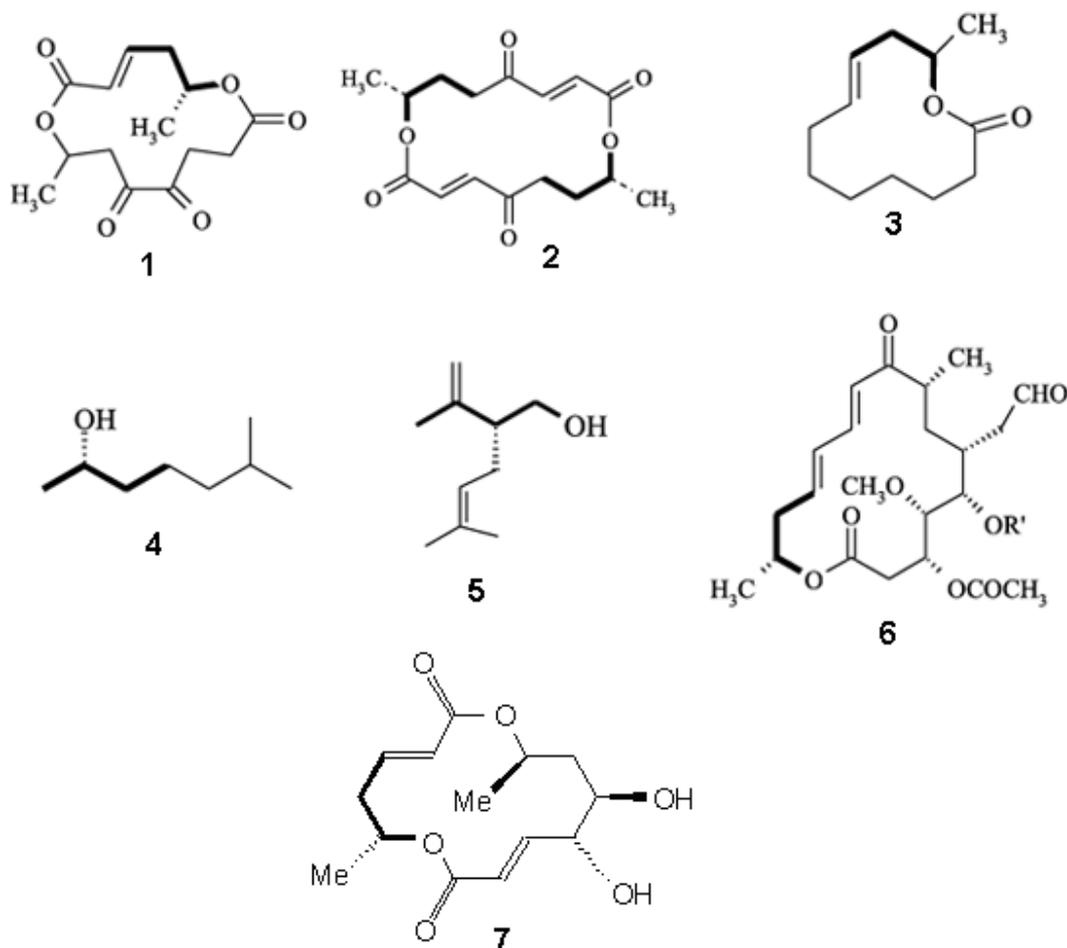


Figura 6: Representação das estruturas sintetizadas a partir do precursor 3 hidroxibutirato de etila, produto da redução do acetoacetato de etila: 1) (R,R)-(-)-grahamimicina, 2) (R,R)-pirenoforina, 3) (R)-(+)-recifeolídeo, 4) (S)-(+)-sulcatol, 5) (R)-lavandulol, 6) carbomicina B e 7) coletodiol (Mori, 1989; Temba e col., 2003).

1.5.2 Fundamentos Bioquímicos da Redução Promovida por Leveduras

Embora se trate de um processo há muito tempo estudado e utilizado em sínteses químicas em escalas laboratoriais, pouco ainda foi estudado no sentido de se compreender melhor o processo do ponto de vista bioquímico, energético e, principalmente, por observações *in vivo*.

É conhecido, através de experimentos realizados com enzimas isoladas de leveduras, que a biorredução é uma reação química enzimaticamente catalisada por enzimas pertencentes à classe das oxirredutases ou desidrogenases, enzimas dependentes do cofator NAD(P)H (Kometani e col., 1989, 1993; Pereira e Durán, 1996, 1998).

Estas enzimas são responsáveis por dois fatores essenciais. O primeiro é o fator cinético, ou seja, redução da energia de ativação da reação química (catálise). Já o segundo fator e, talvez, o mais importante, é a estereosseletividade da redução, ou seja, a capacidade da enzima em fixar o substrato a ser reduzido em uma orientação preferencial, direcionando uma de suas faces pró-quirais (*Re* ou *Si*) para o recebimento do hidreto, oriundo dos cofatores NAD(P)H (Moran e col., 1995).

A redução contínua ocorre mediante a regeneração dos cofatores NAD(P)⁺ a NAD(P)H associada ao metabolismo do microorganismo. A informação de que cofatores NAD(P)H são as espécies redutoras utilizadas no processo de biorredução, permite-nos sugerir que tal processo deva ocorrer intimamente associado ao catabolismo da glicose em condições nutricionalmente pobres (desacoplamento metabólico) (*figura 7*).

Os cofatores NAD⁺ são regenerados a NADH, geralmente, pela via glicolítica (no citossol) e no processo de fosforilação oxidativa (na matriz mitocondrial), como representado na *figura 7*. NADP⁺, geralmente é regenerado a NADPH pela via pentose fosfato. É importante salientar que a *S. cerevisiae* não é capaz de promover a conversão entre as espécies NAD⁺ e NADPH a NADP⁺ e NADH, visto ser conhecido que tal levedura não possui a enzima transidrogenase, responsável pela catálise desta conversão. Seja qual for a via, o consumo de glicose deveria ser essencial para que ocorra o processo de biorredução (Kometani e col., 1991; Kataoka e col., 1992; e Kometani e col., 1997; Bakker e col., 2001).

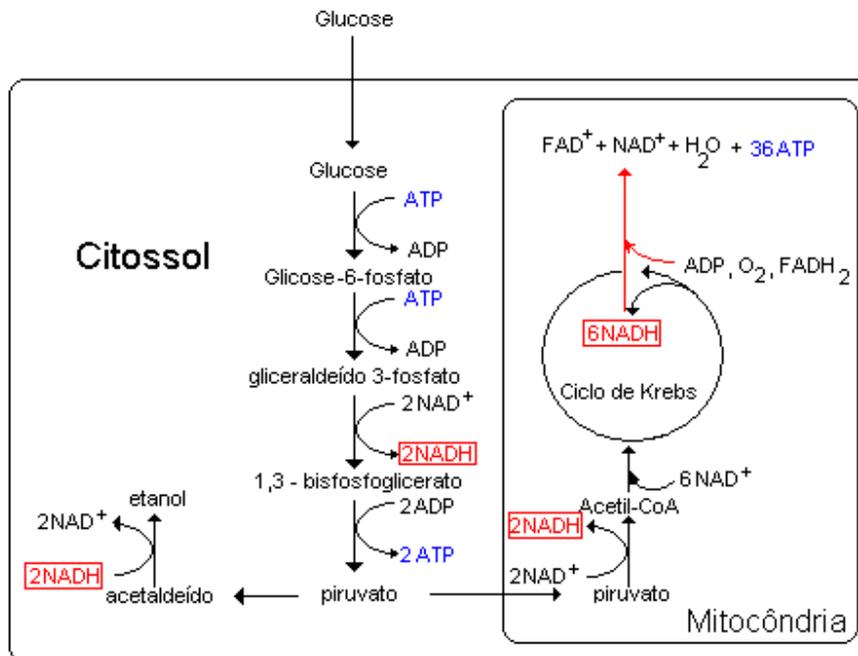


Figura 7: Representação esquemática simplificada do catabolismo da glicose acoplada a regeneração do cofator NADH, que serão utilizados no processo de biorredução, conforme representado pela equação 3.

Kometani e col. (1993) apresentaram evidências empíricas do tipo de oxirredutase, NADH ou NADPH dependentes, envolvidas nas biorreduções, observando-se que a estrutura do substrato está diretamente associada ao tipo de oxirredutase. Porém, não é possível afirmar que estas observações refletem as condições intracelulares da *S. cerevisiae*. No experimento descrito por Kometani e col. (1998), dois substratos diferentes foram biorreduzidos utilizando-se extrato de células de levedura. Nesses experimentos, cada substrato foi seletivamente reduzido associado a um tipo de cofator, NADH ou NADPH. Verificou-se assim o tipo de cofator associado à biorredução de cada substrato um dos dois substratos estudados. No entanto, sabe-se que intracelularmente a razão entre as formas oxidadas e reduzidas dos cofatores é $[NAD^+ / NADH] = 1000$ e $[NADP^+ / NADPH] = 0,01$ (Voet e Voet, 1995), assim sendo as espécies reduzidas, além de coexistirem, não se encontram nas mesmas concentrações no interior da célula, como utilizado nos testes *in vitro* apresentados por Kometani e col. (1993).

O conhecimento do tipo de via metabólica associado à regeneração de cofatores utilizados para a biorredução, assim como o aspecto energético da biorredução, permitirá o aprofundamento do conhecimento sobre o processo e a elaboração de estratégias que tenham efeito direto sobre o processo de regeneração dos cofatores NADH e/ou NADPH diretamente associados ao processo de biorredução, possibilitando a elevação da frequência de regeneração destes cofatores.

1.6 Calorimetria

1.6.1 Técnicas Calorimétricas

Na realização deste trabalho, utilizou-se a calorimetria isotérmica de fluxo como ferramenta no estudo energético e metabólico do processo de biorredução do acetoacetato de etila pela *S. cerevisiae*.

A calorimetria é uma técnica físico-química capaz de medir um efeito térmico, de forma direta ou indireta, através de variações de energia ou entalpia associadas a processos químicos, bioquímicos ou físicos que ocorram no sistema de interesse. O calor não é uma entidade diretamente mensurável, mas pode ser obtido relacionando-se com propriedades facilmente mensuráveis, como por exemplo, a variação de temperatura do sistema ou trabalho exercido sobre o sistema ou arredores deste (Miles e col., 1987).

A propriedade comumente medida nos calorímetros atuais é a temperatura.

Nos calorímetros do tipo adiabáticos e isoperibólicos o calor está relacionado com a variação de temperatura dentro do sistema de interesse. Nos calorímetros isotérmicos o registro é feito em termos de fluxo de calor (dQ/dt), propriedade relacionada à diferença de temperatura entre a cela da reação e os arredores desta em função do tempo, registro este denominado termograma ou curva Potência – tempo (curva P-t). No primeiro caso, a temperatura final do sistema (t_f) é diferente da temperatura inicial (t_i), enquanto que no isotérmico, como o próprio nome diz, a temperatura $t_f = t_i$, visto que o calor gerado na cela é rapidamente escoado para o ambiente e monitorado em função do tempo (Miles e col., 1987).

Os calorímetros adiabáticos e isoperibólicos utilizam como sensor térmico um termistor (NTC), uma resistência elétrica muito sensível a pequenas variações de temperatura. O NTC fica “mergulhado” no meio reacional, medindo as diferenças de temperatura dentro deste.

Os calorímetros isotérmicos utilizam um sensor térmico conhecido como Peltier ou termopilha. Estes componentes eletrônicos foram desenvolvidos inicialmente para a corrida aeroespacial e para fins militares e são constituídos por pares de semicondutores (telureto de bismuto dopado, tipo N e P) combinados em um módulo ou pastilha conectados eletricamente em série e termicamente em paralelo. Esse tipo de sensor é sensível a diferenças de temperatura da ordem de 10^{-4} °C, entre a cela de reação e seu arredor, gerando uma diferença de potencial entre os terminais do dispositivo. Os dispositivos Peltier localizam-se na superfície externa da cela calorimétrica, formando uma ponte para o escoamento de calor entre a cela de reação e o seu arredor (bloco metálico de alta capacidade calorífica mantido à temperatura constante), pois é o único contato direto entre ambos (Volpe, 1993). A *figura 8* mostra uma representação esquemática dos dois tipos de calorímetros comentados.

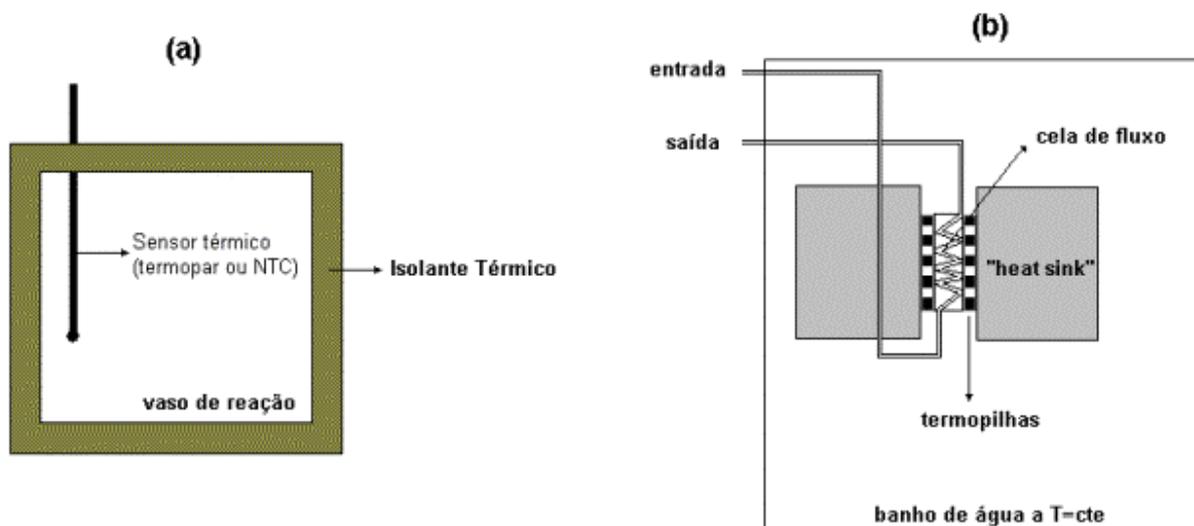


Figura 8: Representação esquemática dos tipos de calorímetros apresentados. a) Calorímetro isoperibólico (adiabático real), b) Calorímetro isotérmico.

O termo microcalorimetria surgiu em função da alta sensibilidade das termopilhas, que permitiu que quantidades de fluxo de calor na escala de microWatts fossem medidas. Desta forma, o prefixo *micro* refere-se a alta sensibilidade dos equipamentos que utilizam esse tipo de sensor.

A idéia de se acoplar em linha um reator biológico externo diretamente a uma cela calorimétrica de fluxo nasceu da necessidade de se controlar parâmetros essenciais para o estudo e monitoramento em tempo real do processo de crescimento, morte e manutenção do metabolismo celular (temperatura, condições de aeração, pH, etc) e também de se monitorar outras propriedades em tempo real como, por exemplo, consumo de substratos e produção de metabólitos, consumo de O₂, pH, etc (Brettel e col., 1980).

1.6.2 Descrição Termodinâmica de Uma Célula

A termodinâmica é a área de conhecimento que estuda a tendência de acontecimento de processos físicos ou químicos, baseando-se nas diferenças de energia e entropia entre os estados termodinâmicos inicial e final do sistema de interesse.

Um sistema termodinâmico ideal é definido basicamente por:

- **Sistema:** compartimento onde o processo de interesse acontece;
- **Ambiente:** Compreende todo o entorno do sistema;
- **Universo:** Sistema + ambiente (Crabtree e Nicholson., 1988, MacQuarrie e Simon, 1997).

O estado metabólico, assim como um estado termodinâmico é determinado por propriedades como temperatura, pressão, que podem ser considerados constantes ao longo do processo metabólico, e concentrações dos intermediários metabólicos.

O metabolismo celular desde a permeação do substrato a ser metabolizado até sua completa oxidação é acompanhado por variações na entalpia e entropia (Crabtree e Nicholson, 1988; Lenhinger e col., 2000).

Em sistemas fechados, as reações tendem a atingir o equilíbrio, situação na qual não há fluxo líquido de espécies químicas, ou seja, as velocidades das reações diretas e inversas se igualam. Sistemas fechados são sistemas separados de seus ambientes por “paredes” que não permitem fluxo de matéria. Esse tipo de sistema não representa uma boa descrição de sistema celular (Crabtree e Nicholson, 1988; MacQuarrie e Simon, 1997, Lenhinger e col., 2000).

Portanto, a melhor descrição termodinâmica de uma célula encontra-se em sistemas abertos, visto que as membranas celulares são “paredes” ou fronteiras que permitem tanto troca de calor quanto de matéria com o meio. Esses sistemas são conhecidos como “sistemas distantes do equilíbrio”, visto que a entrada de substratos e a saída de produtos metabolizados impedem que o estado de equilíbrio químico seja atingido, conforme representação na *figura 9* (Crabtree e Nicholson, 1988).

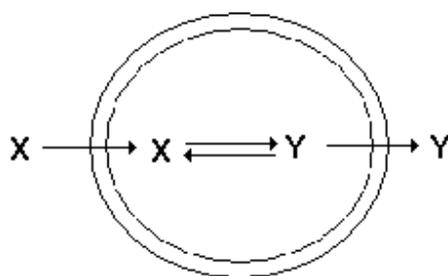


Figura 9: Representação esquemática simplificada de um sistema termodinâmico aberto

Embora as células representem um estado termodinâmico distante do equilíbrio, elas a exemplo do sistema fechado, atingem um estado estável, que não se trata de um estado de equilíbrio, mas de um estado estacionário. Nesta condição o equilíbrio químico propriamente dito não é atingido, mas de forma análoga ao equilíbrio químico às concentrações das espécies X e Y mantêm-se inalteradas no estado estacionário. Este estado “estável” pode ser assumido quando o influxo do substrato X é constante e a taxa de remoção de Y é proporcional à concentração de Y, atingindo-se um valor em que a taxa de remoção de Y é igual à taxa de sua formação. Neste sistema, a

concentração das espécies X e Y encontra-se constante enquanto a taxa de transporte do substrato X para o interior da célula for mantida constante (Crabtree e Nicholson, 1988).

O sistema descrito acima representa uma boa aproximação para a descrição termodinâmica de sistemas metabólicos.

Em primeiro lugar, para que esse estado estacionário seja atingido a taxa de transporte de X deve ser constante, não podendo ser significativamente afetada por alterações na concentração de X externa. Quando o transporte é mediado por carreadores de membrana (transporte mediado por enzimas) essa condição pode ser facilmente atingida saturando-se o meio externo com o substrato a ser metabolizado, mantendo-se saturado os sítios enzimáticos. Para que a condição de estado estacionário seja atingida, também deve-se assumir que o transporte de substrato é cineticamente irreversível, condição facilmente encontrada em situações de saturação do meio externo com o substrato X, de forma que o transporte no sentido contrário seja desprezível (Crabtree e Nicholson, 1988).

Em segundo lugar, para que haja uma remoção constante dos produtos metabólicos, representado por Y, a última reação do processo metabólico (transporte dos metabólitos para o meio externo) também deve ser irreversível, caso contrário o acúmulo de Y influenciaria o processo terminal e a obtenção de um estado estacionário de X e Y seria impossível (Crabtree e Nicholson, 1988).

Esse sistema termodinâmico descrito é a melhor aproximação termodinâmica que se pode ter de um sistema metabólico.

Os sistemas bioquímicos, assim como os sistemas químicos e físicos, seguem rigorosamente a 1º e 2º leis da termodinâmica, embora nem sempre isso pareça claro (Crabtree e Nicholson, 1988; Lenhinger e col., 2000).

Da 1º lei da termodinâmica (**equação 4**) deve-se observar que:

$$\Delta U = Q + w \quad (4)$$

Nesta equação, também conhecida como lei da conservação da energia, **Q** representa o calor liberado ou absorvido pelo sistema e **w** o trabalho realizado sobre o

sistema ou ambiente. Embora o sistema metabólico seja constituído por uma seqüência de reações enzimáticas, essas enzimas são apenas catalisadores e em nada interferem no conteúdo de energia dos produtos ou reagentes do processo. Por esse motivo, ΔU assim como as funções termodinâmicas (ΔG , ΔS e ΔH) são conhecidas como funções de estado e como tais independem do caminho realizado para atingir o estado termodinâmico final (Crabtree e Nicholson, 1988; MacQuarrie e Simon, 1997).

As células biológicas são sistemas com características termodinâmicas bastante particulares. As células são compostas por um conjunto de moléculas com alto grau de organização. Essa organização, embora pareça se opor a 2º lei da termodinâmica, indicando uma entropia negativa, ela está em plena concordância com a mesma (Lenhinger e col., 2000).

A 2º lei da termodinâmica define que a entropia total para uma transformação deve ser positiva, ou seja, $\Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{ambiente}} > 0$. Pela definição fica bem claro que esse aumento de entropia não precisa ocorrer necessariamente no sistema em questão, mas ela pode ocorrer também no ambiente. A energética de processos vivos é extraordinária. Num universo onde variações espontâneas são o resultado de um aumento de entropia e desordem, sistemas vivos são capazes de produzir diminuições localizadas de entropia. Portanto, embora geralmente ocorra uma redução na entropia do sistema celular a entropia do ambiente aumenta de forma a compensar esse elevado nível de organização celular (Crabtree e Nicholson, 1988; Lenhinger e col., 2000).

O aumento de entropia no ambiente ocorre basicamente de duas formas:

- a)** liberação de uma quantidade de espécies metabólicas muito superior à quantidade de espécies reagentes e pela geração de produtos gasosos (alta entropia).
- b)** liberação de calor pelo sistema resultando em um aumento da desordem no ambiente.

A entropia (2º lei) descreve a espontaneidade de um processo ocorrer. Para que um processo seja espontâneo ele deve atender a seguinte condição termodinâmica, *equação 5* (Crabtree e Nicholson, 1988; MacQuarrie e Simon, 1997).

$$\Delta S_{\text{ambiente}} + \Delta S_{\text{sistema}} > 0 \quad (5)$$

No entanto, a definição de entropia é dada pela *equação 6*:

$$\Delta S = Q_{\text{rev}} / T \quad (6)$$

O valor Q_{rev} é o calor produzido por um processo extremamente lento, de forma que o equilíbrio entre o sistema e o ambiente não seja perturbado. Esse processo termodinâmico é conhecido como termodinamicamente reversível. De acordo com essa definição, somente processos em equilíbrio seriam considerados termodinamicamente reversíveis (Crabtree e Nicholson, 1988; MacQuarrie e Simon, 1997).

Para um processo termodinamicamente reversível o valor de Q_{rev} é igual ao ΔH para o processo. Em sistemas fora do equilíbrio termodinâmico, os valores de Q_{rev} e $T\Delta S$ apenas representam o calor que teria sido absorvido se a reação fosse reversível nas dadas concentrações de X e Y. Portanto, os valores de Q_{rev} são valores puramente idealizados, não podendo portanto, ser igualados ao calor real absorvido ou liberado pelo sistema (ΔH) (Crabtree e Nicholson, 1988).

A entropia é uma função de estado que depende das concentrações iniciais e finais das espécies X e Y, diferente de ΔU e ΔH , que são funções de estado termodinâmico cuja influência da concentração das espécies é desprezível.

A espontaneidade de uma reação pode ser descrita apenas pela entropia do sistema, conforme proposto pela equação de Gibbs (*equação 7*) (Crabtree e Nicholson, 1988; MacQuarrie e Simon, 1997).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

quando: $\Delta G < 0$ processo espontâneo

$\Delta G > 0$ processo não espontâneo

1.6.3 Calorimetria Aplicada a Sistemas Biológicos

Desde os primórdios da físico-química, a calorimetria e a termodinâmica sempre foram relacionadas a sistemas vivos. Por muito tempo, e talvez ainda hoje, se tenha o fogo como símbolo da vida e o fim da sua queima como símbolo da morte. É provável que essa idéia tenha sido derivada de uma série de experimentos realizados por Leonardo da Vinci, Priestley e por último, Lavoisier. Em seus experimentos, esses notáveis cientistas promoviam uma queima dentro de um recipiente fechado juntamente com um pequeno animal (cachorro, pássaros) e observavam que a chama e a vida se extinguíam concomitantemente (Lamprecht, 2003).

Muitos pesquisadores atribuem o início da termodinâmica aos estudos de Lavoisier sobre oxidação e a teoria do flogístico (Lamprecht, 1978).

A descoberta e formulação da primeira lei da termodinâmica tiveram uma grande contribuição do jovem médico Julius Robert Mayer e do físico Helmholtz. No entanto, somente cerca de meio século depois, Rubner demonstrou a aplicabilidade da primeira lei em sistemas biológicos, com seus experimentos sobre metabolismo celular (Lamprecht, 1978).

O metabolismo, seja dos mais simples microorganismos ou dos mais complexos seres vivos, é sempre acompanhado pela elevação da temperatura do ambiente em que se encontram. Esse fenômeno é facilmente observado no dia-a-dia em processos de fermentação (fabricação de pão), decomposição de matéria orgânica (decomposição de folhas mortas em um jardim), etc. (Miles e col., 1987).

Estudos calorimétricos sobre sistemas celulares vivos tem sido bastante explorados em pesquisa básica e em diversas aplicações, como por exemplo, o estudo

do efeito da toxicidade de drogas, crescimento celular e estudos metabólicos (Wadso, 1997).

A origem deste calor é tão complexa que não é possível, utilizando-se apenas a calorimetria, atribuí-la a um determinado processo específico. Pela sua inespecificidade, a calorimetria é tida como uma técnica que permite a medida de atividade metabólica, ou seja, o somatório da energia envolvida em todos os eventos e processos catabólicos e anabólicos que ocorrem no metabolismo celular. Por se tratar de uma técnica não específica outros parâmetros associados ao processo (biomassa, pH, consumo de O₂, produção de CO₂, etc.) devem ser também monitorados com o objetivo de se aumentar a especificidade e o entendimento de reações biológicas complexas (James, 1987).

O metabolismo é o resultado de uma imensa quantidade de reações químicas ou bioquímicas que ocorrem tanto no citoplasma quanto em organelas específicas da célula. Trata-se de reações enzimáticas em cadeia, rigorosamente controladas, cujo objetivo principal é a produção de ATP (energia química) e metabólitos, suprindo as necessidades das vias anabólicas (Lamprecht, 1980; Voet e Voet, 1995).

O efeito térmico ou fluxo de calor (curva P-t), registrado pelo calorímetro isotérmico, no acompanhamento de processos de natureza biológica, muito provavelmente decorre da energia liberada ou absorvida do somatório dos processos metabólicos e também da hidrólise do excedente de moléculas de ATP (Monk, 1978; Miles e col., 1987). A espécie química ATP existe nas células em concentrações extremamente baixas (~4 μmol g⁻¹ de peso seco de células), cujo principal papel é o de “carregar” energia livre entre reações exergônicas (catabolismo) e endergônicas (anabolismo), promovendo o que é conhecido como acoplamento metabólico (Lamprecht, 1980). A hidrólise do excedente de ATP é necessária devido à quantidade limitada dessa espécie química no interior das células, uma vez que ADP é necessário para que o processo de fermentação e respiração tenham continuidade (Hoogerheide, 1975).

A porcentagem de energia disponível na célula armazenada na forma de ATP é de 40% para a fermentação (processo anaeróbico) e 69% para a respiração (processo aeróbico), sendo o restante da energia livre liberada na forma de calor. No entanto, em condições metabolicamente desacopladas a quantidade de energia livre liberada na

forma de calor pode chegar próximo de 100%, visto não haver a possibilidade de utilizar a energia armazenada para processos anabólicos, devido à deficiência nutricional do meio de cultura. Nestes casos, o ATP gerado no processo catabólico acaba sendo rapidamente hidrolisado para que o metabolismo tenha continuidade, sendo a energia desta hidrólise liberada na forma de calor (Hoogerheide, 1975; Lamprecht, 1980).

São muitas as vantagens da aplicação da calorimetria ao estudo de sistemas biológicos em relação aos métodos tradicionais. Entre as principais vantagens destaca-se as altas sensibilidade e reprodutibilidade da técnica (James, 1987; Wadso, 1997).

O registro do efeito térmico é feito por uma curva de Potência térmica vs. Tempo (curva P-t). Destas curvas, o valor de ΔH deste processo é obtido através da integração da curva P-t, conforme exemplificado esquematicamente na *figura 10*.

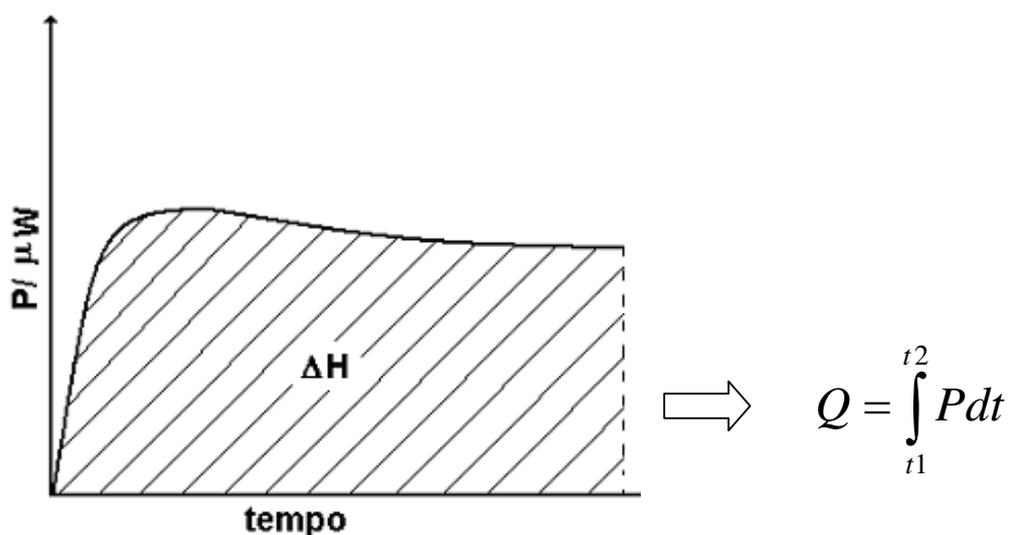


Figura 10: Representação gráfica do registro térmico de um processo biológico

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo produzir um conhecimento mais aprofundado de um processo bastante utilizado em sínteses de álcoois quirais em escalas laboratoriais, ou seja, do processo de redução de cetonas pró-quirais utilizando como reator químico a célula de *Saccharomyces cerevisiae*. Com este estudo, procurou-se compreender um pouco sobre o metabolismo *in vivo* desse microorganismo no processo de biorredução, como por exemplo o acoplamento entre o catabolismo de uma fonte de energia e o processo de biorredução e também, uma possível compartimentalização, ou seja, o local onde o processo de biorredução ocorre preferencialmente, seja no citoplasma ou na matriz mitocondrial.

Embora o processo de biorredução seja bastante utilizado por químicos, pouco se conhece sobre a energética e o processo bioquímico no qual se baseia a biorredução. A literatura traz algumas sugestões sobre onde estes processos ocorrem preferencialmente, quais vias metabólicas estariam envolvidas na biorredução, porém são dados pouco conclusivos, visto que são estudos realizados *in vitro*.

Propusemos, neste trabalho, uma investigação *in vivo* e em tempo real da energética do processo de biorredução da cetona pró-quiral acetoacetato de etila, utilizando a técnica de microcalorimetria isotérmica de fluxo aliada a outras técnicas de monitoramento do processo. Acreditamos que somente o conhecimento mais aprofundado do processo *in vivo* permitirá o desenvolvimento de estratégias racionais para otimização do processo de biorredução.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 *Construção de Curva de Calibração em Cromatógrafo Gasoso para o Acompanhamento Cinético do Consumo do Substrato Acetoacetato de Etila*

Preparou-se uma solução estoque $0,1000 \text{ mol L}^{-1}$ de acetoacetato de etila (Carlo Erba) em água destilada, a partir do acetoacetato de etila previamente destilado.

A partir da solução estoque, foram feitas diluições de forma que a concentração final de cada padrão fosse (mol L^{-1}): 0,100; 0,090; 0,080; 0,060; 0,030; 0,010; 0,005. Transferiu-se 0,800 ml de cada padrão para um *vial* com tampa, o qual foram saturados com NaCl (Vetec). Extraíu-se a fase aquosa com 0,500 ml de tolueno sob agitação manual. Injetou-se 1 μl de amostra no cromatógrafo gasoso CG-500 (CG Master 500), equipado com uma coluna empacotada CG - Carbowax 20M, nas seguintes condições:

T/ injetor	T/ coluna	T/ detector	i / detector	Vazão de H ₂	Atenuação de sinal
150°C	135°C	160°C	200mA	25 ml h ⁻¹	32x

A partir dos dados obtidos, construiu-se uma curva de calibração. Essa curva apresentou alta linearidade na faixa analisada ($0,005\text{-}0,100 \text{ mol L}^{-1}$), com coeficiente de correlação, $R=0,99869$.

3.2 Construção de Curva de Calibração em Cromatógrafo Gasoso para o Acompanhamento Cinético da Produção do 3-Hidroxibutirato de Etila (Produto da Biorredução do Acetoacetato de Etila)

Preparou-se uma solução estoque $0,1000 \text{ mol L}^{-1}$ de 3-hidroxibutirato de etila p.a. (Across) em água.

A partir da solução estoque, foram feitas diluições de forma que a concentração final de cada padrão fosse (mol L^{-1}): 0,080; 0,065; 0,050; 0,020; 0,005. Transferiu-se 0,800 ml de cada padrão para um *vial* com tampa, os quais foram saturados com NaCl (Vetec). Extraíu-se a fase aquosa com 0,500 ml de tolueno sob agitação manual. Injetou-se 1 μl de amostra no cromatógrafo gasoso CG-500 (CG Master 500), equipado com uma coluna empacotada CG - Carbowax 20M, nas mesmas condições apresentadas no *item 3.1*.

A partir dos dados obtidos, construiu-se uma curva de calibração. Essa curva apresentou alta linearidade na faixa analisada ($0,005\text{-}0,080 \text{ mol L}^{-1}$), com coeficiente de correlação, $R=0,99969$.

3.3 Experimentos Microcalorimétricos

Os experimentos microcalorimétricos foram realizados em um microcalorímetro isotérmico equipado com cela de fluxo contínuo confeccionada em ouro, com volume nominal de 0,600 ml. O fluxo contínuo foi mantido através de uma bomba peristáltica (LKB – Pharmacia), conforme esquema apresentado na *figura 11*.

O canal de fluxo do microcalorímetro foi eletricamente calibrado num fundo de escala de $1000 \mu\text{W}$ antes de todos os experimentos. A calibração foi feita com o canal totalmente preenchido com água, sem fluxo.

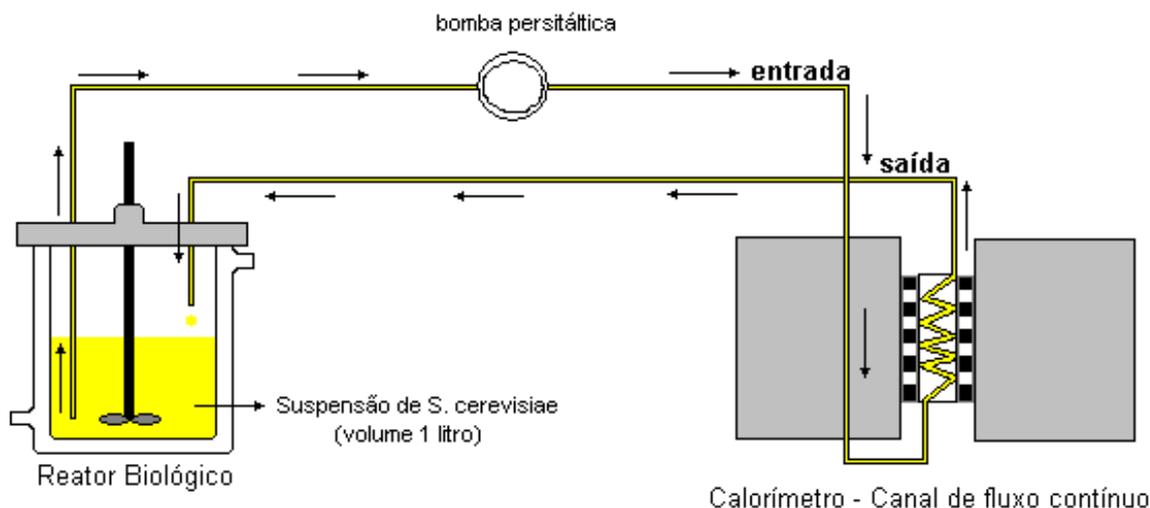


Figura 11: Representação esquemática do sistema em “loop” reator-calorímetro reator, com fluxo mantido por uma bomba peristáltica.

3.3.1 Calibração Química do Canal de Fluxo do Microcalorímetro

Para calibração química do canal de fluxo utilizou-se uma reação padrão, que libera uma taxa de calor aproximadamente constante em curtos intervalos de tempo. Trata-se da reação de hidrólise da triacetina em tampão imidazol/ácido acético, conforme procedimento apresentado por Briggner e Wadso (1991), segundo equação 8.

Preparou-se o tampão ácido acético/ imidazol dissolvendo 27,23 g (0,4 mol) de imidazol em 100,00 g de água destilada. A esta solução foram adicionados 16,00 g de ácido acético glacial. Esta solução foi estocada a 4 °C em frasco âmbar.

Calibrou-se eletricamente o microcalorímetro num fundo de escala de 100 μ W.

Pesou-se 1,0000 g de triacetina em uma balança analítica e transferiu-se essa massa para um microrreator. Adicionou-se em seguida 20,00 g de solução tampão imidazol/ácido acético, mantendo-se o microrreator a 25 °C com auxílio de um banho termostatizado. Introduziu-se o tubo de entrada e de saída do canal do microcalorímetro dentro do microrreator, fazendo um “loop”. Encheu-se o canal de fluxo com a solução de triacetina e desligou-se o fluxo. Registrou-se o fluxo de calor por intervalos de ~1 hora.

3.3.2 Monitoramento Microcalorimétrico - Estabelecimento da Condição Controle

Os experimentos microcalorimétricos foram realizados em um microcalorímetro isotérmico de fluxo Thermometric 2277 - TAM (Thermal Activity Monitor), equipado com duas celas de fluxo contínuo com volume nominal de 0,600 ml, conectadas em paralelo (sistema "Twin" ou amostra - referência). As condições do processo biológico foram mantidas utilizando-se um reator microbiológico Biostat B2 (BBraun Biotech- Sartorius) equipados com um eletrodo de pH (Mettler-Toledo), um eletrodo de oxigênio (Mettler-Toledo), termopar Pt-100, e uma unidade de controle **DFC3**. O reator foi conectado "on line" com a cela do sistema de fluxo do calorímetro através de uma bomba peristáltica, a uma vazão constante de 83,3 ml h⁻¹.

Para os experimentos calorimétricos controle utilizando *S. cerevisiae*, preparou-se uma solução de 72,00 g de glicose (400 mmol) ou 36,03 g (400 mmol) de ácido láctico (neutralizado com solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH) em 1 litro de água destilada. Essa solução (meio de cultura) foi adicionada ao reator, termostalizada à 25°C e mantida sob agitação de 400 rpm. Calibrou-se os eletrodos de pH e de oxigênio. O eletrodo de oxigênio foi calibrado utilizando-se dois pontos: saturação do meio com N₂ para pO₂ = 0 e com ar comprimido (2,5 L min⁻¹) para pO₂ = 100%.

Após a termostatização do meio de cultura no reator, adicionou-se 10,00 g de *S. cerevisiae* liofilizada (Fermix) sob intensa agitação (600 rpm), por 5 minutos, para a rápida dispersão das células no meio. Após a dispersão, a agitação foi reduzida para 400 rpm e o tubo capilar que conduz a suspensão celular para o interior do microcalorímetro foi mergulhado na suspensão celular. Criou-se então um "loop" no sistema de fluxo "on line", introduzindo o tubo de saída da cela de fluxo dentro do reator. O sistema foi mantido em fluxo contínuo durante todo o processo, cuja duração foi de 20 horas para todos os experimentos.

Em todos os experimentos utilizou-se 0,05 g de agente antiespumante FB-50 (Dow Corning), composto por polióxido de etileno e etilenoglicol.

3.3.3 Monitoramento Microcalorimétrico do Processo de Biorredução do Acetoacetato de Etila

O procedimento para o experimento microcalorimétrico de biorredução do acetoacetato de etila é idêntico ao descrito no **item 3.3.2**. Porém, neste caso, o meio é constituído de 72,00 g de glicose ou 36,03 g (400 mmol) de lactato, 0,05 g de antiespumante e 10,00 g de acetoacetato de etila (0,077 mol) previamente destilado, dissolvidos em 1,00 litro de água destilada. Para confirmação o produto da biorredução do acetoacetato de etila, o 3-hidroxi-butirato de etila, foi isolado e caracterizado por RMN ^1H e RMN ^{13}C (Varian, Gemini 300).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): 1,25 ppm (t, CH_3); 1,29 ppm (d, CH_3); 2,07 ppm (d, CH_2); 3,75 ppm (q, CH_2); 3,40 ppm (s, OH); 4,16 ppm (m, CH).

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3): 15,00 ppm (CH_3); 22,50 ppm (CH_3); 42,70 ppm (CH_2); 60,60 ppm (CH_2); 64,20 ppm (COH); 173,11 ppm (COOR)

3.4 Monitoramento do Consumo de Glicose por Método Enzimático

Para o monitoramento do consumo de glicose utilizou-se um kit enzimático (Laborlab, CAT N $^\circ$: 02200), comumente utilizado em dosagens de açúcar em plasma sanguíneo (glicemia), em laboratórios de análises clínicas. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na oxidação enzimática da glicose para formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é reduzido por ação da enzima peroxidase na presença dos reativos de cor 4-aminofenazona e fenol produzindo o composto colorido 4-(benzoquina monoimino) fenazona, sendo a intensidade da cor proporcional a concentração de glicose no meio.

Para o monitoramento do consumo de glicose nos processos, foram coletadas, periodicamente, alíquotas ao longo de todos os experimentos. As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos para remoção das células. O

sobrenadante foi transferido para outro *vial* e acondicionado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das medidas. Utilizou-se sempre um padrão como referência.

As amostras com concentração superior a $4,5\text{ g L}^{-1}$ ou $25,0\text{ mmol L}^{-1}$, limite máximo da faixa linear, foram devidamente diluídas. Após a realização do procedimento descrito acima, as amostras foram analisadas seguindo o procedimento fornecido no manual de instruções do kit (*manual LABORLAB*) em um espectrofotômetro UV-Vis (HP 8453), em $\lambda=505\text{ nm}$.

3.5 Quantificação de Etanol por Método Enzimático

Para a quantificação do etanol produzido nos processos estudados utilizou-se um kit enzimático (Boehringer Mannheim, Biopharm). O método baseia-se na oxidação enzimática do etanol a ácido acético. Quando completada a reação as espécies NADH, regeneradas na oxidação do etanol, são quantificadas por absorção na região do UV ($\lambda=340\text{ nm}$).

O kit é composto por: tampão difosfato pH=9; comprimidos contendo aldeído desidrogenase e NAD⁺; suspensão de álcool desidrogenase e solução padrão de etanol.

Para a análise foram colhidas, periodicamente, alíquotas ao longo do experimento, e estas foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *vial* e acondicionado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das medidas. Antes da análise, o sobrenadante foi aquecido a 80°C em banho-maria por 15 minutos.

As amostras contendo quantidades de etanol superiores a $1,3\text{ mmol L}^{-1}$ ($0,06\text{ g L}^{-1}$), foram devidamente diluídas. Depois de realizado o procedimento de preparação das amostras descrito acima, as amostras foram analisadas, seguindo as instruções do fabricante (*Manual Boehringer Mannheim*), utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (HP-8453), em $\lambda=340\text{ nm}$.

3.6 Quantificação Espectrofotométrica de Lactato por Método Enzimático (Visível)

Para a quantificação de lactato consumido nos processos estudados utilizou-se um kit enzimático (KATAL). O método baseia-se na oxidação enzimática do lactato à alantoína em presença de oxigênio, gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, em presença de um reagente fenólico e 4-aminoantipirina sofre ação da peroxidase produzindo um composto colorido com máximo de absorção em 555 nm.

O kit é composto por frascos de tampão pH=7,20 e um frasco com uma solução aquosa de lactato oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina e azida sódica.

Para a análise foram colhidas, periodicamente, alíquotas ao longo do experimento, as quais foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *vial* e acondicionado a -10 °C até a realização das medidas.

As amostras com concentração superior a 13,3 mmol L⁻¹, limite superior da faixa linear foram devidamente diluídas. Depois de realizada a diluição, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis (HP - 8453), em $\lambda=555$ nm, de acordo com o manual de instruções fornecido pelo fabricante (*Manual KATAL*).

3.7 Monitoramento do Processo de Biorredução do Acetoacetato de Etila por Cromatografia Gasosa

Foram coletadas, no biorreator, alíquotas durante o período do experimento, centrifugadas por 10 minutos a 9000 rpm. Após a centrifugação 0,800 ml de sobrenadante foram transferidos para outro *vial* com tampa vedada por *o-ring* de borracha e mantidas a -10°C até o momento em que foram realizadas as medidas.

As amostras foram descongeladas e saturadas com NaCl. Adicionou-se 0,500 ml de tolueno e extraiu-se os compostos orgânicos sob agitação manual.

O extrato orgânico (1 μ L) foi injetado no cromatógrafo gasoso (CG Master-500), conforme as condições citadas no item **3.2**.

4. RESULTADOS

Neste trabalho, o processo de biorredução do acetoacetato de etila foi monitorado em tempo real, em quatro diferentes condições experimentais:

- a) aerobiamente ($2,5 \text{ L min}^{-1}$ de ar) e na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}) – **AG**;
- b) anaerobicamente ($0,5 \text{ L min}^{-1}$ de N_2 gasoso) e na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}) – **AnG**;
- c) aerobicamente ($2,5 \text{ L min}^{-1}$ de ar) em presença de lactato (400 mmol L^{-1}) – **AL**;
- d) aerobicamente ($2,5 \text{ L min}^{-1}$ de ar) na ausência de fonte de energia exógena – **ASG**.

A apresentação dos **Resultados** e a **Discussão** seguirão a ordem apresentada acima (**a – d**). As curvas calorimétricas (curva $P - t$), pH e consumo de O_2 foram obtidas em duplicata e são apresentadas na forma de curva média.

Os experimentos controle terão sua respectiva sigla iniciadas com a letra **C**, enquanto que nos experimentos de biorredução a sigla iniciará com a letra **B**.

Para que fosse possível o estudo do processo de biorredução do acetoacetato de etila, os experimentos de biorredução foram sempre analisados em relação ao respectivo experimento controle.

4.1 Evidência Calorimétrica da Repressão Catabólica

A **tabela 1** apresenta uma comparação entre os valores de calor liberado/ mol de glicose, teóricos e experimentais, para os processos aeróbicos e anaeróbicos na presença de glicose (400 mmol L^{-1}) e na ausência de nutrientes no meio.

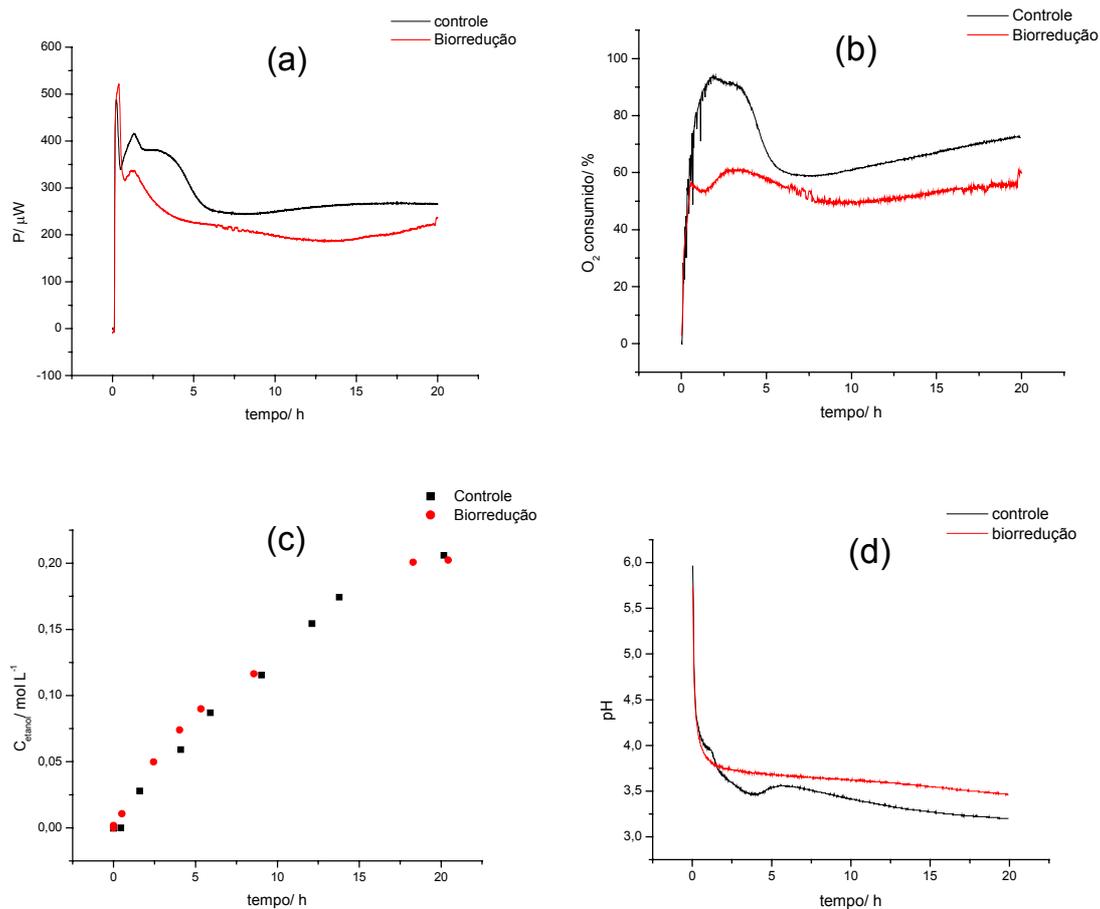
Tabela 1: Valores de Q liberado para o processos controle anaeróbico (Fermentação) e aeróbico (Respiração)

	$\Delta H_{\text{respiração}} / \text{kJ mol}^{-1}$ de glicose (aeróbico)	$\Delta H_{\text{fermentação}} / \text{kJ mol}^{-1}$ de glicose (anaeróbico)
Teórico*	- 2814	-100
Experimentos	-152	-98

* Dados apresentados por Gustafsson, 1991

4.2 Experimentos Aeróbicos com Glicose (C-AG e B-AG)

A figura 12 apresenta as curvas médias obtidas para os processos de controle (C-AG) e biorredução (B-AG) em condições aeróbicas presença de glicose.



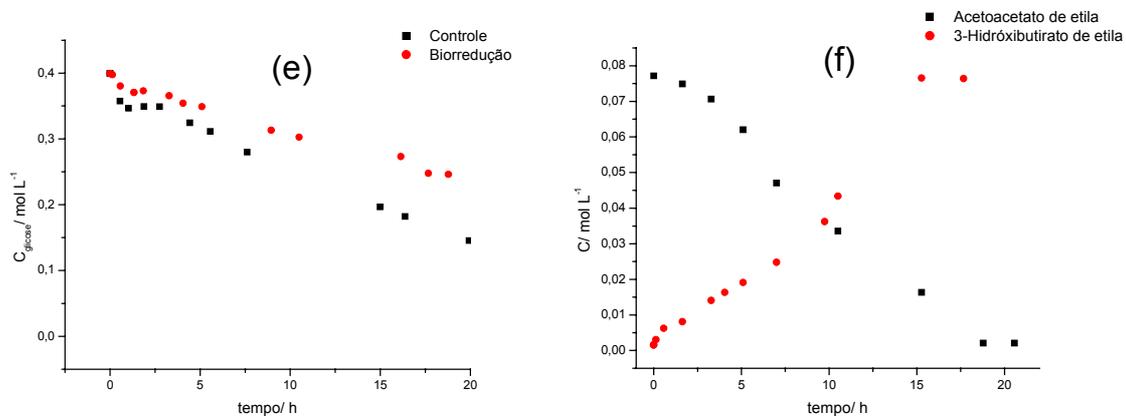
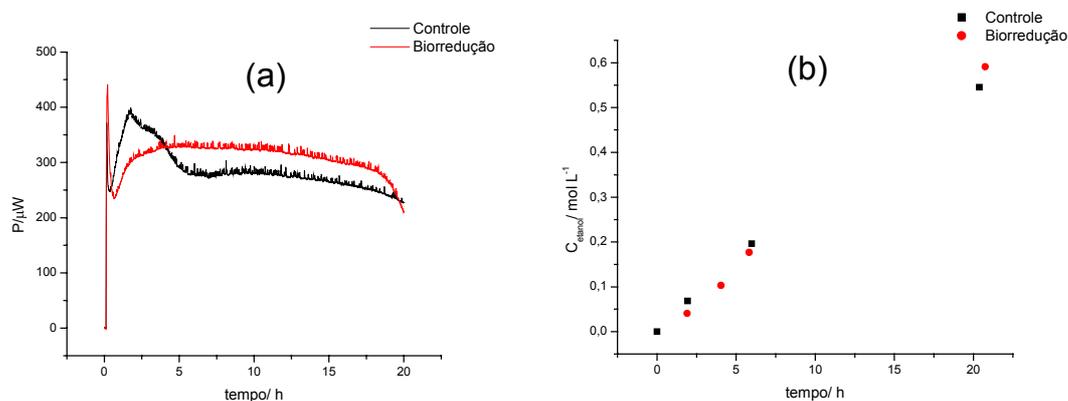


Figura 12: Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}); **a)** Curva Potência-tempo **b)** Curva de consumo de O_2 ; **c)** Produção de etanol; **d)** Curva de monitoramento de pH; **e)** Curva de monitoramento de consumo de glicose; **f)** Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.

4.3 Experimentos Anaeróbicos com Glicose (C-AnG e B-AnG)

A figura 13 apresenta as curvas médias obtidas para os processos de controle (**C-AnG**) e de biorredução (**B-AnG**) em condições anaeróbicas na presença de glicose.



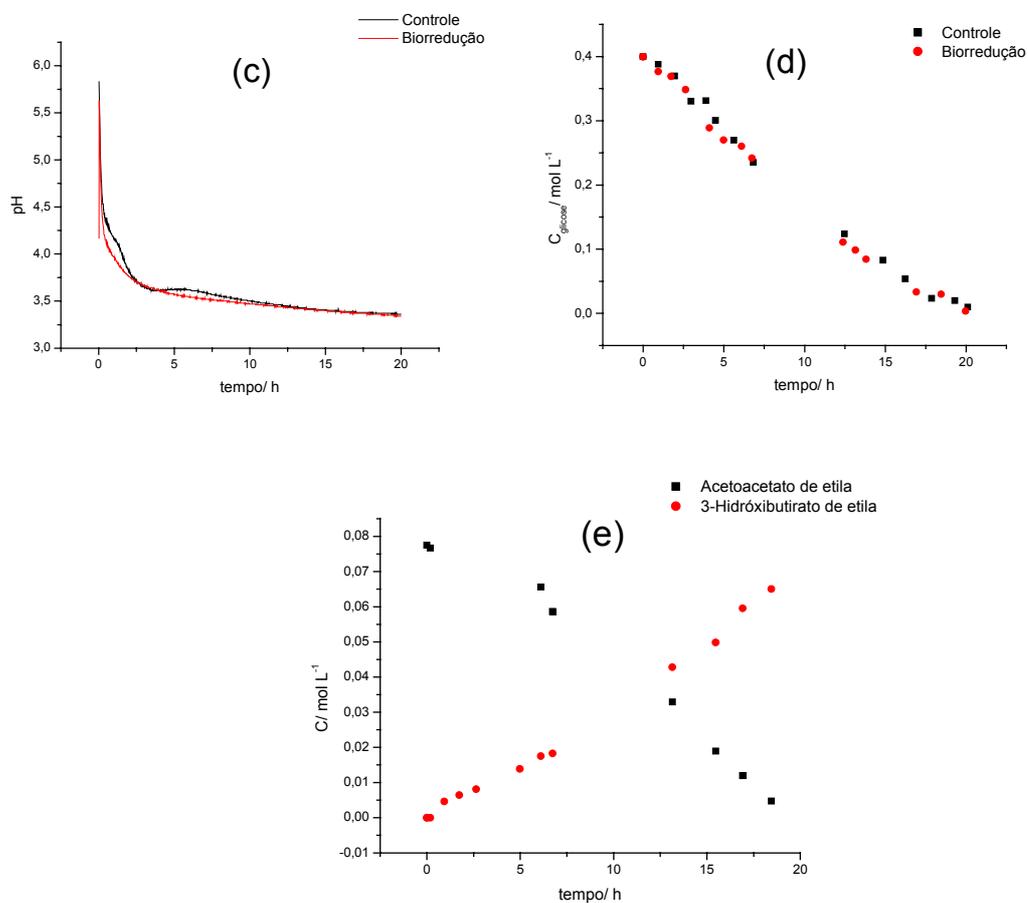


Figura 13: Gráficos obtidos a partir dos experimentos anaeróbicos na presença de excesso de glicose (400 mmol L^{-1}); **a)** Curva Potência-tempo **b)** Produção de etanol; **c)** Curva de monitoramento de pH; **d)** Curva de monitoramento de consumo de glicose; **e)** Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.

4.4 Experimentos Aeróbicos com Lactato (C-AL e B-AL)

A figura 14 apresenta as curvas médias obtidas para os processos de controle (C-AL) e de biorredução (B-AL) em condições aeróbicas na presença de lactato como fonte de energia.

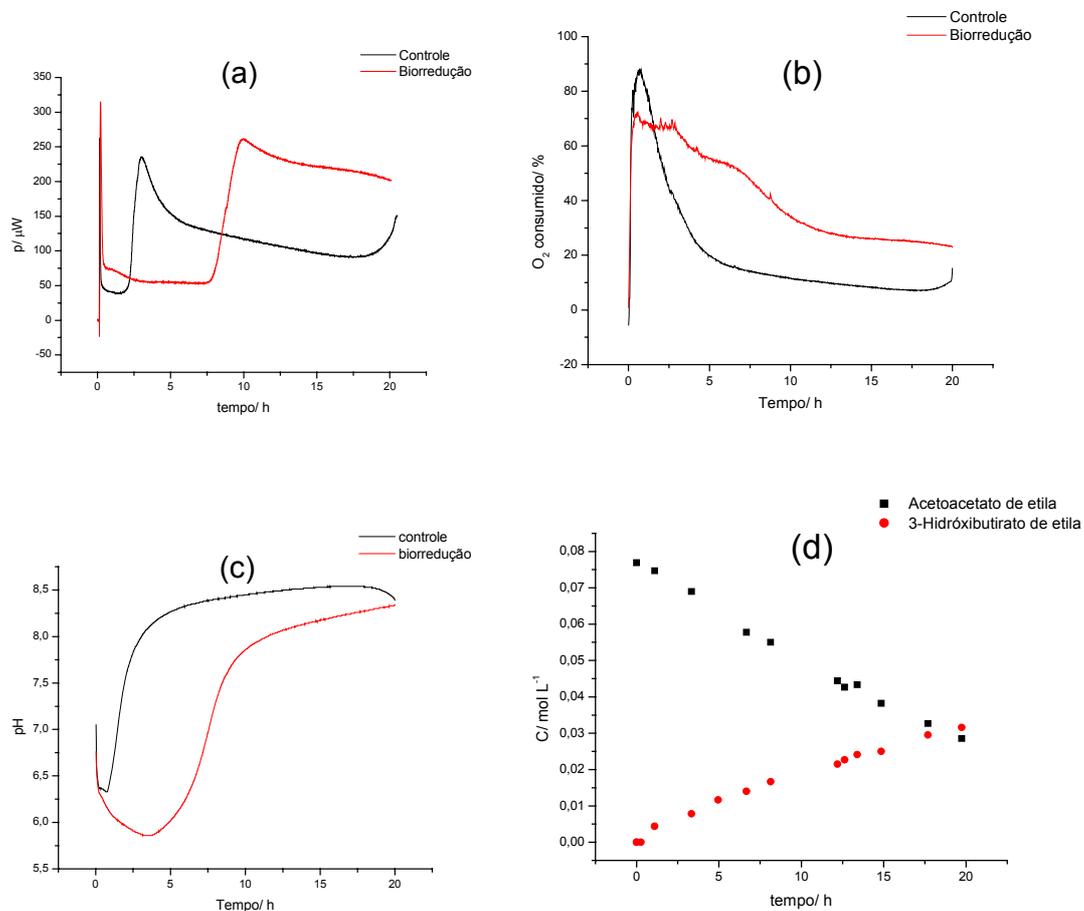


Figura 14: a) Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos com lactato como fonte de energia (400 mmol L^{-1}); **a)** Curva Potência-tempo **b)** Curva de consumo de O_2 ; **c)** Curva de monitoramento de pH; **d)** Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxibutirato de etila.

4.5 Experimentos Aeróbicos na Ausência de Fonte de Energia Exógena (C-ASG e B-ASG)

A figura 15 apresenta as curvas médias obtidas para os processos de controle (**C-ASG**) e de biorredução (**B-ASG**) em condições aeróbicas na ausência de glicose

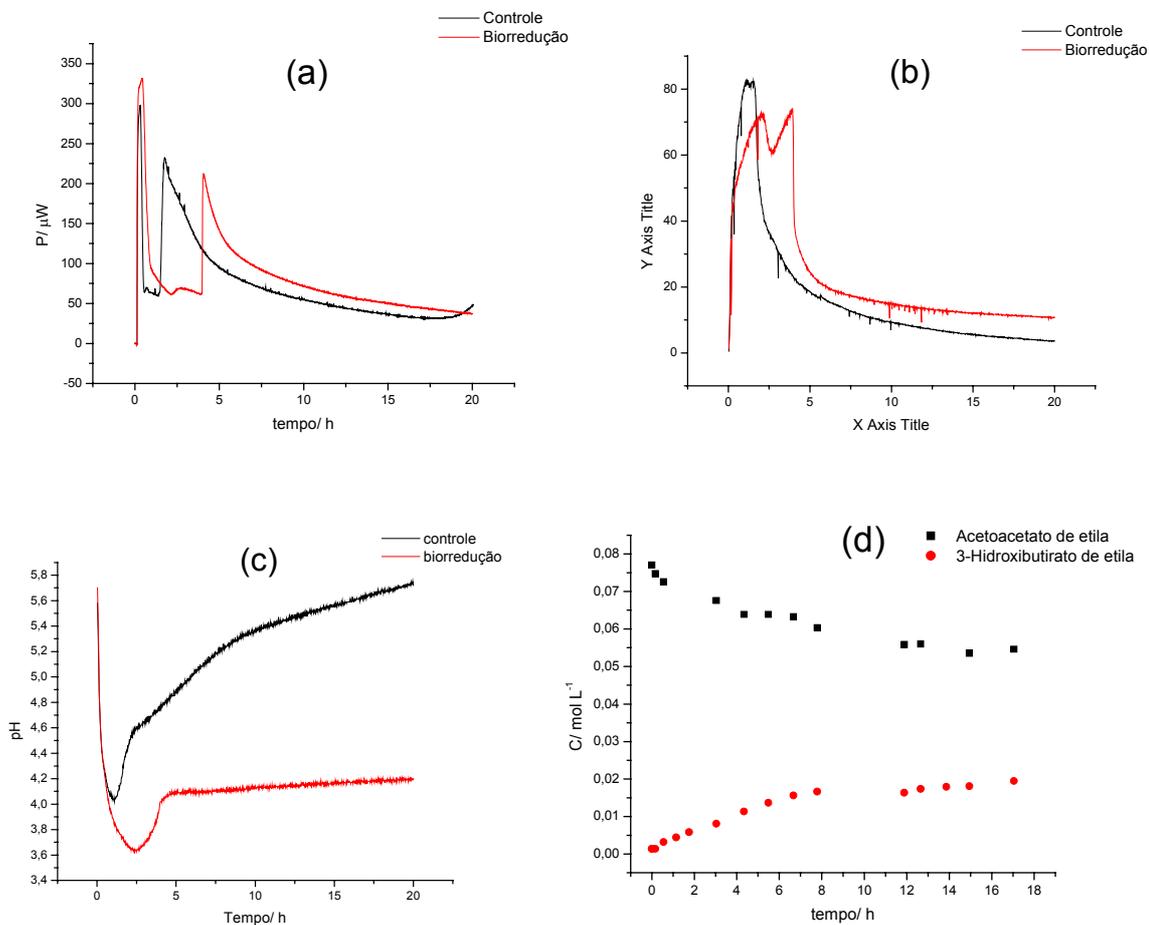


Figura 15: Gráficos obtidos a partir dos experimentos aeróbicos na ausência de fonte de energia exógena: **a)** Curva Potência-tempo **b)** Curva de consumo de O₂; **c)** Curva de monitoramento de pH; **d)** Curva de monitoramento de acetoacetato de etila e do 3-hidróxiacetato de etila.

4.6 Dados Numéricos Relativos aos Experimentos

A *tabela 2* traz os dados numéricos do calor liberado referentes aos gráficos P-t apresentados anteriormente, além dos valores de consumo de glicose, lactato e etanol produzido.

Os valores de calor liberado ao longo dos processos, registrados como curvas P – t (μW vs. horas), foram obtidos por integração da respectiva curva ao longo das 20

horas de experimento $Q = \int_{t1}^{t2} P dt$, onde P (J s⁻¹) é a potência térmica liberada ao longo do experimento.

Tabela 2: Dados experimentais dos processo controle e biorredução nas diferentes condições experimentais estudadas no período de 20 horas de experimento

<i>Experimento</i>	^a <i>Q</i> / kJ g ⁻¹	<i>O</i> ₂ / mol	<i>pH</i> _i	<i>pH</i> _f	<i>Glicose consumida</i> / mol	<i>Etanol produzido</i> / mol
Controle Aeróbico c/ Glicose (C-AG)	3,86	0,205	6,3	3,3	0,254	0,206
Biorredução Aeróbico c/ Glicose (B-AG)	3,06	0,162	5,8	3,5	0,168	0,202
Controle Anaeróbico c/ Glicose (C-AnG)	3,88	0	5,7	4,2	0,396	0,591
Biorredução Anaeróbico c/ Glicose (B-AnG)	4,09	0	5,6	3,4	0,390	0,545
Controle Aeróbico c/ Lactato (C-AL)	1,53	0,059	7,1	8,4	--	0
Biorredução Aeróbico c/ Lactato (B-AL)	2,38	0,118	7,1	8,4	--	*
Controle Aeróbico s/ Glicose (C-ASG)	0,98	0,048	6,3	5,9	--	0
Biorredução Aeróbico s/ Glicose (B-ASG)	1,12	0,054	5,8	4,3	--	*

*Não foi possível determinar, **C** – controle, **B** – biorredução, **A** – aeróbico, **An** – anaeróbico, **G** – glicose 400mmol L⁻¹, **SG** - sem glicose; **L** – lactato 400 mmol L⁻¹

^a Q = quantidade de calor liberado pelo sistema, obtida da integração da curvas P-t (Q/ massa de células liofilizadas)

A *tabela 3* traz os valores numéricos relativos (Q/O_2 , $Q/\text{Gluc.}$, $O_2/\text{Gluc.}$) baseado nos valores apresentados na *tabela 2*.

Tabela 3: Valores numéricos relativos dos controle e biorredução para cada processo estudado, obtidos a partir dos valores absolutos da *tabela 1*

<i>Experimento</i>	Q/O_2 ($\text{kJ mol}^{-1} \text{g}^{-1}$) ^a	O_2/Gluc ^b	Q/Gluc ($\text{kJ mol}^{-1} \text{g}^{-1}$) ^c
C-AG	18,80	0,807	15,17
B-AG	18,85	0,964	18,19
C-AnG	--	--	9,80
B-AnG	--	--	10,49
C-ASG	21,37	--	--
B-ASG	20,72	--	--
C-AL	25,68	--	--
B-AL	20,17	--	--

^a Q (J g^{-1} de células secas)/ mol de O_2 consumido

^b O_2 consumido (mol)/ glicose consumida (mol)

^c Q (J g^{-1} de células secas)/ mol de glicose consumida

A tabela 4 traz os valores de rendimento e conversão do substrato acetoacetato de etila em 3-hidróxibutirato de etila, ao final de 20 horas de experimento.

Tabela 4: Valores de conversão dos processos de biorredução

Experimento de biorredução	Acetoacetato de etila Consumido/ <i>mol L⁻¹</i>	3-Hidroxibutirato de etila Produzido/ <i>mol L⁻¹</i>	Conversão/ %
B-AG	0,077	0,077	100,0
B-AnG	0,077	0,072	93,5
B-ASG	0,023	0,020	87,0
B-AL	0,049	0,031	63,2

Tabela 5: Eficiência do processo de biorredução para os processos **B-AG** e **BAnG**

Experimento de biorredução	<i>n_{3-HB}</i>/ mol	<i>n_{Gluc}</i>/ mol	Razão <i>n_{3HB}</i>/ <i>n_G</i>
B-AG	0,077	0,168	0,458
B-AnG	0,072	0,390	0,184

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos Gerais

No início desta tese, muito trabalho e tempo foi despendido no sentido de definir as condições experimentais tais como concentração de glicose, de células, de substrato, taxa de bombeamento do reator para o microcalorímetro e aeração da suspensão de células no reator.

Inicialmente definiu-se a concentração de glicose em 400 mmol L^{-1} com base em algumas referências onde os autores variavam esse valor entre 25 e 600 mmol L^{-1} (Kometani e col, 1991, Albers e col., 1996). Em todos os experimentos esse valor de concentração de glicose foi fixado com o objetivo de que a fonte de carbono/energia não se extinguísse durante o tempo estabelecido para os experimentos, visto que tal fato provocaria alterações metabólicas durante o andamento do processo, o que dificultaria ou mesmo impossibilitaria a interpretação dos resultados. Neste trabalho, a glicose será referida como apenas fonte de energia, visto não haver, no meio, condições nutricionais para a assimilação de carbono pelas vias anabólicas.

A concentração de *Saccharomyces cerevisiae* foi fixada em 10,00 g de células liofilizadas/ litro. Essa concentração foi a mais alta que pudemos utilizar, com segurança no sistema de fluxo contínuo reator – calorímetro – reator, sem que houvesse riscos de entupimento na cela de fluxo do microcalorímetro, que poderia ocorrer em decorrência da aglutinação celular. Para o estabelecimento deste parâmetro foram feitos testes de bancada utilizando-se uma espira de teflon de 0,8 mm de diâmetro, simulando uma cela de fluxo.

A concentração de acetoacetato de etila foi fixada em $10,00 \text{ g L}^{-1}$ ($76,8 \text{ mmol L}^{-1}$), numa razão de 1:1 (massa de células secas : massa de substrato).

O fluxo de ar utilizado na aeração do reator, proveniente de um cilindro de ar sintético comercial, foi também definido em experimentos preliminares de forma a sempre haver oxigênio disponível no meio, mas evitando-se a completa saturação. Esse valor foi empiricamente definido em $2,50 \text{ L de ar min.}^{-1}$.

Foram realizados experimentos para avaliar a variação da concentração do substrato (acetoacetato de etila) em função da evaporação devido à alta taxa de aeração ($2,5 \text{ L min}^{-1}$). Não observou-se variação significativa na concentração de acetoacetato de etila decorrente da evaporação tanto do próprio acetoacetato de etila quanto da água, indicando que o reator apresenta alta eficiência na manutenção das condições volumétricas do meio.

A taxa de bombeamento da suspensão de células de *S. cerevisiae* do reator para dentro do microcalorímetro foi uma das variáveis mais difíceis de se definir. A vazão normalmente utilizada em experimentos de calorimetria biológica é de 30 ml h^{-1} , onde sua influência sobre o volume térmico da cela é desprezível (O'Neill e col., 2004). Devido à alta densidade celular no meio, a quantidade de oxigênio dissolvido não era suficiente para manter as condições aeróbicas ao longo de todo o percurso da linha de fluxo. Por este motivo, as primeiras curvas calorimétricas $P - t$ obtidas possuíam oscilações muito intensas e periódicas durante todo o tempo ao longo das 20 horas de experimento. Esta periodicidade de oscilações muito provavelmente era consequência de uma transição metabólica aeróbia \Leftrightarrow anaeróbia dentro da cela do calorímetro. Esta justificativa encontrou apoio quando se elevou a vazão de forma que as células atingissem a cela de fluxo em condições ainda aeróbicas, mais próxima possível da condição de aeração do reator. Para encontrar a vazão ideal (ausência de tais oscilações periódicas) foi realizado um experimento, nas condições já definidas acima, partindo-se de 30 ml h^{-1} e elevando-a até $83,3 \text{ ml h}^{-1}$. Nesta taxa de bombeamento as oscilações desapareceram e o termograma passou a representar os fenômenos metabólicos ocorridos no reator, como podem ser observados na semelhança entre as curvas Potência-tempo e as curvas de consumo de oxigênio.

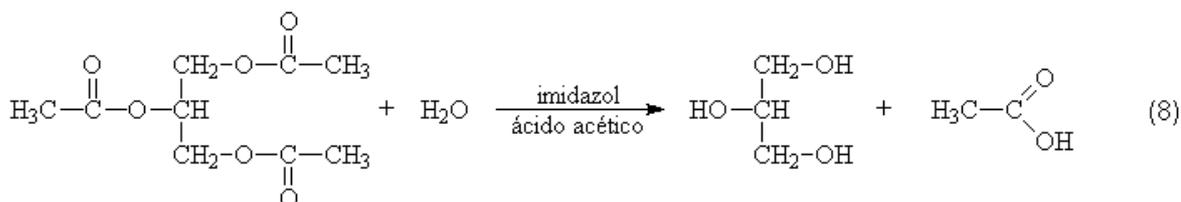
No entanto, como foi utilizada uma vazão superior à comumente utilizada neste tipo de experimento, foi necessário verificar qual a consequência que essa vazão teria sobre o efeito térmico do processo estudado. Uma consequência direta da elevação da taxa de fluxo é a redução do *volume térmico* da cela, efeito esse que cresce com o valor da vazão (O'Neill e col., 2004).

O *volume térmico* é o parâmetro pelo qual podemos avaliar uma redução no valor fluxo de calor na cela do calorímetro decorrente do aumento da vazão. Este efeito

é uma consequência direta da redução do tempo de residência de um segmento de volume dentro da cela calorimétrica.

Para a obtenção do volume térmico na velocidade de bombeamento de 83,3 ml h⁻¹, utilizou-se uma reação bastante conhecida como reação padrão de calibração química em experimentos calorimétricos em fluxo, ou seja, a hidrólise da triacetina em tampão ácido acético/ imidazol, *equação 8* (Briggner e Wadso, 1991; Willson e col., 1999).

Trata-se de uma reação de segunda ordem, cujo tempo de meia-vida é de 18 dias. Essa reação libera uma taxa de calor praticamente constante em curtos períodos de tempo (Willson e col., 1999). Utilizando-se esta reação de calibração química, verificou-se que o *volume térmico* é 12,1% inferior ao volume nominal da cela tendo sido, portanto, a intensidade do fluxo de calor registrado nas curvas P-t sempre corrigidas com base nesse fator.



Antes de iniciarmos a discussão dos dados apresentados no *item 4*, discussão esta que será feita na mesma ordem na qual os dados foram apresentados, é necessário enfatizar as características das condições experimentais utilizadas e suas implicações sobre o metabolismo do microorganismo.

Considerando-se as condições do meio em que os experimentos foram realizados, ou seja, em completa ausência de nutrientes, podemos assumir que prevalece a condição de desacoplamento metabólico como consequência direta do impedimento do crescimento celular.

Do ponto de vista da calorimetria biológica, existe uma grande vantagem em se trabalhar em condições desfavoráveis ao crescimento celular, pois nestas condições o processo metabólico ocorre sem o envolvimento de fatores complicantes associados ao crescimento celular. Tal condição torna mais simples a associação entre vias

metabólicas e a taxa de produção de calor (dQ/dt), relacionados ao estudo proposto (Fujita e Nunomura, 1977).

Nestas condições nutricionalmente pobres, podemos considerar que a condição de desacoplamento metabólico, ou seja, a produção de energia química (ATP) é bastante superior as necessidades energéticas do processo anabólico, visto não haver condições nutricionais para o crescimento celular, mas apenas para a sua manutenção (Larsson e col., 1995).

Desta forma, as únicas maneiras de “escoamento” deste excesso de energia são: **a)** sobrevivência celular, **b)** hidrólise do excedente de ATP não utilizado.

Por sobrevivência celular entende-se: manutenção das funções metabólicas, transporte de substratos e metabólitos, etc., e manutenção da homeostase (pH e osmolalidade) (Lamprecht, 1980).

De acordo com a Primeira Lei da Termodinâmica (*equação 4*), toda a energia liberada pelo processo catabólico está apta a ser utilizada no trabalho de síntese de ATP, forma de energia química útil para a assimilação pelo microorganismo, em nosso caso, para a manutenção das necessidades celulares já mencionadas. A parcela de energia não utilizada é liberada na forma de calor e aumento de entropia do ambiente (*conforme equação.5*), forma de energia não disponível para a assimilação pelo microorganismo. O fato de o ATP ser uma espécie química existente em quantidades diminutas intracelularmente, este não pode ser acumulado, devendo o excesso ser hidrolisado para que o processo metabólico, seja ele fermentativo ou respiratório, não seja interrompido (Hoogerheide, 1975).

Para que fosse possível o estudo e acompanhamento em tempo real dos parâmetros físicos e químicos do processo de biorredução, nas condições mencionadas na parte experimental, os experimentos foram sempre feitos por comparação com o respectivo experimento controle, que se encontra nas mesmas condições da biorredução, exceto pela presença de acetoacetato de etila. Isto nos garante que qualquer diferença entre as taxas de produção de calor (dQ/dt) ou qualquer outra propriedade monitorada seja, única e exclusivamente, decorrente da ação do substrato a ser reduzido sobre os eventos metabólicos da *S. cerevisiae*.

Em condições propícias ao desacoplamento metabólico, como a que é utilizada neste trabalho, podemos assumir que todo o ATP e NAD(P)H são regenerados nos processos catabólicos. Neste trabalho, a discussão será feita com base no rendimento energético das vias catabólicas das fontes de energia (calor total liberado ao longo do processo, Q), que é proporcional a quantidade de ATP regenerado e hidrolisado nas condições de desacoplamento metabólico, garantida pela restrição nutricional. Como a calorimetria é uma técnica não específica, a discussão também será baseada em outras propriedades monitoradas concomitantemente ao monitoramento calorimétrico e, diretamente associadas às vias metabólicas como pH, consumo de O₂, consumo de glicose, consumo de lactato e produção de etanol, em cada condição experimental estudada.

A microcalorimetria de fluxo, técnica utilizada como ferramenta no desenvolvimento do presente trabalho, nos permite determinar a quantidade de calor liberado ao longo de todo processo de natureza biológica, possibilitando a associação entre a taxa de calor liberado e fenômenos metabólicos, sendo esta a motivação central deste trabalho (Hoogerheide, 1975).

Nos experimentos procurou-se reproduzir o mais fielmente possível as condições de biorredução normalmente utilizadas nas sínteses quirais promovidas por *S. cerevisiae*, conforme apresentado na literatura (Kometani e col., 1993, 1994), ou seja, o meio reacional contendo apenas água e o substrato a ser reduzido, tanto na presença quanto na ausência de uma fonte de energia.

5.2 Evidência Calorimétrica do Efeito de Repressão Catabólica

Os experimentos **AG** e **AnG** diferem entre si apenas pela oxigenação do meio. O primeiro foi realizado em condições aeróbicas, mantendo-se o meio saturado com oxigênio ao longo de todo o experimento. Já o segundo, foi realizado em condições extremamente anaeróbicas, mantendo-se o meio saturado com nitrogênio.

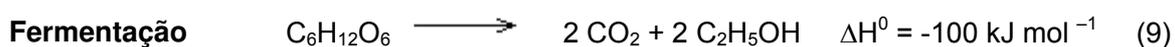
O fato de diferirem apenas nas condições de aeração, nos permite fazer uma análise comparativa entre os valores das propriedades físicas e químicas monitoradas

para os experimentos nestas condições e assim interpretar as diferenças entre os dados obtidos com base nas vias catabólicas da glicose conhecidas para ambas às condições.

Observa-se, na *tabela 2*, que embora a quantidade de calor produzido nos experimentos anaeróbicos (**C-AnG** e **B-AnG**) na presença de excesso de glicose, tenha sido ligeiramente maior que nas condições aeróbicas, a quantidade de calor produzido por mol de glicose consumida (Q/Gluc) (*tabela 3*), foi cerca de 35% e 43% inferiores, comparando entre si os experimentos controle (**C-AG** e **C-AnG**) e biorredução (**B-AG** e **B-AnG**), respectivamente.

Esse menor rendimento energético por mol de glicose em condições anaeróbicas encontra-se, pelo menos do ponto de vista qualitativo, coerente com a diferença entre os rendimentos energéticos conhecidos para os processos de respiração e fermentação.

No entanto, essa diferença encontra-se muito abaixo das expectativas bioquímicas, visto que o rendimento energético em termos de ATP para um metabolismo anaeróbico deveria ser ~95% inferior ao do metabolismo exclusivamente aeróbico, conforme representado pelas *equações 9 e 10* (Hoogerheide, 1975; Lamprecht, 1980; Gustafsson, 1991).



Este resultado evidencia um tipo de metabolismo característico da *S. cerevisiae*, conhecido como metabolismo respiro-fermentativo. Esse tipo de metabolismo é caracterizado pela ocorrência concomitante dos processos de respiração e fermentação, em proporções variáveis em função da concentração da glicose e oxigênio no meio. Esse fenômeno é também conhecido como fermentação aeróbica. O fato de os experimentos aeróbicos terem sido realizados ao longo das 20 horas sob saturação de O_2 e alta concentração de fonte de energia, permite-nos atribuir esse efeito apenas ao excesso de glicose no meio. As quantidades de etanol produzido também conduzem a essa conclusão, cujos altos valores indicam que o metabolismo fermentativo ocorre, paralelamente a respiração, em uma proporção relativamente alta.

O fenômeno metabólico observado é conhecido como repressão catabólica ou efeito *Crabtree*, e foi inicialmente explicado como resultado da alta taxa de metabolismo e conseqüente saturação do ciclo de Krebs em decorrência da alta taxa glicolítica, induzida pelo excesso de glicose em solução, com conseqüente desvio do excedente do fluxo metabólico para as vias fermentativas. Hoje, sabe-se que a glicose inibe a expressão gênica de enzimas pertencentes ao processo respiratório, que é, pelo menos em parte, responsável pelo fenômeno de repressão catabólica (Bakker e col., 2001).

Segundo Hoogerheide (1975), o metabolismo completamente respiratório é conseguido apenas em concentrações de glicose abaixo de ~0,05% (~3 mmol L⁻¹), sem limitação de O₂ (Hoogerheide, 1975).

5.3 Experimentos Aeróbicos na Presença de Glicose (AG)

A discussão dos dados apresentados nas *tabelas 1 e 2* será realizada com base nos conhecimentos existentes na literatura sobre o metabolismo da *S. cerevisiae* e rendimentos energéticos das vias metabólicas.

Durante a discussão dos resultados obtidos foi constatado que existe uma grande escassez de informações a respeito da interpretação das curvas P-t obtidas nas condições de restrição nutricional e excesso de glicose. No entanto Lamprecht (1980), em um excelente trabalho de revisão sobre a termodinâmica de crescimento e metabolismo de leveduras, apresentou algumas curvas P – t em condições bastante parecidas com as utilizadas em nosso trabalho.

Devido à notável semelhança entre as curvas apresentadas nas *figuras 12a e 13a* com as curvas apresentadas e discutidas no trabalho de revisão de Lamprecht (1980), a discussão das curvas P – t serão realizadas com base nas informações apresentadas neste trabalho de revisão.

Às curvas P-t, apresentadas nas *figuras 12a e 13a*, atribuí-se um comportamento multifásico, composto por três fases distintas. Segundo Lamprecht (1980), o curto pico exotérmico, presente em todas as curvas P-t nos minutos iniciais (***primeira fase***), seria

decorrente do que denominou “catabolismo fásico” da glicose, devido à regulação da glicólise pela enzima fosfofrutoquinase.

Esse pico encontra-se presente em todos os experimentos realizados, independente das condições experimentais (*ver figuras 12a, 13a, 14a e 15a*). Na condição de ausência de glicose, como as apresentadas nos experimentos aeróbicos **ASG** e **AL** (discutidos mais adiante), esse “*uptake*” pode ser decorrente do consumo das fontes de energia endógenas (poli ou dissacarídeos), que pode ocorrer de forma praticamente instantânea.

A **segunda fase**, um pico exotérmico de maior duração, seria decorrente da construção de “*pools*” de reserva, ou seja, síntese de reservas endógenas a partir da glicose. Como pode-se observar na *figura 12a*, existe uma diferença notável entre as curvas P-t do controle e biorredução onde nota-se, praticamente, a ausência desse máximo na curva P – t que representa o processo de biorredução. Isso nos permite concluir que o acetoacetato de etila influencia, de alguma forma, esse processo metabólico, reduzindo a capacidade do microorganismo em estocar energia na forma de glicogênio ou trealose. Esse fato também pode ser demonstrado pela maior taxa de consumo de glicose no processo controle (**C-AG**) (*tabela 1*), que pode ser devido a esse mesmo efeito, uma vez que a célula além de manter as suas necessidades mínimas de manutenção, também está, nestas condições, assimilando glicose como reserva endógena

A **terceira fase** do termograma é a fase estacionária considerada como o metabolismo real de manutenção celular, mantendo as necessidades básicas para a sobrevivência do microorganismo no meio onde se encontra. A quantidade de calor liberado durante o metabolismo estacionário, assim como nas outras etapas metabólicas, depende basicamente das condições do meio de cultura, em condições de não crescimento.

A interpretação dada às curvas P-t foi feita como apresentado anteriormente, ou seja, com base na revisão de Lamprecht (1980), visto que as propriedades monitoradas neste estudo não nos permitem chegar a essa conclusão, pois o trabalho em questão não possuía tal pretensão.

Um dos objetivos deste trabalho foi obter e interpretar o rendimento energético total dos processos ao longo de 20 horas de experimento, tempo este definido aleatoriamente.

Utilizando-se o método de integração da curva P-t, conforme representado na *figura 10*, observou-se que a quantidade de energia liberada pelo processo aeróbico de biorredução (**B-AG**) é cerca de 20% inferior ao controle (**C-AG**), como pode ser conferido pelos valores de **Q** apresentados na *tabela 2*. Observa-se, também na *tabela 2*, que a quantidade de oxigênio consumido pelo processo **B-AG** também foi 20% inferior em relação ao controle (**C-AG**). Essa informação nos fornece uma forte indicação de que o processo de biorredução provavelmente está ocorrendo em nível mitocondrial, visto que o acetoacetato de etila influencia, exatamente na mesma proporção, duas importantes propriedades diretamente associadas ao processo de respiração, ou seja, a quantidade de calor produzido (**Q**) e o consumo de oxigênio (**O₂**).

Para reforçar a idéia de que o processo de biorredução em condições aeróbicas e em excesso de glicose (**B-AG**) ocorre em nível mitocondrial, monitorou-se a produção de etanol para ambos os processos (**C-AG e B-AG**), observando-se que para ambos a produção de etanol ocorre numa taxa bastante semelhante (*figura 12c*). Este resultado reforça a hipótese de que biorredução do acetoacetato de etila não interfere na via fermentativa do metabolismo aeróbico respiro-fermentativo, o que reforça a idéia da participação mitocondrial no processo de biorredução, associado, provavelmente, aos cofatores NADH continuamente regenerados pelo processo respiratório.

Com base nestas informações e na teoria aceita para o fenômeno de biorredução, que diz que o processo de biorredução ocorre associado à oxidação dos cofatores NADH (*figura 7 e equação 3*), é possível concluir que o consumo de cofatores NADH pelo processo de biorredução ocorrendo na matriz mitocondrial, realmente provocaria uma redução na taxa de regeneração de ATP pela cadeia transportadora de elétrons, no processo de respiração. Sendo o consumo de oxigênio diretamente associado à taxa de regeneração de ATP na matriz mitocondrial, espera-se que o seu consumo pelo processo respiratório decaia exatamente na mesma proporção, conforme foi observado experimentalmente (*tabela 2*). No entanto, deve-se esclarecer que a associação entre consumo de NADH e a regeneração ATP só é válida para a via

respiratória, a qual ocorre no interior da mitocôndria, conforme representado esquematicamente na *figura 7*.

Contudo, o consumo de glicose no processo **B-AG** foi 34% inferior ao controle (**C-AG**), um valor razoavelmente superior aos observados para consumo de O₂ e produção de energia, que foi cerca de 20% (*tabela 2*). Neste caso, uma possível explicação, seria o “desvio” de parte da glicose consumida para a construção das fontes endógenas no processo **C-AG**, representado pela *segunda fase* da curva P-t (*figura 12a*), segundo interpretação de Lamprecht (1980).

Por este motivo, os valores das razões Q/Gluc e O₂/Gluc, apresentados na *tabela 3*, podem acarretar em conclusões errôneas a respeito das contribuições dos componentes respiratório e fermentativo, do metabolismo respiro-fermentativo, uma vez que somente parte da glicose consumida é, provavelmente, convertida em energia ao longo do experimento, sendo outra parte acumulada como reserva endógena, fato que é mais evidente no processo controle (**C-AG**), segundo interpretação da curva P-t apresentada por Lamprecht (1980).

O fato da biorredução ocorrer preferencialmente na matriz mitocondrial pode ser resultado da possível presença de uma enzima homóloga à β-hidróxibutirato desidrogenase, responsável pela redução do íon acetoacetato oriundo da decomposição de lipídios e aminoácidos (corpos cetônicos). Essa enzima também encontra-se presente em células hepáticas e cardíacas em mamíferos (Voet e Voet, 1995; Genomenet).

Pela alta similaridade estrutural entre o íon acetoacetato e o acetoacetato de etila, faz sentido supor que esta enzima promoveria a redução com alta eficiência. A suposta existência desta enzima poderia ser a base da constatação experimental que indica a preferência do processo de biorredução em nível mitocondrial. Em condições anaeróbicas a biorredução também ocorre, porém as custas de um maior consumo de fonte de energia (*tabela 5*) e com taxa relativamente inferior a observada em condições aeróbicas. Essa menor taxa de redução pode estar associada à menor taxa de regeneração de NADH pela via glicolítica em relação ao obtido em nível mitocondrial e/ou também à presença de desidrogenases com menor especificidade por esse substrato.

A conversão do acetoacetato de etila em 3-hidróxibutirato de etila, nessas condições, foi de 100% (ver tabela 4).

5.4 Experimentos Anaeróbicos na Presença de Glicose (AnG)

Com o objetivo de excluir a contribuição da respiração sobre o processo de biorredução e avaliar o comportamento do referido processo sem a participação da mitocôndria na regeneração dos cofatores NADH, foram realizados experimentos em anaerobiose, condição que foi mantida por fluxo contínuo de nitrogênio gasoso (N₂) no meio reacional.

A exemplo dos experimentos de biorredução em condições aeróbicas (**AG**), os experimentos anaeróbicos (**ANG**) também apresentaram um comportamento multifásico, inclusive com a ausência, no processo de biorredução (**B-AG**, figura 13a), do largo pico exotérmico referente à **segunda fase** da curva P– t, que foi atribuído à síntese de reservas endógenas (trealose e/ou glicogênio) (Lamprecht, 1980). Porém, nesse caso, o estudo metabólico torna-se mais simples, uma vez que temos agora o catabolismo ocorrendo por apenas uma via principal, a via fermentativa. Nessas condições o catabolismo da glicose ocorre quase que exclusivamente no citossol da *S. cerevisiae*.

Após o período de 20 horas de experimento observou-se que a produção de calor (**Q**) para o processo de biorredução (**B-AnG**) (tabela 2) foi muito semelhante ao valor observado para o processo controle, sendo o efeito térmico do controle, apenas 5% inferior ao da biorredução.

Do ponto de vista bioquímico das vias metabólicas, sabe-se que a regeneração de cofatores NADH em condições anaeróbicas ocorre exclusivamente associado à via glicolítica, conforme pode ser observado na figura 4. Assumindo-se que o processo de biorredução do acetoacetato de etila deve ocorrer associado à oxidação de cofatores NADH, esse processo não deveria influenciar o rendimento energético da fermentação, visto que a biossíntese ou regeneração de ATP nesta via não está diretamente associada aos cofatores NADH, como acontece no processo respiratório (figura 4).

No entanto, embora o consumo de NADH pela biorredução não deva influenciar a produção de ATP (rendimento energético), existe um metabólito cuja concentração age como um “sensor” da concentração relativa de NADH no citossol, esse metabólito é o etanol. Como pode ser observado na *figura 4*, o processo fermentativo ocorre pela descarboxilação do piruvato a acetaldeído e posterior redução do acetaldeído a etanol, com utilização dos cofatores NADH citossólicos, regenerados pela via glicolítica. Portanto, o processo de biorredução associado ao processo fermentativo, deve ocorrer com competição (*figura 16*) entre acetaldeído (metabólito) e o acetoacetato de etila (substrato) pelos cofatores NADH, o que inevitavelmente levaria a uma diminuição na produção de etanol.

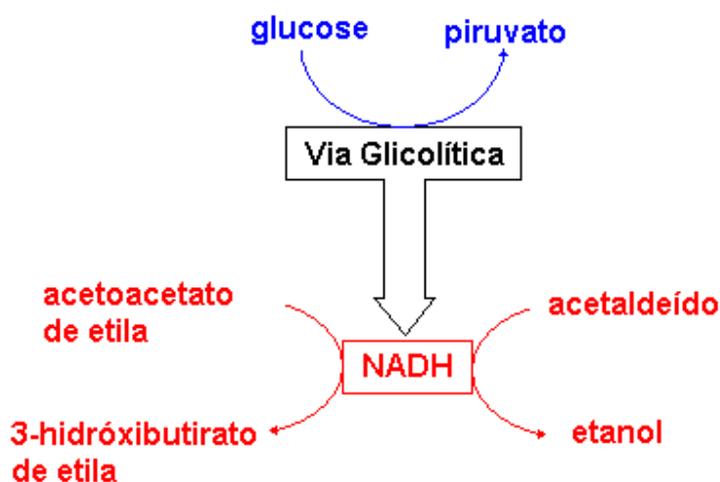


Figura 16: Representação esquemática da competição entre acetoacetato de etila e acetaldeído pelo cofator NADH

No entanto, como foi observado na *figura 13b*, os processos controle e biorredução apresentaram taxas de produção de etanol bastante semelhantes. Tal observação é uma forte indicação de que o processo de biorredução em condições de inatividade mitocondrial (anaerobiose), não ocorre associado à oxidação dos cofatores NADH, regenerados na via glicolítica (*figura 4*).

Também, uma outra possibilidade do catabolismo da glicose em nível citossólico é a via pentose fosfato (VPF) (*figura 4 e 17*), via esta diretamente associada ao anabolismo na qual são produzidos intermediários que são utilizados pelas células para

a síntese de DNA e RNA, além da regeneração dos cofatores NADPH a partir da redução do NADP⁺.

A VPF (*figura 4 e 17*) trata-se de um desvio da via glicolítica, o qual ocorre a partir do 2º intermediário da via glicolítica (glicose - 6 - fosfato). Após sofrer as reações enzimáticas na via pentose fosfato, os produtos desta retornam a via glicolítica como intermediários (Frutose-6-fosfato (F6P) ou Gliceraldeído - 3 - fosfato (GAP)). A F6P retorna a via glicolítica como 3º intermediário desta, logo após o ponto de desvio, seguindo o curso normal da via glicolítica até o produto final, piruvato. O retorno nesse ponto da via não deveria acarretar em alterações na concentração de ATP no citossol, visto que todas as etapas de consumo e produção ATP são mantidas, e o rendimento energético esperado seria igual ou quase igual ao que se esperaria na via glicolítica, ou seja, sem a existência desse “desvio”.

No entanto, o outro intermediário, o GAP, retorna a via glicolítica como 5º intermediário desta. Como é possível observar na *figura 17*, o retorno nesse ponto da via elimina uma etapa de consumo de ATP (*destacado pelo contorno azul*) o que pode influenciar positivamente o rendimento energético do processo de biorredução em relação ao controle. Essa é a base teórica que encontramos para justificar a não alteração na taxa de produção de etanol e a elevação na quantidade de calor produzido pelo processo de biorredução em relação ao processo controle, valores que podem ser conferidos na *tabela 2*.

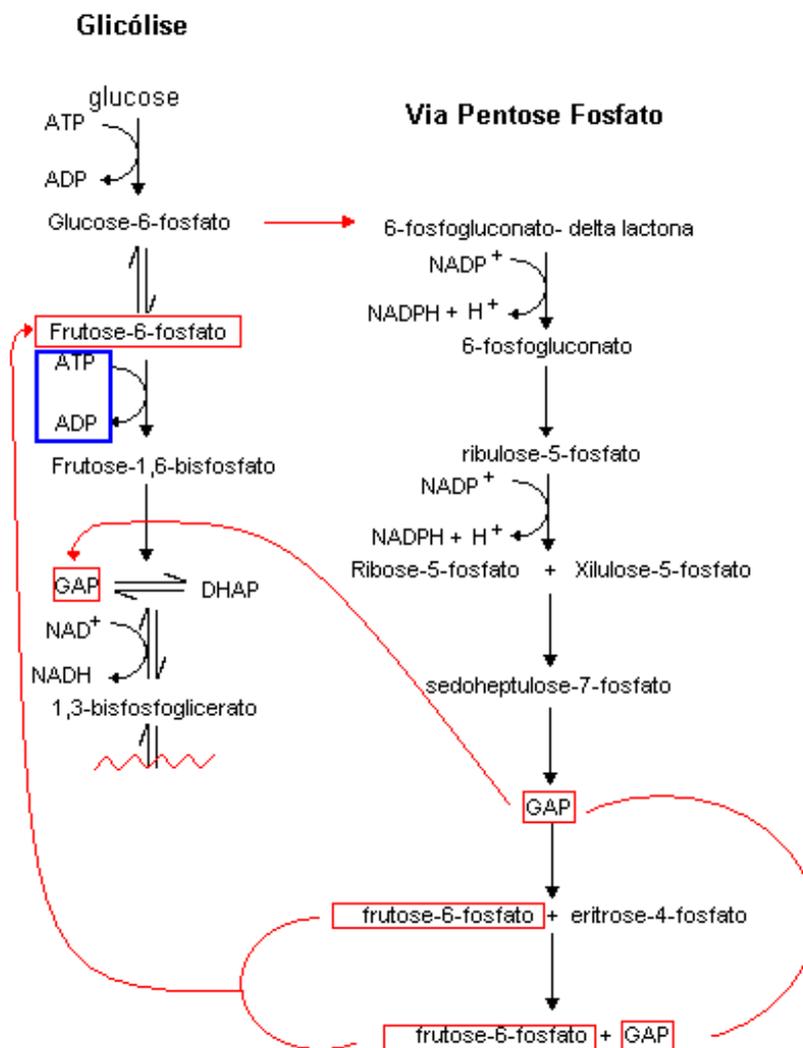


Figura 17: Representação parcial da via glicolítica e a entrada dos intermediários da VPF na via glicolítica

O consumo de glicose pode ser considerado igual para ambos os processos anaeróbicos (**C-AnG** e **B-AnG**, *tabela 2*), fornecendo indícios de que a glicose que possivelmente foi armazenada como fonte endógena nas primeiras horas de experimento, também tenha sido total ou quase totalmente consumida, considerando-se as informações apresentadas por Lamprecht (1980).

Com base nas informações obtidas nos experimentos **AG** e **AnG** foi possível concluir que o processo de biorredução do acetoacetato de etila pode acontecer em ambos os compartimentos celulares, citoplasma ou matriz mitocondrial, associados a

VPF e a mitocôndria (respiração), respectivamente. No entanto, os resultados mostram que **parece haver uma preferência pela via respiratória quando esta é permitida pelas condições experimentais**. Esta conclusão pode ser constatada pelo elevado rendimento do processo de biorredução em condições aeróbicas as custas de muito menos fonte de energia (glicose) em relação ao processo anaeróbico. Esta informação fica mais clara quando se faz a razão entre a quantidade de acetoacetato biorreduzido e a quantidade de glicose consumida no processo, valores apresentados na *tabela 5*.

Essa razão representa a quantidade de 3-hidróxibutirato de etila produzido por mol de glicose consumida pelo microorganismo. Esses valores mostram que o processo de biorredução aeróbico é cerca de 2,5 vezes mais eficiente do que o processo de biorredução anaeróbico, quando se utiliza como critério de eficiência um menor consumo de fonte de energia. Essa constatação reforça, juntamente com a discussão apresentada, os indícios de que a biorredução, provavelmente, ocorre mais eficientemente pela via respiratória, onde a taxa de regeneração dos cofatores NADH é maior em relação às vias glicolítica e VPF.

A conversão do acetoacetato de etila em 3-hidróxibutirato de etila, nessas condições, foi de 93,5% (*ver tabela 4*).

5.5 Experimentos Aeróbicos na Presença de Lactato (AL)

Ao estudar o processo de biorredução em condições aeróbicas, porém, utilizando-se lactato como fonte de energia, teve-se como objetivo principal isolar o processo catabólico em nível mitocondrial, visto que, segundo a literatura (Rigoulet e col., 2004) o processo catabólico do lactato ocorre diretamente na mitocôndria, suprimindo-se assim os efeitos da via glicolítica e da VPF, no que diz respeito à regeneração dos cofatores de redução (NADPH e NADH).

Inicialmente é necessário dizer que o lactato (*equação 6*) é a base conjugada de um ácido orgânico fraco, o ácido láctico, cujo $pK_a = 3,86$. Isso significa que em $pH \sim 7,0$ $[lactato] > [ácido láctico]$ e que somente em condições de $pH < 3,86$, teríamos o ácido conjugado prevalecendo sobre a base conjugada (lactato). Isso nos garante que

A redução de pH é uma consequência do metabolismo da glicose. Durante o processo catabólico da glicose, enzimas conhecidas como ATPases de membrana (*ver figura 3*), trabalham bombeando prótons do citossol para o meio externo, reduzindo o pH externo (Imai e Ohno, 1995; de la Fuente e col., 1997). Essa informação reforça a conclusão de que até o início do segundo pico exotérmico, o microorganismo está consumindo suas fontes endógenas, que são provavelmente, fontes de energia mais facilmente acessíveis nas condições experimentais. Essa redução do pH externo gera um gradiente protônico através da membrana celular, favorecendo mecanismos de transporte do tipo próton-simporte, bastante comum no transporte de ácidos monocarboxílicos como o lactato.

No entanto, o início do segundo pico exotérmico acontece de forma quase concomitante com a elevação de pH, para ambos os processos **C-AL** e **B-AL** (*ver figuras 14a e 14c*). A curva de pH, novamente, teve papel elucidativo no processo observado calorimetricamente. A elevação de pH é coerente com o processo de transporte próton-simporte (*ver figura 2*), apresentado como sendo o provável mecanismo para o transporte de lactato. Nesse processo, o lactato é transportado para citossol mediante o bombeamento de prótons no mesmo sentido (*ver figura 2*). Por este motivo, a elevação de pH é uma forte evidência do transporte de lactato, visto que prótons no meio extracelular são bombeados para o citossol no mesmo sentido do lactato, pelo processo próton-simporte.

Como apresentado na literatura (Casal e col., 1999), a expressão da permease responsável para transporte de lactato é induzida pela presença de lactato no meio de cultura, como única fonte de carbono/ energia. Como não se conhece o processo de crescimento do microorganismo utilizado nos experimentos, visto se tratar de fermento de panificação comercial, é bastante provável que o microorganismo tenha sido crescido em meio complexo na presença de glicose como fonte de carbono/ energia. Com base nesta suposição e nas informações contidas na literatura (Casal e col., 1995, 1999) os microorganismos, provavelmente, não possuíam as permeases para o transporte de lactato. Portanto, o intervalo de tempo necessário para o início do transporte de lactato talvez seja decorrente do tempo que as células necessitam para expressar a permease responsável pelo processo simporte, sendo esta apenas uma suposição.

Observou-se também um atraso de ~6 horas no surgimento do segundo pico exotérmico para o processo **B-AL** em relação ao processo **C-AL** (*figura 14a*). Esse atraso pode ser decorrente de uma influência do acetoacetato de etila sobre o processo de expressão da permease, pois como foi apresentado por Casal (1999), a expressão da enzima responsável pelo transporte de lactato é induzida pela presença do monocarboxilato no meio de cultura.

Outra informação interessante obtida pelos resultados experimentais foi que o valor do calor liberado (**Q**) para o processo **B-AL** foi superior ao obtido para o processo **C-AL** (*ver tabela 2*). Observa-se também uma relação semelhante entre esse excesso de calor (**Q**) liberado no processo **B-AL**, em relação ao processo **C-AL**, e a quantidade de acetoacetato de etila consumido pelo microorganismo (*ver tabelas 2 e 4*) para finalidades que não a da biorredução. Possivelmente esse excesso de calor do processo **B-AL** é decorrência do consumo do acetoacetato de etila como fonte de energia, conforme foi enfatizado pela semelhança entre os valores de excesso de calor liberado pelo processo de biorredução (**B-AL**) em relação ao controle (**C-AL**) e a quantidade de acetoacetato de etila consumido (56% e 36,8%, respectivamente).

É conhecido que, em mamíferos, os ânions acetoacetato e o 3-hidroxiacetato podem ser utilizados como fonte de energia secundária nos tecidos periféricos. Esses compostos são conhecidos como corpos cetônicos e são gerados a partir da decomposição de aminoácidos e lipídios através de uma série de reações enzimáticas (Voet e Voet, 1995), em condições de ausência ou baixa disponibilidade de carboidratos.

Há relatos (Shimizu e col., 1974) da existência de enzimas que possibilitam, nas leveduras, um metabolismo análogo ao observado em mamíferos. A semelhança estrutural que esses íons (acetoacetato e 3-hidroxiacetato) possuem com o substrato acetoacetato de etila e o produto 3-hidroxiacetato de etila pode tornar possível a utilização aeróbica destas espécies como fonte de energia de forma análoga à observada em organismos superiores, o que explicaria esse grande consumo de acetoacetato de etila como fonte de energia nesse caso (Voet e Voet, 1995).

Duas informações que poderiam contribuir bastante para o entendimento e para as conclusões, nessa condição experimental, seriam o monitoramento da produção de

etanol e também do consumo de lactato ao longo das 20 horas de experimento. Em ambos os casos tentou-se realizar a quantificação utilizando-se kits enzimáticos específicos para cada composto. Porém, infelizmente, tanto o kit para etanol quanto o kit para lactato não apresentaram resultados satisfatórios na quantificação dos respectivos compostos para o processo de biorredução.

Constatou-se que o método enzimático para análise de etanol é sensível à presença do acetoacetato de etila, substrato para o processo de biorredução. Embora este tenha se apresentado como um interferente relativamente fraco, devido sua alta concentração e a baixa concentração de etanol, não foi possível obter qualquer informação a respeito da produção de etanol para o experimento **B-AL**. Vale justificar aqui que nas condições estudadas anteriormente (**B-AG** e **B-AnG**), a produção de etanol foi muito superior, de modo que as alíquotas tiveram que ser diluídas por um fator de ~100 vezes, o que suprimiu o efeito do acetoacetato de etila como interferente e permitiu a quantificação deste metabólito.

Embora não tenha sido possível a quantificação de etanol no experimento **B-AL**, esta foi possível no respectivo experimento controle (**C-AL**). No experimento controle (**C-AL**) observou-se que não há produção significativa de etanol, ou seja, não há etanol em concentrações superiores ao limite de detecção do método ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$), isto é, o processo catabólico seja das reservas endógenas ou do lactato, deve ocorrer exclusivamente pela via respiratória.

No caso do lactato, observou-se uma grande oscilação dos valores de concentração de lactato no meio reacional. Acreditamos que esse efeito seja decorrente de interferências de metabólitos gerados no metabolismo do microorganismo ou mesmo problemas relativos à reprodutibilidade, inerentes ao método. Também nesse caso, não foi possível a obtenção de resultados satisfatórios relativos ao consumo de lactato.

A conversão do acetoacetato de etila em 3-hidróxibutirato de etila, nessas condições, foi de 63,2% (*ver tabela 4*).

5.6 Experimentos Aeróbicos na Ausência de Fonte de Energia Exógena

A última condição estudada para o processo de biorredução do acetato de etila foi em condições aeróbicas na ausência de fonte de energia exógena (**ASG**). Nos experimentos realizados nessas condições, teve-se como objetivo obter informações que viessem a complementar as observações e conclusões feitas nos experimentos discutidos anteriormente e também observar como esse processo ocorre na ausência de fontes de energia exógenas, situação que força o microorganismo a utilizar suas fontes endógenas de energia.

Como sabemos, a manutenção da vida celular na completa ausência de glicose ou outra fonte de energia exógena é realizada pelo consumo das fontes endógenas, que no caso da *S. cerevisiae*, são glicogênio e/ou trealose (Lillie e Pringle, 1980). Na carência de fontes exógenas de energia, as fontes endógenas são rapidamente “quebradas” em moléculas de glicose e disponibilizadas para consumo otimizado pelas células.

Embora essas reservas endógenas também sejam constituídas de glicose, elas provavelmente são consumidas pelo microorganismo de forma mais controlada e “racional” do ponto de vista termodinâmico, de forma a manter as células vivas pelo maior período de tempo, uma vez que nestas condições deve ser mínimo o desperdício de energia durante o metabolismo.

Acreditamos que o consumo otimizado dessas reservas endógenas, em condições aeróbicas, ocorra pela completa oxidação da glicose no processo respiratório, processo catabólico que garante o maior rendimento energético na forma de ATP. Com isso, acreditamos também que as vias catabólicas cujos rendimentos energéticos são inferiores não ocorram em taxas significativas. Este fato levaria à não produção de etanol ou a uma produção insignificante, visto que o rendimento energético da via fermentativa, na forma de ATP, é consideravelmente inferior ao da respiração. Como vimos, o metabolismo respiro-fermentativo só ocorre quando a concentração de glicose excede um valor limite ($0,03 \text{ mmol L}^{-1}$). Logo, a não produção de etanol nessa condição experimental (**C-ASG**, *tabela 2*), nos indica que o metabolismo ocorre exclusivamente pela via respiratória.

A não ocorrência de um metabolismo misto respiro-fermentativo pode ser decorrente da taxa de quebra de glicogênio em glicose, que deve ocorrer numa taxa muito próxima daquela em que a glicose é consumida pela via glicolítica, de forma que a concentração de glicose no citossol não atinge a concentração limite para a ocorrência da repressão catabólica, sendo o catabolismo respiratório ocorrendo exclusivamente.

Segundo Eaton (1960), alguns pesquisadores obtiveram dados de que as reservas endógenas podem ser consumidas tanto aerobicamente quanto anaerobicamente, onde a produção de etanol é observada somente em condições anaeróbicas, conforme discutido anteriormente.

Infelizmente, a exemplo do que ocorreu no caso do experimento **B-AL**, não foi possível a quantificação de etanol no experimento de biorredução (**B-ASG**). Tal impossibilidade deve-se a interferência do substrato acetoacetato de etila no método enzimático de quantificação de etanol, conforme foi discutido nos caso do experimento **B-AL** (ver item 5.5).

Entretanto, no experimento **C-ASG**, onde obviamente não havia acetoacetato de etila, foi possível observar que ao longo das 20 horas não foi detectado quantidades significativas de etanol no meio reacional, ou seja, quantidades superiores ao limite de detecção do método ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$ em $\lambda=340 \text{ nm}$) (Manual Boehringer Mannheim). Esta constatação reforça a suposição de que o consumo das reservas endógenas deve ocorrer pelo processo respiratório, processo, como já foi dito, no qual o rendimento energético em forma de ATP é bastante superior ao obtido pela fermentação.

Nas curvas P-t (*figura 15a*), observa-se um estreito pico exotérmico com duração de, aproximadamente 30 minutos, para ambos os processos (**C-ASG** e **B-ASG**). Esse pico é semelhante ao que foi atribuído, aos experimentos **AG** e **AnG**, ao catabolismo fásico da glicose, segundo Lamprecht (1980). A exemplo dos experimentos **AL**, aqui também não foi adicionado glicose ao meio, o que nos permite concluir que, provavelmente, esse efeito térmico está diretamente relacionado ao consumo de glicose endógena, a exemplo dos experimentos **AL**.

A semelhança entre as curvas calorimétricas e de pH entre os experimentos **AL** e **ASG** é notável (ver *figuras 14a, 14c, 15a, 15c*).

Estas curvas calorimétricas apresentam um estreito pico inicial, seguido por um sinal calorimétrico baixo ($\sim 70\mu\text{W}$) e aproximadamente constante. O segundo pico exotérmico ocorre diretamente relacionado ao aumento do pH. O que reforça a suposição de que as reservas endógenas estão sendo consumidas até o início do segundo pico exotérmico é a diminuição contínua do pH do meio até pouco antes do início do segundo pico exotérmico, fenômeno que ocorre nos dois experimentos **C-ASG** e **B-ASG**. Como já foi discutido no *item 5.5*, essa redução de pH é característica do catabolismo da glicose e ocorre pelo bombeamento de prótons do citossol para o meio externo pelas ATPases de membrana, como representado na *figura 3* (Imai e Ohno, 1995; de la Fuente e col., 1997). Essa redução de pH possui, entre outras funções, gerar um gradiente protônico que pode ser utilizado pelo microorganismo para promover transporte de metabólitos, como no caso do processo de transporte próton-simporte.

A elevação do pH pouco antes do aparecimento do segundo pico exotérmico, assim como o próprio efeito térmico associado a este fato, pode ser decorrente do consumo de uma segunda fonte de energia, que pelos resultados apresentados, supõe-se que se trate do consumo de algum metabólito gerado no catabolismo da glicose. A semelhança com os resultados apresentados nos experimentos **AL** (*figura 14a-c*) sugere que a segunda fonte de energia seja algum metabólito semelhante ao lactato, como, por exemplo, o ânion acetato, que é um metabólito comum da *S. cerevisiae* e também sofre transporte pelo mesmo mecanismo próton-simporte, descrito anteriormente para o lactato, podendo ter sido gerado na etapa de consumo das fontes endógenas de energia.

A exemplo do que foi observado nos experimentos **AL**, observou-se também um atraso no surgimento do segundo pico exotérmico para o processo **B-ASG** em relação ao processo **C-ASG** (*figura 15a*), porém nesse caso o atraso de $\sim 2,5$ horas, pode ser decorrente de uma influência do acetoacetato de etila sobre o processo de expressão da permease, pois como foi apresentado por Casal (1999), a enzima responsável pelo transporte de lactato é descrita também como sendo responsável pelo transporte de acetato, e esta expressão da permease é induzida pela presença do monocarboxilato no meio de cultura. Como já foi dito anteriormente, não se conhece o processo de

crescimento do microorganismo utilizado nos experimentos, visto se tratar de fermento de panificação comercial. Porém, acredita-se que o microorganismo tenha sido crescido em meio complexo na presença de glicose como fonte de carbono/ energia. Com base nesta suposição e nas informações contidas na literatura (Casal e col., 1995; Casal e col., 1999) os microorganismos, provavelmente, não possuíam as permeases necessárias para o transporte de tais monocarboxilatos, o que sugere que há necessidade de expressá-las para tornar possível o transporte do lactato para o citossol.

Outra informação semelhante aos experimentos **AL** foi que o calor liberado (**Q**) para o processo **B-ASG** foi superior ao obtido para o processo **C-ASG**. Observa-se uma semelhança entre o excesso de calor (**Q**) liberado no processo de biorredução (**B-ASG**), em relação ao processo controle (**C-ASG**), e a quantidade de acetoacetato de etila consumido pelo microorganismo para finalidades que não a da biorredução (*14% e 13%, respectivamente*), possivelmente, como fonte de energia. Portanto, esse excesso de calor do processo **B-AL** pode ser decorrente do consumo do acetoacetato de etila como fonte de energia, conforme foi enfatizado pela semelhança entre os valores de **Q** e consumo de acetoacetato de etila.

Também como já foi dito, os ânions acetoacetato e o 3-hidróxibutirato podem ser utilizados como fonte de energia secundária nos tecidos periféricos. Esses compostos são conhecidos como corpos cetônicos e são gerados a partir da decomposição de aminoácidos e lipídios através de uma série de reações enzimáticas (Voet e Voet, 1995), em condições de ausência ou baixa disponibilidade de carboidratos.

Há relatos (Shimizu e col., 1974) da existência das enzimas que possibilitam, nas leveduras, um metabolismo análogo ao observado em mamíferos. Acreditamos que devido à semelhança estrutural que esses íons (acetoacetato e 3-hidróxibutirato) possuem com o substrato acetoacetato de etila e o produto 3-hidróxibutirato de etila a utilização aeróbica destas espécies como fonte de energia de forma análoga à observada em organismos superiores seja possível, o que explicaria esse grande consumo de acetoacetato de etila como fonte de energia nesse caso (Voet e Voet, 1995).

Uma informação que contribuiria bastante para as conclusões nessa condição estudada, seria o monitoramento da produção de etanol e também da possível produção de acetato ao longo dos experimentos.

A conversão do acetoacetato de etila em 3-hidróxibutirato de etila, nessas condições, foi de 87% (*ver tabela 4*).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho, conforme proposto no projeto de pesquisa, teve a finalidade de investigar de forma sistemática e em tempo real o processo de biorredução do substrato acetoacetato de etila promovido por *S. cerevisiae*, utilizando para tal estudo a técnica de calorimetria de fluxo aliada ao monitoramento de propriedades diretamente relacionadas ao metabolismo celular.

Como foi discutido, os primeiros experimentos, aeróbicos e anaeróbicos na presença de glicose (400 mmol L^{-1}) permitiu-nos concluir que o processo de biorredução pode ocorrer em ambos os compartimentos, citoplasma e matriz mitocondrial. A biorredução também mostrou-se diretamente associada ao catabolismo da glicose, seja fermentativo ou respiratório.

Com base nos valores de calor liberado (**Q**) e O_2 consumido, constatou-se que o processo de biorredução do acetoacetato de etila interfere diretamente no processo respiratório (mitocondrial), mas não interfere na via fermentativa, do metabolismo respiro-fermentativo da *S. cerevisiae*.

Constatou-se que o processo de biorredução do acetoacetato de etila parece ocorrer preferencialmente na matriz mitocondrial. Isso também foi constatado pelo alto rendimento e conversão a 3-hidróxibutirato de etila obtidos para o processo aeróbico, além da taxa de produção de etanol muito semelhante. Este fato é uma indicação de que a biorredução não consome cofatores NADH oriundos da via glicolítica **quando há condições de aeração que possibilite a respiração.**

O fato da biorredução ocorrer preferencialmente na mitocôndria pode ser resultado da presença de uma enzima mitocondrial na *S. cerevisiae*, homóloga a β -hidróxibutirato desidrogenase. Essa enzima é responsável pela redução do íon acetoacetato, oriundo da decomposição de lipídios e aminoácidos. Pela alta similaridade estrutural entre o íon acetoacetato e o acetoacetato de etila, faz sentido supor que esta enzima promoveria a biorredução com alta eficiência. A suposta existência desta enzima poderia ser a base da constatação experimental que indica a preferência do processo de biorredução em nível mitocondrial. Em condições anaeróbicas a biorredução também ocorre, porém as custas de um maior consumo de

fonte de energia e com taxa relativamente inferior a observada em condições aeróbicas. Essa menor taxa de redução pode estar associada à menor taxa de regeneração de NADH pela via glicolítica em relação ao obtido em nível mitocondrial e/ou também à presença de desidrogenases com menor especificidade por esse substrato.

Nas outras duas condições estudadas, com lactato (**AL**) e (**ASG**), há observações bastante interessantes, porém pouco conclusivas com relação aos aspectos bioquímicos do processo de biorredução.

Primeiro observa-se que os experimentos de biorredução, tanto para **AL** quanto para **ASG**, liberam mais calor e consomem mais oxigênio em relação aos seus respectivos controles. Isso nos fornece um indício bastante forte de que o acetoacetato de etila pode estar sendo consumido como fonte de energia nesses processos. Fato semelhante, porém de menor intensidade também foi observado para o experimento em condições anaeróbicas (**B-AnG**). No entanto, sem um estudo metabólico detalhado não é possível indicar para qual finalidade o acetoacetato de etila está sendo consumido, sendo possível apenas fazer suposições com base nos dados que foram obtidos.

Nos experimentos **AL** e **ASG** constatou-se também um deslocamento no tempo de aparecimento do segundo pico calorimétrico de liberação de calor para o processo de biorredução (**B-AL** e **B-ASG**), em comparação com os respectivos controles (**C-AL** e **C-ASG**).

Com esse trabalho tivemos como objetivo principal mostrar a importância que o conhecimento do processo bioquímico possui sobre a compreensão e racionalização do processo de biorredução. Com as conclusões apresentadas aqui, acreditamos que seja possível se ter uma visão mais racional sobre aquelas observações comuns, como por exemplo, o porquê de valores de rendimento, estereosseletividade e excesso enantioméricos serem diferentes entre processos aeróbicos e anaeróbicos. Afinal, como vimos, em cada condição o processo ocorre em regiões diferentes no interior da célula, utilizando enzimas e cofatores diferentes.

Por se tratar de um trabalho inédito, foi gasto muito tempo na otimização de parâmetros experimentais. Com isso, acreditamos que o curto espaço de tempo para o desenvolvimento do presente trabalho (~1,5 ano) aliado a sua complexidade, tenha se

tornado um obstáculo na obtenção de mais informações que reforçassem tais conclusões ou mesmo elucidassem algumas dúvidas. No entanto, não tínhamos a pretensão de realizar um estudo completo sobre o assunto, visto se tratar de um sistema bastante complexo. Para isso seria necessário muito mais tempo de estudo do que possuíamos, além da necessidade de cooperação entre pesquisadores de outras áreas, como por exemplo, de algumas especialidades das ciências biológicas.

Acreditamos que, contudo, com esse trabalho abrimos uma porta para pesquisadores que visem a elucidação de tais mecanismos bioquímicos responsáveis pelo processo de biorredução, com objetivo de tirar do empirismo os processos de biossíntese e quem sabe um dia termos controle sobre esses complexos processos bioquímicos, assim como temos sobre grande parte dos processos químicos.

Nesse trabalho, utilizando um microcalorímetro de fluxo, mostramos ser possível um estudo metabólico detalhado do processo de biorredução do acetoacetato de etila pela *Saccharomyces cerevisiae* e abrimos uma porta para pesquisadores que queiram estudar esse ou outros processos de biotransformação por calorimetria, uma aplicação inédita para essa técnica físico-química.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L.; “Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and product Formation”, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (9), p. 3187-3195.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris, A.J.A. Kötter, P., Luttik, A.H., van Dijken, J.P., Pronk, J.T.; “Stoichiometry and Compartmentation of NADH Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, p. 15-37.
- Barnett, J.A.; “ The Utilization of Sugars by Yeasts”, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, *32*, p. 125-233.
- Belluco, A.E.S. em “*Alterações Fisiológicas e de Composição em Saccharomyces cerevisiae sob Condições Não Proliferantes*”, Dissertação de Mestrado, ESALQ – Piracicaba, 2001, p. 8-15
- Brettel, R., Lamprecht, I., Schaarschmidt, B.; “Microcalorimetric Investigations of the Metabolism of Yeasts VII. Flow-Calorimetry of Aerobic Batch Cultures” *Radiat. Environ. Biophys.* **1980**, *18*, p. 301-309.
- Bonato, C.M., Rubin, C.J., Melges, E., Santos, V.D.; “Nutrição Mineral de Plantas”, *Universidade Estadual de Maringá (UEM)*, Maringá, Paraná, 1998, p.32-35.
- Briggner, L., Wadsö, I.; “Test and Calibration Processes for Microcalorimeters, with Special Reference to Heat Conduction Instruments Used With Aqueous Systems”, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1991**, *22*, p.101-118.
- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W.; “Fungal Molecular Systematics”, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1991**, *22*, p. 525-564.
- Casal, M., Blásquez, M.A., Javier-Gamo, F., Gancedo, C., Leão, C.; “Lack of Lactate-Proton Symport Activity in *pck1* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*” *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *128*, p. 279-282.
- Casal, M., Cardoso, H., Leão, C.; “Effects of Ethanol and Others Alkanols on Transport of Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*(2), p. 665-668.
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R.P., Gancedo, C., Leão, C.; “The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by *JEN1*”, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*(8), p. 2620-2623.

- Cássio, F., Leão, C., van Uden, N.; “Transport of Lactate and Other Short-Chain Monocarboxilates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*(3), p. 509-513
- Crabtree, B., Nicholson, B.A. em *Studies in Modern Thermodynamics & Biochemical thermodynamics*”, editado por Jones, M.N., Elsevier - New York, 1988, p. 347-394
- D’Auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G.; “Antifungal Activity of Lavandula Angustifolia Essential oil Against *Candida albicans* Yeast and Mycelial Form”, *Med. Mycol.* **2005**; *43*, p. 391-396.
- Davenport, R.R. em *Biology and Activities of Yeasts*, editado por Skinner, F.A., Passmore, S.M. e Davenport, R.R., The Society for Applied Bacteriology Symposium Series nº 9, Academic Press, Londres, 1980, p. 1-6.
- De la Fuente, N., Maldonado, A.M., Portillo, F.; “Glucose Activation of the Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Requires the Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway”, *FEBS Lett.* **1997**, *411*, p. 308-312.
- Eaton, N.R.; “Endogenous Respiration of Yeast. I. The Endogenous Substrate”, *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *88*, p. 17-25.
- Eddy, A. A.; “Mechanisms of Solute Transport in Selected Eukariotic Micro-Organisms”, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1982**, *23*, p. 1-78.
- Elbein, A. D.; “The Metabolism of α,α – Trehalose”, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1974**, *30*, p. 227-256.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G. F., Kappelli; O., “Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells”, *Adv. Microb. Physiol* **1981**, *22*, p. 123 -183
- François, J., Villanueva, M.E., Hers, H.; “The Control of Glycogen Metabolism in Yeast”, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *174*, p. 551-559.
- Fujimoto H, Nagano J, Yamaguchi K, Yamazaki, M.; “Immunosuppressive Components from an Ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii*”, *Chem. Pharm. Bull.*, **1998**; *46*, p. 423-429.
- Fujita,T., Nunomura, K.; “Calorimetric Studies of Yeast Metabolism under Nongrowing Conditions” em *Application of calorimetry in life sciences*, editado por Lamprecht, I. e Schaarschmidt, B., Walter de Gruyter – New York, 1977, p. 119-127.

- Genomenet – Bioinformatic Center Institute for Chemical Research, sítio: http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?ligand+1.1.1.30, Kyoto University – Japan, acessado em 09/10/2005.
- Gustafsson, L.; “ Microbiological Calorimetry”, *Thermochim. Acta* **1991**, *193*, p.145-171.
- Harrison, J.S. em *The Yeasts*; editado por Rose, A.H. e Harrinson, J.S., Academic Press, London, 1970, vol. 3, p. 529-543.
- Hoogerheide, J.C.; Studies on the Energy Metabolism During the Respiratory Process by Baker Yeast”, *Rad. Environ. Biophys.* **1975**, *12*, p. 281-290.
- Imai, T., Ohno, T.; “The Relationship Between Viability and Intracellular pH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61(10)*, p.3604-3608.
- James, A. M. em *The Thermal and Energetics Studies of Cellular Biological Systems*, editado por James, A.M., Wright-Bristol, 1987.
- Kataoka, M., Yoshiko, N., Shimizu, S., Yamada, H.; “Enzymes Involved in the NADPH Regeneration System Coupled with Asymmetric Reduction of Carbonyl Compounds in Microorganisms”, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56(5)*, p. 820-821.
- Kometani, T., Kitatsuji, E., Matsuno, R.; “Baker’s Yeast Mediated Bioreduction. A New Procedure Using Ethanol as an Energy Source”, *Chem. Lett.***1989**, p. 1465-1466.
- Kometani, T., Kitatsuji, E., Matsuno, R.; “Baker’s Yeast Mediated Bioreduction: Pratical Procedure Using EtOH as Energy Source”, *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71(9)*, p. 197-199.
- Kometani, T., Yoshi, H., Takeuchi, Y., Matsuno, R.; “Large-Scale Preparation of (R)-1,2-Propanediol Through Baker’s Yeast-Mediated Bioreduction”, *J. Ferment. Bioeng.*, **1993**, *76 (5)*, p. 414-415.
- Kometani, T., Morita, Y., Furui, H., Yoshi, H., J., Matsuno, R.; “NAD(P)H Regeneration Using Ethanol as an Energy Source in Baker’s Yeast-Mediated Bioreduction”, *J. Ferment. Bioeng.*, **1994**, *77(1)*, p. 13-16.
- Kometani, T., Sakai, Y., Hisae, U., Yoshi, H., Matsuno, R.; “NADPH-Dependent Reduction of Ethyl Acetoacetate Coupled with Ethanol Oxidation in *Kloeckera magna*”, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61(8)*, p. 1370-1372.

- Kometani, T., Sakai, Y., Urai, H., Goto, M., Matsuno, R.; “Effect of Aeration Conditions on Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Yeast Cultivation”, *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *86* (6), p. 617-619.
- Kreger-Van Rij, N. J. W. em *Biology and Activities of Yeasts*; editado por Skinner, F.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R., The Society for Applied Bacteriology Symposium Series nº 9, Academic Press, 1980, p. 28-52.
- Lamprecht, I. em *Thermodynamics of Biological Processes*; editado por Lamprecht, I. E Zotin, A.I., Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1978, p. 5.
- Lamprecht, I., “Growth and Metabolism in Yeasts” em *Biological Microcalorimetry*, editado por Beezer, A.E., Academic - London, 1980, p. 43-112.
- Lamprecht, I.; “Calorimetry and Thermodynamics of Living Systems” *Thermochim. Acta* **2003**, *405*, p. 1-13.
- Larsson, C., von Stockar, U., Marison, I., Gustafsson, L.; “Metabolic Uncoupling in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Thermochim. Acta* **1995**, *251*, p. 99 -110.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. “Princípios de Bioenergética”, *Princípios de Bioquímica*, Traduzido por: Simões, A.A. e Lodi, W.R.N, Savier - São Paulo, 2000, p. 273-293
- Lillie, S.H., Pringle, J.R.; “Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation”, *J. Bacteriol.***1980**, *143*(3), p. 1384-1394.
- Lodi, T., Fontanesi, F., Guiard, B.; “Co-ordinate Regulation of Lactate Metabolism Genes in Yeast: The Role of the Lactate Permease Gene *JEN1*”, *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *266*, p. 838-847.
- MacQuarrie, D.A., Simon, J.D. em *Physical Chemistry – A Molecular Approach*, University Science Books - Califórnia, 1997, p. 764-773.
- Manual de Instruções Boehringer Mannheim, *Kit Enzimático para Quantificação de Etanol – Método UV*, Produzido por R-Biopharm, Darmstadt – Hessen, Alemanha.
- Manual de Instruções KATAL, *Kit Enzimático para Quantificação de Lactato – Método Colorimétrico*, Produzido por KATAL Biotecnológica Ind. Com. Ltda, Belo Horizonte - MG, Brasil.
- Manual de instruções LABORLAB, *Kit Enzimático para Quantificação de Glicose – Método Colorimétrico*, Produzido por LABORLAB Produtos para laboratório Ltda, Guarulhos – SP, Brasil.

- Miles, R.J., Beezer, A.E., Perry, B.F. em *Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems*, editado por James, A.M., IOP Publishing LTD, Bristol, 1987, p. 106-130.
- Monk, P.R.; "Microbial Calorimetry as an Analytical Method", *Process Biochem.* **1978**, *13(12)*, p. 4-8.
- Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.; Carvalho, M.; Brenelli, E.C.S. em *Some mechanistic considerations on the Baker's Yeast Reduction of α -Substituted acetophenones and Propiophenones*, *Atualidades de Físico-Química Orgânica*, 1995, p. 499.
- Mori, K.; "Synthesis of Optically-active Pheromones", *Tetrahedron* **1989**, *45(11)*, 3233-3298.
- O'Neill, M.A.A., Beezer, A.E., Vine, G.J., Kemp, R.B., Olomolaiye, D., Volpe, P.L.O., Oliveira, D.; "Practical and Theoretical Consideration of Flow-Through Microcalorimetry: Determination of "Thermal Volume" and Its Flow Rate Dependence", *Thermochim. Acta* **2004**, *413*, p. 193-199.
- Pereira, R. S., Duran, N.; "Variable Influence of Ferric and Cupric Ions on *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used in Asymmetric Organic Synthesis", *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18(7)*, p. 857-862.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., Dijken, J.P.V; "Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast* **1996**, *12*, p. 1607-1633.
- Rigoulet, M., Aguilaniu, H., Avéret, N., Bunoust, O., Camougrand, N., Grandier-Vazeille, X, Larsson, C., Pahlman, I., Manon, S., Gustafsson, L.; "Organization and Regulation of the Cytosolic NADH Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *256/257*, p. 73-81.
- Rose, A. H. em *The Yeasts*, editado por Rose, A.H. e Harrinson, J.S., Academic Press, Londres, 1987, 2º ed., vol. 2, p. 6-40.
- Shimizu, I., Nagai, J., Katsuki, H.; "Formation and Metabolism of Acetoacetate in Yeast", *J. Biochem.* **1974**, *75*, p. 69-76.
- Temba, E.S.C., Oliveira, I.M.F., Donnici, C.L.; "Chiral Alcohols: Chemical and Catalytic of Preparation by Asymmetric reduction", *Quim. Nova* **2003**, *26(1)*, p.112-122.
- Voet, D., Voet, J.G. em *Biochemistry*, John Wiley & Sons, INC. New York, 2ºed., 1995, p.16, 524, 595, p. 678-680

- Volpe, P.L.O.; “O que são Termopilhas, como Funcionam e como os Químicos Podem Utilizar estes Componentes”, *Quim. Nova* **1993**, *1*, p. 49-53.
- Wadso, I.; “ Trends in Isothermal Calorimetry”, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26(2)*, p.79-86.
- Willson, R.J.; Beezer, A. E.; Hills, A.K.; Mitchell, J.C.; “The Imidazole Catalysed Hydrolysis of Triacetin: A Medium Term Chemical Calibrant for Isothermal Microcalorimeters”, *Thermochim. Acta* **1999**, *325*, p. 125-132.