



# *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de ensino de toxicologia a estudantes do ensino médio

*Saccharomyces cerevisiae* as a model for teaching toxicology to high school students

L. C. Vitorino<sup>1\*</sup>; L. G. S. Vanin<sup>2</sup>; L. A. Bessa<sup>1</sup>; R. Braghiroli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Agrícola, Instituto Federal Goiano campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, 75901-970, Rio Verde-GO, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Fertilizantes Organominerais, Instituto Federal Goiano campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, 75901-970, Rio Verde-GO, Brasil

\*luciana.vitorino@ifgoiano.edu.br

(Recebido em 17 de agosto de 2020; aceito em 21 de janeiro de 2021)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é comumente utilizada em bioensaios de toxicidade por ser um modelo eucariótico de fácil acesso e cultivo. Assim, este trabalho propõe um protocolo experimental de fácil replicação, utilizando esta levedura e químicos facilmente adquiridos no mercado, para possibilitar que o professor introduza, de forma prática, conceitos de toxicologia para estudantes do ensino médio. Para tanto, foi avaliado o percentual de mortalidade dessa levedura na presença de formulações comerciais de etanol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e observado um comportamento linear da mortalidade com o aumento gradual da concentração dos químicos. Foi verificada toxicidade superior do peróxido, possivelmente associada ao estresse oxidativo. Este protocolo permite ao professor, demonstrar que a toxicidade está intimamente relacionada à concentração dos químicos e abre perspectivas para testes com outras amostras, sendo elas biológicas, como extratos vegetais ou químicas como águas residuais, agrotóxicos e outros.

Palavras-chave: toxicidade, leveduras, bioindicadores

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is commonly used in toxicity bioassays because it is a eukaryotic model that is easily accessible and cultivated. Thus, this work proposes an experimental protocol of easy replication, using this yeast and chemicals easily acquired on the market, to enable the teacher to introduce, in a practical way, concepts of toxicology for high school students. Therefore, the mortality percentage of this yeast was evaluated in the presence of commercial formulations of ethanol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and a linear behavior of mortality was observed with the gradual increase in the concentration of chemicals. Superior peroxide toxicity was verified, possibly associated with oxidative stress. This protocol allows the teacher to demonstrate that toxicity is closely related to the concentration of chemicals and opens up prospects for testing with other samples, biological, such as plant extracts or chemicals such as wastewater, pesticides and others.

Keywords: toxicity, yeasts, bioindicators

## 1. INTRODUÇÃO

O contínuo aumento do número de substâncias químicas e artificiais incorporadas ao cotidiano das pessoas, bem como a industrialização intensiva e o uso de produtos químicos na agricultura, contribuíram para a liberação de muitos compostos tóxicos na água, no ar e no solo, causando muitos problemas ambientais [1] e aumentado a demanda por testes que verifiquem o caráter tóxico de produtos, insumos ou resíduos. O uso de bioensaios como ferramentas de triagem para caracterizar contaminantes em uma variedade de matrizes ambientais, como águas residuais, lixiviados de aterros sanitários ou solos expostos a contaminantes, tornou-se uma ferramenta popular e poderosa no campo da toxicologia ambiental [2, 3, 4].

No geral, é apropriado que se utilize um conjunto de bioensaios envolvendo organismos que representam diferentes níveis tróficos, sobretudo para efluentes complexos, pois permite a avaliação da toxicidade em diferentes organismos com diferentes modos de ação e sensibilidade [5, 6]. Testes utilizando a planta aquática *Lemna minor*, o peixe tropical *Danio rerio* (toxicidade abrangente), as bactérias luminescentes *Qinghaiensis vibrio* e *Vibrio fischeri* (toxicidade para bactérias), os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Artemia salina* (toxicidade para invertebrados) e embriões ou larvas dos anuros *Xenopus tropicalis* e *Rhinella arenarum* (toxicidade a embriões ou

larvas) têm se tornado cada vez mais populares na área ambiental [e.g., 7, 8, 9, 10, 11]. Mas entre esta gama de testes comumente aplicados, os que utilizam a levedura *S. cerevisiae* têm se destacado [e.g., 12, 13, 14, 15, 16], sobretudo pelo fácil acesso a essa levedura, naturalmente comercializada em supermercados. Aliado a isso, as leveduras são organismos eucariontes de fácil manipulação, sendo consideradas excelentes modelos experimentais [17].

Assim, *S. cerevisiae* atende a todos os requisitos de um objeto biológico adequado para testes rápidos de toxicidade. Uma outra vantagem da sua utilização é a possibilidade de armazenamento a longo prazo em estado seco (18 meses em condições normais de armazenamento), mas assim que adicionamos água à levedura, ela ganha vida e está pronta para uso nos bioensaios toxicidade [15]. É preciso considerar também, o alto grau de homologia de *S. cerevisiae* com organismos celulares superiores e a rápida resposta na presença de contaminantes [18].

Apesar da sua popularidade, professores raramente utilizam bioensaios práticos para trabalhar conceitos básicos de toxicologia, como toxicidade, DL50 e outros, com estudantes do ensino médio. Isso ocorre a despeito de a toxicologia ambiental ter desenvolvido inúmeras ferramentas que permitem desde a identificação de metabólitos a jusante de contaminantes ambientais e a remediação de contaminantes garantindo a sustentabilidade e higiene ambiental, até a elucidação de impactos biológicos e resultados adversos da exposição aos contaminantes [19, 20]. É certo que a disseminação de conceitos de toxicologia ao público adolescente pode ajudar na formação de cidadãos mais conscientes dos efeitos adversos da exposição humana ou de componentes da paisagem à ação de substâncias tóxicas, tornando-os mais vigilantes quanto à identificação de eventos poluidores impactantes. Kovacs et al. (2018) [21] demonstraram que estudantes submetidos a cursos de toxicologia são mais propensos a utilizar os conhecimentos adquiridos na resolução de problemas toxicológicos, ajudando no aprimoramento geral dos conceitos de química verde. Dessa forma, alunos que adquirem conceitos de toxicologia desenvolvem uma consciência dos princípios e conceitos toxicológicos que estão ausentes no currículo comum e reconheçam produtos e processos químicos que constituem risco à saúde e meio ambiente [22]. Baseado nisso, este trabalho propõe um protocolo experimental de fácil replicação, utilizando a levedura modelo *S. cerevisiae*, a ser empregado por professores na tarefa de introduzir estudantes do ensino médio em conhecimentos da área da toxicologia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição e preparação do material

Foram testadas formulações comerciais dos químicos Etanol - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (92,8 %) da marca Itajá® e Peróxido de Hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 %) da marca Farmax®. Como material biológico foi utilizada a levedura fermentadora comercial *S. cerevisiae* da marca Fleischmann®, sendo os ensaios conduzidos no laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

A levedura foi primeiramente ativada, adicionando-se a 1g do fermento biológico, 20 g de sacarose (açúcar cristal da marca Cristal®). Esta mistura foi então solubilizada em 100 mL de água destilada previamente autoclavada (20 minutos, a 121°C). A solução foi deixada em repouso por 20 minutos para que se iniciasse o processo de fermentação (Figura 1). Caso a temperatura ambiente esteja inferior a 25 °C, a ativação pode demorar um tempo maior que o previsto. Nestes casos é aconselhável realizar a mistura em água previamente aquecida a 30 °C.

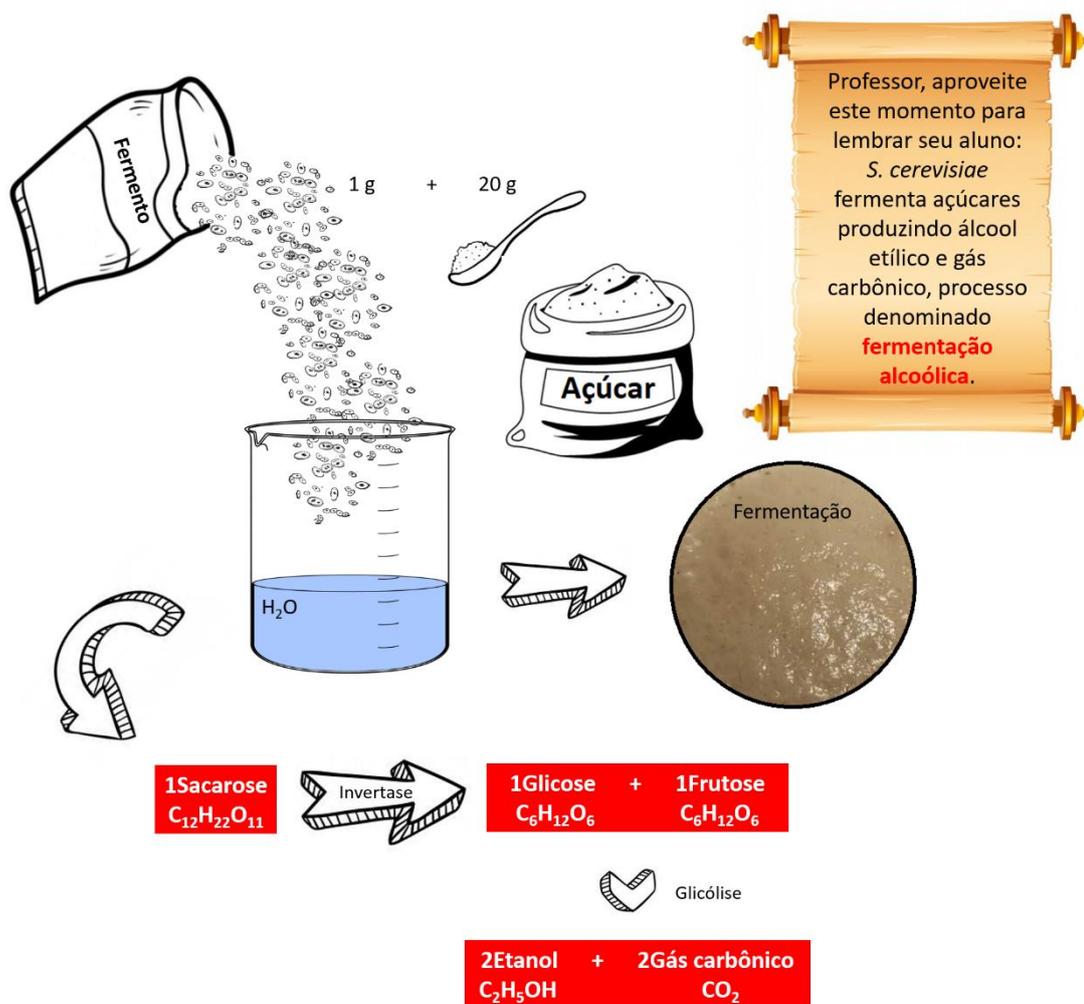


Figura 1: Ativação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por meio de indução da atividade fermentativa em solução de sacarose. A ativação é confirmada pelo aparecimento de bolhas de  $CO_2$  na solução.

Após início da atividade fermentativa, que indica replicação da levedura, foram transferidos 5 mL da solução de fermentação para 20 tubos de ensaio devidamente numerados e identificados. Alternativamente, foram preparadas soluções de 100 mL para cada concentração de Etanol e Peróxido a ser testada. Estas soluções foram preparadas contendo os químicos separadamente, nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10%. Destas soluções, foram pipetados 1 mL de cada concentração para os tubos contendo solução de fermentação (Figura 2), constituindo as soluções de bioensaio. Estas soluções foram deixadas em repouso por 15 minutos para ação tóxica dos químicos avaliados.

Também foi preparada uma solução indicadora de azul de metileno ( $C_{16}H_{18}C_1N_3S.xH_2O$ ) a 1 % (m/v). Posteriormente, uma alíquota de 20  $\mu$ l de cada solução de bioensaio foi depositada em microtubos do tipo Eppendorf 2 mL, juntamente com 20  $\mu$ l de azul de metileno, constituindo uma solução de proporção 1:2 (1 volume da solução de bioensaio, contendo as células e 1 volume do corante). A mistura foi homogeneizada, permitindo a ação do azul de metileno na coloração das células.

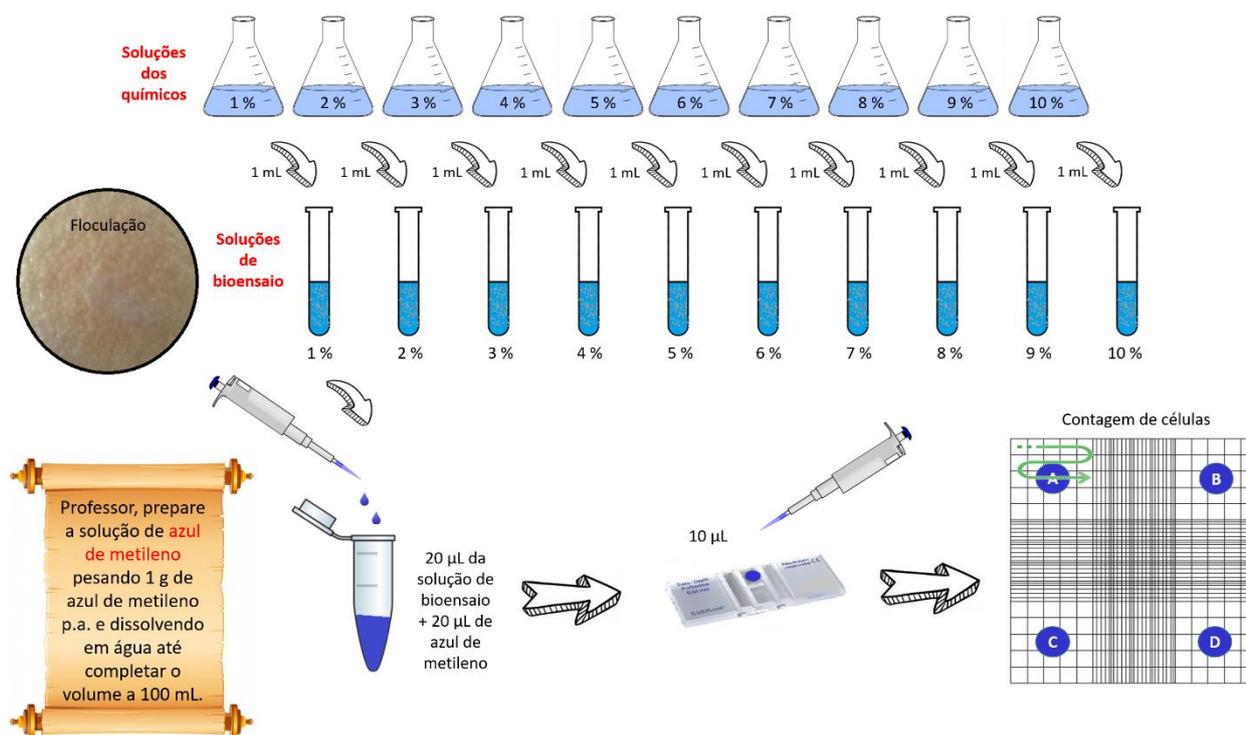


Figura 2: Preparo das soluções independentes dos químicos Etanol -  $C_2H_5OH$  (92,8 %) e Peróxido de Hidrogênio -  $H_2O_2$  (40 %), bem como preparo das soluções de bioensaio, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* exposta à ação dos químicos em diferentes concentrações. Aliquotas das soluções de bioensaio foram submetidas a coloração por azul de metileno para posterior contagem em hemocitômetro.

Após a coloração, 10  $\mu\text{L}$  de cada mistura foram aplicados em hemocitômetro (câmara de Neubauer), procedendo-se com a contagem do número de células mortas e células vivas em microscópio óptico trinocular (lente de 40X) Motic®. A contagem foi realizada nos quadrantes (A, B, C e D), seguindo-se a direção apontada na figura 2. As células presentes em cima das linhas internas dos quadrantes devem sempre ser consideradas e as presentes em cima das linhas externas não são contadas. Para calcular o número de células mortas e vivas por mL da solução de bioensaio foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes}} \times 2 \times 10^4$$

Sendo: 2 = fator de diluição;

$10^4$  = fator de correção do volume contado na câmara para 1 mL.

Os dados foram transformados em percentual de células mortas por mL da solução de bioensaio. Os percentuais de mortalidade foram avaliados por meio de regressão, sendo os modelos selecionados com base nos maiores coeficientes de determinação. Curvas incorporando os modelos foram obtidas utilizando-se o software Microsoft Excel®. As equações correspondentes às curvas de regressão foram utilizadas para calcular a DL50, ou seja, a dose letal do químico (nas condições avaliadas) capaz de provocar a mortalidade de 50% da população de levedura.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado aumento linear no percentual de mortalidade de *S. cerevisiae*, em decorrência do aumento gradativo das concentrações, independente dos químicos testados (Figura 3). Contudo, nas condições analisadas, observamos maior toxicidade pela exposição da levedura ao composto

$H_2O_2$  que ao álcool. Analisando as curvas, é possível observar que já na primeira concentração (1%), a taxa de mortalidade na presença de  $H_2O_2$  era superior à verificada na presença de etanol. Os valores de  $\beta$  (3.3944) para a equação da regressão correspondente à toxicidade de  $H_2O_2$ , no entanto, são menores, comprovando uma menor declividade dessa curva, quando comparada à declividade observada para a toxicidade do etanol (3.7917). Isso indica que embora a toxicidade de  $H_2O_2$  seja maior para *S. cerevisiae*, os danos provocados por este químico às células ocorreram mais lentamente.

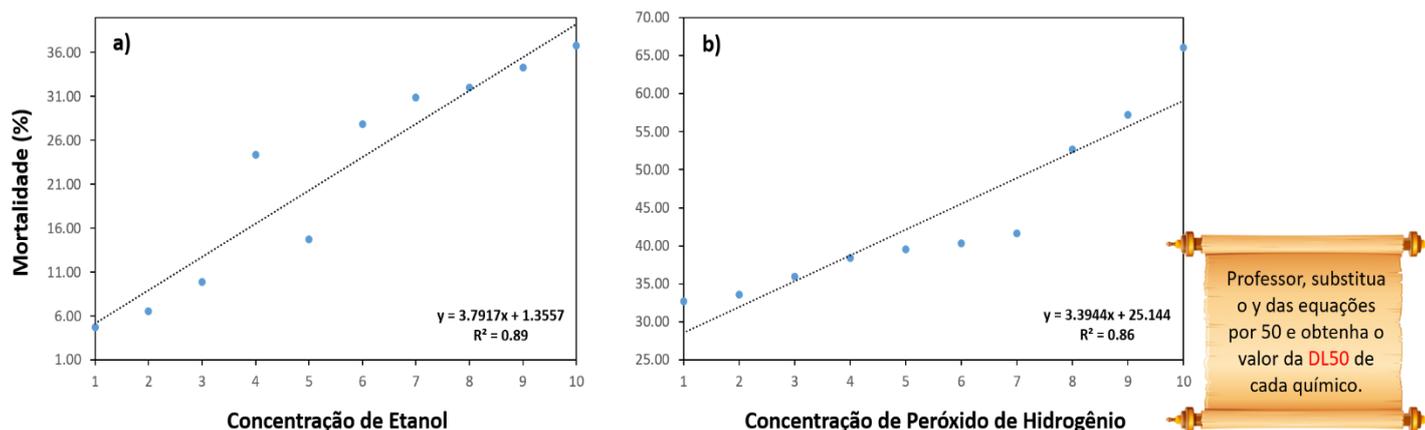


Figura 3: Percentual de mortalidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em função de diferentes concentrações de Etanol -  $C_2H_5OH$  (92.8 %) (a) e Peróxido de Hidrogênio -  $H_2O_2$  (40 %) (b).

A DL50 calculada para o etanol foi de 13 % enquanto para  $H_2O_2$ , ela ficou entre as concentrações 7 % e 8 %. Estes cálculos confirmam toxicidade superior de  $H_2O_2$  a *S. cerevisiae*.

Este protocolo só é possível porque o azul de metileno interage com as células de leveduras corando intensamente as células mortas que tornam-se perceptivelmente muito azuladas quando observadas na microscopia [23, 24]. Este corante, contudo, não afeta a viabilidade de células vivas das colônias, não interferindo assim, nos resultados de testes de toxicidade.

No processo de fermentação alcoólica induzido neste protocolo, é utilizado o açúcar do tipo sacarose. Este é o principal açúcar encontrado no mosto da fabricação de cachaça e o primeiro passo para sua utilização pela levedura *S. cerevisiae* é a hidrólise extracelular, através da enzima invertase [25]. Desta forma, obtém-se glicose e frutose, que são transportadas para o interior da célula, degradadas pela via glicolítica até piruvato e transformadas em etanol e gás carbônico. A fermentação alcoólica permite a obtenção de produtos de panificação, a produção em escala industrial de bebidas alcoólicas e a produção do combustível bioetanol. A levedura secreta etanol como um subproduto do seu metabolismo, contudo, o acúmulo de altas quantidades de etanol no mostro pode afetar o crescimento e a viabilidade da cultura por seu efeito tóxico sobre as células [26].

A toxicidade não apenas de grandes quantidades de etanol, mas de quaisquer substâncias tóxicas pode ser facilmente vista em culturas de *S. cerevisiae*, porque na presença de químicos estressantes, as células tendem a flocular, como observado nos tubos representados na figura 2. A expressão do fenótipo floculante em *S. cerevisiae* pode estar relacionada a uma diversidade de fatores, como choque frio, escassez de nutrientes, estresse osmótico e situações quimicamente estressantes, como a toxicidade do etanol [27]. Este fenômeno é considerado um mecanismo de defesa, onde a adesão célula-célula diminuiu a área superficial de contato das células com o agente estressor, visando autoproteção e sobrevivência [28, 29, 30]. Soares (2010) [31] considera a agregação de células de levedura em flocos, um exemplo de comportamento social (uma estratégia comunitária de sobrevivência a longo prazo ou um meio de proteção contra condições ambientais negativas). Na mesma linha, Lei et al. (2007) [32] demonstraram que uma população de células floculantes aumenta a tolerância ao etanol com o aumento do tamanho do floco em até 300  $\mu m$ .

Os genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11* codificam para a flocculina, uma família de proteínas da parede celular que produzem agregação reversível assexuada de células [33, 34]. Além da expressão destes genes, sob condições de estresse, alterações nas interações hidrofóbicas que ocorrem na parede celular podem aumentar a capacidade de agregação de leveduras, levando a uma mudança adaptativa [35]. A flocculação pode assim, tornar as células duas vezes mais resistentes ao etanol (10%) e cem vezes mais resistentes ao estresse oxidativo [36]. Desta forma, é importante que o professor chame a atenção dos seus alunos para o evento de flocculação que ocorrerá após você pipetar os químicos nos tubos de ensaio contendo as células leveduriformes. A observação crítica deste evento permitirá aos estudantes perceberem que respostas comportamentais podem ocorrer em populações de bioindicadores na presença de poluentes, podendo estas respostas serem distintas e avaliadas em organismos.

A toxicidade do etanol a células de *S. cerevisiae* está relacionada à inibição de enzimas metabolicamente importantes como hexoquinase e a álcool desidrogenase. Zech e Görisch (1995) [37] demonstraram que a invertase de *S. cerevisiae* sofre inativação de até 100% quando submetida a altas concentrações de álcool (acima de 8% v:v). Por outro lado, o etanol afeta os fosfolípidios das membranas se ligando no interior hidrofóbico, causando enrijecimento, e conseqüentemente, acarretando distúrbios dos sistemas de transporte [38], de forma que o índice de insaturação lipídica e a fluidez da membrana têm sido relacionados com tolerância casual de células de *S. cerevisiae* ao estresse por etanol [39]. Mas os efeitos do álcool sobre a membrana de leveduras podem diferir em função das cepas e de propriedades intrínsecas de cada linhagem. Quando a membrana é afetada, ela tem sua capacidade seletiva comprometida e passa a permitir a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons que reduzem o potencial de membrana. Tal descontrole celular acaba resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica [40, 41].

Resíduos de  $H_2O_2$  são naturalmente produzidos pelo metabolismo respiratório ou oxidação de ácidos graxos nas células de *S. cerevisiae*, contudo, esta ERO (espécie reativa de oxigênio) tem efeito antimicrobiano [42], devido à sua capacidade de danificar um grande número de constituintes celulares. As ERO produzem quebras na dupla fita do DNA, peroxidam lípidios e oxidam cadeias laterais de aminoácidos nas proteínas [43]. No geral, os danos produzidos pelo  $H_2O_2$  metabólico podem ser minimizados pela ação de enzimas anti-oxidantes como peroxidase, catalase e superóxido desmutase [44] e de açúcares como a trealose, que protege proteínas e ácidos graxos insaturados da oxidação [45], mas estas estratégias podem ser insuficientes quando concentrações exógenas de peróxido são administradas às células. Assim, foi verificada alta toxicidade de  $H_2O_2$  a *S. cerevisiae*, sendo esta superior à observada para o etanol.

Este trabalho desenvolveu um protocolo prático que pode ser facilmente aplicado por professores para trabalhar conceitos de toxicologia com estudantes do ensino médio. A base nacional comum curricular do ensino médio prevê no tópico Ciências da Natureza e suas Tecnologias, que os estudantes adquiram a habilidade de avaliar potenciais prejuízos de diferentes materiais e produtos à saúde e ao ambiente, considerando sua composição, toxicidade e reatividade, como também o nível de exposição a eles, posicionando-se criticamente e propondo soluções individuais e/ou coletivas para o uso adequado desses materiais e produtos [46]. Apesar disso, os protocolos atualmente disponíveis na literatura para se avaliar toxicidade ou potenciais bioindicadores são complexos e impraticáveis nas estruturas atualmente disponíveis em instituições de ensino brasileiras voltadas para o público do nível médio, inviabilizando a execução de aulas práticas [e.g., 47, 48, 49]. Além disso, a maioria dos laboratórios destas instituições, sobretudo das públicas, não dispõem dos aparatos legais de segurança que permitem ao professor seguramente trabalhar com substâncias contaminantes, sem expor seus alunos ao risco. Pereira e da Conceição (2019) [50] desenvolveram um estudo em laboratórios multidisciplinares de ciências da natureza em 26 escolas públicas localizadas no oeste do estado do Paraná e verificaram a presença de equipamentos de segurança, como extintores de incêndio em apenas um dos laboratórios, contudo, o prazo de validade do mesmo encontrava-se vencido. Desta forma, a utilização de álcool e peróxido de hidrogênio para induzir respostas de toxicidade em um organismo modelo de fácil acesso, como *S. cerevisiae*, pode prontamente auxiliar o professor na tarefa de ensinar conceitos básicos de toxicologia.

#### 4. CONCLUSÃO

Este protocolo, portanto, permite ao professor trabalhar conceitos básicos de toxicologia e demonstrar de forma prática que a toxicidade está intimamente relacionada à concentração do químico. A utilização de *S. cerevisiae* como bioindicador de toxicidade, neste protocolo experimentalmente simples, pode ser explorada por professores em bioensaios diversos, visando a testagem de novos produtos e produtos já encontrados no mercado, abrindo perspectivas para a avaliação de amostras biológicas, como extratos vegetais ou químicas como águas residuais, agrotóxicos e outros.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal Goiano, pela disponibilização de estrutura e discentes que contribuíram para a realização deste trabalho.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patnaik P. Handbook of Environmental Analysis. Chemical pollutants in air, water, soil, and solid wastes. Boca Raton (US): CRC Press Inc; 1997.
2. Ghosh P, Thakur IS, Kaushik A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotox Environ Safe*. 2017 Jul;141:259-70, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.023.
3. Wilke BM, Rieper F, Koch C, Kühne T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotox Environ Safe*. 2008 Jun;70(2):283-93, doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.003.
4. Lee J, Hong S, Kim T, Lee C, An S-A, Kwon B-O, Lee S, Moon H-B, Giesy JP, Khim JS. Multiple bioassays and targeted and nontargeted analyses to characterize potential toxicological effects associated with sediments of Masan Bay: Focusing on AhR-mediated potency. *Environ Sci Technol*. 2020 Mar;54(7):4443-54, doi: 10.1021/acs.est.9b07390.
5. Hernando MD, De Vettori S, Martínez Bueno MJ, Fernández-Alba AR. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*. 2007 Jun;68(4):724-30, doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.097.
6. Thomas DJL, Tyrrel SF, Smith R, Farrow S. Bioassays for the evaluation of landfill leachate toxicity. *J Toxicol Env Heal B*. 2009 Dec;12(1):83-105, doi: 10.1080/10937400802545292.
7. Libralato G. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Mar Environ Res*. 2014 Oct;101:38-43, doi: 10.1016/j.marenvres.2014.08.002.
8. Defu H, Ruirui C, Enhui Z, Na C, Bo Y, Huahong S, Minsheng H. Toxicity bioassays for water from black-odor rivers in Wenzhou, China. *Environ Sci Pollut R*. 2014 Jan;22(3):1731-41, doi: 10.1007/s11356-013-2484-1.
9. Gatidou G, Stasinakis AS, Iatrou EI. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere*. 2015 Jan;119:S69-S74, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.030.
10. Zhou Y, Wang F, Wan J, He J, Li Q, Chen Q, Gao J, Lin Y, Zhang S. Ecotoxicological bioassays of sediment leachates in a river bed flanked by decommissioned pesticide plants in Nantong City, East China. *Environ Sci Pollut Res*. 2017 Feb;24(9):8541-50, doi: 10.1007/s11356-016-8307-4.
11. Aronzon CM, Peluso J, Coll CP. Mixture toxicity of copper and nonylphenol on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Environ Sci Pollut Res*. 2020 Feb;27:13985-94, doi: 10.1007/s11356-020-07857-7.
12. Esteve K, Poupot C, Dabert P, Mieton M, Milisic V. A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009 Oct;36:1529-34, doi: 10.1007/s10295-009-0649-1.
13. Gomes LH, Duarte KMR, Kamogawa MY, Ferrarezi JA, Andrino FG, Tavares ACL, Silva APM, Laguna SE, Lira SP. YTOX: a rapid toxicity test based on the dehydrogenase activity of *Saccharomyces cerevisiae* for detection of contaminants in water samples. *J Microbiol Meth*. 2019 Jun;161:43-6, doi: 10.1016/j.mimet.2019.04.008.
14. Rumlova L, Dolezalova J. A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. *Environ. Toxicol Pharmacol*. 2012 May;33(3):459-64, doi: 10.1016/j.etap.2012.01.008.

15. Dolezalova J, Rumlova L. A new biological test of water toxicity–yeast *Saccharomyces cerevisiae* conductometric test. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2014 Nov;38(3):977-81, doi: 10.1016/j.etap.2014.10.009.
16. Vyatchina OF, Zhdanova OG, Beizhen Xie, Ponomareva AL, Stom DI, Fialkow VA, Kupchinsky AB, Saksonov MN. The applying of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for rapid estimation of surface-active substances' toxicity. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* 2019;272(3):032208, doi: 10.1088/1755-1315/272/3/032208.
17. Hagler AN. Yeasts as indicators of environmental quality. In: Péter G, Rosa C, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.* Heidelberg (Berlin): Springer; 2006. p. 515-532, doi: 10.1007/3-540-30985-3\_21.
18. Nweke CO. Effects of metals on dehydrogenase activity and glucose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Nigerian J Biochem Mol Biol.* 2010 25(2):28-35.
19. Dai J, Song Y, Lau CS. Introduction to special issue: Environmental toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2020 Jun;33(6):1279-80, doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00203.
20. Landis WG, Sofield RM, Yu MH. *Introduction to environmental toxicology: Molecular structures to ecological landscapes.* 4th ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.
21. Kovacs DG, Rediske RR, Marty S, Spencer PJ, Wilson D, Landenberger B. Contemporary concepts in toxicology: a novel multi-instructor general education course to enhance green chemistry and biomedical curricula. *Green Chem Lett Rev.* 2018 Jul;12(2):136-46, doi: 10.1080/17518253.2019.1609600.
22. Cannon AS, Finster D, Raynie D, Warner JC. Models for integrating toxicology concepts into chemistry courses and programs. *Green Chem Lett Rev.* 2017 Oct;10(4):436-43, doi: 10.1080/17518253.2017.1391880.
23. Kucsera J, Yarita K, Takeo K. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J Microbiol Methods.* 2000 Jun;41(1):19-21, doi: 10.1016/S0167-7012(00)00136-6.
24. Freitas RB, Silva VNH, Maia VT, Santos OB, Calvette YMA, Fiaux SB. Low-cost device to measure concentration of *Saccharomyces cerevisiae* through methylene blue reduction. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2020 May;69(5):2232-38, doi: 10.1109/TIM.2019.2923486
25. Bhalla TC, Bansuli, Thakur N, Savitri, Thakur N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. *LWT - Food Sci Technol.* 2017 Apr;77:178-85, doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.034.
26. Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 2010 Jun;109:13-24, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.
27. Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007 Sep;31(5):535-69, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x.
28. Moreno-García J, García-Martínez T, Moreno J, Mauricio JC, Ogawa M, Luong P, Bisson LF. Impact of yeast flocculation and biofilm formation on yeast-fungus coadhesion in a novel immobilization system. *Am J Enol Vitic.* 2018 Apr;69(3):278-88, doi: 10.5344/ajev.2018.17067.
29. Rossouw D, Bagheri B, Setati ME, Bauer FF. Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. *PloS One.* 2015 Aug;10(8):e0136249, doi: 10.1371/journal.pone.0136249.
30. Cheng C, Zhang M, Xue C, Bai F, Zhao X. Development of stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by metabolic engineering: New aspects from cell flocculation and zinc supplementation. *J Biosci Bioeng.* 2017 Feb;123(2):141-46, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.07.021.
31. Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J Appl Microbiol.* 2010 Nov;110(1):1-18, doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x.
32. Lei J, Zhao X, Ge X, Bai F. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast flocc populations with different size distribution. *J Biotechnol.* 2007 Sep;131(3):270-5, doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.937.
33. Vergara-Álvarez I, Quiroz-Figueroa F, Tamayo-Ordóñez MC, Oliva-Hernández AA, Larralde-Corona CP, Narváez-Zapata JA. Flocculation and expression of FLO genes of a *Saccharomyces cerevisiae* mezcalt strain with high stress tolerance. *Food Technol Biotechnol.* 2019 Dec;57(4):544-53, doi: 10.17113/ftb.57.04.19.6063.
34. Di Gianvito P, Tesnière C, Suzzi G, Blondin B, Tofalo R. FLO5 gene controls flocculation phenotype and adhesive properties in a *Saccharomyces cerevisiae* sparkling wine strain. *Sci Rep.* 2017 Sep;7(1):1-12, doi: 10.1038/s41598-017-09990-9.
35. Lopes ML, Paulillo SCL, Cherubin RA, Godoy A, Neto HBA, Amorim HV. *Linhagens de leveduras personalizadas® para produção de etanol: seleção dirigida pelo processo.* Piracicaba (SP): Fermentec Tecnologias em Açúcar e Álcool Ltda; 2015.

36. Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vences MD, Jansen A, Prevost MC, Latgé J-P, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*. 2008 Nov;135(4):726-37, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.037.
37. Zech M, Görisch H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible activation by components of industrial molasses media. *Enzyme Microb Tech*. 1995 Jan;17(1):41-6, doi: 10.1016/0141-0229(94)00047-U.
38. Loureiro-Dias MC, Peinado JM. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*. 1982 Nov;4(11):721-4, doi: 10.1007/BF00134666.
39. Ishmayana S, Kennedy UJ, Learmonth RP. Further investigation of relationships between membrane fluidity and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microb Biot*. 2017 Nov;33(12):218, doi: 10.1007/s11274-017-2380-9.
40. Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM. High-growth brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production. *Appl Environ Microbiol*. 1984 Sep;48(3):639-46.
41. Dombek KM, Ingram LO. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 1986 Nov;52(5):975-81.
42. Zhu G, Wang Q, Lu S, Niu Y. Hydrogen peroxide: a potential wound therapeutic target. *Med Princ Pract*. 2017 Aug;26(4):301-08, doi: 10.1159/000475501.
43. Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DWS. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*. 1994 Dec;140(12):3277-83, doi: 10.1099/13500872-140-12-3277.
44. Nishimoto T, Watanabe T, Furuta M, Kataoka M, Kishida M. Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol Sci*. 2016 Jan;21(3):179-82, doi: 10.4265/bio.21.179.
45. Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio ECA. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Mar;1760(3):340-6, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.01.010.
46. Brasil. Ministério da Educação. Base Nacional Comum Curricular. Brasília (DF): Fundação Carlos Alberto Vanzolini; 2018. Disponível em: [http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC\\_EI\\_EF\\_110518\\_-versaofinal\\_site.pdf](http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC_EI_EF_110518_-versaofinal_site.pdf)
47. Scanlan LD, Lund SP, Coskun SH, Hanna SK, Johnson ME, Sims CM, Brignoni K, Lapasset P, Petersen EJ, Elliott JT, Nelson BC. Counting *Caenorhabditis elegans*: protocol optimization and applications for population growth and toxicity studies in liquid medium. *Sci. Rep*. 2018 Jan;8(1):904, doi: 10.1038/s41598-018-19187-3.
48. Mitchelmore CL, Griffitt RJ, Coelho GM, Wetzel DL. Modernizing protocols for aquatic toxicity testing of oil and dispersant. In: Murawski S, Ainsworth C, Gilbert S, Hollander D, Paris C, Schlüter M, Wetzel D, editors. Scenarios and responses to future deep oil spills. Cham (Switzerland): Springer; 2020. p. 239-252. doi: 10.1007/978-3-030-12963-7\_14.
49. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, et al. In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018 Apr;96:1-17, doi: 10.1016/j.yrtph.2018.04.014.
50. Pereira AS, da Conceição NCP. Um estudo sobre laboratórios multidisciplinares de ciências da natureza em escolas públicas da região Oeste do Pará. *Rev Exitus*. 2019 Nov;9(5):331-360, doi: 10.24065/2237-9460.2019v9n5ID1110.