

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA**



CARINE CAROLINA WIESIOLEK

**Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae*
submetida a campo eletromagnético estático**

RECIFE

2007

CARINE CAROLINA WIESIOLEK

**Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae*
submetida a campo eletromagnético estático**

Dissertação apresentada para conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Mauricy Motta

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Glícia Calazans

RECIFE

2007

Wiesiolek , Carine Carolina.

Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae* submetida a campo eletromagnético estático / Carine Carolina Wiesiolek – Recife: O Autor, 2007.

91 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biotecnologia 2. Campos magnéticos estáticos - *Saccharomyces cerevisiae* 3. Alterações fisiológicas - levedura I. Título.

663.12 CDU (2.ed.)

UFPE

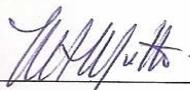
663.13 CDD (22.ed.)

CCB – 2008- 003

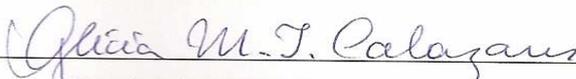
CARINE CAROLINA WIESIOLEK

**Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae*
submetida a campo eletromagnético estático**

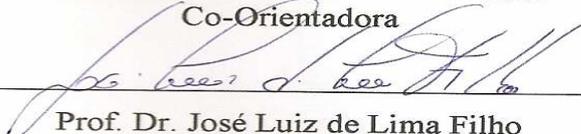
Dissertação apresentada para conclusão
do curso de Mestrado em Ciências
Biológicas - Fisiologia, Departamento de
Fisiologia e Farmacologia, Universidade
Federal de Pernambuco.



Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta
Universidade Federal de Pernambuco
Orientador



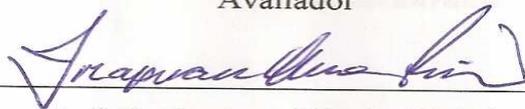
Prof. Drª Glícia Maria Torres Calazans
Universidade Federal de Pernambuco
Co-Orientadora



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco
Avaliador



Prof. Dr. Carlos Edison Lopes
Universidade Federal de Pernambuco
Avaliador



Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro
Universidade de Pernambuco
Avaliador

Com muito amor à minha família: minha mãe, meu pai, minhas irmãs Carla e Camila e, em especial, à Lúcia Figueiroa e Marcelo Figueiroa pelo constante incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mauricy Motta pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos científicos e pela grande oportunidade de aprendizado que me foi concedida.

À Profª Drª. Glícia Calazans, pessoa fundamental na execução deste trabalho, que me concedeu tempinhos preciosos em sua agenda e abriu as portas do seu laboratório e do seu coração para que esse trabalho pudesse ter sido realizado com tanto esforço e companheirismo.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Biofísica da UFPE, em especial Márcio Pires e seu Fredson.

Aos colegas do laboratório LPF-3 e a Salatiel do Departamento de Antibióticos - UFPE pelos esclarecimentos e auxílios constantes durante a realização do trabalho.

À André e aos professores Alexandre Schuller e Maurício Motta do Departamento de Engenharia Química, UFPE.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Biomédica, Professor Milton, Sandra, Márcio e Diogo pela cooperação, pois de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimento especial a minha amiga-irmã Carol, que agüentou poucas e boas com sua amizade incansável, ouvidos atentos e todo carinho e atenção em cada momento de alegria e desespero.

Meus agradecimentos, também, para os queridos professores e amigos do Departamento de Fisioterapia da UFPE, em especial Prof. Dr. Carlos Lucena e Prof. Dr. Eduardo Montenegro pelo companheirismo, amizade, ajuda e incentivo desde o início do curso de Mestrado.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a influência de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, na fisiologia da levedura *S. cerevisiae* crescendo em meio sintético a base de glicose. As fermentações foram conduzidas segundo duas condições: em biorreatores submetidos a campo magnético (com magnetos cilíndricos, constituídos da liga metálica NdFeB (Neodímio-Ferro-Boro) com ½ pol de diâmetro e ¼ pol de espessura (modelo 27DNE3208 Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc. USA)) e em biorreatores sem magnetos. Foi aplicado campo magnético estático, não homogêneo de intensidade 220 mT. A levedura foi cedida da coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, classificada como UFPEDA – 1012, em meio contendo extrato de levedura e glicose e durante 24 horas de fermentação. Foram monitoradas a pureza microbiológica do cultivo e realizadas amostragens para avaliação do crescimento por medida do peso seco e por contagem de células viáveis (UFC/mL). A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi avaliada e realizadas análises de imagem, aferições dos valores de pH, determinação da concentração de etanol através de cromatografia a gás e dosagem de glicose por método enzimático. As amostras submetidas ao campo magnético obtiveram aumento na produção de biomassa a partir das 12 horas de fermentação, quando comparadas às amostras controle. Este aumento foi de até 181% em relação à amostra não magnetizada, evidenciando que o campo magnético estimula a produção de biomassa em leveduras, bem como o aumento no número de células viáveis com aumento de até quatro vezes o valor em relação à amostra controle. A análise da velocidade específica de crescimento confirmou os achados anteriores de que a curva de crescimento das amostras controle encontraram-se em fase estacionária, ao passo que a amostra magnetizada apresenta prolongamento da fase exponencial de crescimento. Esse fato pode ser interpretado como um efeito do campo magnético na aceleração do metabolismo celular e ser um instrumento de uso biotecnológico na otimização da produção de biomassa. A forma de magnetização teve influência marcante nos resultados das variáveis estudadas, mostrando que o campo magnético aplicado em *S. cerevisiae*, estimulou a proliferação e a biomassa, com grande potencial de aplicação na biotecnologia.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, fisiologia, campo magnético estático.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the influence of static non-homogeneous magnetic fields on the physiology of the yeast *S. cerevisiae* growing in culture media containing glucose. The fermentations were driven into biorreactors with magnetic rods produced with NdFeB (Neodymium-iron-boron) alloy, of 0.5" diameter and 0.25" thickness (model 27DNE3208 Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc.USA) attached and into biorreatores without magnets. The applied static magnetic field no homogeneous had a field intensity of 220 mT. The yeast was obtained of the collection from the Departamento de Antibióticos of the Universidade Federal de Pernambuco, classified as UFPEDA-1012. The fermentations were accomplished in media containing yeast extract and glucose (5%) and for 24 hours of fermentation the microbiological conditions of the cultivation were monitored and sampling from the culture for the biomass growth evaluation, the dry weight measuring and the viable cell count (UFC / mL). The values of specific speed of cell growth (μ x) were calculated and were done image analyses, pH value measurements, determination of the ethanol concentration through gas chromatography, glucose level dosage by enzymatic method. The samples submitted to magnetic field showed increased biomass production, starting at 12 h of culture, when compared to the samples control. This increase was observed up to 181% in relation to the sample non-magnetized ones, evidencing that the magnetic field stimulates the biomass production in yeasts, as well as the increase in the number of viable cells, which increased of up to 4 times the value of the control samples. The analysis of the cell growth speed confirmed the previous discoveries with a control samples growth curve that showed a stationary phase whereas the experimental sample presented a prolongation of the exponential growth phase. This fact can be interpreted as an effect of the magnetic field on the acceleration of the cellular metabolism and could be used as a biotechnological technique in the enhancement and optimization of the biomass production. The magnetization produced outstanding influences on the results of the variables studied, showing that the applied magnetic field in *S. cerevisiae*, stimulated the proliferation and the biomass.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, physiology, static magnetic field.

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Componentes do meio de manutenção Sabouraud Dextrose Agar	35
Tabela 2	Componentes do meio de glicose para Fermentação Alcoólica	36
Tabela 3	Resultado da variação de biomassa às 12 horas de fermentação	74
Tabela 4	Resultado da variação de biomassa às 16 horas de fermentação	74
Tabela 5	Resultado da variação de biomassa às 20 horas de fermentação	75
Tabela 6	Resultado da variação de biomassa às 24 horas de fermentação	75
Tabela 7	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 1.	50
Tabela 8	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 2.	51
Tabela 9	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 3.	52
Tabela 10	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 4.	53
Tabela 11	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 5.	54
Tabela 12	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 6.	55
Tabela 13	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 7.	56
Tabela 14	Resultado de biomassa, biomassa produzida e velocidade de crescimento celular da Fermentação 8.	57
Tabela 15	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 1.	63
Tabela 16	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 2.	64
Tabela 17	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da	64

	Fermentação 3.	
Tabela 18	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 4.	65
Tabela 19	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 5.	65
Tabela 20	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 6.	66
Tabela 21	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 7.	66
Tabela 22	Resultado das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo da Fermentação 8.	67
Tabela 23	Resultado da produção de etanol, do consumo de glicose e rendimento bioquímico para as fermentações realizadas.	69
Tabela 25	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 1.	76
Tabela 26	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 2.	76
Tabela 27	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 3.	77
Tabela 28	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 4.	77
Tabela 29	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 5.	78
Tabela 30	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 6.	78
Tabela 31	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 7.	79
Tabela 32	Resultados da variação de biomassa durante Fermentação 8.	79
Tabela 33	Resultados da variação de pH na Fermentação 1.	80
Tabela 34	Resultados da variação de pH na Fermentação 2.	80
Tabela 35	Resultados da variação de pH na Fermentação 3.	81
Tabela 36	Resultados da variação de pH na Fermentação 4.	81
Tabela 37	Resultados da variação de pH na Fermentação 5.	82
Tabela 38	Resultados da variação de pH na Fermentação 6.	82
Tabela 39	Resultados da variação de pH na Fermentação 7.	83
Tabela 40	Resultados da variação de pH na Fermentação 8.	83
Tabela 41	Valores de “a” da equação da reta das curvas de velocidade das fermentações realizadas.	84
Tabela 42	Resultados da produção de etanol para cada fermentação realizada.	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP: Adenosina Trifosfato

CM : Campo magnético

CME: Campo magnético estático

CO₂ : Dióxido de carbono

DNA: Ácido desoxirribonucléico

G0: Estágio de mitose celular em que não ocorre divisão celular

Hz: Hertz, ciclos por segundo (unidade de frequência)

mT: miliTesla (unidade de campo magnético no Sistema Internacional de unidades)

MRI : Imagem por ressonância magnética

NAD: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo com próton

NdFeB: Neodímio-Ferro-Boro (liga que compõe os magnetos utilizados neste trabalho)

pH: Potencial hidrogeniônico (concentração de íons H⁺)

UFC: Unidades formadoras de colônias

μ_x : Velocidade específica de crescimento

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ii
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
OBJETIVOS	34
Geral	34
Específicos	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
Experimentos em biorreatores	35
Experimentos Controle	36
Campo Magnético	36
Magnetos	36
Microorganismo	37
Meios de cultura	37
Meios de pré-fermentação e fermentação	38
Manutenção de Microorganismo	38
Preparo do inoculo	39
Coleta das amostras	39
Exposição ao campo	39
Análise do acompanhamento da Fermentação	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
Variação do peso seco	43
Efeito do pH	47
Variação do crescimento de biomassa	47
Biomassa medida, biomassa produzida e velocidade de crescimento	49
Contagem das Unidades Formadoras de Colônias	63
Produção de etanol, consumo de glicose e rendimento bioquímico	68
Análise da imagem	69

CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
Apêndice	

1 INTRODUÇÃO

Os campos eletromagnéticos produzidos pelo homem têm se tornado uma parte crescente do nosso biosistema. Eles se propagam em toda a Terra, para servir ao homem, em seu benefício. Porém os organismos vivos têm de se adaptar a esse novo fator, pois eles podem influenciar algumas de suas funções biológicas. Grande quantidade de artigos científicos tem sido publicada nos últimos anos, sobre estas influências. Primeiramente eles estavam focados na epidemiologia e na questão do aumento no risco de câncer em pessoas trabalhando ou morando próximas às linhas de força. Os resultados se mostraram controversos e na última década os efeitos dos campos magnéticos em objetos biológicos menores começaram a ser investigados (FOJT *et al.*, 2004).

O estudo da fisiologia celular é um instrumento de revelação dos mecanismos moleculares e celulares compreendidos entre os possíveis efeitos biológicos e as implicações na saúde, de radiações não-ionizantes, como os campos magnéticos (LUCERI *et al.*, 2005).

A estimulação ou inibição de processos celulares por campos eletromagnéticos é de interesse considerável na biologia celular e na biotecnologia, não só por estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também por suas aplicações potenciais práticas. Diferentes alvos incluindo proliferação celular, reações enzimáticas, síntese de biopolímeros e transporte de membrana têm sido investigados com respeito às alterações induzidas por energia eletromagnética (LEI e BERG, 1998).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um excelente modelo eucariótico para ser usado na avaliação dos efeitos dos campos eletromagnéticos no crescimento celular devido às suas características morfológicas, metabólicas e genéticas bem definidas e à sua conservada similaridade com mecanismos moleculares associados aos processos básicos, ao longo das diferentes espécies eucarióticas, incluindo as células humanas. Além da semelhança com as células de mamíferos, esta levedura possui a vantagem de ter um tamanho maior, em contraste com as bactérias, o que facilita também o estudo da sua morfologia (BOTSTEIN e FINK, 1988; HADJILOUCAS, CHAHAL e BOWEN, 2002).

A *S. cerevisiae* é, no Brasil, o microrganismo de preferência na agroindústria para converter açúcar em etanol. Esta levedura tem se tornado um modelo útil e informativo na investigação da bioquímica e da biologia molecular de reparo de DNA e regulação do ciclo celular em eucariontes, visto que há considerável informação disponível da função gênica e de seu sistema de regulação (ZALDIVAR *et al.*, 2005).

As leveduras são capazes de sobreviver em flutuações ambientais intensas por adaptarem rapidamente sua maquinaria bioquímica interna, ao encontrarem variações ambientais. Um aspecto desta adaptação é a marcada capacidade de ajuste da expressão gênica às necessidades ambientais requeridas para seu crescimento (LUCERI *et al.*, 2005).

O mecanismo de interação entre a biologia e os campos elétricos e magnéticos tem sido um tema dominante, de uma maneira ou outra, na história da Biofísica e da Fisiologia desde o início do conhecimento destes campos. Pesquisas nesta área revelam mudanças morfológicas e bioquímicas importantes provocadas por esses campos, apontando esses como uma nova ferramenta fundamental para as pesquisas no futuro da biociência (FOSTER, 2003; MEHEDINTU e BERG, 1997).

Atualmente, a aplicação de campos magnéticos para melhorar o processo fermentativo constitui uma importante estratégia inovadora, que poderá se tornar uma alternativa viável no aumento da eficiência desse processo (MUNIZ, 2002).

Devido à importância sócio-econômica da produção biológica de etanol no Brasil e no mundo, tendo em vista a utilização deste produto na indústria de alimentos e como fonte de combustível com menor impacto ambiental, estudos visando à obtenção de melhores procedimentos tecnológicos no processo fermentativo tornam-se de fundamental importância (MARQUES e SERRA, 2004).

Nos últimos anos, pesquisas na melhoria da produção de etanol têm sido aceleradas por razões ecológicas e econômicas, principalmente como carburante alternativo em substituição aos combustíveis fósseis baseados no petróleo. O etanol pode ser produzido por duas vias: a petroquímica, a partir da hidratação de etileno e a biotecnológica, a partir da fermentação de biomassa. O Brasil, como um país tropical e com tradição na produção do etanol, tem muito potencial na oferta de energia através de sua indústria sucro-alcooleira. Produtos derivados da cana-de-açúcar são hoje a maior fonte, economicamente importante, da agroindústria nordestina. Não só álcool carburante, mas também de biomassa para co-geração de energia, bem como uma reserva de energia renovável e, ainda, como insumo da indústria química. Impulsionado pela criação do PROÁLCOOL em 14/11/1975, o país tem se tornado nos últimos anos, o maior produtor de etanol via fermentação de derivados da cana-de-açúcar, desenvolvendo e melhorando muitos processos fermentativos usados anteriormente (ALFENORE *et al.*, 2004; GOLDEMBERG *et al.*, 2004).

O bioetanol, etanol originado de biomassa, é uma fonte de energia atrativa e sustentável para utilização como combustível e de importância sócio-econômica maior para o Brasil. Ele tem sido apontado como a solução para uma variedade de problemas complexos relacionados à energia e ao meio ambiente. Comparado aos combustíveis fósseis, o etanol possui a vantagem de ser renovável, produzir queimação limpa, produzindo menor teor de gases que contribuem para o efeito estufa. Deste modo, com a implantação das leis de proteção ambiental em muitos países, a demanda para este combustível está aumentando (ALTINTAS *et al.*, 2002; RIVERA *et al.*, 2006).

O Brasil produz cerca de 15 bilhões de litros por ano, produzidos por mais de trezentas destilarias concentradas nas regiões sudeste e nordeste, sendo a região nordeste, uma das regiões produtoras mundiais de maior importância (WHEALS *et al.*, 1999).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DOS CAMPOS MAGNÉTICOS

Os estudos relacionados ao magnetismo se iniciaram com a descoberta de minérios de ferro que possuíam a propriedade de atrair outros metais não magnetizados. Entre esses metais encontravam-se o ferro, o cobalto e o níquel. Esses fragmentos de minério de ferro foram descobertos na cidade de Magnésia, na Ásia Menor, e por este motivo foram chamados magnetos (KRAUS e CARVER, 1986).

Os pólos magnéticos foram descobertos por volta de 1260, quando um monge chamado Pedro Pelegrino apresentou um magneto de hematita. Ele descobriu que certas regiões deste material atraíam outros metais com maior intensidade que outras e essas regiões foram chamadas de pólos magnéticos. Ao tentar separar essas regiões, Pedro Pelegrino descobriu que era impossível separar pólos magnéticos. Em vez disso, eram criados novos magnetos menores, cada um destes contendo pólos opostos. Os pólos foram chamados de pólo norte e pólo sul, pois quando pendurado por um fio, os mesmos se alinhavam com as direções norte e sul da Terra. Sabe-se que o campo magnético é formado pelo deslocamento de uma carga elétrica, ou seja, ao se deslocar, a carga elétrica gera no espaço ao seu redor, em um plano defasado de 90 graus, uma força magnética que atrairá ou afastará – dependendo da sua polaridade – qualquer outra carga que interaja com ela (QUEVEDO, 1977).

Atualmente, os campos eletromagnéticos estão se tornando cada vez mais importantes, pelo fato de que existe um crescente aumento do número de equipamentos elétricos e eletrônicos que utilizam radiações eletromagnéticas, as quais estão cada vez mais presentes em nosso meio. Também nos diversos tipos de terapia onde o campo magnético é utilizado, tal como o uso de campos magnéticos pulsáteis na promoção do reparo de fraturas ósseas, no tratamento da inflamação, além do uso de aparelhos que geram campo magnético estático sobre a pele para o tratamento da dor (BLANK 1995; MALMIVUO e PLONSEY, 1995; McLEAN, ENGSTROM e HOLCOMB, 2001; PEIXOTO, 2001). Além disso, é largamente utilizado no diagnóstico por Imagem de ressonância Magnética, o qual chega a produzir campos de 7 Tesla, que atuam nos pacientes durante 30 minutos, em média (MIYAKOSHI, 2006).

A caracterização do campo magnético efetivo e dos mecanismos de interação com substratos biológicos encontra-se incompleta. A dependência do tempo do efeito, no entanto, sugere lentas mudanças na conformação dos canais iônicos ou enzimas, como por exemplo, fosforilação ou desfosforilação de canais de sódio. Estudos apontam para o fato de que campos magnéticos estáticos geram mudança na conformação de proteínas transmembrana e proteínas solúveis para produzir efeitos biológicos significantes (McLEAN, ENGSTROM e HOLCOMB, 2001).

Dependendo da forma de magnetização de um material, o mesmo pode ser classificado como diamagnético que sofre fraca influência dos campos magnéticos; paramagnéticos, que sofrem uma magnetização no mesmo sentido do campo aplicado, porém ainda assim é uma magnetização fraca; e os ferromagnéticos, que possuem uma magnetização forte e duradoura no sentido do campo magnético aplicado (LIN, 1994).

2.2 EXPOSIÇÃO AO CAMPO MAGNÉTICO

Em países desenvolvidos, a exposição a vários tipos de campos eletromagnéticos é comumente encontrada. Campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa, gerados de linhas de força, campos eletromagnéticos de alta frequência através de telefones celulares e computadores e campo magnético estático pela imagem de ressonância magnética são as fontes familiares mais comuns de exposição (IKEHATA *et al.*, 1999).

Vários estudos experimentais realizados nos últimos 30-40 anos têm examinado os efeitos da exposição aguda e crônica em animais de laboratório a campos magnéticos estáticos

e poucos efeitos adversos têm sido identificados. No entanto, com o desenvolvimento de eletromagnetos no século XIX e de magnetos supercondutores no século XX, tornou-se possível a exposição de seres humanos a intensos campos magnéticos (SAUNDERS, 2005).

A interação de campo magnético estático com organismos vivos é um campo de investigação de crescimento rápido. Uma das razões extremamente importantes para se aprofundar os estudos sobre o verdadeiro modo de ação dos campos magnéticos (CM) em organismos vivos é a necessidade de proteger a saúde do homem. Isto, devido à provável introdução, no futuro, de novas tecnologias como trens com levitação magnética e o uso terapêutico dos CMs como uso da imagem de ressonância magnética e a exposição ao CM como agente quimioterápico (DINI e ABRRO, 2005).

Os campos magnéticos estáticos podem ser classificados como fraco (menor que 1mT), moderado (1 mT a 1 T), forte (1 a 5 T) e ultra-forte (maior que 5 T). Um remarcado fenômeno de campo magnético estático fraco é o campo magnético da Terra que desencadeia resposta em muitos organismos, especialmente para orientação espacial e navegação (DINI e ABRRO, 2005).

A ação dos campos magnéticos estáticos (CME) nos sistemas biológicos é ligada à propriedade da estrutura molecular da membrana (isto é, anisotropia diamagnética) que tem o potencial para ser influenciado por estes campos. Muitos componentes inorgânicos e aproximadamente todos os componentes orgânicos têm algum grau de diamagnetismo. Um mecanismo geral para a ação de intensidade moderada do CME nos sistemas biológicos pode ser explicado através de seu efeito na estrutura molecular das membranas excitáveis; um efeito suficiente para modificar a função dos canais iônicos específicos encontrados nessas membranas. Um CME de moderada intensidade pode afetar a rotação das moléculas de fosfolípidos da membrana em consequência da sua propriedade diamagnética coletiva, o que de fato, explica virtualmente, os bioefeitos atribuídos a este campo (DINI e ABRRO, 2005).

Além disso, os CMEs podem alterar a orientação do *spin* de elétrons e de prótons e consequentemente, o seu nível de energia, podendo exercer forças nas moléculas biológicas, dependendo de sua susceptibilidade anisotrópica magnética (IKEHATA *et al.*, 1999).

Os organismos são capazes de responder a uma larga variedade de estímulos ambientais e estresses (incluindo os campos magnéticos), promovendo mudanças intra e extracelulares que podem ser classificadas como irreversíveis, reversíveis e resultarem em mudanças de células e de suas organelas. As modificações celulares e moleculares induzidas quando os campos

magnéticos interagem com materiais biológicos são, no entanto, dependentes da duração da exposição, da penetração no tecido e geração de aquecimento, os quais por sua vez, estão relacionados à sua intensidade e frequência do estímulo. Em adição, respostas celulares dependem não somente da intensidade e frequência do campo, mas também do tipo de campo (estático ou oscilatório), na forma da onda (sinusoidal, quadrada, etc), na condição biológica e no tipo da célula exposta (DINI e ABRRO, 2005; SAFFER e PHILLIPS, 1996).

Em ambos os lados de cada membrana celular existem íons livres (principalmente K, Na, Cl, Ca) que: controlam o volume celular causando forças osmóticas que são responsáveis pela entrada e saída de água; têm um importante papel em diferentes processos celulares metabólicos, como o processo de transdução de sinal e criam um forte campo elétrico (em torno de 10^7 V/m) que existe entre ambos lados de todas as membranas celulares. Este campo não envolve somente a membrana plasmática que circunda toda a célula, mas envolve também as membranas celulares internas, como as membranas das mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático ou complexo de Golgi (PANAGAPOULOS *et al.*, 2000).

O fluxo iônico através das membranas celulares é causado por forças devido à concentração e gradientes de voltagem entre os dois lados da membrana. Em condições de equilíbrio, o conjunto de fluxo iônico através da membrana é zero, com o lado interno negativo em relação ao externo, o que é chamado de potencial elétrico de membrana. A diferença de potencial elétrico total através da membrana pode ser a soma das contribuições de todos os íons existentes, restando um balanço final entre forças osmóticas e elétricas. Um campo elétrico externo pode exercer forças sobre estes íons, com dois possíveis resultados: a) polarização de magnitude e de direção constantes na célula se o campo for estático ou b) vibração forçada sobre os íons livres, se o campo for oscilante (PANAGAPOULOS *et al.*, 2000).

De acordo com Tenforde, 1985, o efeito do CME pode ser explicado por seguintes hipóteses: 1) Os CMEs exercem forças (chamadas de forças de Lorentz) nos movimentos dos eletrólitos dando aumento da indução de campos elétricos e correntes. Isto significa que campos elétricos e correntes podem ser induzidos no corpo através do CME; 2) efeitos magnéticos-mecânicos que levam à orientação de materiais ferro e paramagnéticos ao longo dos gradientes de CME e 3) Campos magnéticos podem afetar reações químicas por influenciar o nível energético do spin eletrônico envolvido em reações intermediárias. Estas alterações eletrônicas têm sido observadas em reações fotoquímicas. Além disso, muitos estudos sugerem

que fortes CMEs causam algum tipo de estresse oxidativo para organismos vivos (IKEHATA *et al.*,1999).

Amara e colaboradores (2006) realizaram exposição sub-crônica de campo magnético estático (128 mT, 1 hora por dia, durante 30 dias consecutivos) e observaram que o campo induziu estresse oxidativo em tecidos de ratos e oxidação de DNA nos rins. Estes autores afirmam que o indicativo de estresse oxidativo se deve ao fato do CME induzir diminuição na atividade de enzimas antioxidantes associado á peroxidação lipídica. Estes autores consideram ainda que há duas possíveis explicações para o estresse oxidativo induzido por CME como a exposição ao CEM pode estar associada a produção de radicais livres e/ou a sua exposição induzir provavelmente uma perturbação da homeostase de elementos minerais bivalentes, contribuindo para sua deficiência nos tecidos.

Para esclarecer os efeitos biológicos observados pelos CME, muitos mecanismos celulares têm sido sugeridos, incluindo alterações fisiológicas em receptores de membrana ligados às proteínas G e mecanismos ligados à melatonina. Destes, a estimulação da proliferação das células expostas aos CME é o efeito mais consistente tendo sido demonstrada em muitos laboratórios e associada a mecanismos já conhecidos de vias de resposta celular ao estresse, sendo também afetadas a transcrição e a translação. No caso da transcrição, ambos campos magnéticos e elétricos têm sido mostrado estimular alguns fatores de transcrição, com modelos similares de amplitude, frequência e tempo dependentes. A grande diferença é que a energia necessária para induzir transcrição com o CM é milhares de vezes inferiores à necessária com o campo elétrico. Mudanças na síntese de proteínas, estimulada pela baixa frequência de CEM, são similares àqueles seguidos no estresse celular chamado de choque térmico. A variação na distribuição de proteínas com a força do campo magnético e com o aumento de temperatura de choque térmico são similares como o são as mudanças em muitas outras proteínas individuais. A energia necessária para induzir transcrição pelos campos magnéticos é em muitas ordens de vezes mais baixa do que a energia necessária para estimulação elétrica e térmica. O sistema de resposta ao estresse é uma via bem definida em todas as células. Os CEMs parecem estimularem esta via natural e a resposta biossintética ocorre de maneira similar à resposta celular ao aquecimento e outros estresses físicos (BLANK, 1995).

A resposta geral ao estresse (como elevada temperatura, toxinas, metais pesados, etc) é encontrada em todas as bactérias, plantas e células animais e é marcadamente conservada

através da evolução. O mecanismo de resposta ao estresse tem sido amplamente investigado em *Saccharomyces cerevisiae* e provê um modelo de sistema útil para estudos em eucariontes. Entre os muitos mecanismos biológicos propostos de interação do campo magnético, o foco maior está na hipótese que campo magnético pode ser um tipo de estresse ambiental agindo como choque térmico ou dano de DNA (LACY, METCALFE e HESKETH, 1998; McCANN DIETRICH F e RAFFERTY, 1998; MIYAKOSHI *et al.*, 1996; NAKASONO *et al.*, 2003).

Muitas das teorias envolvendo o mecanismo de interação entre sistemas biológicos e CME sugerem que a membrana plasmática é o local onde o campo magnético exerce seu efeito primário (REPACHOLI e GREENBAUM, 1999).

É largamente conhecido que as mudanças morfológicas e estruturais para a membrana plasmática interferem em muitos aspectos funcionais e estruturais das células, levando a mudanças na forma da célula, no arranjo do citoesqueleto, no fluxo iônico, na distribuição de receptores e na fagocitose (DINI e ABRRO, 2005).

O arranjo molecular mais detalhado do mecanismo de CEM tem sido originado de estudos sobre a enzima Na, K-ATPase de membrana. Baixa frequência de campos elétricos parecem aumentar a ligação de ativação de íons na superfície da Na, K-ATPase, enquanto baixa frequência de campo magnético parece aumentar o movimento de cargas no interior da proteína que coordena a superfície. A frequência ótima do campo magnético está muito associada ao número de reciclagem da enzima, sugerindo que o campo acopla-se ao movimento de cargas durante as reações químicas, sugeriu que estes campos podem ter um efeito direto sobre as reações de transferência de elétrons (BLANK, 1995).

Os efeitos biológicos do CME de moderada intensidade nas células não são citotóxicos. No entanto, enquanto as perturbações para as células de intensidade moderada de CME são sub-letais (algumas intensidades tem efeitos apoptóticos) elas podem especialmente a maiores tempo de exposição, causarem acúmulo de modificações progressivas como exemplo, expressão gênica, podendo atuar como fator co-cancerígeno (NAKASONO e SAIKI, 2000). Estudos *in vitro* da exposição aos CEMs têm mostrado mudanças na atividade de enzimas (tal como a Na, K-ATPase) bem como na estimulação de processos biossintéticos que envolvem RNA polimerase. Os mecanismos destes processos fisiológicos e bioquímicos podem ser explicados pela ligação direta com a frequência destes campos (BLANK, 1995).

Os parâmetros físicos do campo magnético (intensidade, frequência e forma de onda), o tipo de célula, temperatura de exposição e o estado biológico da célula podem influenciar os

possíveis efeitos destes campos nos sistemas biológicos. Portanto, é muito importante ter uma *performance* de um controle completo dos parâmetros que podem influenciar, fazendo uma exaustiva caracterização do CM, protocolo de exposição, manipulação de amostras, temperatura de exposição, intervalos de tempo antes e depois da exposição, e o que pode ser um dos mais importantes parâmetros: o estado biológico das células (RUIZ GOMEZ *et al.*, 2004).

Limites seguros de exposição a CME não são conhecidos e os fatores que eventualmente determinarão a força do campo máximo permitido estão, ainda, para serem determinados (SCHENCK, 2005).

Uma recente revisão da literatura sobre os efeitos celulares dos campos magnéticos estáticos concluiu que a exposição a campos magnéticos estáticos não tem ou então exerce efeitos extremamente pequenos no crescimento celular e na toxicidade genética. No entanto, alertam os autores, em combinação com fatores externos como radiação ionizante e alguns agentes químicos, o campo magnético pode modificar seus efeitos (MIYAKOSHI, 2006).

Desde que a imagem por ressonância magnética tem sido largamente difundida como finalidade diagnóstica e desde que as densidades de fluxo usadas estão aumentadas, estudos dos efeitos dos campos magnéticos a nível celular devem continuar (MIYAKOSHI, 2006).

De acordo com Salles (1997), para que a radiação eletromagnética possa induzir algum efeito em tecido ou em qualquer outra substância, é necessário que haja transferência de energia desta radiação para o meio, e que esta energia seja absorvida. Os efeitos desta absorção no tecido são de natureza térmica ou não-térmica, dependendo se os efeitos são devidos à deposição de calor (efeito térmico) ou devido à interação direta do campo com as substâncias, sem transferência significativa de calor (efeito não térmico). Os fatores mais importantes para a absorção das ondas são: constante dielétrica, condutividade, geometria e o conteúdo de água do meio.

Nakasono e colaboradores (2003) não encontraram mudanças na expressão de proteínas ou genes relacionados à resposta de choque térmico, reparo de DNA, respiração, síntese de proteínas e ciclo celular após exposição de levedura a 50 Hz e 300 mT por 24 h. Os achados deste estudo demonstram que não há evidência de que a exposição ao campo magnético atue como fator de estresse alterando a expressão gênica por processos celulares bem definidos e adianta que, se o CM é capaz de induzir mudanças genéticas em organismos superiores, como

humanos, o efeito se dá a nível relativamente mais baixo ou envolve mecanismos específicos destes organismos, em vez de uma resposta geral de eucariontes.

Da mesma forma, quando proteínas responsivas ao estresse foram analisadas em células expostas a 14 mT de campo eletromagnético (EMF) – 5 a 100 Hz, nenhuma mudança foi observada. Portanto, estes autores concluíram que não há evidência que este campo magnético possa atuar como um fator de estresse no mecanismo fisiológico básico (NAKASONO e SAIKI, 2000).

Os resultados discordantes publicados de diferentes laboratórios demonstram que o problema ainda não está resolvido e os diversos autores usam campos com densidades de fluxo com diversos valores. Esta é a base para que se estabeleçam condições de exposição que levem a determinar os parâmetros físicos e biológicos influenciáveis nos bioefeitos do CEM (RUIZ GOMEZ, 2004).

2.3 CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS

Os fungos foram os primeiros microrganismos a serem investigados cientificamente, fazendo da micologia, o estudo dos fungos, a primeira ciência microbiológica (McKANE e KANDEL, 1996).

As leveduras são fungos que se encontram predominantemente sob forma unicelular e facilmente se diferenciam das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. Taxonômicamente, a levedura é definida como um microrganismo eucariótico unicelular que se divide por brotamento. Outros aspectos que as caracterizam como fungos, são a composição da parede celular, a perda de motilidade e a ausência de fotossíntese (McKANE e KANDEL, 1996; MORTIMER, 2000).

As leveduras têm estado a serviço do homem durante muitos séculos, fermentando os sucos de fruta, levedando pães e fabricando diversos produtos. Sua importância é ainda maior nos dias atuais, porque são utilizadas numa ampla variedade de processos fermentativos e também na síntese de vitaminas e proteínas a partir de açúcares simples e de nitrogênio amoniacal. As leveduras também contribuíram para o progresso científico constituindo modelo celular de escolha na elucidação de processos bioquímicos e metabólicos fundamentais das células vivas eucarióticas (PELCZAR, REID E CHAN, 1980).

O primeiro homem que visualizou, microscopicamente, leveduras foi Antonie van Leuwenhoek, que em 1680 enviou desenho e descrições de células à Sociedade Real de Londres. O barão Charles Cagniard-Latour demonstrou em 1837 que a levedura da cerveja consiste em corpos esféricos, capazes de se multiplicar e junto com Theodor Schwann, que o apoiou, deu à levedura o nome de *Zuckerpilz* ou fungo do açúcar, de onde se originou a denominação de *Saccharomyces*. Louis Pasteur utilizou esta levedura e também obteve êxito na solução de problemas relacionados à fermentação alcoólica; depois ele introduziu o método de pasteurização. As leveduras são organismos eucarióticos e suas estruturas correspondem às daquelas de outras células eucarióticas. A forma e a estrutura variam muito entre as diversas espécies. Em virtude de sua importância na agricultura e na indústria, a maior parte das informações foram obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

S. cerevisiae é uma levedura pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, não-patogênica, unicelular, de aproximadamente 5 µm de diâmetro cuja genética, biologia molecular e metabolismo têm sido estudadas extensivamente. Como um organismo de laboratório, a *S. cerevisiae* é de fácil manejo, se reproduz por brotamento de uma célula-filha por uma célula-mãe e prontamente prolifera em tipo de meio de cultura simples. Por séculos, sua habilidade de converter açúcares a etanol e dióxido de carbono tem sido usada para produção de bebidas alcoólicas e pães. Também é usada para equilibrar a flora intestinal. Hoje, mais de um milhão de linhagens de *S. cerevisiae* são usadas no mundo todo anualmente. Em adição à sua importância industrial, *S. cerevisiae* é um organismo de pesquisa muito significativo, em particular como sistema modelo para outros organismos eucarióticos, incluindo humanos. O sistema genético de leveduras, assim como o cromossomo artificial de leveduras, é indispensável para estudo de organização física do DNA humano. Em 1996, devido à sua importância, a *S. cerevisiae* se tornou o primeiro organismo eucariótico a ter seu completo conjunto de cromossomos inteiramente seqüenciado (FORSTER *et al.*, 2003; GLICK e PASTERNAK, 1998).

Quando a levedura é exposta a um agente físico, é esperado, em termos gerais, que o agente atue como um fator citotóxico ou como fator de estresse, induzindo dano celular ou então não causando nenhum efeito imediato na célula. Desta forma, é bem sabido e documentado que o tipo de levedura selvagem tem mecanismos de reparo eficientes para evitar dano induzido por agentes químicos ou físicos em altas doses (FRIEDL *et al.*, 1998).

Organismos celulares requerem condições internas específicas para crescimento e função ótimos. Estratégias múltiplas existem para manter essas condições internas, face a vários e freqüentes ambientes externos instáveis. Considerando que organismos multicelulares podem usar órgãos e tecidos especializados para prover um ambiente interno relativamente estável e homogêneo, organismos unicelulares como a levedura *S. cerevisiae* tem desenvolvido mecanismos autônomos para adaptação de mudanças ambientais drásticas. As leveduras regularmente resistem a flutuações nos tipos e quantidades de nutrientes disponíveis, temperatura, osmolaridade e acidez de seu ambiente a variável presença de agentes nocivos como radiação e agentes tóxicos. De fato, quando condições ambientais mudam abruptamente, a célula deve rapidamente ajustar seu programa de expressão genômica para adaptarem-se as novas condições (GASH *et al.*, 2000).

A complexidade do sistema celular de leveduras para detecção e resposta a variação ambiental está somente começando a emergir. Os genes cuja transcrição e resposta à variedade de estresse têm sido relacionados e as respostas de expressão gênica parecem ser específicas às condições ambientais particulares. Muitos sistemas reguladores têm sido implicados na modulação destas respostas, mas a completa rede de reguladores de resposta ao estresse e os detalhes de suas ações, incluindo os sinais que os ativam e estimulam alvos regulados por eles, permanecem a serem elucidados (GASH *et al.*, 2000; RESNICK, 2000).

A proliferação de células eucarióticas é controlada por fatores específicos de crescimento e pela disponibilidade de nutrientes essenciais. Se qualquer destes sinais é perdido, as células podem entrar em um estágio de repouso ou de não divisão especializado, conhecido como fase estacionária ou G0. A entrada neste estágio é tipicamente acompanhada por diminuição dramática no ritmo de crescimento como um todo e aumentada resistência à variedade de estresses ambientais (CHEN, VAL e GORFF, 2000; HERMAN, 2002).

A melhor caracterização do crescimento em suspensão de *S. cerevisiae* é o que ocorre seguindo o crescimento em meio contendo glicose (HERMAN, 2002).

O crescimento pode ser definido como um aumento dos constituintes celulares, levando a um aumento no número de células, quando microrganismos respondem através de processos como brotamento ou fissão binária. O crescimento de microrganismos reproduzido por fissão binária pode ser descrito como função logarítmica do número de células em determinado período de incubação, resultando numa curva de quatro fases diferentes (GLAZER, 1998).

1. Fase *lag*: quando os microrganismos entram num meio de cultura fresco, usualmente não aumentam imediatamente o número de células ou massa. De fato, a divisão celular não ocorre imediatamente, pois a célula está sintetizando novos componentes. Esta fase varia seu comprimento consideravelmente com as condições do microrganismo e a natureza do meio (GLAZER, 1998).
2. Fase exponencial ou fase *log*: os microrganismos estão crescendo ou dividindo ao ritmo máximo possível dado seu potencial genético, à natureza do meio e às condições na qual estão crescendo. Seu ritmo de crescimento é constante durante esta fase, visto estarem crescendo e se duplicando a intervalos regulares. A população é mais uniforme em termos químicos e fisiológicos nesta fase (GLAZER, 1998).
3. Fase estacionária: o crescimento populacional cessa e a curva se torna horizontal. O tamanho da população final depende da disponibilidade de nutrientes, dentre outros fatores. Nessa fase, o número total de organismos viáveis permanece constante. Este pode ser resultado de um balanço entre divisão e morte celular ou a população pode simplesmente cessar a divisão e permanecer em atividade metabólica. Sabe-se que os microrganismos entram em fase estacionária por muitas razões, sendo uma delas a limitação de nutrientes. Porém o crescimento também pode cessar devido ao acúmulo de detritos de produtos tóxicos, limitando principalmente culturas anaeróbias (GLAZER, 1998; PRESCOTT, 1999).
4. Fase de morte. Restrições ambientais ocorrem com a deprivação de nutrientes e a produção de detritos tóxicos que levam ao declínio no número de células viáveis, característica da fase de morte. A morte da população microbiana, como seu crescimento, é exponencial e usualmente logarítmica (constante proporção de células morre a cada hora). Este padrão ocorre mesmo quando o número total de células permanece constante porque as células simplesmente não se dividem após morrerem (GLAZER, 1998; PRESCOTT, 1999).

O crescimento e a divisão celular em leveduras, por brotamento, são firmemente relacionadas a manutenção da homeostase do tamanho celular durante o crescimento proliferativo. A progressão das células através do ciclo de divisão é regulada por sinais extracelulares do ambiente, bem como por sinais internos que monitoram e coordenam os processos celulares durante as fases do ciclo celular. Culturas crescendo exponencialmente

contêm todos os estágios de divisão celular: G1, S, G2 e M. Como já relatado, as leveduras se dividem por brotamento, sendo a emergência do broto um indicativo do fim da fase G1 e o começo da fase S. Ambas fases G2 e M incluem células com brotos grandes e em G0 as células são um indicativo de células em descanso, não ativamente em divisão (DUBOC, 1996, HATZIS e PORRO, 2006; HERMAN, 2002).

Na *S. cerevisiae* o maior ponto de coordenação entre crescimento celular e divisão ocorre no ponto ou período “start”, onde nas células começam a emergir o broto e a replicação de DNA somente após ter alcançado tamanho crítico, como ilustrado na Figura 1 (COOPER, 1997; HATZIS e PORRO, 2006; JONHSTON, 1990).

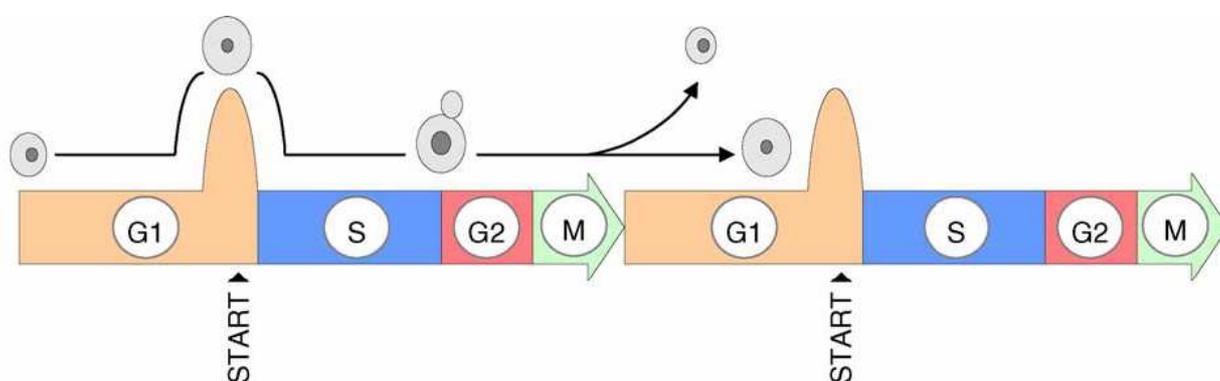


Figura1. Estágios de divisão celular em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os mecanismos moleculares de controle do tamanho da célula não estão ainda totalmente elucidados. A duração do “start” e o ritmo de crescimento celular são afetados pelas condições de nutrientes, determinando a duração da fase “pré-start” e a média de tamanho celular na população de leveduras (HATZIS e PORRO, 2006).

O caminho convencional para a regulação molecular das células no período “start” envolve ativação de proteoquinases ciclina-dependentes Cdc 28 e ciclina 3 (HATZIS e PORRO, 2006).

Jorgensen e colaboradores (2002) estudando um conjunto completo de inativação de genes em linhagens de *S. cerevisiae*, identificaram 40 componentes desconhecidos participando do controle do “start”, muitos dos quais parecem estar envolvidos na biogênese de ribossomas.

O crescimento celular na fase “pré-start”, G1, é tipicamente uniforme e isotrópico. No entanto após o início do crescimento do broto, se torna localizado no broto e vetorial,

adicionando novo material da parede celular na porção distal final do broto. Células recém-nascidas são tipicamente menores que suas mães, especialmente em condições pobres de nutrientes, e portanto necessitam de um fase de “pré-start” maior antes que possam alcançar seu tamanho crítico (CHEN, VAL e GORFF, 2000; HAROLD,1990; LORD 1980).

Vanoni e colaboradores (1993) integraram os aspectos da regulação do ciclo celular em um modelo de crescimento em que assumem que há dois pontos críticos que regulam a passagem das células pelo ciclo celular: o tamanho crítico ao “start”, na qual as células têm de alcançar para iniciar o brotamento e a síntese de DNA e o tamanho crítico para o início da mitose.

A massa celular aumenta devido ao crescimento dentro de cada estágio e a probabilidade de que as células prossigam para o próximo estágio é uma função do tamanho crítico correspondente (HATZIS e PORRO, 2006).

As condições para que se mantenha um tamanho celular médio constante irão depender do tempo do ciclo celular, que deverá coincidir com o tempo que a célula levará para que ocorra a duplicação do seu tamanho. Caso o tempo do ciclo seja mais curto do que o tempo necessário para a duplicação do tamanho celular, as células se tornarão menores em cada geração e se o ciclo apresentar um tempo maior do que o tempo de duplicação, as células serão maiores em cada geração (JOHNSTON, 1990)

As leveduras crescem numa ampla faixa de variação térmica, tendo como temperatura ótima para a maior parte das leveduras 20 a 30 graus centígrados. *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo acidófilo, que cresce melhor em condições ácidas. Um pH ótimo é necessário para a atividade das proteínas da membrana plasmática, incluindo enzimas e proteínas transportadoras (NARENDRANATH e POWER, 2005).

2.4 FISILOGIA DAS LEVEDURAS

Num grupo de organismos tão grande e diversificado como as leveduras, pode-se encontrar uma variedade de reações fisiológicas, assim como pode ser visto em relação à morfologia e à reprodução. A desassimilação de açúcares como glicose, pode ocorrer anaeróbica (fermentação) ou aerobicamente (respiração). O processo mais característico é a desassimilação anaeróbica, também conhecida comumente como fermentação alcoólica, cujos produtos finais são álcool etílico e dióxido de carbono (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

Esta fermentação se efetua de acordo com o esquema glicolítico. A glicólise é a soma total de todas as reações bioquímicas pelos quais a glicose é convertida a piruvato. A via mais frequente é a de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). (Figura 2)

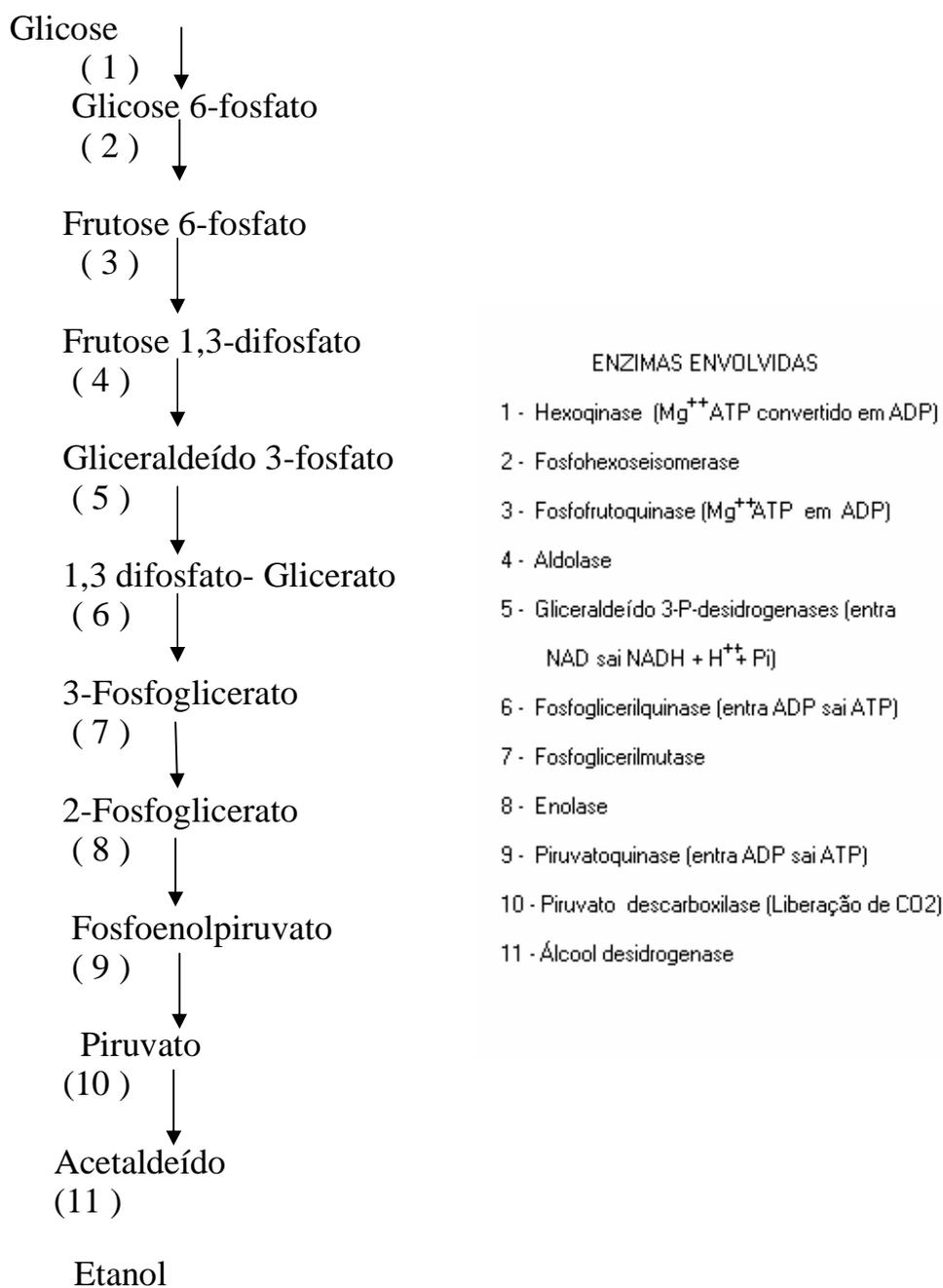


Figura 2 - Degradação da glicose (Via de Embden-Meyerhof-Parnas)

De acordo com o papel do oxigênio em seu metabolismo, as leveduras podem ser classificadas como (1) aeróbias obrigatórias; (2) fermentativas facultativas, desempenhando ambos metabolismo respiratório e fermentativo e (3) fermentativas obrigatórias (MÉRICO *et al.*, 2007).

A habilidade das leveduras crescerem em condições muito limitadas de oxigênio é dependente da capacidade de desenvolver fermentação alcoólica, permitindo a reoxidação de NADH gerado durante a glicólise. Em *S. Cerevisiae*, a fermentação predomina sobre a respiração quando as concentrações de glicose são altas. Dependendo desta característica, as leveduras são classificadas como Crabtree positivas ou negativas (POSTMA *et al.*, 1989; PRONK, 1996; MÉRICO *et al.*, 2007)

S. cerevisiae, que acumula etanol na presença de oxigênio, é chamada de levedura Crabtree positiva. O efeito Crabtree é explicado pelo fato da fermentação alcoólica ter via predominante na degradação das hexoses (açúcares) na presença de oxigênio devido à insuficiente capacidade ou saturação do metabolismo respiratório, levando a superprodução de piruvato (PISKUR *et al.*, 2006)

O efeito Crabtree tem conseqüências importantes nos processos industriais, objetivando a produção de biomassa, onde a formação dos produtos derivados da fermentação não são desejados (LO CURTO e TRIPODO, 2001).

A levedura *S. cerevisiae* possui três enzimas diferentes envolvidas na fosforilação da glicose e frutose: hexoquinase A, hexoquinase B e glucoquinase. As duas hexoquinasas fosforilam glicose e frutose enquanto a glucoquinase é específica para a glicose. Piruvato, que é o último metabólito da glicólise, pode ser convertido em muitas rotas que dependem da oxirredução e do estado energético das células. Em aeróbios, a maioria do piruvato entra no ciclo do ácido tricarboxílico (via acetilcoenzima A) onde é oxidado completamente a CO₂ e água. Porém, em condições limitadas de O₂, ou em organismos anaeróbios, o piruvato pode ser convertido em produtos metabólicos como ácido lático, ácido acético e etanol, via fermentativa. O maior produto final do metabolismo de leveduras é o etanol, e por esta razão, é conhecido como fermentação alcoólica. No entanto, acetato e succinato são formados. A via fermentativa, que gera etanol e acetato, começa com a descarboxilação de piruvato a acetaldeído, que é posteriormente reduzido a etanol pela álcool-desidrogenase ou então é oxidado a acetato (NGUEN *et al.*, 2004; STEPHAMOPONHOS *et al.*, 1998).

Durante a fase logarítmica de crescimento, esta levedura cresce por fermentação da glicose disponível no meio. Quando a glicose se torna limitante, as células transitoriamente suspendem seu crescimento e desviam seu metabolismo para um modo de produção de energia respiratório. Este período de transição é conhecido com diauxismo. No período de

crescimento subsequente ao diauxismo, as células crescem lentamente e utilizam o etanol que foi produzido durante período prévio de fermentação (HERMAN, 2002).

A maior diferença no metabolismo fermentativo destas leveduras está por não preceder pela via acetilCoA, como nas bactérias. Há 4 isoenzimas da enzima álcool desidrogenase: ADHI, ADH II, ADH III e ADH IV. ADH I citosólica é constitutivamente expressa durante crescimento anaeróbico em glicose e é responsável pela formação de etanol. ADH II é citosólica e reprimida pela glicose, principalmente associada ao crescimento aeróbico com produção de etanol. A função ADH III mitocondrial é também reprimida pela glicose e funciona como mecanismos de oxiredução equivalentes entre citosol e citoplasma. Duas isoenzimas de aldeído desidrogenase têm sido identificadas. Um caminho usa ambos NAD⁺ e NADP⁺ como cofator e outro é específico para NADP⁺. De fato, a formação de acetato pode levar à formação de NADPH e este pode ser a fonte chave do suprimento de NADPH em leveduras. De maneira geral, a conversão de glicose a etanol por *S.cerevisiae*, não ocorre com geração de NADH. No entanto, a síntese do precursor dos metabólitos e dos elementos estruturais usados na biossíntese causam uma formação conjunta de NADH (por exemplo, formação de piruvato a partir da glicose leva a geração de 1 NADH para cada piruvato formado), as células necessitam de uma rota metabólica para dissipar o excesso de NADH formado. Uma possibilidade é a formação de glicerol a partir da dihidroxiacetonafosfato (DAP) (PELCZAR, REID e CHAN., 1980).

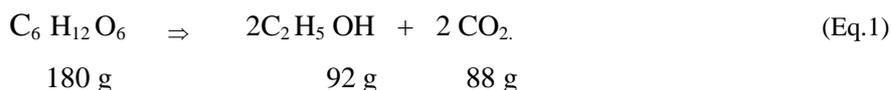
Sob condições aeróbicas, a desassimilação envolve a utilização do oxigênio atmosférico por diversas vias possíveis. Na respiração, a oxidação completa da glicose fornece dióxido de carbono e água, enquanto a oxidação incompleta é acompanhada pelo acúmulo de ácidos e de produtos intermediários, sendo uma das vias mais importantes, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos de Krebs (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

A fermentação etanólica é um processo complexo envolvendo reações que são descritas na literatura em detalhes. Entretanto, a produção de etanol é dependente de diferentes fatores como temperatura, pH ou a presença de moduladores enzimáticos ou inibidores de enzima específicos (AZENHA, VASCONCELOS e MORADAS-FERREIRA, 2000).

A fermentação por leveduras é um dos processos mais antigos que se tem conhecimento. Em microbiologia, fermentação é definida como um processo metabólico para a geração de ATP, na qual, produtos da degradação de compostos orgânicos servem como doadores e receptores de hidrogênio. O oxigênio não é um reagente no processo fermentativo. Nas palavras de Louis Pasteur “...la fermentation est la vie sans l’air” (GLAZER, 1998; TIMBERLAKE, 1999).

As enzimas de *S. cerevisiae* são responsáveis por quase toda a produção atual de álcool etílico por fermentação do caldo de cana de açúcar. Este microrganismo converte glicose pela via glicolítica com altos rendimentos de etanol e CO₂. Somente duas moléculas de ATP são produzidas por mol de glicose metabolizada e as células da levedura as usam para crescimento. O etanol é recuperado em 90 – 95 % do rendimento teórico (GLAZER, 1998).

Uma compreensão da produção aritmética de etanol começa com a equação estabelecida por Gay Lussac, em 1810, para a conversão de glicose a etanol por leveduras:



Para esta equação, o rendimento teórico de álcool a partir da glicose é calculado como sendo 51,1 % do peso. No entanto, a produção de álcool por leveduras é atualmente um produto do crescimento das leveduras e alguns dos substratos são utilizados na produção de mais células.

Crescendo rapidamente, os microrganismos podem produzir em torno de 10 g de peso seco de células para cada mol de ATP sintetizado, durante a fermentação. Como cada mol de glicose fermentado a etanol produz 2 moles de ATP, assim o rendimento teórico das células é 20 g do peso seco. O conteúdo de carbono destas células é perto de 50 %. Como a glicose é a fonte de carbono no meio fermentativo, e o conteúdo de carbono na glicose é 40 %, 25 g de glicose são necessárias para prover 10 g de carbono celular. Permitido o crescimento celular, o máximo de rendimento de álcool esperado seria em torno de 86%. No entanto, fermentações por leveduras resultam em maiores rendimentos de etanol, 90 a 95% do valor teórico. A razão para isso, é que nem todo ATP é usado para produzir novas células e alguma energia é gasta com outras funções celulares, independentemente da taxa de crescimento celular. Esta proporção é menor durante o crescimento rápido, mas quando o crescimento se lentifica, isto pode ocorrer durante a inibição por etanol ou limitação de nutrientes, e o requerido para a manutenção de energia não diminui (GLAZER, 1998).

A presença de etanol, no entanto, pode causar vazamento iônico através das membranas celulares, alguns dos quais necessários para a manutenção de energia em altas concentrações de etanol. De fato, como etanol aumenta durante fermentações em bateladas, as células usam uma partilha crescente de ATP para a manutenção do gasto de reprodução e fração de carbono de glicose. No fermentador isto é representado pelo fato das células diminuírem de 14% para 5% ou menos da concentração inicial de glicose com correspondente aumento no rendimento de etanol.

Como indicado pela equação de Gay-Lussac, tanto CO₂ como o etanol são produzidos em quantidades equimolares. Reações adicionais também ocorrem no fermentador, resultando em volumes menores de produtos como glicerol, ácido acético, ácido lático e ácido succínico, acetaldeído, furfural e 2,3-butanediol. Destes, o glicerol é o que resulta maior quantidade e é formado pela redução do metabólito glicolítico intermediário, dihidroxiacetona fosfato para glicerol – 3 – fosfato, que é desfosforilado a glicerol. A *S. cerevisiae* sintetiza glicerol como um metabólito osmoregulador em resposta a altas pressões osmóticas da solução de açúcar no fermentador. A escolha do glicerol como um metabólito osmoregulador pode ser influenciada pelo fato de que na via Embden-Meyerhof o caminho que leva ao glicerol, regenera diretamente NAD⁺ (GLAZER, 1998; INGRAM *et al.*, 1998).

2.5 IMPORTÂNCIA DAS LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo importante para processos industriais e para pesquisas científicas. A característica fisiológica fundamental das leveduras é sua habilidade de degradar carboidratos, hexoses, como a glicose, a componentes de dois carbonos, em particular etanol, sem completamente oxidá-los a dióxido de carbono na presença de oxigênio, como muitas leveduras fazem (DUARTE, PALSO e FU, 2004, PISKUR *et al.*, 2006).

S. cerevisiae é um importante organismo biotecnológico para produção de etanol, proteínas recombinantes, antibióticos ou biomassa (FRICK e WITTMANN, 2005)

Durante a produção de etanol, a energia para o crescimento é provida pela glicólise e pelas vias de fermentação mais do que pela via de respiração oxidativa, sendo a produção de etanol a principal rota do catabolismo central do carbono em *S. cerevisiae* durante crescimento em meio contendo glicose (NGUEN *et al.*, 2004; PISKUR *et al.*, 2006).

Durante a fermentação (aeróbica ou anaeróbica) as leveduras reciclam NADH na conversão de acetaldeído a etanol. Se oxigênio está disponível, o etanol acumulado é convertido novamente a acetaldeído. A conversão etanol-acetaldeído é catalisada pela álcool-desidrogenase (ADH) que pode, em princípio, catalisar a reação em ambas direções (PISKUR *et al.*, 2006).

A competitividade de *S. cerevisiae* deve-se a uma combinação de muitas propriedades incluindo crescimento rápido, eficiente utilização de glicose e boa habilidade para produzir etanol, bem como alta concentração de etanol e baixos níveis de oxigênio (PISKUR e LANGKAJAR, 2004).

A importância industrial das leveduras vem se estendendo da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico e a produção de biomassa irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. (PRETORIUS, TOIT e RENSBURG, 2003)

Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *S. cerevisiae*, quer na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável, tal microrganismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido. (AQUARONE, LIMA e BORZANI, 2001)

Outra importante razão para a aplicabilidade da levedura *S. cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia, é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante (OSTERGAARD, OLSSON e NIELSEN, 2000).

No Brasil, indústrias de açúcar e álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. A crise internacional do petróleo em 1974, fez com que o Brasil iniciasse uma nova fase na produção de etanol. Com a utilização deste combustível alternativo e o aumento da demanda ampliou-se o parque canavieiro, fez-se modernização das destilarias e uma rápida e importante evolução na construção de motores para esse combustível. O plano de desenvolvimento da produção de álcool no Brasil, denominado Proálcool, não foi mais do que a continuidade e evolução de um programa do uso do álcool como combustível, iniciado em 1931 por ocasião da primeira grande crise do petróleo, que foi causada pela primeira guerra mundial(LIMA *et al.*, 2001).

A via fermentativa é a maneira mais importante para obtenção de álcool etílico no país. Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação da cana-de-açúcar a forma mais econômica de sua obtenção é a fartura de matéria prima natural existente em todo o território (LIMA *et al.*, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a influência da ação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, na fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* crescendo em meio contendo glicose.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência exercida pela intensidade de campo magnético utilizado e pela forma de magnetização no crescimento e na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*.
- Avaliar a influência do campo magnético sobre as velocidades específicas de crescimento celular;
- Verificar o efeito exercido pelo campo magnético sobre os rendimentos bioquímicos da levedura na produção de etanol a partir da glicose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos em biorreatores

As fermentações foram conduzidas segundo duas condições:

1. em biorreatores submetidos a campo magnético (com magnetos);
2. em biorreatores sem magnetos.

Os biorreatores utilizados tinham capacidade interna de 150 mL e foram vedados com tampão de algodão hidrofóbico. As fermentações foram desenvolvidas em estufa a 30 ° C, sem agitação mecânica.

O biorreator magnetizado foi constituído usando-se uma proveta de 150 mL de capacidade, onde foram fixadas (fita adesiva) duas hastes de madeira contendo orifícios nos quais se encontravam os magnetos. Cada haste de madeira tinha dimensões 10x2, 5x2 cm e 5 orifícios dispostos ao longo do comprimento, com o mesmo diâmetro dos magnetos e onde foram inseridos com espaçamento de 13 mm entre os centros de cada magneto. As duas hastes de madeira foram longitudinalmente fixadas, diametralmente opostas na parede externa. Os magnetos foram inseridos no suporte de madeira de forma que o CM de um lado do reator ficou orientado no sentido norte enquanto o do outro lado foi orientado para o sul. Deste modo foi conseguido dentro do reator um CM uniforme, onde as linhas de força eram paralelas e tinham a mesma polaridade.

Os biorreatores foram mantidos em estufa microbiológica a 30 ° C durante 24 horas, período utilizado para realização do experimento completo. Abaixo uma ilustração do sistema, sendo a foto da direita, o biorreator magnetizado.

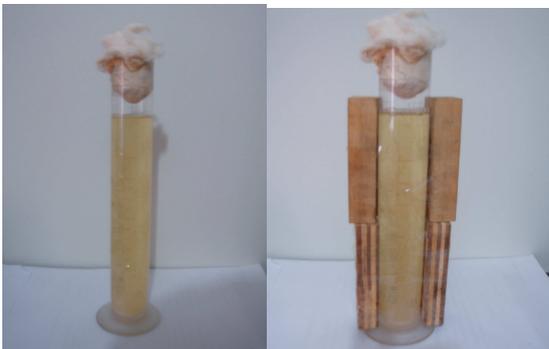


Figura 3 – Ilustração do sistema de magnetos.

3.2 Experimentos controle

Neste trabalho, foram usados dois frascos, um submetido ao campo magnético e um frasco como controle sem a presença do campo magnético. Para isso, foram utilizados frascos de vidro, marca LENA, com capacidade total de 150 mL e foram agitados manualmente, apenas nos momentos das retiradas das amostras para análises. Os experimentos não submetidos ao CM, denominados controle, ficaram durante a fermentação afastados (2,0 m) do outro reator, a fim de não sofrer influência, mesmo de baixa intensidade, proveniente dos magnetos ali fixados .

3.4 Campo Magnético

3.4.1 Geração do Campo Magnético

O campo magnético utilizado no experimento foi do tipo estático, não homogêneo, de intensidade 220 mT, gerado com o auxílio de 10 magnetos .

3.5 Magnetos

Os magnetos utilizados tinham formato cilíndrico, constituídos da liga metálica NdFeB (Neodímio-Ferro-Boro) com ½ pol de diâmetro e ¼ pol de espessura (modelo 27DNE3208 Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc. USA) com densidade residual de fluxo $B_r = 12.300$ Gauss (Figura 3). A densidade de fluxo ao longo de uma distância x do centro da superfície do magneto cilíndrico, pode ser calculada em função do seu raio “R” e da sua espessura “L”, com razoável exatidão, através da equação 1 (Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc.).

$$B_x = \frac{B_r}{2} \left(\frac{L+X}{\sqrt{R^2+(L+X)^2}} - \frac{X}{\sqrt{R^2+X^2}} \right) \quad (\text{Eq.2})$$

Onde: R – Raio da base do magneto, L – espessura do magneto (Figura)

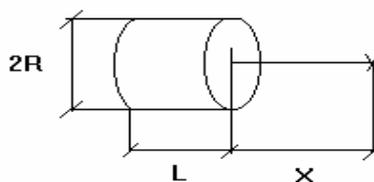


Figura 4 - Representação gráfica de um magneto cilíndrico de raio R e espessura L .

A equação 2 pôde ser comprovada experimentalmente através da medição de densidade de fluxo magnético por ponta de efeito hall, utilizando um Gaussímetro modelo 9.500, F.W. BELL, USA. As medições foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos experimentos foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida da coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, classificada como UFPEDA – 1012.

3.7 Meios de Cultura

3.7.1 Meio de Manutenção

A levedura foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultivo Sabouraud Dextrose Ágar. O meio foi preparado com pH de 5,6 e esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Em seguida, distribuiu-se em tubos de 13X180 mm e deixado para solidificar em posição inclinada. Os componentes do meio Sabouraud Dextrose Ágar e suas respectivas concentrações estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1 - Componentes do meio de manutenção Sabouraud Dextrose Ágar

Componente	Quantidade	Unidade
Peptona	10	g/L
Glicose	40	g/L
Ágar	15	g/L
Água destilada	1.000	mL

3.7.2 Meios de Pré-fermentação e Fermentação

Os meios de crescimento utilizados nas Pré-fermentações foram os mesmos meios utilizados nas fermentações. As fermentações foram realizadas utilizando um meio contendo extrato de levedura e glicose, denominado de meio de glicose para fermentação alcoólica. O meio foi preparado com pH ajustado para 5 e esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Os componentes do meio utilizado e suas respectivas concentrações, estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Componentes do meio de glicose para Fermentação Alcoólica

Componente	Quantidade	Unidade
Extrato de levedura	1,0	g/L
Glicose	50,0	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	g/L
Peptona de caseína	1,0	g/L
Água destilada	1000	mL

4. MÉTODOS

4.1 Manutenção dos microrganismos

A cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, UFPEDA - 1012 foi mantida em meio sólido, Sabouraud Dextrose Ágar sob refrigeração a 4°C e transplantadas para novos meios sólidos, a cada 30 dias. Depois do transplante, as culturas eram mantidas em estufa, por 24 horas, a 30°C e após o crescimento eram novamente refrigeradas a 4°C. Desta maneira, manteve-se sempre uma quantidade de células em estoque suficiente para satisfazer à demanda das fermentações.

4.2 Preparo do inóculo

A fase de pré-fermentação consistiu na inoculação de células de *Saccharomyces cerevisiae*, retiradas do meio de manutenção (sólido) para o meio de pré-fermentação (líquido) estéril. As células inoculadas no meio de pré-fermentação foram mantidas em estufa a 30°C por um período de 18 horas. Após este período, adicionou-se ao meio de fermentação obedecendo ao aumento de volume de cultivo na ordem de 10% (v/v). Para se garantir concentrações iniciais de células iguais em ambos os biorreatores, os frascos contendo os volumes de pré-fermentação tinham sua turbidez comparada ao tubo 1 da escala de McFarland (que corresponde a 10^9 células) e adicionados aos biorreatores contendo o meio de fermentação. Todas as etapas seguiram-se obedecendo às técnicas estéreis de manuseio de microrganismos. Durante a fermentação os frascos foram mantidos em estufa microbiológica a 30°C, sendo retirados apenas para a coleta de amostras.

4.3 Coleta de amostras

A retirada de amostras dos biorreatores para análises foi realizada com auxílio de pipeta graduada estéril e através de seringa estéril. A cada 4 horas, eram retirados 500 µL para realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), 2000 µL em seringa estéril para determinação do peso seco e 100 µL para análise da imagem. Os frascos eram abertos e homogeneizados apenas no momento da retirada do material, sempre próximo ao bico de Bunsen.

4.4 Exposição ao campo magnético

O biorreator teste foi submetido ao campo gerado por cinco pares de magnetos cilíndricos (modelo 27DNE3208 NdFeB fabricados por Magnet Sales & Manufacturing, Inc.) com os pólos opostos se defrontando.

Para construção desta estrutura, foram inseridos linearmente os cinco magnetos em cada haste de madeira, em orifícios de 19,5 mm de diâmetro e 9,7 mm de profundidade, com espaçamento de 13 mm entre as bordas de cada magneto. A polaridade da superfície cada magneto encaixado foi igual em cada haste de forma que um conjunto tinha o pólo norte e o outro, o pólo sul em contato com a parede externa do reator. As hastes foram fixadas com fita adesiva com 180 graus de afastamento entre a linha média de ambas.

O campo magnético, gerado na parede interna do biorreator próximo aos magnetos era de 265 mT e no ponto médio da distância entre cada par de magnetos no eixo central do biorreator, era de 45 mT, originando um gradiente de campo horizontal de 220 mT entre o centro e superfície interna adjacente a cada par de magneto.

4.5. Análises de Acompanhamento da Fermentação

4.5.1 Pureza dos cultivos

A pureza microbiológica de amostras coletadas durante a execução do trabalho foi monitorada para a verificação da presença de possíveis contaminantes, cada uma foi testada por plaqueamento direto em meio Àgar – Sabouraud.

4.5.2 Avaliação do crescimento

O crescimento das leveduras foi avaliado por medida do peso seco e por contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

4.5.2.1 Avaliação do peso seco

Amostras de 2 mL eram coletadas e filtradas através de membrana previamente tarada, de porosidade 0,45 μm e diâmetro 25 mm, marca Schleicher & Schüll. A amostra era coletada através de seringa estéril de 3 mL. Após a injeção de 2 mL de amostra em porta-filtro contendo a membrana, estas eram lavadas duas vezes com água destilada e levadas a estufa de 105 ° C durante 40 minutos (LUNA, LOPES, MASSARINI, 2005).

O tempo de permanência em estufa era obtido por teste, de forma que o peso permanecesse constante, sendo aferido a cada 5 minutos. Após resfriamento durante 30 minutos em dessecador, as membranas com as células lavadas e secas foram novamente pesadas e por diferença determinaram-se os pesos das biomassas nas alíquotas. A pesagem foi feita em Balança Analítica Scaltec GMBH Heiligenstadt, modelo SBA31, precisão 0,1 mg, Alemanha.

4.5.2.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias

Foram coletados 0,5 mL da amostra e adicionados ao frasco de diluição contendo 4,5 mL de água estéril para realização de diluição seriada (diluição de 1 : 10). Após a diluição, foram transferidos do último frasco, 5 alíquotas de 5 µL para superfície dos meios distribuídos em placas de Petri com 60 mm de diâmetro, contendo 10 mL de meio ágar-Sabouraud estéril por placa.

A incubação foi feita em estufa a 30°C durante 24 horas. As colônias formadas foram contadas com auxílio do Contador de colônias mecânico, da marca Phoenix – CP-602 e os resultados expressos como Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

4.5.3 Biomassa produzida e velocidade específica de crescimento

Os valores de biomassa produzida foram obtidos subtraindo-se o valor de biomassa coletado a cada hora do valor obtido no tempo anterior, ou seja, biomassa final menos a inicial. A medida de velocidade específica de crescimento (μ_x) foi calculada através da fórmula:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{d_x}{d_t} \cdot (x_2 - x_1) \quad (\text{Eq.3})$$

onde: x = biomassa, d_x é a diferença de biomassa final menos a inicial e d_t é a diferença de tempo final menos inicial.

4.5.3 Análise de Imagem

Para análise de imagem, uma alíquota de 100 µL da amostra foi coletada e colocada em lâmina, recoberto com lamínula, sem adição de corante. Em estado fresco, a amostra foi visualizada em um microscópio óptico utilizando a objetiva 10x e ocular de 40x que resultou em um aumento final de 400 vezes. Esse processo foi repetido a cada quatro horas para o controle e para o magnetizado.

A aquisição das imagens foi feita com o auxílio de uma câmera de vídeo fixada sobre o microscópio e conectada a um computador por carta de aquisição. Foram obtidas cerca de 60 imagens das leveduras por amostra a cores.

O sistema de aquisição de imagem é formado por um microscópio Zeiss (Modelo Axiostar Plus), sobre o qual é conectada uma câmara Samsung SDC-312 digital colorida. O sinal é enviado ao computador, Pentium 4, através de uma placa de aquisição de imagens Pinnacle Systems “on board”. As imagens são convertidas em tons de cinza, através de um

software desenvolvido pela Dra. Marie-Noelle Pons (ENSIC, INPL / Nancy – França) e disponibilizado para uso no estudo pela própria.

As imagens foram em seguida tratadas automaticamente com auxílio do programa LevMorph[®] desenvolvido em Visilog[®] v.5 (Noesis, Les Ulis, França).

Para a análise automática das imagens, foram utilizadas a metodologia e programas apresentados por Da Motta et al. (2003). Este programa apresenta em uma planilha Excel[®] (Microsoft, EUA) e os valores são dados em *pixel*, unidade básica de imagem, e convertidos em milímetros na mesma planilha.

4.5.4 Monitoramento do pH

As aferições dos valores de pH foram realizadas empregando-se potenciômetro marca Digimed, modelo DM 21, série 18527, Digimed Instrumentação Analítica Ltda. As amostras foram aferidas a cada 4 horas com o líquido descartado após filtração de membrana.

4.5.6 Dosagem de etanol

A determinação da concentração de etanol das amostras foi realizada através de cromatografia a gás, utilizando o cromatógrafo Ciola & Gregori, modelo CG 90, São Paulo, Brasil. O material utilizado para análise da amostra foi o mesmo utilizado para a medida de pH que imediatamente após aferição em peagômetro era armazenado em tubos Eppendoff e mantido em freezer até o momento da análise.

Condições do Cromatógrafo:

1. Temperatura da coluna: 100° C (isotérmica);
2. Temperatura da coluna vaporizada: 130 ° C;
3. Temperatura do detector: 150 ° C;
4. Coluna: Carbowax 20 M, comprimento 2,5 metros, diâmetro 1/8 polegada;
5. Fase móvel: nitrogênio;
6. Vazão da fase móvel. 30 ml/min;
7. Detector: ionização de chama;
8. Volume injetado: 5µL;
9. Método de Cálculo: padronização externa;

10. Sistema de aquisição de dados: IQ3 – modelo DS1000 (Dani).

4.5.7 Dosagem de açúcares redutores :

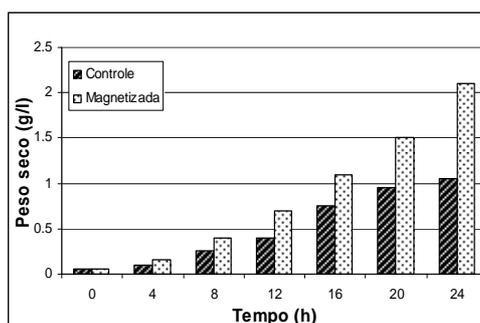
A dosagem de glicose das amostras controle e magnetizadas foi feita através do método enzimático de glicose, glicose-oxidase, colorimétrico, marca Laborlab. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Labormed, modelo Spectro UV-VISORS, EUA, a 505 nm e as amostras analisadas foram as iniciais e finais de cada fermentação, após as diluições pertinentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

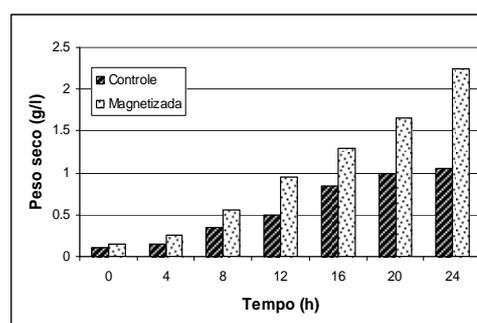
A literatura que trata dos efeitos biológicos resultantes da aplicação de radiações é controversa. A não uniformidade nos resultados experimentais deve ser devido à larga faixa de parâmetros utilizados, variedade das espécies de animais e intensidades dos campos testados (FREITAS JUNIOR, 2003).

Os valores de variação de peso seco, acompanhados ao longo de cada fermentação são mostrados na Figura 4. Ao observar as Figuras de A a H verifica-se que o peso seco magnetizado mostrou-se maior que o peso controle a cada 4 horas de fermentação, Através da análise gráfica dos resultados obtidos, observa-se que a partir das 12 horas de fermentação há uma visível tendência ao aumento de biomassa produzida pela amostra magnetizada em relação à amostra controle.

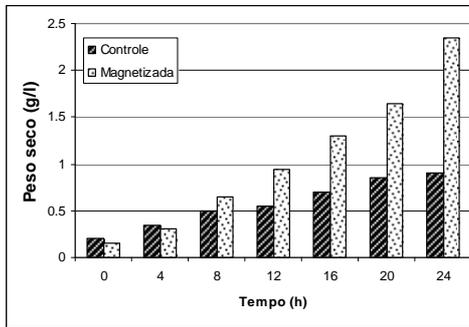
A



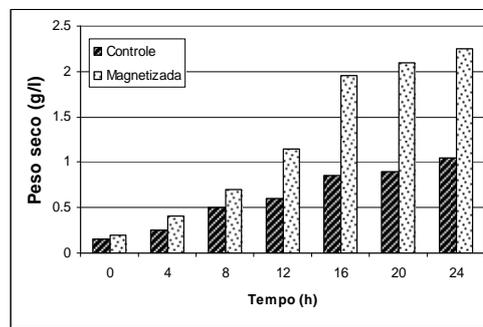
B



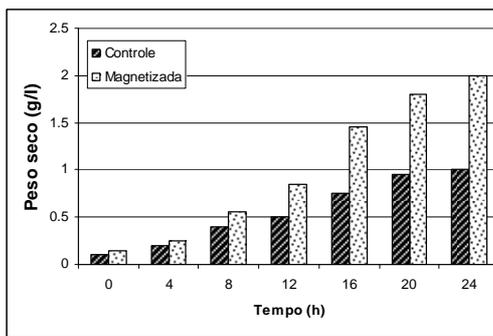
C



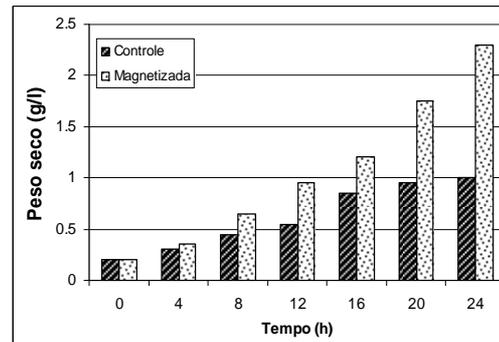
D



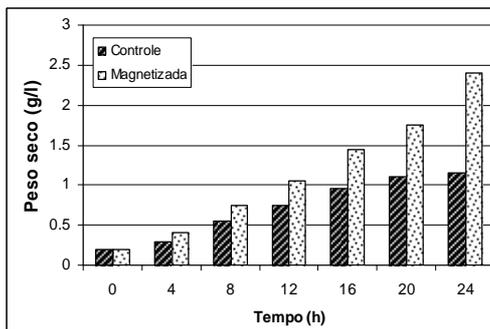
E



F



G



H

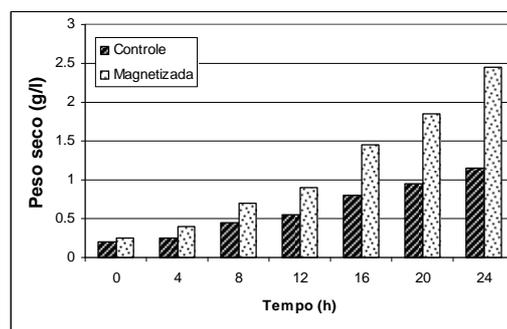


Figura 4. Gráficos de valores da variação de peso seco em função do tempo. A – Fermentação 1, B- Fermentação 2, C- Fermentação 3, D – Fermentação 4, E – Fermentação 5, F – Fermentação 6, G – Fermentação 7, H- Fermentação 8.

As Tabelas de 3 a 6 no Apêndice, mostram os valores de biomassa das fermentações analisadas a partir das 12 horas de fermentação. A análise estatística através do teste T de Student demonstrou diferenças significativas entre as amostras controle e magnetizadas das 12, 16, 20 e 24 horas. De acordo com os dados apresentados pelas Tabelas de 3 a 6, as amostras submetidas a campo magnético obtiveram aumento na produção de biomassa quando comparadas as amostras controle, a partir das 12 horas de fermentação, sendo estatisticamente significantes, com valores de $p \leq 0,001$; 0,005; 0,001 e 0,001 respectivamente para as amostras das 12, 16, 20 e 24 horas. Pode ser observado o aumento na produção de biomassa de até 181% em relação à amostra não magnetizada, como observado nas 20 horas da Fermentação 8, evidenciando que o campo magnético estimula a produção de biomassa em leveduras.

A análise percentual da variação média de peso seco entre as médias das amostras controle e magnetizada, de todas as fermentações realizadas, com seus respectivos desvios-padrão está ilustrada na Figura 5.

Pela análise do gráfico pode ser observado que a diferença entre o peso seco das culturas estimuladas magneticamente sempre foram superiores a 70%, em relação ao das culturas controle. Esta diferença chegou a dobrar o valor do peso seco, como pode ser observado na Fermentação 4.

As medidas de dispersão (desvio padrão) destas diferenças extrapolaram o valor médio na Fermentação 3 e tiveram valores inferiores àquela média nas fermentações 2, 3, 4, e 8. Estas variações dependem do estado em que se encontram as células e quanto ao ciclo reprodutivo, no momento da inoculação. Quanto maior for a predominância de células em estado de gemulação, tanto menor será a dispersão dos resultados.

Na Figura 5, percebe-se que o peso seco, medida direta da biomassa, confirmou os achados das medidas feitas pela contagem de células viáveis (UFC/mL), os quais deram resultados mais robustos, em vista do maior número de células.

Deste modo, como houve maior número de células e de biomassa úmida (viva) do que biomassa seca, infere-se que as células eram menos volumosas porém mais numerosas, nas culturas estimuladas magneticamente. Não apenas a contagem das UFC como a diferença de brotamento (visto na análise de imagens) confirma o aumento da proliferação celular nas culturas magnetizadas.

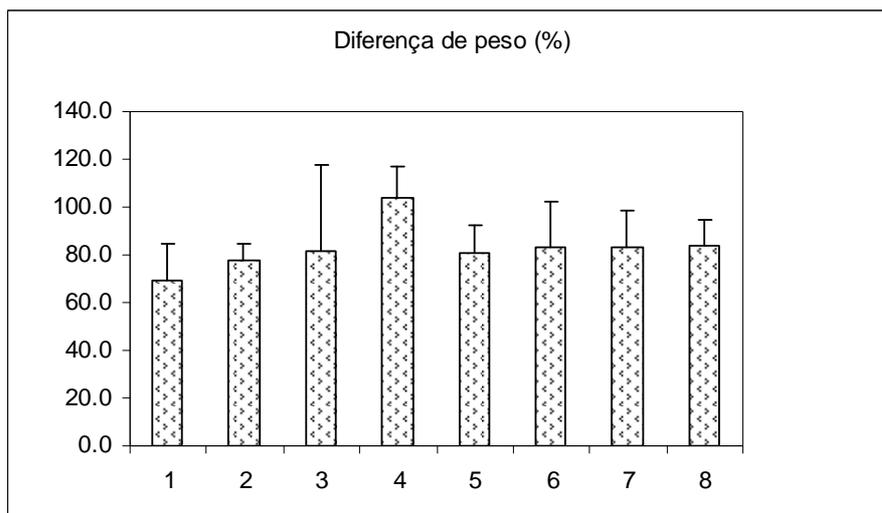


Figura 5 – Diferença percentual de peso seco entre amostras controle e magnetizada para cada fermentação realizada.

De acordo com os resultados publicados por Moore (1979), o crescimento de microrganismos pode ser estimulado ou inibido em presença de campos magnéticos alternantes, dependendo da intensidade e da frequência do campo. O autor afirma ainda que a esporulação e a frequência de mutação dos microrganismos, não foram afetadas pelas intensidades e frequências de campos magnéticos, utilizados nos experimentos. Foram utilizados nos experimentos campos magnéticos alternantes com frequências variando de 0 a 0,3 Hz e intensidades de 0,5 mT a 9 mT, aplicados sobre leveduras da espécie *Cândida albicans* e bactérias das espécies *Bacillus subtilis* (células vegetativas e esporos), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Halobacterium halobium*.

Estudos utilizando *S. cerevisiae* como modelo, têm referido que a proliferação aumenta mais do que 25 % a 50 Hz e 0,5 mT de campo magnético alternado durante 10 h de exposição (MEHEDINTU e BERG, 1997). No entanto, o efeito encontrado por estes autores quando foi usado 0,2 mT, 50 Hz, foi de uma ação inibitória de 16 % na proliferação celular. A dependência do crescimento celular com a frequência, encontrada por estes autores, mostra respostas positivas com mais de 20 % de aumento no número de células após 10 h de exposição a 15 e 50 Hz, sugerindo a existência de “janelas” de frequência de proliferação (MEHEDINTU e BERG, 1997).

Potenza e colaboradores (2004) realizaram exposição de *Escherichia coli* a campo magnético estático de 300 mT de intensidade, produzido por discos de neodímio. Estes autores verificaram o crescimento celular e a expressão gênica desta bactéria durante 50 horas de exposição, a 37° C, com o crescimento de biomassa analisado a cada 12 horas de exposição através de espectrofotometria de luz visível. Os achados revelaram que as curvas de

crescimento das células expostas e não expostas ao CME apresentaram características semelhantes para as primeiras 8 horas e mostraram diferenças significativas às 25 horas de crescimento.

Efeito do pH

A acidificação é considerada um dos mecanismos importantes envolvidos na inibição da fermentação alcoólica e no crescimento de leveduras (ROSA e SÀ CORREIA, 1996).

Os resultados obtidos experimentalmente das amostras controle e magnetizada encontram-se representados nas Tabelas de número 33 a 40 ilustradas no Apêndice. Os dados apresentam o perfil de variação do pH das amostras controle e magnetizada, ficando evidenciado que ocorre decréscimo deste parâmetro até a 24^a hora. No entanto, não são registradas diferenças consideráveis nas fermentações desenvolvidas nos dois reatores.

Como resultado, pode ser observado que os valores pH das fermentações se mantiveram sem grandes oscilações e sem diferenças significativas entre os grupos, permanecendo entre os limites normalmente observados nas fermentações dessa natureza.

Variação de crescimento da biomassa

A Figura 6 ilustra os gráficos da curva de crescimento de biomassa das amostras experimentais e controle.

Os resultados experimentais apresentados nos gráficos demonstram que a aplicação do campo eletromagnético prolonga a fase de crescimento celular, mostrando que o campo pode ser capaz de mudar o perfil da curva de crescimento do microrganismo e influenciar na produção de biomassa e na velocidade de crescimento ao longo do processo. Na Figura 6 observa-se que a curva de crescimento continua ascendente com cerca de 20 horas de fermentação nos experimentos magnetizados, enquanto nos experimentos controle dos mesmos experimentos, a curva entra ou está tendendo à fase estacionária de crescimento.

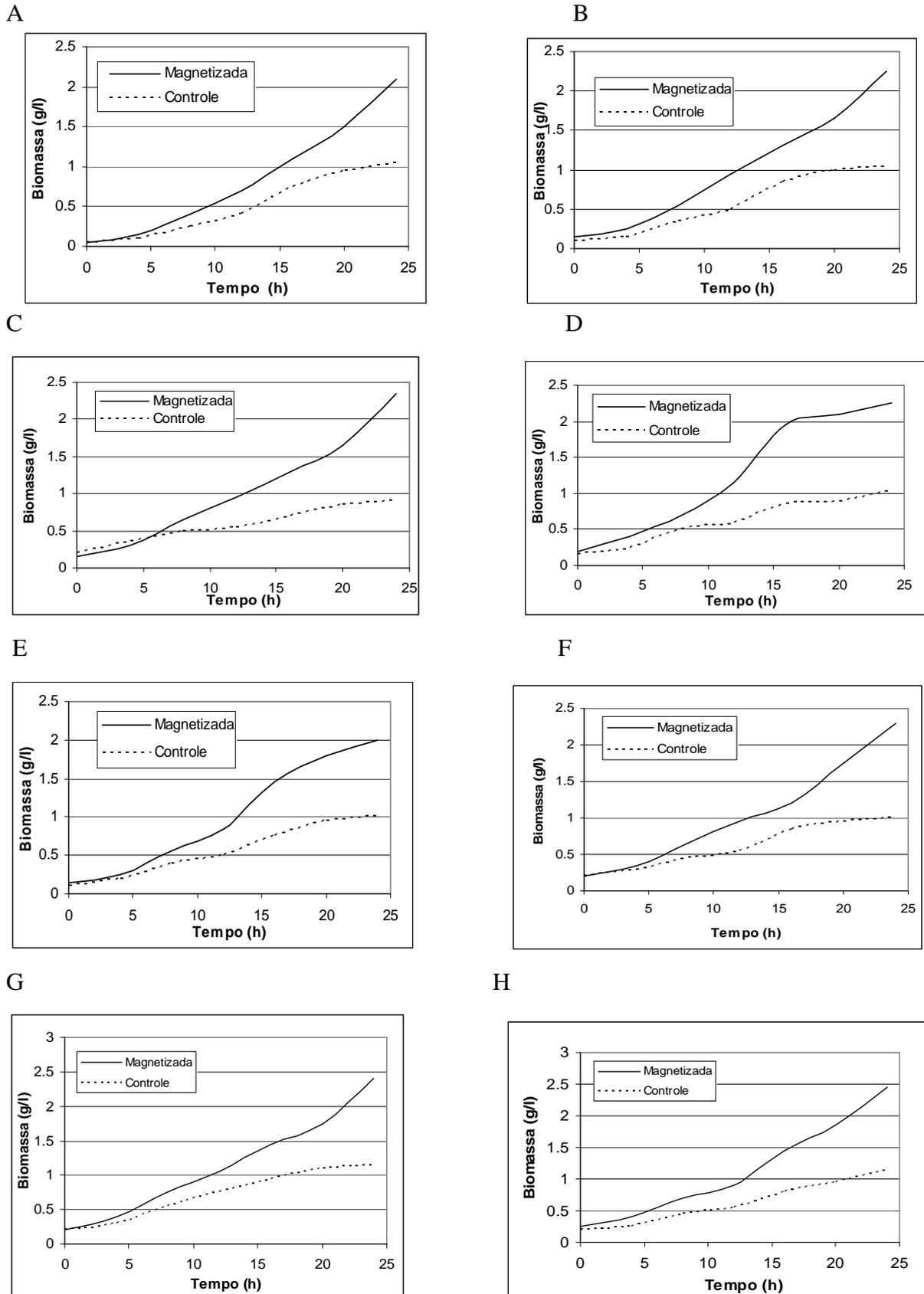


Figura 6. Curvas de crescimento de biomassa em função do tempo. A – Fermentação 1, B – Fermentação 2, C – Fermentação 3, D – Fermentação 4, E – Fermentação 5, F – Fermentação 6, G – Fermentação 7, H – Fermentação 8.

Ruiz Gómez e colaboradores (2004) aplicaram campo magnético estático e sinusoidal de 50 Hz (0.35 e 2.45 mT) em culturas de leveduras durante 24 e 72 h e não observaram alterações de crescimento na fase exponencial em relação às culturas não expostas. O crescimento celular foi monitorado por medida de densidade óptica a 600 nm. Os dados indicaram que o CM estático e sinusoidal de 50 Hz (0.35 e 2.45 mT) não induzem alterações no crescimento destas leveduras, estando este resultado em desacordo com os publicados previamente por Mehedintu e Berg, (1997).

No mesmo estudo anteriormente citado, Potenza e colaboradores (2004) observaram que a exposição ao campo magnético de 300 mT, durante 50 horas, fez com que as células expostas continuassem a proliferar enquanto as células controle entraram em fase estacionária, de forma que o platô não pôde ser observado até as 50 horas de exposição ao campo. Além disso, aqueles autores observaram expressões de clones genéticos nas células expostas ao campo, levando a considerar que o CME induz diferenças nas respostas metabólicas em relação ao metabolismo de carboidratos.

Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x)

Nas Tabelas de 7 a 14 estão apresentados os resultados de biomassa, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) medidas nos diferentes tempos de fermentação. A biomassa medida corresponde ao valor aferido no momento da pesagem das amostras e biomassa produzida foi obtida subtraindo-se o valor da biomassa final do valor inicial para cada medida no tempo.

Foi verificado que os valores de biomassa medida das amostras magnetizadas foram superiores aos valores encontrados nas amostras controle, sendo estatisticamente significante para as amostras coletadas às 12, 16, 20 e 24 horas de fermentação. A biomassa produzida também apresentou diferença estatística para as amostras das 12, 16, 20 e 24 horas com $p \leq 0,001$, confirmando que o campo magnético otimiza a produção de biomassa em leveduras.

Tabela 7. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 1. A = amostra controle, B = amostra magnetizada.

A

<i>Tempo(h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,05	0
4	0,05	0,1	0,25
8	0,2	0,25	0,18
12	0,35	0,4	0,10
16	0,7	0,75	0,12
20	0,9	0,95	0,05
24	1,0	1,05	0,02

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,05	0
4	0,1	0,15	0,25
8	0,35	0,4	0,17
12	0,65	0,7	0,11
16	1,05	1,1	0,09
20	1	1,5	-0,01
24	2,05	2,1	0,12

Tabela 8. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 2. A = amostra controle, B = amostra magnetizada

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,1	0
4	0,05	0,15	0,25
8	0,25	0,35	0,2
12	0,4	0,5	0,09
16	0,75	0,85	0,11
20	0,9	1	0,04
24	0,95	1,05	0,01

B

<i>Tempo(h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,15	0
4	0,1	0,25	0,25
8	0,4	0,55	0,18
12	0,8	0,95	0,12
16	1,15	1,3	0,07
20	1,5	1,65	0,05
24	2,1	2,25	0,07

Tabela 9. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 3. A = amostra controle, B = amostra magnetizada.

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,15	0,35	0,25
8	0,3	0,5	0,12
12	0,35	0,55	0,03
16	0,5	0,7	0,07
20	0,65	0,85	0,05
24	0,7	0,9	0,01

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,15	0
4	0,15	0,3	0,25
8	0,5	0,65	0,17
12	0,8	0,95	0,09
16	1,15	1,3	0,07
20	1,5	1,65	0,05
24	2,2	2,35	0,07

Tabela 10. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 4, A = amostra controle, B = amostra magnetizada

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,15	0
4	0,1	0,25	0,25
8	0,35	0,5	0,17
12	0,45	0,6	0,05
16	0,7	0,85	0,08
20	0,75	0,9	0,01
24	0,9	1,05	0,04

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,2	0,4	0,25
8	0,5	0,7	0,15
12	0,95	1,15	0,11
16	1,75	1,95	0,11
20	1,9	2,1	0,01
24	2,05	2,25	0,01

Tabela 11. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 5. A = amostra controle, B = amostra magnetizada

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,1	0
4	0,1	0,2	0,25
8	0,3	0,4	0,16
12	0,4	0,5	0,06
16	0,65	0,75	0,09
20	0,85	0,95	0,05
24	0,9	1	0,01

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,15	0
4	0,1	0,25	0,25
8	0,4	0,55	0,18
12	0,7	0,85	0,10
16	1,3	1,45	0,11
20	1,65	1,8	0,05
24	1,85	2	0,02

Tabela 12. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 6. A = amostra controle, B = amostra magnetizada.

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,1	0,3	0,25
8	0,25	0,45	0,15
12	0,35	0,55	0,07
16	0,65	0,85	0,11
20	0,75	0,95	0,03
24	0,8	1	0,01

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,15	0,35	0,25
8	0,45	0,65	0,16
12	0,75	0,95	0,10
16	1	1,2	0,06
20	1,55	1,75	0,08
24	2,1	2,3	0,06

Tabela 13. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 7. A = amostra controle, B = amostra magnetizada.

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/l)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,1	0,3	0,25
8	0,35	0,55	0,17
12	0,55	0,75	0,09
16	0,75	0,95	0,06
20	0,9	1,1	0,04
	0,95	1,15	0,01

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,2	0,4	0,25
8	0,55	0,75	0,15
12	0,85	1,05	0,08
16	1,25	1,45	0,08
20	1,55	1,75	0,04
24	2,2	2,4	0,07

Tabela 14. Resultados de biomassa medida, biomassa produzida e velocidade específica de crescimento celular (μ_x) da Fermentação 8. A = amostra controle, B = amostra magnetizada.

A

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,2	0
4	0,05	0,25	0,25
8	0,25	0,45	0,20
12	0,35	0,55	0,07
16	0,6	0,8	0,10
20	0,75	0,95	0,05
24	0,95	1,15	0,05

B

<i>Tempo (h)</i>	<i>Biomassa produzida (g/L)</i>	<i>Biomassa medida (g/L)</i>	<i>Velocidade específica (μ_x)</i>
0	0	0,25	0
4	0,2	0,4	0,25
8	0,55	0,7	0,15
12	0,85	0,9	0,08
16	1,25	1,45	0,08
20	1,55	1,85	0,04
24	2,2	2,45	0,07

As Figuras de 7 a 14 a seguir apresentam as curvas de velocidade de crescimento das amostras controle e magnetizada obtidas para cada fermentação.

A velocidade específica de crescimento é um parâmetro de controle essencial na produção industrial de fermento por leveduras (HOEK *et al*; 1998).

Varela e colaboradores (2004) propõem que a velocidade da fermentação é em função de dois componentes: um componente intracelular (a propriedade do metabolismo da célula) e um componente celular (que é dependente da massa celular ativamente em fermentação). A velocidade de crescimento de leveduras pode ser afetada por conteúdo de nutrientes limitado, temperaturas extremas e a toxicidade de etanol.

Regenberg e colaboradores (2006) afirmam que mudanças na velocidade específica de crescimento têm impactos substanciais nos níveis de transcrição genética em *S. cerevisiae*, sugerindo que a velocidade de crescimento pode ter papel importante na resposta da célula ao estresse.

A velocidade específica de crescimento na maioria dos experimentos mostrou-se maior nas amostras magnetizadas, o que fica bem evidenciado na análise da Figura 17 da Fermentação 7. A inclinação da reta corresponde velocidade de crescimento de biomassa, sendo evidenciada pela representação da letra “a” na equação da reta : $ax + b$, sendo o valor de “a” diretamente proporcional à velocidade. A média dos valores de “a” foi calculada para as amostras controle e magnetizada e os valores obtidos foram de 0,040 e 0, 147 respectivamente. Portanto, os maiores valores de “a” são encontrados nas amostras magnetizadas, como pode ser evidenciado pelos gráficos abaixo das amostras magnetizadas possuírem maiores inclinações da reta. Na Tabela 41 no Apêndice, encontram-se ilustrados os valores de “a” para as amostras controle e magnetizada das fermentações realizadas,

A análise da velocidade através das Figuras de 7 a 14, confirma os achados anteriores de que o crescimento das amostras controle diminui anteriormente à amostra magnetizada, tendo a magnetizada, apresentando prolongamento de crescimento a partir das 20 horas de fermentação. Esse fato pode ser interpretado como um efeito de aceleração do campo magnético sobre o metabolismo celular, podendo vir a ser um instrumento de uso biotecnológico para produção de biomassa de leveduras. A importância desse achado, pode ser justificada pela afirmação de Ferreira (1995) que diz que o objetivo geral de um processo biotecnológico com crescimento microbiano é minimizar a duração da fase de latência e maximizar a taxa de crescimento e a duração da fase exponencial.

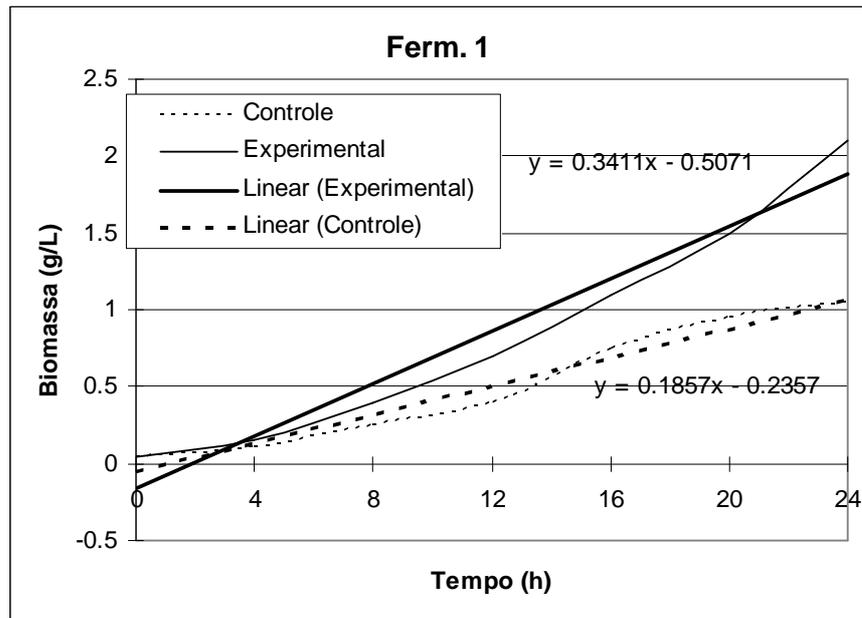


Figura 7. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 1,

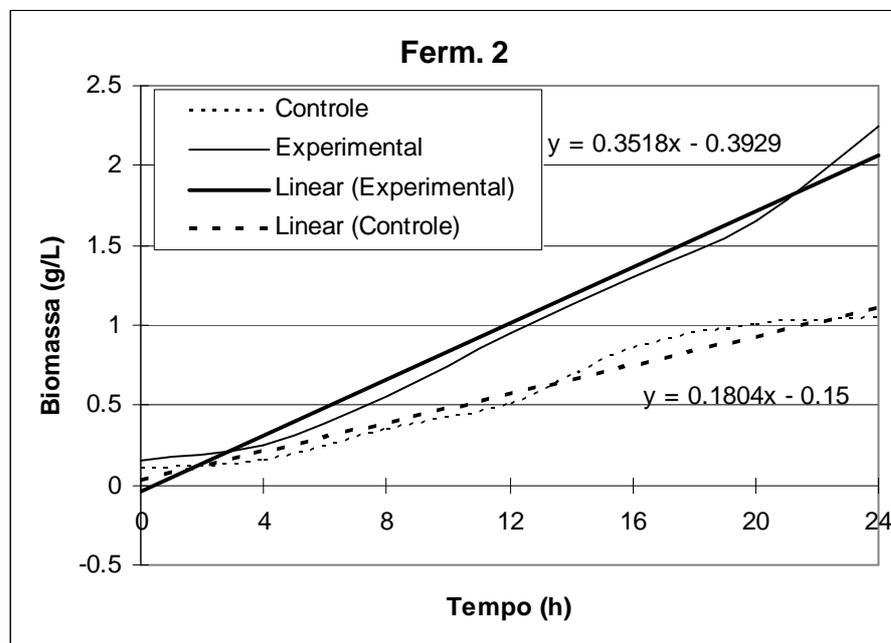


Figura 8. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 2,

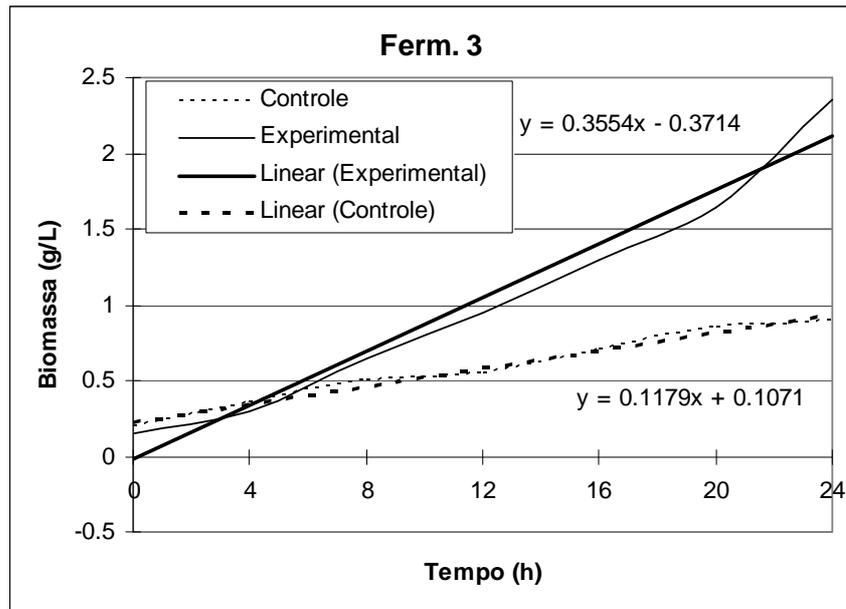


Figura 9. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 3,

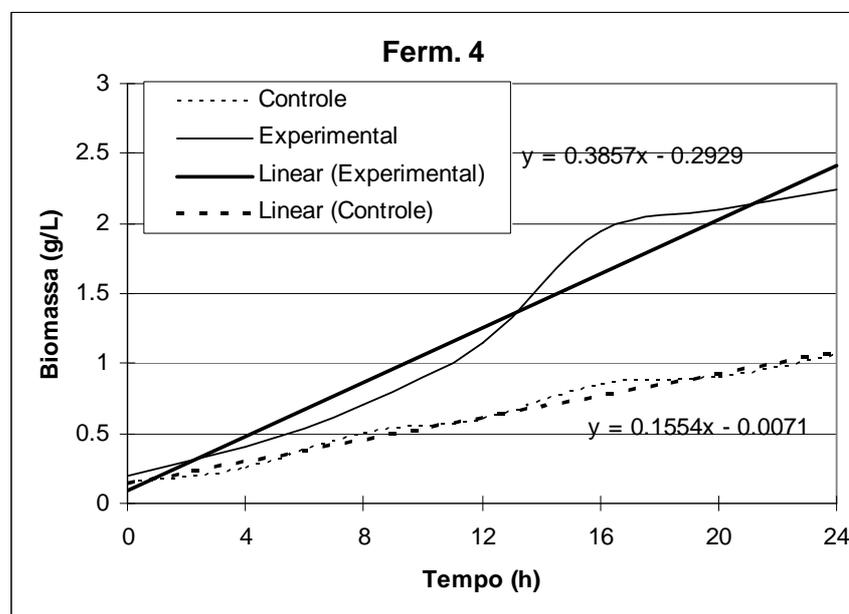


Figura 10. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 4.

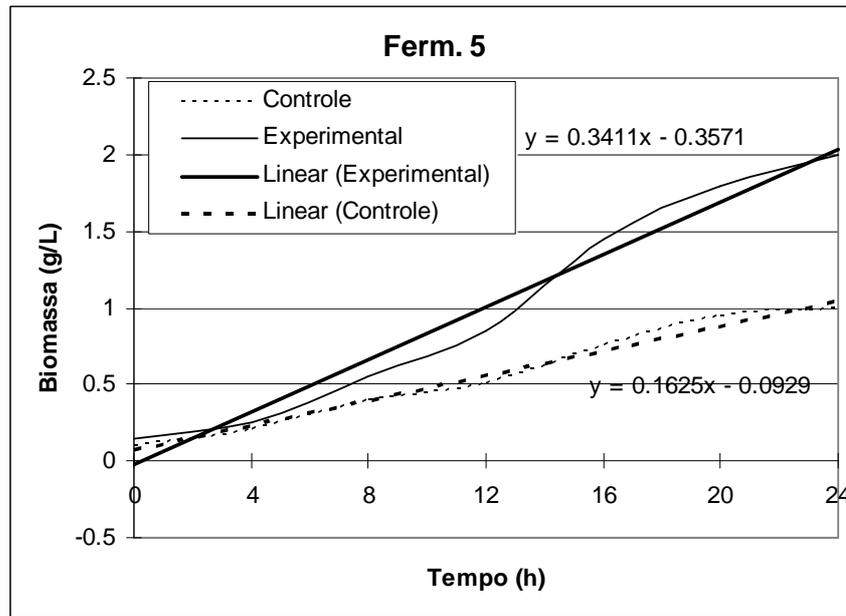


Figura 11. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 5.

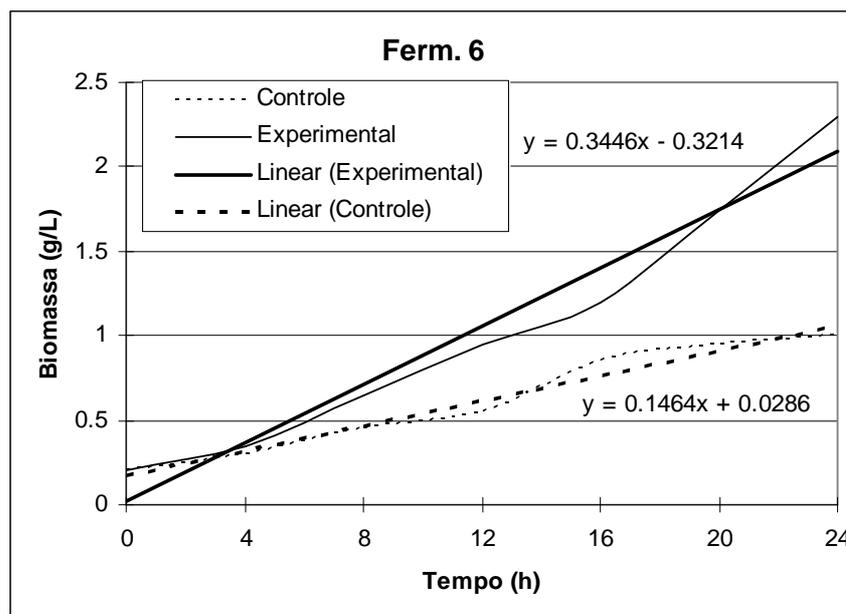


Figura 12. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 6.

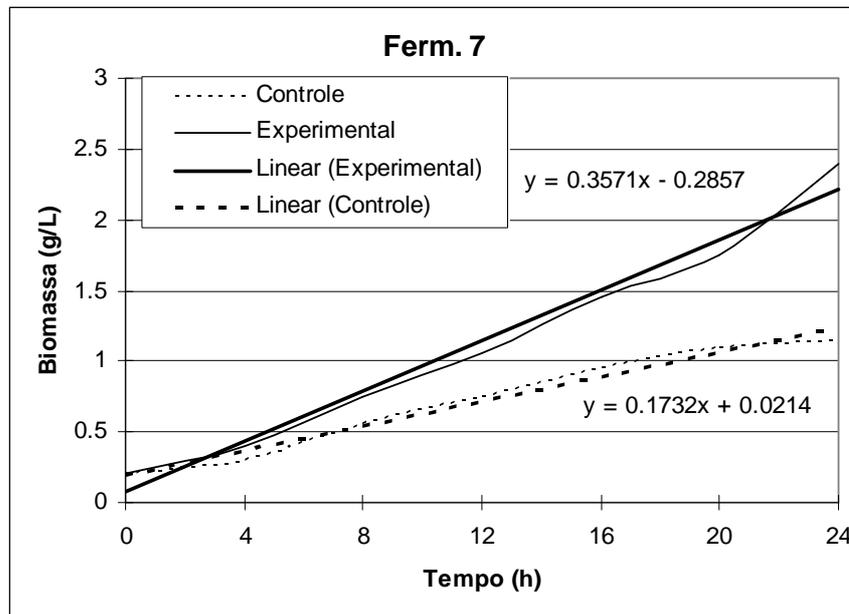


Figura 13. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 7.

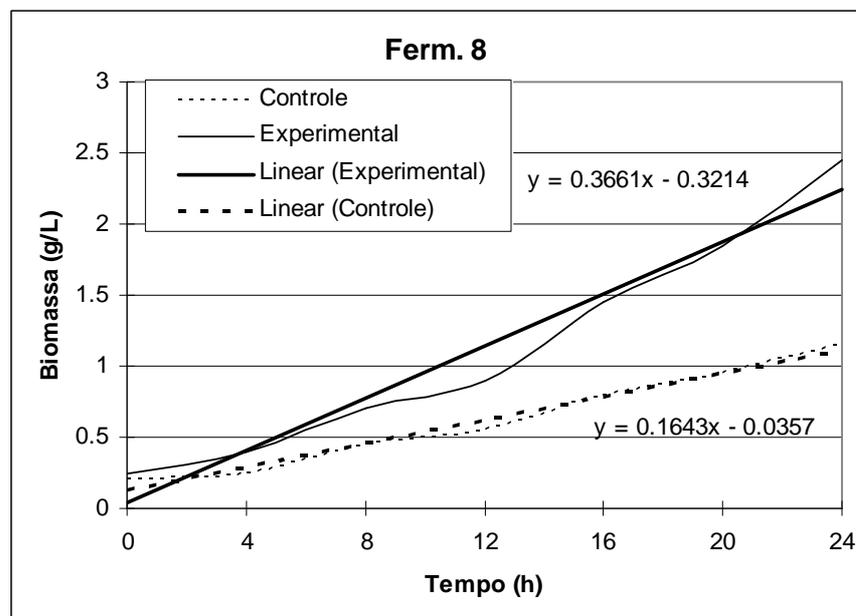


Figura 14. Curvas de crescimento em função do tempo da Fermentação 8.

Resultados da Contagem de células, expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

As Tabelas de 15 a 22 apresentam o número das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) do mosto fermentado. Foram observados valores superiores na contagem das amostras magnetizadas em comparação as amostras controle, na maioria dos tempos de fermentação, sendo a diferença significativa nas amostras coletadas das 16 e 20 horas, com valores de $p = 0,004$ e $0,002$ respectivamente,

Tabela 15. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 1.

<i>Tempo</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	$1,6 \times 10^5$	2×10^5
4	$1,9 \times 10^5$	7×10^5
8	$1,4 \times 10^6$	3×10^6
12	4×10^6	$2,2 \times 10^7$
16	3×10^7	$7,5 \times 10^7$
20	4×10^6	$5,6 \times 10^6$
24	$3,5 \times 10^6$	6×10^6
$p > 0,005$		

Tabela 16. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 2.

<i>Tempo (h)</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
4	$1,9 \times 10^5$	3×10^5
8	$1,2 \times 10^6$	3×10^6
12	2×10^6	$4,7 \times 10^6$
16	3×10^6	1×10^7
20	2×10^6	7×10^6
24	1×10^6	3×10^6
p >0,005		

Tabela 17. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 3.

<i>Tempo (h)</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	1×10^5	$1,2 \times 10^5$
4	$1,5 \times 10^5$	3×10^5
8	4×10^5	6×10^5
12	1×10^6	6×10^6
16	2×10^6	$1,5 \times 10^7$
20	3×10^6	2×10^7
24	1×10^6	4×10^7
p >0,005		

Tabela 18. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 4.

<i>Tempo</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	2×10^5	2×10^5
4	$2,3 \times 10^5$	4×10^5
8	3×10^6	$5,6 \times 10^5$
12	1×10^6	3×10^6
16	3×10^6	2×10^7
20	$1,2 \times 10^6$	1×10^7
24	1×10^6	6×10^6
p >0,005		

Tabela 19. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 5.

<i>Tempo</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	1×10^5	1×10^5
4	$1,3 \times 10^5$	2×10^5
8	3×10^5	1×10^6
12	1×10^6	2×10^6
16	$3,5 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$
20	3×10^6	1×10^7
24	$1,5 \times 10^6$	7×10^6
p >0,005		

Tabela 20. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 6.

<i>Tempo</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	1×10^5	$1,3 \times 10^5$
4	$1,8 \times 10^5$	4×10^5
8	5×10^5	1×10^6
12	1×10^6	4×10^6
16	$2,7 \times 10^6$	5×10^7
20	2×10^6	1×10^7
24	2×10^6	6×10^6
p > 0,005		

Tabela 21. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 7.

<i>Tempo (h)</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
4	2×10^5	3×10^5
8	1×10^6	2×10^6
12	$1,4 \times 10^6$	5×10^6
16	3×10^6	3×10^7
20	$2,8 \times 10^6$	1×10^7
24	1×10^6	5×10^6
p > 0,005		

Tabela 22. Resultados da Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em função do tempo da Fermentação 8 .

<i>Tempo</i>	<i>UFC Controle (UFC/mL)</i>	<i>UFC magnetizada (UFC/mL)</i>
0	1×10^5	1×10^5
4	$3,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$
8	5×10^5	1×10^6
12	1×10^6	$4,9 \times 10^6$
16	$2,2 \times 10^6$	7×10^6
20	3×10^6	4×10^7
24	1×10^6	7×10^6
p >0,005		

Novak e colaboradores (2006) afirmaram que a contagem por UFC é o melhor método para avaliar as mudanças no crescimento de *S. cerevisiae*. Estes mesmos autores relataram efeitos inibitórios no crescimento de leveduras após exposição ao campo magnético de 10 mT, durante 60 minutos a temperatura de 24 a 26 graus. Foi observado, que a inibição iniciou-se imediatamente após a cultura de levedura ser exposta ao campo magnético. Dessa forma, os autores sugerem que o campo magnético, ou a corrente induzida por ele, destrói parte das leveduras (talvez as mais sensíveis a campos externos) e o restante das células sobrevive e continua seu desenvolvimento sem qualquer distúrbio.

Fojt e colaboradores (2004) compararam o efeito da exposição de CM em três linhagens de bactérias: *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* e *staphylococcus aureus* a intensidade de campo de 10 mT, 50 Hz, durante 30 minutos, para estudo da viabilidade celular através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Estes autores observaram que a viabilidade celular diminui com o maior tempo de exposição, sendo o efeito do campo dependente da linhagem bacteriana utilizada. O maior efeito da exposição ao campo e da diminuição da viabilidade foi observado em *E. coli*, concluindo que a diminuição na UFC inicia imediatamente após aplicação do campo. Os autores creditam o fato da diminuição exponencial do número de UFC ao fato do campo magnético afetar o transporte iônico no interior da célula resultando em mudanças biológicas nos organismos vivos, além de possível formação de radicais livres decorrentes da exposição.

Baseando-se nos resultados encontrados neste trabalho, pode-se observar que o campo magnético de intensidade de 220 mT acarreta aumento no número de unidades formadoras de colônias, que pode ser observado a partir das 4 horas de exposição, alcançando ao final das 24 horas de fermentação, um aumento de até 4 vezes o valor da amostra controle, como pode ser evidenciado na Tabela 17 da Fermentação 3. Essa afirmação sugere que o campo eletromagnético tenha efeito estimulador no crescimento celular, pelo menos, na intensidade utilizada, contrastando com os achados anteriores. Duas possibilidades poderiam explicar as diferenças encontradas: é possível que o efeito sobre as leveduras varie em função da intensidade do campo e também de acordo com Fojt e colaboradores (2004), a linhagem utilizada.

Resultados da produção de etanol, de consumo de glicose e de rendimento bioquímico

Os valores da produção de etanol, de consumo de glicose e de rendimento bioquímico para cada fermentação realizada estão representados na Tabela 23.

A análise de etanol através de Cromatografia Gasosa consistiu da aferição do valor nos tempos 0 e 24 horas de fermentação. A produção de etanol foi obtida subtraindo-se o valor final do etanol inicial. Os resultados de etanol foram submetidos a análise estatística do teste t de Student após aplicação do princípio de exclusão de Chauvernet. Após análise dos resultados, verificou-se que, estatisticamente, a diferença na produção de etanol entre a fermentação controle e a magnetizada não foi significativa, apesar de serem observados valores superiores da produção de etanol na maioria das amostras submetidas ao campo magnético.

O consumo de glicose foi quantificado através de teste enzimático de glicose. Da mesma forma que para produção de etanol, os valores seguiram o princípio de exclusão de Chauvernet e posterior aplicação do teste t de Student. Os dados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados amostra controle e magnetizada, com $p \leq 0,05$. Esse fato justifica-se pelo fato das leveduras magnetizadas apresentarem aumento de sua população (verificado através das UFC/mL e biomassa medida e produzida) em relação as amostras controle, de forma que as células em crescimento se utilizaram da glicose como fonte de carbono; comprovando o efeito do campo magnético sobre o metabolismo celular das leveduras.

De acordo com Lagunas (1986), o metabolismo de glicose e oxigênio em *S. cerevisiae* pode ser relacionado ao efeito Pasteur, que é definido como a inibição do metabolismo

fermentativo pelo oxigênio, sendo este fenômeno observado nestas leveduras em fluxos glicolíticos baixos.

Tabela 23. Resultados da produção de etanol, consumo de glicose e rendimento bioquímico para as fermentações realizadas.

<i>Valores médios das Fermentações realizadas</i>	<i>Consumo de glicose (g/L)</i>	<i>Produção de etanol (g/L)</i>	<i>Rendimento Bioquímico (%)</i>
Amostras Controle	51,7	11,4	47,8
Amostras Magnetizadas	81,0	13,6	38,3

Os dados referentes ao rendimento bioquímico de *S. cerevisiae* demonstram que as fermentações realizadas não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras com valor de $p = 0,53$.

A análise do rendimento bioquímico revela que a conversão glicose em etanol nas culturas estimuladas magneticamente se mostrou diminuída, obtendo valores cuja média foi 27% inferior à das culturas controle. Esta afirmação demonstra que em nossa pesquisa o campo magnético exerceu efeito maior na produção de biomassa, desviando o metabolismo celular para produção de células em detrimento à produção de etanol.

Análise da Imagem

Foram calculados diversos parâmetros morfológicos das leveduras, tanto isoladas como aglomeradas. Os resultados apresentados selecionados objetivaram mostrar a estrutura morfológica das leveduras e a reprodutibilidade das mesmas com e sem influência do campo magnético.

Dos oito experimentos realizados, foram selecionados três para se proceder ao estudo através do tratamento de imagens. A seleção foi baseada na reprodutibilidade do aumento da produção de etanol com as amostras que obtiveram média de 19% a mais de álcool em relação ao controle. Foram analisadas então as imagens das fermentações 5, 6 e 8 e analisadas as

amostras controle e magnetizadas. Ressalta-se que esta seleção foi realizada antes do tratamento estatístico dos resultados de produção de álcool.

Cada pacote de imagens foi tratado separadamente pelo programa Levures.sc5, que funciona em ambiente Visilog 5 (Noesis, França), o qual foi desenvolvido pela Prof^a, Marie Noelle Pons (ENSIC – Nancy/França). Os dados foram tratados em Excel e fez-se uma adimensionalização dos resultados, dividindo-se os resultados dos parâmetros dos experimentos com campo magnético pelos resultados do controle (sem CM).

Pode-se observar através da Figura 15 que a diferença entre o diâmetro equivalente das leveduras submetidas ao campo magnético em relação às do controle (sem campo) são, em sua maioria, inferiores à 5%, estando assim dentro do erro do programa, o que significa em não ter sido observado diferença estatística,

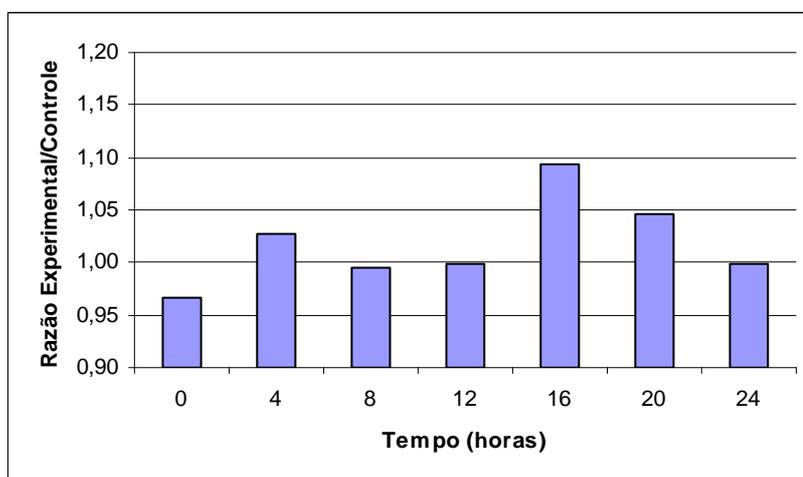


Figura 15. Variação relativa do diâmetro equivalente (Deq) magnetizada/ Deq controle ao longo da fermentação,

Em experimentos anteriores, Da Motta e colaboradores (2003) também verificaram que o campo não influenciava o diâmetro equivalente das leveduras. Contudo eles não monitoraram o consumo de açúcar, nem o peso seco e tão pouco a produção de etanol, para ver se houve alguma diferença entre os experimentos. Neste caso, os resultados mostraram aumento médio na produção de álcool da ordem de 19 %, apesar de não apresentar valor estatístico significativo,

Para a relação entre o comprimento e a largura, também não foram verificadas diferenças significativas (Figura 16). Todavia, para o número de brotos (Figura 24), observam-se diferenças superiores à 5,0 %. Esta informação comprova os resultados obtidos a partir do peso seco, nos quais a massa de leveduras magnetizadas apresentou um valor superior ao do controle.

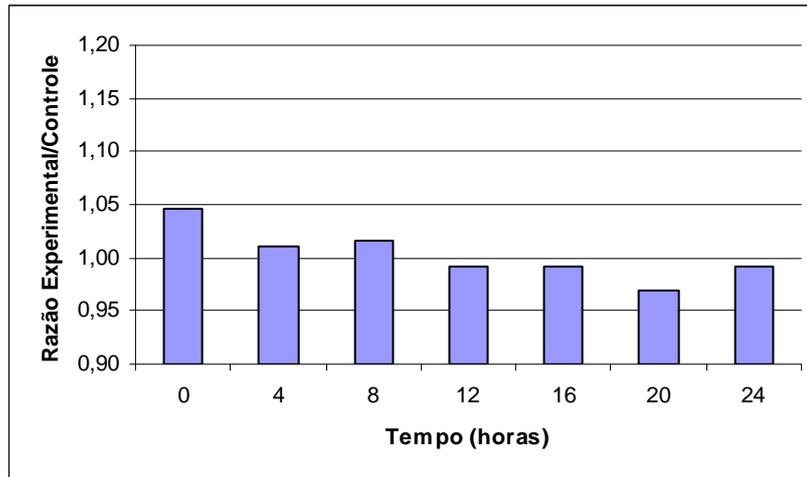


Figura 16. Variação relativa do razão Comprimento (FM)/Largura (Fm) magnetizada / controle ao longo da fermentação.

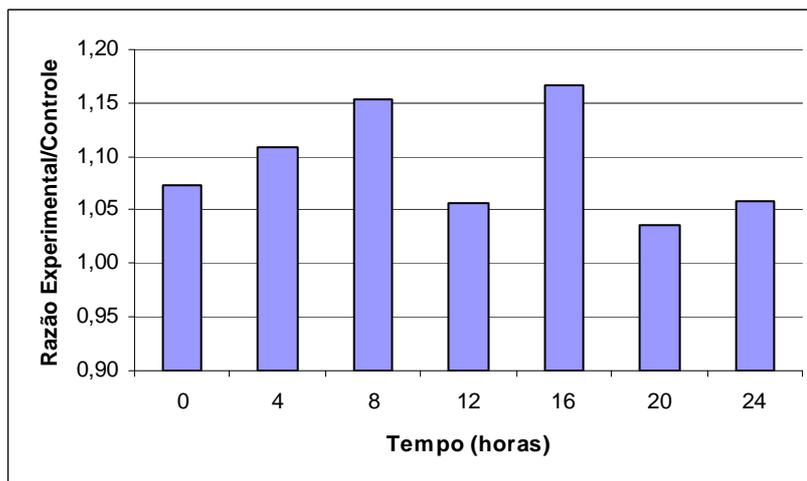


Figura 17. Variação relativa do Número de brotos (Nb) magnetizada / controle ao longo da fermentação.

Desta maneira, pode-se concluir que o aumento da produção de álcool quando a fermentação está sob ação do campo magnético, não é devida a modificações morfológicas. Assim, a ação do campo deverá estar agindo sob aspectos metabólicos, como o aumento da reprodução ou através do aumento na produção de enzimas. Isto parece ter importância quanto à sua aplicação industrial, visto a magnetização promover aumento da produção de inóculo em tempo menor, otimizando a aplicação do campo magnético na prática industrial e biotecnológica.

CONCLUSÃO

A forma de magnetização teve influência marcante no crescimento da levedura *S. cerevisiae*, favorecendo o aumento de biomassa e aumento no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

A aplicação desta intensidade de magnetização resultou em aumento do consumo glicolítico pela amostra magnetizada confirmando os achados anteriores. No entanto, a produção de etanol não obteve aumento significativo, sugerindo que o campo deve desviar foco do metabolismo celular para produção de células e não de etanol.

Para isto, a aplicação de campo eletromagnético pode ser usada para o aumento da velocidade de crescimento e aumento de biomassa, tendo potencial aplicação em biotecnologia.

A necessidade de maiores estudos a fim de investigar os efeitos provocados pelo campo magnético na atividade metabólica e de uso deste processo em grande escala, são sugestões para trabalhos futuros.

APÊNDICE

Tabelas com resultados de variação de biomassa durante as fermentações.

Tabela 3. Resultados da variação de biomassa com 12 horas de fermentação.

<i>Fermentações</i>	<i>Biomassa controle</i>	<i>Biomassa magnetizada</i>
1	0,4	0,7
2	0,5	0,95
3	0,55	0,95
4	0,6	1,15
5	0,5	0,85
6	0,55	0,95
7	0,75	1,05
8	0,55	0,9
Média	0,55	0,93
Desvio padrão	0,10	0,13
$P \leq 0,001$		

Tabela 4. Resultados da variação de biomassa com 16 horas de fermentação.

<i>Fermentações</i>	<i>Biomassa controle</i>	<i>Biomassa magnetizada</i>
1	0,75	1,1
2	0,85	1,3
3	0,7	1,3
4	0,85	1,95
5	0,75	1,45
6	0,85	1,2
7	0,95	1,45
8	0,8	1,45
Média	0,81	1,4
Desvio Padrão	0,07	0,25
$p \leq 0,005$		

Tabela 5. Resultados da variação de biomassa com 20 horas de fermentação.

<i>Fermentações</i>	<i>Biomassa controle</i>	<i>Biomassa magnetizada</i>
1	0,95	1,5
2	1	1,65
3	0,85	1,65
4	0,9	2,1
5	0,95	1,8
6	0,95	1,75
7	1,1	1,75
8	0,95	1,85
Média	0,95	1,75
Desvio Padrão	0,07	0,17
$p \leq 0,001$		

Tabela 6. Resultados da variação de biomassa com 24 horas de fermentação.

<i>Fermentações</i>	<i>Biomassa controle</i>	<i>Biomassa magnetizada</i>
1	1,05	2,25
2	1,05	2,25
3	0,9	2,35
4	1,05	2,25
5	1	2
6	1	2,3
7	1,15	2,4
8	1,5	2,45
Média	1,08	2,28
Desvio Padrão	0,18	0,13
$p \leq 0,001$		

Tabela 25. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 1

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,05	0,05
4	0,1	0,15
8	0,25	0,4
12	0,4	0,7
16	0,75	1,1
20	0,95	1,5
24	1,05	2,1
Média	0,50	0,85
Desvio padrão	0,40	0,75
p >0,005		

Tabela 26. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 2.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,1	0,15
4	0,15	0,25
8	0,35	0,55
12	0,5	0,95
16	0,85	1,3
20	1	1,65
24	1,05	2,25
Média	0,57	1,01
Desvio padrão	0,39	0,59
p >0,005		

Tabela 27. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 3.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,2	0,15
4	0,35	0,3
8	0,5	0,65
12	0,55	0,95
16	0,7	1,3
20	0,85	1,65
24	0,9	2,35
Média	0,57	1,05
Desvio Padrão	0,25	0,78
p >0,005		

Tabela 28. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 4.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,15	0,2
4	0,25	0,4
8	0,5	0,7
12	0,6	1,15
16	0,85	1,95
20	0,9	2,1
24	1,05	2,25
Média	0,61	1,25
Desvio Padrão	0,33	0,85
p >0,005		

Tabela 29. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 5.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,1	0,15
4	0,2	0,25
8	0,4	0,55
12	0,5	0,85
16	0,75	1,45
20	0,95	1,8
24	1	2
Média	0,55	1,00
Desvio padrão	0,35	0,74
p >0,005		

Tabela 30. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 6.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,2	0,2
4	0,3	0,35
8	0,45	0,65
12	0,55	0,95
16	0,85	1,2
20	0,95	1,75
24	1	2,3
Média	0,55	1,00
Desvio Padrão	0,35	0,74
p >0,005		

Tabela 31. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 7.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,2	0,2
4	0,3	0,4
8	0,55	0,75
12	0,75	1,05
16	0,95	1,45
20	1,1	1,75
24	1,15	2,4
Média	0,61	1,05
Desvio Padrão	0,32	0,75
P >0,005		

Tabela 32. Resultados de variação de biomassa durante a Fermentação 8.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Peso seco controle (g/L)</i>	<i>Peso seco magnetizada</i>
0	0,2	0,25
4	0,25	0,4
8	0,45	0,7
12	0,55	0,9
16	0,8	1,45
20	0,95	1,85
24	1,15	2,45
Média	0,71	1,14
Desvio padrão	0,37	0,77
p >0,005		

As tabelas abaixo mostram os resultados da variação de pH nas fermentações realizadas.

Tabela 33. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 1.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,57	4,49
8	3,61	3,69
12	3,31	3,26
16	3,2	2,85
20	2,95	2,72
24	3,38	3,32
Média	3,60	3,48
Desvio Padrão	0,58	0,64
p > 0,005		

Tabela 34. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 2.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,75	4,98
4	4,43	4,28
8	3,98	3,83
12	3,74	3,65
16	3,57	3,52
20	3,47	3,39
24	3,29	3,21
Média	3,89	3,83
Desvio Padrão	0,53	0,60
p > 0,005		

Tabela 35. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 3.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,5	4,36
4	4,04	3,85
8	3,26	3,03
12	3,05	2,88
16	2,89	2,68
20	2,68	2,59
24	2,63	2,51
Média	3,29	3,12
Desvio Padrão	0,71	0,70
p >0,005		

Tabela 36. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 4.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,36	4,27
4	3,95	3,81
8	3,14	3,33
12	2,83	2,59
16	2,59	2,4
20	2,32	2,3
24	2,43	2,31
Média	3,08	3,00
Desvio Padrão	0,78	0,80
p >0,005		

Tabela 37. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 5.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,18	4,21
4	3,25	4,2
8	3,49	3,33
12	3,04	3,06
16	2,76	2,75
20	2,96	2,81
24	2,82	2,53
Média	3,21	3,27
Desvio Padrão	0,49	0,68
p >0,005		

Tabela 38. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 6.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,56	4,4
4	4,1	4
8	3,6	3,2
12	3,4	2,93
16	2,92	2,66
20	2,88	2,54
24	2,71	2,43
Média	3,45	3,16
Desvio Padrão	0,68	0,75
p >0,005		

Tabela 39. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 7.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,75	4,73
4	4,5	4,2
8	4	3,94
12	3,85	3,52
16	3,1	2,87
20	2,84	2,53
24	2,73	2,4
Média	3,68	3,45
Desvio Padrão	0,80	0,88
p >0,005		

Tabela 40. Resultados de variação de pH durante a Fermentação 8.

<i>Tempo (h)</i>	<i>pH controle</i>	<i>pH Magnetizada</i>
0	4,4	4,6
4	3,95	4
8	3,78	3,7
12	3,66	3,2
16	3,42	2,96
20	3	2,84
24	2,55	2,4
Média	3,53	3,38
Desvio Padrão	0,61	0,75
p >0,005		

A tabela abaixo mostra os valores de “a” encontrados nos experimentos para a equação da reta $ax + b$, aplicada na variação da velocidade de crescimento das amostras nas fermentações realizadas.

Tabela 41. Valores de “a” da equação da reta das curvas de velocidade das Fermentações realizadas.

<i>Fermentações</i>	<i>Amostra controle</i>	<i>Amostra Magnetizada</i>
1	0,0464	0,0772
2	0,0451	0,0879
3	0,0295	0,0888
4	0,0388	0,0964
5	0,0406	0,0853
6	0,0366	0,0862
7	0,0433	0,0893
8	0,0411	0,0893
Média	0,040	0,147

Tabela 42. Resultados da análise da produção de etanol para cada fermentação realizada.

<i>Fermentações</i>	<i>Produção de etanol (g/l) –</i>	<i>Produção etanol (g/l)– magnetizada</i>
Fermentação 1	6,3	5,63
Fermentação 2	5,64	9,78
Fermentação 3	10,95	11,55
Fermentação 4	16,58	16,93
Fermentação 5	23,35	27,71
Fermentação 6	13,64	16,14
Fermentação 7	4,71	8,44
Fermentação 8	10,6	12,9
Média	11,47	13,63
Desvio Padrão	6,81	6,82
p > 0,005		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENORE, S., *et al.* Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Appl Microbiol Biotechnol** 63:537–542, 2004.

ALTINTAS M. M., *et al.* Improvement of ethanol production from starch b recombinant yeast through manipulation of environmental factors. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 640–647, 2002.

AMARA S., *et al.* Zinc supplementation ameliorates static magnetic field-induced oxidative stress in rat tissues. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Article in Press, 2006.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A. ; BORZANI, W. **Biotecnologia : alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgarg Blucher Ltda, v. 5, p. 1-43, 2001.

AZENHA, M., VASCONCELOS, M. T., MORADAS-FERREIRA, P. The influence of Cu concentravion on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 90 (2): 163-167, 2000.

BLANK M. Biological effects of environmental electromagnetic fields: molecular mechanisms. **BioSystems**, 35, 175-178, 1995.

BININGER D. M., UNGVICHIAN V. Effects of 60 HZ Ac magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 43, 83-89, 1997 .

BOTSTEIN D., FINK G.R. “Yeast:” an organism for modern biology. **Science**, 240, 1439 – 1443, 1988.

CHEN, K. C., VAL, J., GORFF, B. Kinetic Analysis of a Molecular Model of the Budding Yeast Cell Cycle. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 11, 369–391, January 2000.

COOPER, G.M. The cell: a molecular approach. Cap 14: The cell cycle p. 561, ASM Press, 1997.

DA MOTTA, M., PONS, M. N., ROCHE, N., *et al.* Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.8, n.13, p. 170-181, 2003.

DINI L.; ABRRO L. Bioeffects of moderate intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron** 36, 196- 217, 2005.

DUARTE, N.; PALSON, B. O., FU, P. Integrate analysis of metabolic phenophés in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genomics**,5: 63, 2004.

DUBOC, P., MAISON I., STOCKAR, U. Physiology of *Sacharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations. **Journal of Biotechnology**, 51: 57-72, 1996.

- FERREIRA, E. M. F. C. Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos. Dissertação para doutoramento em Engenharia Química na Faculdade de Engenharia Química na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 1995.
- FIEDLER U., GRÖBNER U., BERG H. Electrostimulation of yeast proliferation. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 38, 423-425, 1995.
- FOJT, L. *et al.* Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Lecleria adecarboxilata* and *Staphilococos aureus*. **Bioelectrochemistry** 63 : 337-341, 2004.
- FORSTER, J., *et al.* Genome –Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic network. **Genoma Research**, 13 (2). 244-253, 2003.
- FOSTER K.R. Mechanisms of interaction of extremely low frequency electric fields and biological systems. **Radiation Protection Dosimetry**, 106 (4), 301-310, 2003.
- FREITAS JUNIOR, R. A. Alterações induzidas por campos magnéticos contínuos não homogêneos em embriões de *Biomphalaria glabrata* (Sa 1818). Dissertação de Mestrado do curso de Mestrado em Biofísica. Recife, 2003.
- FRIEDL A. A., *et al.* Radiation- induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. **Genetics**, 148, 975-988, 1998.
- FRICK, O.; WITTMAN, C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative C¹³ analysis. **Microbial Cell Factories**, 4: 30, 2005.
- GASH A. P., *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, 11, 4241-4257, 2000.
- GLAZER, A.N. Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology. 2 ed., Freeman and Company, 1998.
- GLICK B. R., PASTERNAK J.J. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. CAP 2. Molecular Biotechnology Biological Systems . p. 13 a 18, 2^aed. Asm Press Washington , D.C., 1998.
- GOLDEMBERG J. *et al.* Ethanol learning curve - the Brazilian experience. **Biomass Bioenergy**, 26: 301- 304, 2004.
- HADJILOUCAS S., CHAHAL M.S., BOWEN J.W. Preliminary results on the non-thermal effects of 200-350 GHz radiation on the growth rate of *S. cerevisiae* cells in microcolonies. **Physics in Medicine and Biology**, 47, 3831-3839, 2002.
- HAROLD, F.M. To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. **Microbiol. Rev.** ,54, 381-431, 1990.

- HATZIS C., PORRO D. Morphological-structured models of growing budding yeast populations. **Journal of Biotechnology**. Article in Press, 2006.
- HERMAN P. K. Stationary phase in yeast. **Current Opinon in Microbiology**, 5: 602-607, 2002.
- HOEK, P. V. *et al.* Effect of specific growth rate on fermentative capacity of Baker yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, nov., 4226-4233, 1998.
- IKEHATA M., *et al.* Mutagenicity and co-mutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay. **Mutation Research** 427, 147-156, 1999.
- INGRAM L. O. *et al.* Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. **Biotechnol. Bioeng.** 58, 204–214., 1998.
- IWASAKA M., IKEHATA M., MIYAKOSHIC J., UENO S. Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. **Bioelectrochemistry**, 65, 59 –68, 2004.
- JENNISON, M. W. The growth of bacteria, yeast, and molds in strong magnetic field. **Journal of Bacteriology**, 33, 15-16, 1937.
- JOHNSTON, L. H. Periodic events in the cell cycle. **Current Opinion in Cellular Biology** 2, 274-279, 1990.
- JORGENSEN, P., NISHIKAWA, J.L., *et al.* Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. **Science**, 297, 395-400, 2002.
- KIMBALL, G. C. The growth of yeast in magnetic field. **Journal of Bacteriology**, 35, 109-122, 1937.
- KRAUS, J. D.; CARVER, K.R. **Eletromagnetismo**; 2^aed; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.
- LACY, A. H., METCALFE J.C., HESKETH R. Biological responses to electromagnetic fields. **FASEB JOURNAL**, 12, 395-420, 1998.
- LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 2, 221-228, 1986.
- LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 45, 261-265, 1998.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. Vol 3., Processos Fermentativos e enzimáticos. Cap 1 Produção de etanol, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 593 pags, 2001.
- LIN, J. C. Early contributions to electromagnetic fields in living systems. In: **Advances in electromagnetic fields in living systems**, vol.1, New York : Plenum Press; 1994.

- LO CURTO, R. B.; TRIPODO, M. M. Yeast production from virgin grape marc. **Bioresour Technol**, 78: 5-9, 2001.
- LORD, P. G., WHEALS, A. E. Assymetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, 142, 808-818, 1980.
- LUCERI C., *et al.* Extremely low frequency electromagnetic fields do not affect DNA damage and gene expression profiles of yeast and human lymphocytes. **Radiation Research**, 164, 277-285, 2005.
- LUNA, C. L.; LOPES, C. E.; MASSARINI, G. Recovery of *Bacillus sphaericus* spores by Flocculation / Sedimentation and Floccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, 61-70, 2005.
- MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. **Bioelectromagnetism – Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields**; Oxford University Press; New York; 1995.
- MARQUES, T. A., SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência Tecnol. Alim. Campinas**, 24 (4): 532-535, 2004.
- McCANN J., DIETRICH F., RAFFERTY C. The genotoxic potencial of electric and magnetic fields: an update. **Mutation Research**, 411, 45-86, 1998.
- McKANE L., KANDEL J. **Microbiology – essentials and applications**. 2^a ed. McGraw – Hill, Inc, 1996.
- McLEAN M., ENGSTROM S., HOLCOMB R. Static Magnetic field for treatment of pain. **Epilepsy and Behavior** 2, 74-80, 2001.
- MEHEDINTU M., BERG H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 43, 67-70, 1997 .
- MIYAKOSHI J. The review of cellular effects of a static magnetic field. **Science and Technology of Advanced Material**, 7, 305-307, 2006.
- MIYAKOSHI J., *et al.* Increase in hypoxanthine – guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50 Hz magnetic fields. **Mutation Research**, 349, 109-114, 1996.
- MOORE, R. L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. **Canada Journal of Microbiology**, 25, 1145-1151, 1979.
- MORTIMER, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) Genome. **Genoma Research**, 10(4):403-409, 2000.

- MUNIZ, J. B. N. F. Influência da ação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biofísica, Recife 2002.
- NARENDRANATH, N. V., POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of Lactobacilli *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, 2239-2243, 2005.
- NOVÁK J. *et al.* Effects of low- frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, , article in press , 2006.
- NAKASONO S. *et al.* Effect of power frequency magnetic fields on genome-scale gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Radiation Research**, 160, 25 – 37, 2003.
- NAKASONO S.; SAIKI H. Effect of ELF magnetic fields on protein synthesis in *Escherichia coli* K12. **Radiation Research**, 154, 208-216, 2000.
- NGUYEN, H. T. T. *et al.* Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-glycerol 3- phosphate. **Metabolic Engineering**, 6, 155-163, 2004.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, 34-50, 2000.
- PANAGAPOULOS, D. J., *et al.* A mechanism for action of oscillating electric fields on cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 272, 634-640, 2000.
- PEIXOTO, A. M. **Influência do campo magnético estático sobre o tecido sanguíneo de camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Mestrado de Biofísica, 2001.
- PELCZAR, M.; REID, R, CHAN, E. C. S. **MICROBIOLOGIA**. VOL.1. São Paulo: McGraw – Hill do Brasil, 1980.
- PISKUR, J., *et al.* How did *Saccharomyces cerevisiae* evolve to became a good brewer? **Trends in Genetics**, 22(4), 2006.
- PISKUR, J., LANGKAJAR, R. B. Yeast Genome sequencing. The power of comparative genomics. **Mol Microbiol**, 53: 381-389, 2004.
- POSTMA, E.; *et al.* Enzymatic analysis of Cabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, 55, 468-477, 1989.
- POTENZA L., *et al.* Effect of static magnetic field on cell growth in *Escherichia coli* . **Mutation Research**, 561: 53-62, 2004.
- PRESCOTT, L.; HARLEY, M. , *et al.* Microbiology, 4 ed. 1999.
- PRONK, J. T. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 12, 1607-1633, 1996.

- PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. Du; RENSBURG, P. Van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21 century. **Food Technology Biotechnology**, v. 41 (1), 3- 10, 2003.
- QUEVEDO, C.P. **Eletromagnetismo**; McGraw-Hill do Brasil. São Paulo 1977.
- REGENBERG, B. *et al.* Growth rate regulated genes have profound impact on interpretation of transcriptome profiling. **Genoma Biology**, 7 (11), 2006.
- REPACHOLI M. H., GREENBAUM B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. **Bioeletromagnetics**, 20, 133-160, 1999.
- RESNICK, M. A. Yeast as an honorary mammal. **Mutation Research**, 451: 1-11, 2000.
- RIVERA E. C. *et al.* Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, 41, 1682 – 1687, 2006.
- ROSA, M. F.; SÁ CORREIA, I. Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. **FEMS Microbiology Letters** 135, 27 1-274, 1996.
- RUIZ-GOMEZ M. J. *et al.* Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, 64, 151-155, 2004.
- SAFFER J.D., PHILLIPS J.L. Evaluating the biological aspects of in vitro studies in bioelectromagnetics. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 40, 1 – 7, 1996.
- SALLES, A. A. Riscos a Saúde provocados pelos telefones celulares. **Revista da Escola de Engenharia UFRGS**, vol. 24, n.1, pp 7-16, 1997.
- SAUNDERS, R. Static magnetic fields: animal studies. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 87, 225-239, 2005.
- SCHULZE, U. *et al.* Physiological effects of nitrogen starvation in an anaerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 142: 2299:2310.
- STEPHAMOPONHOS, G. N.; *et al.* **Metabolic Engineering: principles and methodologies**. Academic Press, cap. 2, 1998.
- TENFORDE T. S. Mechanisms for biological effects of magnetic fields; in: M.GRANDOLFO S.M., MICHAELSON A. Rindi. **Biological effects and dosimetry of static and ELF – electromagnetic Fields**: Plenum, New York, pp. 71-92, 1985.
- TIMBERLAKE, K. C. **Chemistry: an introduction to general, organic e biological chemistry**. 7ª ed., 1999.

VANONI, M., *et al.* Structural heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, 156, 1282-1291, 1983.

VARELA, C. *et al.* Biomass content governs fermentation rate in nitrogen – deficient wine musts. **Applied and Environmental Microbiology**, 3392-3400, 2004.

ZALDIVAR, J. *et al.* Ethanolic fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Bioresource Technology**, 96, 1670-1676, 2005.

WHEALS, E. A. *et al.* Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnology**, 17: 482-487, 1999.