

João Batista Nunes Ferreira Muniz

INFLUÊNCIA DA AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS, NÃO
HOMOGÊNEOS, NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Departamento de Biofísica e Radiobiologia
da Universidade Federal de Pernambuco, em
cumprimento às exigências, para obtenção do
grau de Mestre em Biofísica.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta

Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Recife, 2002

INFLUÊNCIA DA AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS, NÃO
HOMOGÊNEOS, NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE

João Batista Nunes Ferreira Muniz

Data da Defesa: 10 de setembro de 2002

Conceito

Examinadores:

Profa. Dra. Glícia Maria Torres Calazans

Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Aos meus pais José Muniz Falcão e Higínia
Nunes Ferreira Muniz

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Deus, pela vida, saúde e crença no seu poder e na força da solidariedade dos homens, meus irmãos.

Aos meus Pais, pela compreensão e incentivo na solidificação dos laços familiares.

À Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, minha Co-orientadora, pelas eficientes orientações metodológicas na redação, revisão do trabalho e que me abriu as portas do Departamento de Antibióticos da UFPE, sem o qual, seria impossível a realização dos trabalhos descritos.

Ao Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta, meus sinceros agradecimentos por sua competente orientação, amizade e ensinamentos ao longo desses dois anos, como Professor e Orientador.

Ao Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro, importante colaborador das atividades planejada e elaborada, no acompanhamento e nos procedimentos técnico-experimentais em fermentações que me permitiram a elaboração desta dissertação.

Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, esteio de competência, dedicação e simplicidade, meus agradecimentos.

À Profa. Dra. Maria Tereza Jansen A. Catanho, por suas valiosas orientações e apoio que me permitiram o acesso ao Departamento de Antibióticos da UFPE.

À Autarquia Educacional do Araripe, em nome do seu Diretor-Presidente Darlan Granjeiro Teles, pela disponibilidade, apoio e esforços na conclusão deste Curso de Mestrado.

Ao Prof. Alexandre Schuler, enaltecendo sua boa-vontade ao permitir, orientar e acompanhar a realização de análises em cromatografia gasosa.

À Profa. Maria dos Remédios Ferreira Muniz de Andrade, minha irmã, pelos incentivos, correções e revisão gramatical.

Aos colegas de Mestrado, pela amizade e companheirismo ao longo desses dois anos de convivência.

Aos Professores e Funcionários do Mestrado em Biofísica e Radiobiologia, pelas valiosas informações, transmissão de conhecimentos e cordialidade no trato com os alunos.

Aos Professores, Funcionários e Estudantes do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela receptividade e colaboração nos momentos decisivos das atividades experimentais.

RESUMO

Há bastante tempo, a produção de álcool etílico é realizada através de processo fermentativo e pouco progresso se tem conseguido no seu aperfeiçoamento. A aplicação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, em fermentações alcoólicas, surge como uma alternativa viável para melhorar a eficiência desse processo. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da aplicação desses campos magnéticos em fermentações alcoólicas por *Saccharomyces cerevisiae*, através do monitoramento do pH, da biomassa, produção de etanol e consumo de glicose. Foram realizadas três tipos de fermentação, combinando a forma de magnetização com o meio de crescimento utilizado, denominadas de X, Y e Z. As fermentações foram realizadas em frascos de 150 mL de capacidade, com e sem agitação mecânica de 104 rpm. Foram utilizados dois meios de fermentação denominados de meios “A” e “B”. O meio A era composto de glicose a 50g/L e extrato de levedura a 5 g/L e o meio B de glicose a 150g/L, sais minerais e extrato de levedura a 5 g/L. Foram utilizadas duas formas de magnetização dos biorreatores, chamados de arranjos “1” e “2” que magnetizavam os biorreatores por meio de cinco pares de magnetos cilíndricos de NdFeB. Os magnetos foram instalados, verticalmente, na superfície externa das paredes desses biorreatores, com os pólos contrários defrontando-se, arranjo 1 (pólos norte de um lado e sul do lado oposto), e se defrontando alternadamente, arranjo 2. O gradiente de campo magnético, entre o ponto médio da distância de cada par e a parede interna do biorreator, próxima ao magneto no arranjo 1, era de 2.200 Gauss e no arranjo 2, foi diminuída, substancialmente, aproximando-se de zero. Os resultados médios das fermentações Tipo X (meio A, arranjo 1) mostraram que a biomassa do grupo magnetizado cresceu 108% a mais que o controle e a produção de etanol foi 114% superior. Houve um aumento na taxa de consumo de glicose pelas leveduras magnetizadas e não houve alterações no pH dos grupos magnetizado e controle. Nas fermentações Tipo Y (meio A, arranjo 2), não houve diferenças entre esses grupos, nas variáveis estudadas. Nas fermentações Tipo Z (meio B, arranjo1), os efeitos biológicos encontrados na biomassa, produção de etanol e consumo de glicose, não foram estatisticamente significantes. Portanto, as fermentações Tipo X foram as que obtiveram os melhores resultados, no que diz respeito ao crescimento da biomassa, produção de etanol e consumo de glicose, mostrando ser uma promissora técnica para aplicação na indústria do álcool.

ABSTRACT

The fermentative ethyl alcohol production accomplished little progress and improvement, up to now. The application of static inhomogeneous magnetic fields in alcoholic fermentations appeared to be a viable alternative to improve the efficiency of this process. This study had the objective of investigating the influence of those magnetic fields in the alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, through the pH monitoring, the biomass growth, the ethanol production and glucose uptake. Fermentations were accomplished in flasks with capacity for 150 mL, with and without mechanical agitation of the middle of growth. Two-growth medium were used: A medium (50g/l glucose and 5g/l yeast extract) and B one (150g/l glucose and 2g/l yeast extract, salt mix). Moreover, two magnetization forms were used on the bioreactors tests using five equal cylindrical magnets: arrangement 1 (N and S on each side) and arrangement 2 (alternate N-S). So, NdBFe magnet discs were installed vertically on the wall surface of those bioreactors: with contrary poles confronting continuously (arrangement 1) or confronting alternately (arrangement 2). The magnetic field gradient between the reactor axis and the tube wall in the arrangement 1 was of 2,200G, while in the arrangement 2 it was reduced, approaching of zero in the center. Thus, three fermentation types were done: X,Y and Z, combining magnet arrangements and growing media. The mean results of the fermentations Type X (medium A, arrangement 1) showed that the biomass of the magnetized group increased 108% the more than the control and the ethanol production was 107% superior. There was an increase in the rate of glucose consumption for the magnetized yeast and there were not alterations in the pH in the magnetized and control groups. In the Fermentations type Y (medium A, arrangement 2), there were not differences among those groups, in the studied variables. In the fermentations type Z (medium B, arrangement 1), the biological effects found in the biomass, ethanol production and glucose consumption, were not statistically significant. Therefore the fermentations type X yielded the best results in the growth of the biomass, ethanol production and glucose consumption, showing as a promising technique for application in the alcohol industries.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
CAPÍTULO 1.....	15
INTRODUÇÃO	15
1.1 – OBJETIVOS	16
1.1.1 – Objetivo geral	16
1.1.2 – Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 2.....	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 – MAGNETISMO	17
2.1.1 - Histórico	17
2.1.2 – Campos gerados por magnetos permanentes	18
2.1.3 - Os magnetos permanentes na nossa vida diária	19
2.1.4 - Classificação dos materiais quanto ao magnetismo	20
2.2 – Características gerais da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3 – Ação de campos magnéticos sobre os sistemas biológicos e particularidades de fermentações alcoólicas	25
CAPÍTULO 3.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 – MATERIAIS.....	36
3.1.1 – Experimentos em biorreatores	36
3.1.1.1 – Sistema de agitação mecânica e suporte dos biorreatores.	36
3.1.2 - Experimentos em frascos.....	38
3.1.3 - Campo magnético	38
3.1.3.1 - Geração do campo magnético	38
3.1.4. - Microrganismo	39

3.1.5 - Meios de cultura	39
3.1.5.1 - Meio de manutenção	39
3.1.5.2 - Meios de pré-fermentação e fermentação	40
3.1.6 – Equipamentos	41
3.2 - MÉTODOS	42
3.2.1 - Manutenção dos microrganismos	42
3.2.2 - Preparo do inóculo	42
3.2.3 - Obtenção de amostras.....	42
3.2.4 - Exposição ao campo magnético	43
3.2.5 - Análises de acompanhamento da fermentação.....	44
3.2.5.1 - Biomassa	44
3.2.5.2 - Dosagem de açúcares redutores (Miller, 1959).....	46
3.2.5.3 - Dosagem de etanol.	47
3.2.5.4 - Monitoramento do pH.	47
3.2.5 – Análises estatísticas.	47
CAPÍTULO 4.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.2 – FERMENTAÇÃO TIPO X.....	48
4.3 - FERMENTAÇÃO TIPO Y	52
4.4 - FERMENTAÇÃO TIPO Z.....	53
CAPÍTULO 5.....	57
CONCLUSÕES	57
PERSPECTIVAS	57
APÊNDICE A – Tabelas de resultados das fermentações.....	59
APÊNDICE B - Testes estatísticos	63
APÊNDICE C - Gráficos de fermentações	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Degradação da glicose (Via de Embden-Meyerhof-Parnas).....	24
Figura 2 - Experimentos em biorreatores, dotados de agitação mecânica.....	37
Figura 3 - Fermentações em frascos adaptados para utilização de campo magnético.....	38
Figura 4 - Representação gráfica de um magneto cilíndrico de raio R e espessura L.	39
Figura 5 - Arranjo 1 dos biorreatores expostos a campo magnético gerado por magnetos cilíndricos	43
Figura 6 - Arranjo 2 dos biorreatores, expostos a campo magnético, gerado por magnetos cilíndricos	44
Figura 7 - Curva de calibração, absorvância, versus concentração celular	45
Figura 8 - Curva padrão para DNS (absorvância versus concentração glicose).....	46
Figura 9 – Fermentação X_1 : curvas das variáveis monitoradas durante a fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	49
Figura 10 – Fermentação Tipo X: Curvas dos valores médios das variáveis monitoradas nas Fermentações alcoólicas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em função do tempo de fermentação, com suas respectivas barras de erro (desvios padrão): a – Biomassa, b – Produção de Etanol, c- Consumo de glicose, d- Acompanhamento do pH.	51
Figura 11 – Fermentação Y_1 : curvas das variáveis monitoradas na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	53
Figura 12 – Fermentação Z_1 : curvas das variáveis monitoradas na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b –Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	54
Figura 13 – Fermentação Tipo Z: gráficos dos valores médios das variáveis monitoradas nas fermentações alcoólicas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em função do tempo de fermentação, com suas respectivas barras de erro (desvios padrão): a – Biomassa, b – Produção de Etanol, c- Consumo de glicose, d- Acompanhamento do pH.	55

Figura 14 Gráficos dos valores médios da biomassa e etanol, nas fermentações alcoólicas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em função do tempo de fermentação. A – Biomassa e etanol fermentação X., b – Biomassa e etanol fermentação Z.	56
Figura 15 – Fermentação X ₂ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	67
Figura 16 – Fermentação X ₃ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	67
Figura 17 – Fermentação X ₄ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	68
Figura 18 – Fermentação Y ₂ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	68
Figura 19 – Fermentação Y ₃ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.	69
Figura 20 – Fermentação Y ₄ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH. (4ª Fermentação Y).	69
Figura 21 – Fermentação Z ₂ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH. (2ª Fermentação Z).	70
Figura 22 – Fermentação Z ₃ : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação:	

a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de unidades.....	19
Tabela 2 - Componentes do meio de manutenção Sabouraud Dextrose Ágar	40
Tabela 3 - Componentes do meio de fermentação A.....	40
Tabela 4 - Componentes do meio de fermentação B.....	41
Tabela 5 – Tipos de fermentação utilizados nos experimentos	44
Tabela 6 - Resultados fermentação X_1	59
Tabela 7 - Resultados fermentação X_2	59
Tabela 8 - Resultados fermentação X_3	60
Tabela 9 - Resultados fermentação X_4	60
Tabela 10 - Resultados fermentação Y_1	60
Tabela 11- Resultados fermentação Y_2	61
Tabela 12 - Resultados fermentação Y_3	61
Tabela 13 - Resultados fermentação Y_4	61
Tabela 14 - Resultados fermentação Z_1	62
Tabela 15 - Resultados fermentação Z_2	62
Tabela 16 - Resultados fermentação Z_3	62
Tabela 17 – Fermentação Tipo X: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	63
Tabela 18 – Fermentação Tipo X: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.	63
Tabela 19 - Fermentação Tipo X: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e TesteT.....	63
Tabela 20 - Fermentação Tipo X: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	64
Tabela 21 – Fermentação Tipo Y: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	64
Tabela 22 - Fermentação Tipo Y: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.	64
Tabela 23 - Fermentação Tipo Y: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e TesteT.....	65

Tabela 24 - Fermentação Tipo Y: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	65
Tabela 25 – Fermentação Tipo Z: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	65
Tabela 26 - Fermentação Tipo Z: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e Teste T.	66
Tabela 27 - Fermentação Tipo Z: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e TesteT.....	66
Tabela 28 – Fermentação Tipo Z: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlNiCo	Alumínio Níquel Cobalto (Liga que compõe alguns magnetos)
ADP	Adenosina-difosfato.
ATP	Adenosina-trifosfato.
BC	Biomassa do grupo controle.
BM	Biomassa do grupo magnetizado.
c	Velocidade da luz no vácuo ($3 \cdot 10^8$ m/s).
CGS	Sistema de unidades (centímetro, grama, segundo).
CM	Campo magnético.
CMA	Campo magnético alternante.
CMC	Campo magnético contínuo.
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Concentração de etanol do grupo controle.
EM	Concentração de etanol do grupo magnetizado.
G	Gauss (unidade de campo magnético do sistema CGS).
GC	Concentração de glicose do grupo controle.
GDH	Glutâmico desidrogenase.
GM	Concentração de glicose do grupo magnetizado.
Hz	Hertz, ciclos por segundo (unidade de freqüência).
MKS	Sistema internacional de unidades (metro, kilograma, segundo).
pH	Potencial hidrogeniônico (concentração de íons H ⁺).
pHC	pH do grupo controle.
pHM	pH do grupo magnetizado.
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo com próton
NdFeB	Neodímio Ferro Boro (liga que compõe os magnetos utilizados neste trabalho).
SI	Sistema internacional.
T	Tesla (unidade de campo magnético do Sistema Internacional).
W	Weber (unidade de fluxo magnético do sistema Internacional).
u.m.a.	Unidades de massa atômica

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A exposição de leveduras, a campos magnéticos, vem sendo realizada, visando a entender quais os seus efeitos no metabolismo destas células. Estas investigações procuram mostrar a possibilidade de interação dos campos magnéticos, em fermentações alcoólicas, na tentativa de identificar que intensidades, tempos de exposição e tipos de campo são mais favoráveis ao processo.

A produção de álcool etílico é um processo fermentativo, usado há bastante tempo, e pouco progresso tem sido observado no seu aperfeiçoamento. Algumas cepas novas foram introduzidas no processo de produção, porém, sem o resultado esperado. Atualmente, a introdução da técnica de campos magnéticos para melhorar o processo fermentativo constitui uma estratégia inovadora e importante, que poderá se tornar uma alternativa viável no aumento da eficiência desse processo.

O funcionamento de um magneto é consequência direta dos movimentos dos elétrons, e cargas elétricas em movimento produzem efeitos elétricos e magnéticos. Baseados nessas afirmações, poderemos então citar em termos gerais, algumas maneiras, pelas quais, um sistema biológico poderia interagir com um campo magnético externo. Partimos do princípio de que nos sistemas biológicos, existem cargas elétricas em movimento, (íons). Os íons possuem características paramagnéticas e são suscetíveis à ação de campos magnéticos. Citamos ainda, a existência de dipolos magnéticos moleculares ou atômicos nos sistemas biológicos, a exemplo de alguns radicais, como os radicais livres, entre outros, que também possuem características paramagnéticas e são passíveis de sofrerem a ação de campos magnéticos externos. Vários são os experimentos que mostram os efeitos biológicos, causados por campos magnéticos, que serão descritos e comentados, a seguir, nesta dissertação.

Diversos autores relatam o aumento na produção de CO₂ em reatores submetidos a campos magnéticos, durante a fermentação alcoólica e esta produção de CO₂ está associada à produção de etanol. Outros também frisam que a aplicação de campos magnéticos elevados (acima de 10.000 Gauss) em fermentações por *Saccharomyces cerevisiae*, tem promovido a inibição do crescimento microbiano e não tem encontrado ganhos significativos com relação à melhorias na produção CO₂ e etanol. Os melhores resultados encontrados na literatura são de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, compreendidos entre 1000 e 10.000 Gauss.

Aparentemente, algumas intensidades de campo, dentro dessa faixa, favorecem o crescimento do microrganismo e conseqüentemente à produção de etanol.

Com base no que foi exposto, o uso de campos magnéticos poderá ser uma alternativa eficiente para aumentar o rendimento da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Este processo que ora desenvolvemos, apresenta um grande potencial de aplicação na indústria alcooleira, que deverá ser desenvolvido em etapas posteriores.

1.1 – OBJETIVOS

1.1.1 – Objetivo geral

Investigar a influência da ação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.2 – Objetivos específicos

Avaliar a influência exercida pela intensidade de campo de 2.650 Gauss, a forma de magnetização e o meio de crescimento na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, através do monitoramento do crescimento celular, do pH, dos teores de etanol e de açúcares residuais.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma síntese sobre o magnetismo, uma descrição das principais características do *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura anaeróbia facultativa, responsável por praticamente toda a produção industrial de etanol do planeta. Em seguida, é feita uma revisão sobre interações de campos magnéticos com sistemas biológicos, em particular com *Saccharomyces cerevisiae*, bem como, algumas particularidades de fermentações alcoólicas.

2.1 – MAGNETISMO

2.1.1 - Histórico

A descoberta de materiais capazes de atrair outros objetos está relacionada diretamente com a origem do estudo da eletricidade. Os relatos mais antigos de que se tem registro, atribuem ao povo grego, já no século VI aC, o privilégio de terem observados esses fenômenos. Duas observações contribuíram de forma substancial para o despertar da curiosidade e do senso de investigação na antiguidade. A primeira, foi a descoberta de um material fóssil, denominado âmbar, semelhante ao plástico, resultante do endurecimento da seiva de árvores de uma espécie extinta a milhões de anos, que ao ser atritado com lã ou pele de animal, tinha a capacidade de atrair materiais “leves”. A segunda, se refere ao comportamento de pedras encontradas na região grega denominada Magnésia. Estas pedras têm a propriedade de atrair objetos de ferro e são compostos de uma substância denominada hoje de magnetita. A magnetita é composta basicamente de óxido de ferro (Fe_3O_4) e é considerado um ímã natural (Taton, 1960).

Na idade média, o médico inglês Willian Gilbert (1544-1603) elaborou um estudo detalhado dos ímãs e explicou o funcionamento da bússola, baseado na idéia de que a terra se comportava como um gigantesco ímã. Gilbert afirmou também que o âmbar não era o único material que, ao ser atritado com outro, atraía materiais leves. A partir da tradução da palavra âmbar para o grego, que é *eléktron*, chamou-se então os materiais com estas características de elétricos e, segundo ainda sua interpretação, quando esses materiais eram atritados ocorria a passagem de um fluido elétrico de um corpo para outro. O corpo que ganhava o fluido elétrico

foi chamado de eletrizado (Ronan, 1994). Hoje, sabemos que além do ferro, outras substâncias são suscetíveis à presença de campos magnéticos.

John Michell, em 1750, mostrou que a atração e a repulsão dos pólos de um magneto tinham a mesma intensidade e variavam inversamente proporcional ao quadrado da distância entre os pólos. Estes resultados foram confirmados mais tarde por Coulomb. Em 1820, André Marie Ampère e colaboradores demonstraram que a corrente elétrica atrai pedaços de ferro e que correntes paralelas se atraem mutuamente. Eles também propuseram a teoria de que as correntes elétricas são a fonte de todo o magnetismo. Ampère imaginava estas correntes nos materiais ferromagnéticos, como “espiras” moleculares de corrente, alinhadas sempre que o material fosse magnetizado. A teoria de Ampère constitui a base da teoria do magnetismo moderno (Tipler 1984).

Em 1819, Hans Christian Oersted (1777 – 1851) verificou que ao se colocar um fio, conduzindo uma corrente elétrica, próxima a uma bússola, essa corrente influenciava a agulha da bússola, provocando deflexão. Doze anos depois, o físico inglês Michael Faraday (1791 – 1857) verificou o aparecimento de uma corrente momentânea em um circuito, quando em um circuito vizinho se iniciava ou se interrompia uma corrente. O cientista americano Joseph Henry (1797 – 1878) havia se antecipado às descobertas de Faraday, há cerca de um ano, embora Faraday tenha sido o primeiro a publicar. Os créditos dessa descoberta são atribuídos a Faraday. Pouco tempo depois, se verificou que um ímã se aproximando ou se afastando de um circuito, produzia o mesmo efeito. Oersted demonstrou que efeitos magnéticos, poderiam ser produzidos por cargas elétricas em movimento, enquanto que Faraday e Henry mostraram que as correntes elétricas, poderiam ser produzidas por ímãs em movimento (Sears e Zemansky, 1973).

2.1.2 – Campos gerados por magnetos permanentes

Um magneto provoca o aparecimento de forças, especialmente em materiais ferromagnéticos (ferro, níquel, cobalto, e algumas ligas), mesmo não estando em contato com eles. Portanto, um magneto cria em sua volta uma região de influência denominada campo magnético (Biscuola *et al.* 1992).

Quando foi introduzido o conceito de campo magnético, no século XIX, convencionou-se chamar de campo magnético “H”, o campo magnético no interior dos magnetos e de indução magnética “B”, o campo magnético no exterior dos magnetos. Na

época, foi dada mais importância ao campo “H” do que ao “B”. Hoje, o campo “B” é chamado de campo magnético, embora alguns autores, por razões históricas, ainda hoje se refiram ao campo “B” como indução magnética (Dampier, 1961).

Os magnetos artificiais são, normalmente, barras de ferro ou aço às quais se transmite a propriedade magnética. Os magnetos artificiais levam vantagem sobre os naturais por terem maior poder atrativo e também pela possibilidade de receber a forma geométrica mais conveniente ao seu uso (Bonjorno *et al.*, 1999).

O campo magnético “B” está relacionado com o campo “H” através da equação 2.1

$$B = \mu \cdot H \quad (2.1)$$

onde μ é a permeabilidade magnética no vácuo. Para o Sistema de Unidades CGS $\mu = 1$ e para o Sistema Internacional $\mu = 4\pi \cdot 10^{-7}$ (Gonçalves, 1966). As unidades de campo e fluxo magnético dos principais sistemas são dadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistemas de unidades.

	Sistema CGS (centímetro, grama, segundo)	Sistema Internacional (metro, quilograma, segundo)	Sistema Inglês (polegada, libra, segundo)
Campo Mag. (B)	Gauss (G)	Tesla (T)	Linhas/pol ²
Fluxo Magnético	Maxwel (Mx)	Weber (Wb)	Maxwel (Mx)
Campo Mag. (H)	Oersted (Oe)	Ampère espira/metro	Ampère espira/pol

2.1.3 - Os magnetos permanentes na nossa vida diária

Os magnetos têm importância substancial para o nosso dia a dia. Fazem parte de componentes essenciais de motores elétricos, computadores, CD players, fornos de microondas, equipamentos de pesquisa. Os magnetos funcionam como transdutores de energia, pois transformam energia de uma forma para outra, sem qualquer perda permanente de sua energia própria. Relacionaremos, a seguir, alguns exemplos destas transformações:

- Energia mecânica em energia mecânica – Atração e repulsão.
- Energia mecânica em energia elétrica – Geradores e microfones.
- Energia elétrica em energia mecânica – Motores, autofalantes e deflexão de partícula carregada.
- Energia mecânica em calor - Correntes de histeresis

- Efeitos especiais – Resistência magnética, equipamentos de efeito hall e ressonância magnética.

Existem, hoje, quatro grandes classes de magnetos com propriedades magnéticas próprias, são elas: NdFeB (neodímio, ferro, boro), SmCo (samário, cobalto), Cerâmicos e AlNiCo (alumínio, níquel, cobalto). Os magnetos de NdFeB e SmCo são conhecidos como magnetos Terras Raras, por serem materiais compostos de elementos químicos do grupo dos Terras Raras. Exibem excelentes propriedades magnéticas em temperaturas ambientes. Suas composições químicas são: $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$, SmCO_5 e $\text{Sm}_2\text{CO}_{17}$. Os cerâmicos são conhecidos como Férricos, cujas composições químicas são BaFe_2O_3 ou SrFe_2O_3 . Eles são comercializados, desde 1950, e continuam muito usados ainda hoje, devido aos seus baixos custos. Por fim, os magnetos AlNiCo, que apresentam boas propriedades magnéticas e são comercializados desde 1930.

2.1.4 - Classificação dos materiais quanto ao magnetismo

Segundo Sampaio e Calçada (2001), os materiais paramagnéticos são aqueles formados por átomos, íons ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Conseqüentemente, o átomo produz um campo total, não nulo, comportando-se como um minúsculo magneto elementar. Como exemplos de substâncias paramagnéticas, podemos citar: cálcio, cromo, magnésio, alumínio, platina. O ferromagnetismo é semelhante ao paramagnetismo. A diferença é que nos materiais paramagnéticos, na ausência de um campo magnético externo, os magnetos elementares estão orientados em todos os sentidos, enquanto que, nos materiais ferromagnéticos, há um alinhamento espontâneo dos magnetos elementares, num dado sentido. Como exemplos de substâncias ferromagnéticas, podemos citar: ferro, cobalto, níquel, gadolínio, disprosio. Com relação ao diamagnetismo, os autores relatam que o elétron, ao executar o seu movimento orbital em torno do núcleo, produz um campo magnético. Numa amostra de material qualquer, existe uma infinidade de elétrons, produzindo campos magnéticos em todas as direções e sentidos, o que resulta no cancelamento dos campos. Ao se colocar uma amostra na presença de um campo magnético externo, esse campo atua sobre os elétrons, aumentando a velocidade daqueles que giram em um sentido e diminuindo a velocidade dos que giram em sentido oposto; de maneira que a amostra passa a produzir um campo magnético de sentido contrário ao campo aplicado, e esse é o efeito diamagnético. Este efeito ocorre em todas as substâncias, porém em algumas, é

superado pelos efeitos paramagnético e ferromagnético. Substâncias diamagnéticas são aquelas que não apresentam os efeitos paramagnéticos e ferromagnéticos, apresentando apenas o efeito diamagnético. Dentre as substâncias diamagnéticas, podemos citar: água, cobre, prata, bismuto.

2.2 – Características gerais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O reino Fungi abrange organismos eucariontes, heterótrofos, aclorofilados que incorporam alimentos por absorção. Os fungos não possuem flagelos nem qualquer outro meio de locomoção (exceção para os Ficomycetos aquáticos cujos esporângios são móveis). As leveduras ou fungos leveduriformes são microrganismos unicelulares, pertencentes ao reino Fungi como o *Saccharomyces cerevisiae*. (Pelczar, 1996).

De acordo com Trabulsi (1986), a espécie *Saccharomyces cerevisiae* se enquadra entre os organismos eucarióticos que possuem um só núcleo. No seu citoplasma, contêm mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Cada célula tem vida independente e não forma tecidos (películas). Podem se desenvolver tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio, realizam respiração e na ausência, fermentação. São anaeróbios facultativos.

Saccharomyces cerevisiae apresenta-se morfológicamente como células globosas, ovais, elipsoidais, cilindróides ou alongadas, medem de 3 a 7 μm e são normalmente de cinco a sete vezes maiores que as bactérias (Macedo, 1993).

Em concordância com Lodder (1970), o gênero *Saccharomyces* foi definido por Riss em 1870 e inclui hoje, 41 espécies e seis variedades. Segundo o autor, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* tem sido empregada como fonte produtora de uma grande variedade de enzimas. Nenhuma outra espécie tem sido submetida, tão intensamente, a estudos bioquímicos e genéticos.

Quanto à nutrição, *Saccharomyces cerevisiae* são organismos heterótrofos que se alimentam por absorção. Os principais nutrientes, necessários ao desenvolvimento das leveduras, para que ocorra uma fermentação satisfatória, são: o nitrogênio, elemento de transformação plástica, importante para o crescimento da levedura; o fósforo, elemento de translocação de energia, em sua ausência, não ocorrerá fermentação; o potássio, o magnésio, o zinco, o manganês, todos importantes nas reações enzimáticas; vitaminas do complexo B, que

são aceleradoras das fermentações, além da presença de outros sais, a exemplo de cobalto e cobre, enxofre, boro que são referidos como micronutrientes (Macedo, 1993).

Quanto às condições de cultivo, *Saccharomyces cerevisiae* são microrganismos acidófilos. Quando em fermentações alcoólicas, o pH entre 4 e 5 é considerado ideal. Trata-se da faixa de atividade ótima da enzima invertase (sacarase) das leveduras e, provavelmente, das demais enzimas produzidas por este microrganismo. A atividade das leveduras está diretamente ligada à acidez do meio fermentativo. Um meio com acidez ideal, além de propiciar um ambiente adequado às leveduras, agiria, ainda, como bactericida, inibindo o crescimento de algumas bactérias contaminantes do meio. Um meio com pH alcalino induz a desvios do mecanismo normal de fermentação como, por exemplo, o aumento da produção de glicerina em detrimento a de etanol. Um meio com pH abaixo de 4, também não é benéfico à fermentação alcoólica por reduzir a velocidade de fermentação e aumentar a taxa de morte celular (Amorim, 1977).

Saccharomyces cerevisiae pode crescer em meio com elevadas concentrações de açúcar, de 200 a 220g/L e suportam altas concentrações de etanol: em torno de 12°GL. São leveduras perfeitas, isto é, produzem ascósporos por conjugação. Os ascósporos são mais resistentes a condições adversas do ambiente do que as células vegetativas e contribuem para a sobrevivência da espécie. As leveduras podem crescer em temperaturas que variam de 5 a 39°C, dependendo da cepa. Formam colônias brancas a cremes, butirosas. Em fermentações alcoólicas, a temperatura ideal para o desenvolvimento de leveduras fica entre 26 e 35°C. Na prática industrial, é comum aqui na região Nordeste, que a temperatura chegue nas dornas de fermentação a 38°C ou até um pouco mais, por deficiência de refrigeração. Ainda assim as leveduras desempenham bem o seu papel fermentativo, porém, a perda de álcool, por evaporação e arraste, cresce muito. Isto também favorece o crescimento de bactérias termotolerantes, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter* que podem vir a se transformar em problemas para a fermentação (Moraes, 2001).

Saccharomyces cerevisiae se reproduz, assexuadamente, por brotamento ou gemulação da célula mãe. No processo de brotamento, a célula mãe origina um broto que cresce e recebe um núcleo, após a divisão do núcleo da célula mãe. A célula filha separa-se da célula mãe, pela formação de uma parede celular, rica em mananas (um polímero de manose). O broto, também denominado de gêmula, pode permanecer ligado à célula mãe, formando pseudo-hifas, que em seu conjunto, formam pseudomicélio (Trabulsi, 1986).

Os substratos utilizados para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, podem ser classificados como: açucarados (cana-de-açúcar, beterraba açucareira, melaços, mel de abelha e frutas), como amiláceos (amido de grãos e fécula de raízes e tubérculos) e como celulósicos ou derivados de celulose (madeiras e seus resíduos sulfíticos de fábricas de papel). Os substratos açucarados são divididos em: diretamente fermentáveis (que não precisam de tratamento hidrolítico para serem fermentados pelo microrganismo) e não diretamente fermentáveis. Os fermentáveis seriam as hexoses glicose e frutose e os dissacarídeos sacarose e maltose. Os polissacarídeos amido, glicogênio e celulose são exemplos de substratos, não diretamente fermentáveis, pois precisam de tratamento hidrolítico para serem fermentados por leveduras. (Rose, 1961)

Um dos aspectos bioquímicos mais importantes do *Saccharomyces cerevisiae* é a capacidade de produzir etanol e uma característica interessante desta levedura é o chamado diauxismo, ou seja, a capacidade de apresentar um perfil duplo de crescimento, pois o *Saccharomyces cerevisiae* pode se multiplicar tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose. Quando se utiliza a glicose como fonte de carbono do meio, um fenômeno denominado repressão por glicose é o responsável pelo aparecimento do diauxismo. O catabolismo da glicose pelo *Saccharomyces cerevisiae* pode se dar tanto pela via anaeróbia (fermentativa) quanto pela aeróbia (respiratória). A transformação da glicose em piruvato é comum às duas vias. Ao chegar ao piruvato na ausência de O₂, a via escolhida é a anaeróbia, via de Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 1) com a formação de CO₂ e etanol. Mesmo na presença de O₂, a via escolhida pode ser ainda a anaeróbia, desde que a concentração de glicose do meio seja superior à 9 g/L, considerada concentração crítica. Em concentrações de glicose, acima da crítica, acontece o fenômeno denominado repressão por glicose que consiste na repressão dos genes que codificam as enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. Com a atividade mitocondrial do *Saccharomyces cerevisiae* reduzida, a via seguida pelo piruvato é a anaeróbia com a formação de CO₂ e etanol. Por outro lado, em meio, contendo concentrações de glicose abaixo da crítica e na presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbia, pois não se encontram reprimidos os genes em questão. Portanto, ao esgotar-se a glicose do meio, não mais existirá a repressão dos genes citados, criando condições para que a fonte de carbono que agora será o etanol, produzido pela levedura, passe a ser utilizado pela recém criada via aeróbia. O diauxismo pode também ser verificado, quando o *Saccharomyces cerevisiae* se defronta com duas fontes de carbono diferentes no meio de cultura (Rettori e Volpe, 1999).

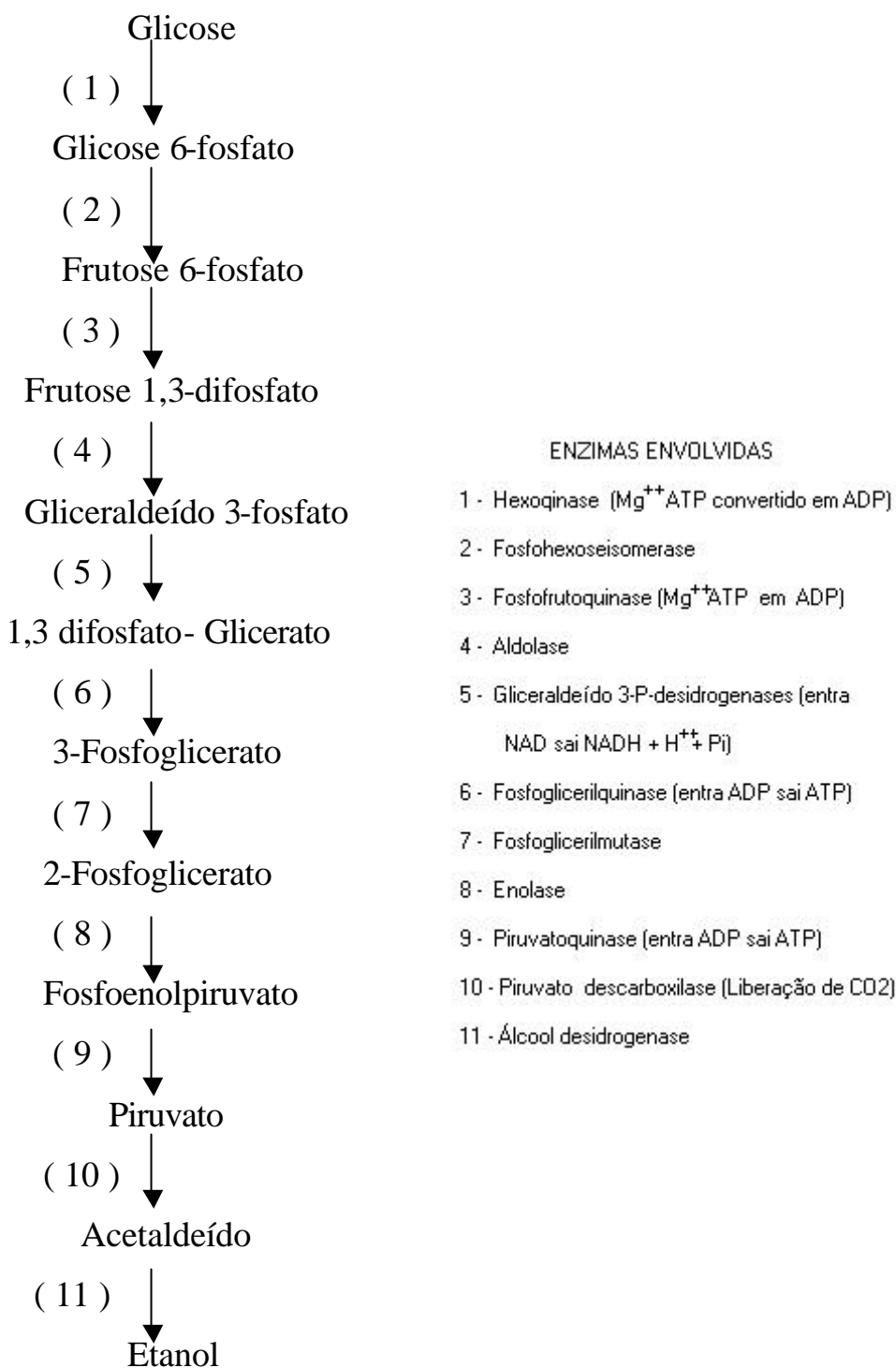


Figura 1 - Degradação da glicose (Via de Embden-Meyerhof-Parnas)

2.3 – Ação de campos magnéticos sobre os sistemas biológicos e particularidades de fermentações alcoólicas

Kimbal (1937) afirma que a aplicação de um campo magnético de 11.000 Gauss no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio sólido, promove um retardo de 20% a 30% na taxa de brotamento da levedura. Segundo a autora, o efeito do campo na levedura começa a aparecer na segunda metade da fase *Lag* e é produzido pelo gradiente de campo. Isto ocorre porque, enquanto campos homogêneos, apenas orientam as partículas paramagnéticas do material, a exemplo de radicais como $(C_6H_6)_3 - OH$ e algumas células catalíticas que contêm ferro, campos não homogêneos, além de orientarem as partículas paramagnéticas, tendem ainda a forçar a entrada do material biológico para a parte alta do campo. Isto explicaria, segundo a autora, porque muitos experimentos biológicos, com campos homogêneos de alta intensidade, falharam, ao passo que, campos não homogêneos de pequena intensidade, produziram estatisticamente bons resultados. A autora afirma que os efeitos produzidos no brotamento das leveduras estão sempre associados a campos magnéticos não homogêneos, pois, campos homogêneos, não produzem efeitos. A autora ressalta que uma provável explicação para o caso é o fato de algumas moléculas das células serem deslocadas de suas posições, interrompendo assim o progresso normal do anabolismo celular.

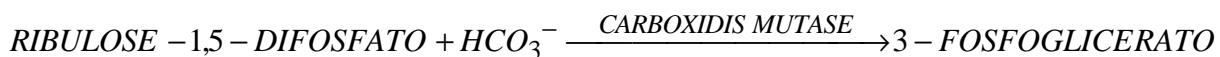
Jenisson (1937), ao fazer experimentos com leveduras e bactérias, relata que campos magnéticos estáticos de 3.000 Gauss não produzem efeitos sobre o tamanho e a morfologia de colônia, o tamanho e a forma individual das células, a reação para coloração de Gram e a produção de esporos. Para chegar a estas conclusões, o autor semeou leveduras em placas de Petri contendo (AN) Agar Nutritivo, dentre outros meios e colocou-as entre os pólos de um eletroímã cuja intensidade média de campo era de 3.000 Gauss. O campo era aplicado de duas maneiras: a primeira atravessando perpendicularmente a superfície da placa e a segunda atravessando paralelamente a superfície. O experimento foi realizado, durante 48 horas a 25°C. O autor semeou leveduras em meio sólido e expôs ao campo magnético. Provavelmente, a utilização do meio sólido tenha impedido o aparecimento de algum efeito biológico, uma vez que não foram dadas condições necessárias para que o campo magnético interagisse com o sistema. Não houve leveduras em suspensão, não foi possível haver interação de partículas paramagnéticas em suspensão com o campo.

Em novembro de 1961, foi realizado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Illinois (Estados Unidos), o primeiro Simpósio de Biomagnetismo. Foram apresentados diversos trabalhos, relatando efeitos biológicos, causados por campos magnéticos. Neste evento se destacou o trabalho de Gerencser *et al.* (1962) além do surgimento de propostas novas para possíveis interpretações de efeitos de campos magnéticos sobre os sistemas biológicos (Barnothy, 1962).

Gerencser *et al.* (1962) submeteram culturas das bactérias *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* a campos magnéticos, não homogêneos, de 15.000 Gauss com gradientes de 2.300 Gauss/cm e 5.200 Gauss/cm respectivamente, com intervalos 6, 7, 8, 9 e 10 horas de exposição. Os autores observaram que em ambas as culturas houve inibição do crescimento entre 7 e 8 horas de exposição ao campo, indicando que o campo magnético afeta o crescimento bacteriano e que o mecanismo exato que causa a inibição é desconhecido, sendo mais provável que a inibição seja indicativa de um fenômeno paramagnético onde a bactéria muda sua posição relativa na direção do vetor gradiente do campo. Esta constante mudança de posição sugere à existência de correntes de convecção e movimento *Browniano* que tenderiam a apresentar, em primeiro plano, efeitos cumulativos reversíveis e, por último, efeitos imediatamente permanentes no crescimento do microrganismo exposto.

Reno e Nutini (1963) investigando os efeitos de campos magnéticos de 7.300 Gauss na respiração celular em tecidos de rins de ratos, inoculados com células tumorais, afirmam existir uma correlação entre a atividade metabólica dos tecidos e a intensidade e a direção do campo magnético. Segundo os autores, embora tenham observado que campo magnético causa alguma interferência na taxa de oxigenação dos tecidos investigados, não foi objeto do trabalho, explicar através de bases teóricas, o fenômeno observado.

Akoyounoglou (1964) estudou os efeitos de campos magnéticos estáticos de 20.000 Gauss na atividade da enzima carboxidismutase que é uma enzima que catalisa a reação de descarboxilação primária em fotossínteses, representada pela reação.



A atividade da carboxidismutase é aumentada na ordem de 14% a 20%, quando o tubo contendo a solução com a enzima é colocado entre os pólos de um eletroímã e exposto a um campo magnético de 20.000 Gauss. Para evitar o aquecimento e conseqüente acúmulo de perturbações no sistema, a solução enzimática foi colocada em tubos de paredes duplas por

onde circulava água a 4°C e envolvidos com uma cobertura preta para eliminar qualquer efeito, devido à presença de luz. O autor afirma ainda que é natural a perda da atividade enzimática em decorrência do tempo, devido à desnaturação da enzima. No entanto, esta inativação foi mais visível no grupo controle, não exposto ao campo, do que no teste, exposto ao campo. Para o autor, o efeito do campo parece ser o inverso da desnaturação.

Moskwa e Rostkowska (1965) acompanharam a aplicação de campos magnéticos homogêneos de 2.400 a 3.600 Gauss nas fermentações em batelada com *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores afirmam que a produção de CO₂ nos reatores teste (magnetizados) foi 30% menor que a produção de CO₂ nos reatores controle (sem a presença do campo magnético). Os autores acreditam que essa marcante diminuição na produção de CO₂ nos reatores teste indica que o campo magnético de 2.400 Gauss a 3.600 Gauss prejudica a fermentação. Citam ainda que a fermentação foi mais lenta nos reatores submetidos ao campo do que nos reatores utilizados como controle, sem campo magnético. Para o experimento, os autores utilizaram um meio de crescimento à base de sacarose (25 g/L) e aplicaram o campo em intervalos de tempo que variavam de 35 a 90 minutos. A produção de CO₂ foi medida para cada intervalo de tempo.

Labes (1966) cita que campos magnéticos na ordem de 1.000 Gauss e superior, influenciam os fenômenos relativos a transporte de íons, a transferência de massa (velocidade de difusão) e a velocidade de reação nos sistemas biológicos. Este argumento, segundo o autor, está baseado na combinação de observações, já bem conhecidas e documentadas na literatura. A primeira é que as moléculas, tipo bastonete, dentro de um cristal líquido, podem seguir a orientação das linhas de força de um campo magnético; e a segunda é que materiais cristalinos líquidos têm sido identificados em seres vivos. Segundo Labes (1966), existem muitos trabalhos, relatando os efeitos de campos magnéticos nas propriedades dielétricas dos cristais líquidos e os sistemas biológicos estão repletos de materiais cristalinos líquidos.

Segundo Nostran *et al.* (1967), o principal efeito dos campos magnéticos de 4.600 Gauss sobre o *Saccharomyces cerevisiae*, corresponde a uma significativa redução do crescimento celular, durante o tempo em que a levedura foi exposta ao campo. Afirmam ainda que o efeito inibitório, no crescimento da levedura foi mascarado pela pressão osmótica na temperatura de 38°C, indicando que a redução na quantidade de água das células, permite que o crescimento celular seja mais eficiente à temperatura mais elevada. Citam os autores que uma relação de sinergismo foi evidente entre a pressão osmótica e a temperatura.

Haberdtzi (1967) pesquisou mudanças na atividade das enzimas glutâmico desidrogenase (GDH) e catalase, quando submetidas à presença de campos magnéticos externos. Segundo o autor, a atividade da GDH teve um decréscimo de 5 a 12%, quando submetida, durante 40 minutos, à ação de um campo magnético estático de 70.000 Gauss, enquanto que, a atividade da catalase foi aumentada de 5 a 16%, quando submetida, durante 15 minutos, à ação de um campo magnético estático de 60.000 Gauss.

Cook *et al.* (1969) realizaram estudos sobre os efeitos de campos magnéticos estáticos na respiração celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Ao submeterem as leveduras à ação de campos magnéticos estáticos de 80 a 10.000 Gauss, os autores observaram que a respiração celular foi estimulada numa média de $40 \pm 5\%$. Houve uma pequena depressão na ordem de 6,8% na respiração celular, quando a levedura foi exposta à intensidade de campo de 80 Gauss. Nas demais intensidades investigadas, ou seja, 85, 90, 100, 200, 500, 3.000, 5.000, 7.300 Gauss e 10.000 Gauss, houve um incremento médio de $40 \pm 5\%$. Segundo os autores citados, a razão deste efeito biológico, poderia ser atribuída à existência de células em diferentes estágios de proliferação o que seria assim a “chave do mistério”.

Senftle e Hambright (1969) investigaram as características dos materiais biológicos, quanto à suscetibilidade a campos magnéticos. Segundo os autores, a maioria dos materiais biológicos é diamagnética, alguns são paramagnéticos e poucas ocorrências têm sido relatadas, quanto à presença de materiais ferromagnéticos nos sistemas biológicos. Os autores citam também que os compostos que não possuem elétrons desemparelhados são diamagnéticos, não são suscetíveis a campos magnéticos e independem da temperatura. Os radicais livres são paramagnéticos, pois contêm íons de metais de transição com elétrons desemparelhados. São dependentes da temperatura e pouco suscetíveis à ação do campo magnético. Alguns metais e componentes inorgânicos têm propriedades ferromagnéticas e são dependentes da temperatura. Os autores relatam que o paramagnetismo é inversamente proporcional à temperatura absoluta e, que, enquanto o paramagnetismo é dependente da temperatura, o diamagnetismo é independente. Por esta razão, um componente paramagnético é mais facilmente detectado num meio biológico.

Liboff (1969) sugere que o processo de crescimento celular é movido por um mecanismo de dissociação e difusão de sais entre o meio extracelular e o citoplasma, via membrana plasmática e vice versa, e entre o citoplasma e o núcleo, via membrana nuclear e vice versa. O autor afirma que existem duas regras simples que mostram que o campo magnético pode influenciar a estrutura do sistema celular, através de um mecanismo de

interferência no processo de difusão iônica. Cita ainda que campos magnéticos interagem com cargas em movimento. Segundo o autor, nestas regras simples que se apresentam para explicar o fenômeno, em ambas, a órbita da partícula carregada é considerada helicoidal na presença de um campo magnético. O raio da parte circular da hélice é chamado de raio de Larmor. Para a primeira regra, considerar-se-ia uma partícula ionizada de massa 30 u.m.a. à temperatura absoluta de 300 K. O campo magnético B, capaz de provocar algum efeito biológico está relacionado com o raio de Larmor pela expressão 2.2 a seguir:

$$B \cong 90/R \text{ (cgs)} \quad (2.2)$$

O autor considera ser o valor de R para células típicas, $R \cong 10^{-4}$ cm Segundo estas condições, o valor do campo magnético B, capaz de provocar algum efeito biológico seria aproximadamente igual a 10^6 Gauss. A segunda regra é obtida, segundo o autor, mediante as seguintes considerações: supondo-se que a partícula carregada está se movendo num meio viscoso, a partícula está sofrendo ν colisões por segundo e que, se o campo magnético permanece através do meio, então a partícula carregada move-se numa órbita helicoidal com o raio de Larmor, com a frequência de Larmor Ω , e considerando-se ainda, que para a partícula provocar algum efeito, ela deve executar pelo menos uma órbita de Larmor, antes de colidir. Logo teria-se

$$\Omega > \nu \rightarrow \frac{\Omega}{\nu} > 1$$

Para uma partícula de massa “m” e carga “e” que está se movendo num meio caracterizado por um coeficiente de mobilidade $\mu \approx 10^{-3}$ e $\nu \approx 10^{11}$ colisões/seg sob presença de um campo magnético B, toma-se a equação 2.3

$$\Omega/\nu = \mu B/c \quad (2.3)$$

onde c é a velocidade da luz $c=3 \cdot 10^{10}$ cm/s e $\Omega/\nu > 1$, logo $\mu B/c > 1$, $10^{-3} B/3 \cdot 10^{10} > 1$, logo teríamos $B \approx 10^{13}$ Gauss

Portanto segundo o autor, mediante estas condições, seria necessário um campo magnético extremamente elevado de 10^{13} Gauss, para provocar algum efeito biológico.

Belossi e Duclos (1973) realizaram estudos sobre os efeitos de campos magnéticos no crescimento celular do *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores estudaram fermentações em frascos e expuseram durante 3 horas a um campo magnético de intensidade média 5.200 Gauss, por intermédio de um eletroímã. A temperatura média do ambiente foi de 30°C. Obtiveram como resultado um brotamento na ordem de 131,12 brotos para cada 500 células no controle e 165,62 brotos para cada 500 células, no magnetizado, ou seja, um brotamento mais acentuado nas células submetidas à ação do campo. Segundo os autores, o brotamento das leveduras, após o campo magnético, é a favor da hipótese de que as sínteses são aumentadas até o esgotamento da reserva de energia armazenada.

Schaarsschmidt e Lamprecht (1974) investigando os efeitos de campos magnéticos, combinados com luz ultravioleta em *Saccharomyces cerevisiae*, observaram que o campo magnético, quando aplicado, antes da exposição, à radiação ultra violeta UV, promove um incremento na taxa de sobrevivência, e, quando aplicado, logo após à exposição a UV, mostrou uma diminuição. O experimento foi realizado com duas cepas: a cepa 211 e uma outra mutante S20294 CI com alta sensibilidade à luz ultravioleta. O campo utilizado foi de 73.000 Gauss, gerado por um supercondutor magnético (CRYOS 30-350, Siemens) com 3cm de diâmetro. Os autores afirmam ainda que as células expostas ao campo magnético, acima citado, mostraram uma diminuição na taxa de crescimento, combinado com um incremento na produção de gás, indicando uma estimulação no metabolismo.

Blakemore (1975), por sua vez, afirma ter sido observado em sedimentos marinhos, bactérias com mobilidade para campos magnéticos locais. O autor cita que estes organismos “magnetostáticos” possuem novas partículas, ricas em ferro, no interior do citoplasma e que estas partículas impõem um momento magnético às células. Isto poderia esclarecer a migração destes microrganismos, observadas até em campos fracos de 0,5 Gauss. O autor cita que estes microrganismos, não foram ainda isolados e crescidos em cultura pura, e que, tirando proveito de procedimentos magnetostáticos, conseguiu obter uma suspensão de células purificadas para análise em microscopia eletrônica.

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 50 Gauss a 900 Gauss, aplicados sobre leveduras da espécie *Cândida albicans* e bactérias das espécies *Bacillus subtilis* (células vegetativas e esporos), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Halobacterium halobium*.

Galar e Sanchez (1985) verificaram a influência da ação de campos magnéticos contínuos e alternantes de diferentes intensidades sobre o crescimento do *Saccharomyces cerevisiae*. No experimento, foi feito o monitoramento de parâmetros como: densidade celular, consumo de glicose e produção de íons de hidrogênio. Os autores afirmam que o campo magnético pulsante de 150 Gauss e 120 Hz, não interfere significativamente no crescimento da levedura e que o campo pulsante de 300 a 2000 Gauss possui efeito máximo em 600 Gauss com 8 horas de exposição. Para esta intensidade, a densidade óptica do grupo magnetizado foi estatisticamente maior em 29% e, a glicose residual significativamente menor; resultando num consumo de glicose 25% maior no grupo magnetizado. No campo magnético alternante, de 450 Gauss e 60 Hz, houve uma diminuição de 19% na velocidade de crescimento em relação ao controle e os campos magnéticos contínuos de 300 a 600 Gauss, não produziram efeitos significativos nos parâmetros estudados. Em decorrência da complexidade dos seres vivos e em se tratando de sistemas unicelulares, como é o caso, não foi possível saber quais estruturas foram alteradas pela ação dos campos magnéticos para se obterem respostas a fenômenos, observados macroscopicamente. Porém, existem algumas formas pelas quais um sistema biológico poderia interagir com um campo magnético externo. Em termos gerais, dois fenômenos são relacionados pelos autores. O primeiro é a interação entre cargas elétricas (íons) em movimento e campos magnéticos e o segundo é a interação entre dipolos magnéticos moleculares ou atômicos e campos magnéticos. Em ambos os casos, deveriam ser consideradas as características paramagnéticas, tanto do sistema biológico quanto do meio de cultivo. Os autores afirmam ainda que nos seres vivos existem campos magnéticos, associados ao movimento de partículas portadoras de cargas elétricas, especialmente através das membranas e do citoplasma de células; além da existência de estruturas magneticamente influenciáveis que se comportam como dipolos magnéticos em presença de campos magnéticos externos, a exemplo dos radicais livres que apresentam propriedades paramagnéticas. Os efeitos de campos magnéticos sobre o crescimento de leveduras estão relacionados com a rotação de partículas do sistema, as quais se comportariam como dipolos magnéticos que tenderiam a orientar-se no campo externo, segundo a direção deste. Isto implicaria que o campo magnético estático estaria produzindo uma restrição à livre rotação térmica das moléculas paramagnéticas.

Moraes *et al.* (1986) executando estudos sobre os efeitos do etanol na atividade fermentativa do *Saccharomyces cerevisiae* observaram que o efeito do etanol no crescimento da levedura apresenta uma cinética de inibição não competitiva, característica esta, também encontrada na atividade fermentativa. Para tanto os autores cultivaram a cepa Y 185 do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em meio sólido, a 4°C. O crescimento era medido através da densidade celular relacionada com o peso seco através da curva de calibração. A produção de etanol e de gás carbônico foi acompanhada observando as velocidades de produção de CO₂, utilizando os frascos conectados a um respirômetro de Gilson. A fermentação era iniciada logo após a adição da suspensão de células no interior do frasco do respirômetro. Quando em presença de etanol, a liberação de CO₂ só se iniciava após uma curta fase “lag” que variava de 4 a 15 minutos cuja duração aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração inicial de etanol. Esta fase acontecia, devido à dificuldade de homogeneização entre células e etanol nos frascos. Após esta fase, não linear, a produção de CO₂, variou linearmente com o tempo e sua velocidade diminuiu, proporcionalmente, ao aumento da concentração de etanol nos diferentes frascos que no experimento foi de: 36,8; 46,0; 55,2; 64,4; 73,6; e 82,8 g/L.

Gutiérrez *et al.* (1988), investigando o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes fontes e concentração de carbono, afirmaram que a concentração de açúcar do meio não teria uma relação linear com a velocidade de crescimento da levedura. Observaram também que o pH do meio tem pouca influência no crescimento. Para o experimento, o meio de cultura utilizado era composto de extrato de levedura 1g/L, bactopectona 2g/L e glicose nas seguintes concentrações: 1, 20, 60 e 100 g/L com o pH ajustado para dois valores: 4,5 e 6,2. Os pesquisadores testaram 2 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, uma selvagem e uma outra EC-81 mutante antibiótico resistente. A velocidade de crescimento da cepa selvagem, independente da concentração de açúcar e do pH, se manteve sem diferenças estatisticamente significantes, enquanto que a cepa mutante apresentou um crescimento ótimo na concentração 20 g/L de glicose.

Okuno *et al.* (1991), trabalhando com aplicação de altos campos magnéticos no crescimento da *Escherichia coli*, citam que não foi observado nem mutação nem efeitos letais sobre a bactéria, quando expostas a campos magnéticos de 117.000 Gauss. Quando a bactéria foi cultivada em meio complexo, o crescimento foi estimulado e quando cultivada em meio sintético, a taxa de crescimento foi reduzida significativamente. Observaram ainda, que o campo magnético pode provocar algum efeito como mudança na estrutura da membrana

alterando a permeabilidade da mesma, mudança na conformação de enzimas ou atividades intracelulares. Foram utilizados dois meios complexos e dois meios sintéticos durante o experimento. Os meios complexos eram ricos em compostos orgânicos e os meios sintéticos em compostos inorgânicos.

Ager e Radul (1992) verificaram que campos eletromagnéticos de 10 Gauss e 60Hz não induzem, em células de *Saccharomyces cerevisiae*, nem mutação, nem ligações cruzadas de cromossomos homólogos (*crossing-over*) nem conversão de gene. Para realizar as análises os autores expuseram células da levedura durante 3 dias à temperatura ambiente entre 23 e 24°C em meio YPD.

Malko *et al.* (1994), submeteram *Saccharomyces cerevisiae* a campos magnéticos de 15.000 Gauss, usando um aparelho clínico de ressonância magnética. Os autores relatam que não encontraram evidências estatísticas que comprovassem o efeito do campo no crescimento celular. As células magnetizadas e o controle foram cultivados à mesma temperatura e o crescimento celular, observado através de microscopia óptica e contagem de células viáveis. O experimento foi realizado, durante, aproximadamente, sete divisões celulares. Os autores não encontraram mudanças no crescimento celular das leveduras expostas ao campo, provavelmente devido ao curto tempo de exposição. A exposição ao campo, segundo os autores, se deu por um período de aproximadamente sete divisões celulares, o que equivaleria a aproximadamente 3,5 horas, uma vez que as leveduras, normalmente, se reproduzem em ciclos de 30 min (Macedo, 1993). Os efeitos biológicos no crescimento de leveduras, expostas a campos magnéticos, normalmente são observados, após seis horas de exposição, ou mais, conforme detectamos na maioria dos relatos da literatura.

Blank *et al.* (1995) em seus estudos relatam que a atividade da bomba de sódio-potássio (Na,K-ATPase) da membrana é afetada, quando em presença de campos elétricos e magnéticos. Sob condições ótimas, a atividade enzimática é inibida por campos elétricos e estimulada por campos magnéticos. No entanto, ambos os campos causam incrementos na atividade enzimática, quando a atividade basal da enzima é reduzida pela idade, por diminuição da temperatura, ou por inibidores. Os autores verificaram que, sob condições basais, o campo magnético (0 a 70 Hz e 0 a 2 Gauss) aumenta a atividade da Na,K-ATPase de 5 a 10%.

Binninger e Ungvichian (1996) afirmam que a expressão de gens em *Saccharomyces cerevisiae* é alterada pela resposta à exposição contínua a um campo eletromagnético de 0,2 Gauss e 60 Hz. Este efeito foi observado por mudanças na quantidade

de m(RNAs) específicos. Estas mudanças foram avaliadas através de eletroforese bidimensional em gel. As leveduras foram expostas ao campo, durante um período de aproximadamente 15 divisões celulares

Vigants *et al.* (1996) estudaram mudanças nos parâmetros do anabolismo (velocidade de crescimento, aumento da biomassa) e do catabolismo (produção de etanol e levana) da bactéria *Zymomonas mobilis*. Para o experimento, os autores utilizaram um meio de cultura, contendo sacarose como fonte de carbono. Verificou-se a existência de uma significativa relação linear entre um incremento no crescimento da biomassa e um aumento na produção de etanol. Com estes resultados, os autores sugerem que a síntese de etanol em *Zymomonas mobilis* tem um crescimento associado ao aumento da biomassa.

Ivanova *et al.* (1996) trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizado em reator com leito estabilizado em campo magnético externo de 800 Gauss a 2.600 Gauss, transversal ao escoamento do fluido. Através da variação do fluxo de fluido, independentemente da variação da intensidade de campo, os autores afirmam que puderam variar a expansão do leito, permitindo a criação de leitos fixos com diferentes arranjos de partículas que afetaram a porosidade do leito, a área de contato fluido-partícula e os processos de transferência de massa. Neste trabalho, foi observado altas concentrações de etanol (1,5 vezes maior) e consumo de glicose 27% superior ao alcançado em reator de leito convencional. (reator de leito fixo sem presença de campo magnético).

Shoda (1996), ao expor células de *Escherichia coli* a campos magnéticos de 70.000 Gauss, observou que não houve aumento na taxa de morte celular de mutantes bacterianos com vários sistemas de reparo deficientes. Isto levou o autor a concluir que esta intensidade de campo, não afeta o DNA destas células. No experimento, bactérias foram cultivadas no SBS (Superconducting Magnet Biosystem), que nada mais é do que um ímã e um biorreator sob um campo magnético contínuo de 70.000 Gauss. Observou-se que o crescimento celular foi praticamente igual ao grupo controle (sem campo) até a fase estacionária, mas que na fase de declínio, o número de células do grupo teste, foi sempre mais elevado do que o controle, indicando que quando os nutrientes celulares estão se exaurindo, as células ficam sensíveis a altos campos magnéticos. O crescimento celular foi acompanhado durante as fases exponencial, estacionária e de declínio, e o tempo de acompanhamento variou de 24 à 72h.

Montenegro (1999) relata que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio Sabouraud (glicose 40g/L), submetido à ação de um campo magnético de 2.200 Gauss,

produziu 72% a mais de CO₂ que o grupo controle (sem o campo). Neste experimento, foi verificado que a atividade da hexoquinase, determinada através de Kit enzimático, aumentou de 10 a 15%.

Horiuchi *et al* (2000) cultivaram a bactéria *Escherichia coli*, aerobiamente, em meio LB (Luria-Bertani), composto de: 10g/L de polipeptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de NaCl, suplementado com ácido glutâmico a 43°C, com pH foi ajustado para 7, sob a ação de campos magnéticos na faixa de 52.000 a 61.000 Gauss. O número de células neste experimento, na fase estacionária, foi 100.000 vezes maior do que o grupo que não estava submetido ao campo magnético. Acredita-se que a quantidade de fator sigma S, codificado pelo gene rpoS do grupo submetido ao campo magnético, é maior que o do grupo controle, indicando que a atividade do gene rpoS pode ser afetada pelo alto campo magnético.

Motta *et al.* (2001) em seus experimentos, submeteram leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* à ação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, de 1.100 Gauss e 2.200 Gauss. Os autores afirmam que na presença do campo magnético de 2.200 Gauss houve um aumento de 84% na biomassa e de 36,1% na produção de CO₂ em relação ao controle (sem a presença do campo). Citam ainda que não encontraram diferenças significativas nos parâmetros estudados, quando em presença do campo de 1.100 Gauss. Para a realização dos estudos foram utilizados frascos com tampa, contendo meio Sabouraud (glicose 20 g/L) e leveduras, expostas ao campo magnético, durante 24horas.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta inicialmente uma descrição detalhada dos materiais utilizados neste experimento entre eles os biorreatores, os magnetos, os meios de cultura, os microrganismos e os equipamentos utilizados no experimento. Em seguida, são relatadas técnicas de cultivo e manuseio do microrganismo, formas de exposição de meios de fermentação a campos magnéticos, e por fim, técnicas de análises de acompanhamento da fermentação.

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Experimentos em biorreatores

As fermentações foram conduzidas segundo duas condições: experimentos em biorreatores, com agitação mecânica, e experimentos em frascos, sem agitação mecânica.

Os biorreatores utilizados têm capacidade interna de 150 mL e volume útil de 120 mL. Foram vedados com tampa de borracha, as quais continham orifício excêntrico de 3 mm de diâmetro, para retirada de amostra, e um furo central de mesmo diâmetro, por onde passa o eixo giratório em aço inoxidável, com duas hélices transversais acopladas ao mesmo, que giravam a 104 rpm. As hélices têm formato retangular, com 13 mm de comprimento e 4 mm de altura. A hélice inferior dista 13 mm do fundo da proveta e 40 mm da hélice superior.

A agitação mecânica dos biorreatores foi possível, mediante uma estrutura descrita a seguir. Nestes casos foi utilizado um biorreator como teste e um como controle.

3.1.1.1 – Sistema de agitação mecânica e suporte dos biorreatores.

A estrutura é composta de uma base inferior de madeira e metal, fixada a uma base superior de metal, por intermédio de quatro colunas metálicas verticais (Figura 2).

Os dois biorreatores (teste e controle) estão apoiados na base inferior de madeira de dimensões 100 mm x 400 mm x 30 mm com um sulco central indentado lateralmente para melhor fixação e estão separados entre si por 400 mm de distância.

Os eixos de agitação do meio de fermentação são acionados por um sistema de polias e transmissão por correias impulsionadas por um conjunto motor elétrico com redutor

de velocidade (9w-52rpm-110v, Bodine Eletric Company, Chicago, USA). O motor elétrico situa-se no ponto médio da base superior, em posição eletricamente neutra.

O sistema de polias que interliga cada reator ao motor compõe-se de uma polia motriz de três gumes e 30 mm de diâmetro, acoplada ao eixo do conjunto motor-redutor e duas polias movidas de dois gumes e 15 mm de diâmetro, acopladas a rolamentos 20 mm de diâmetro, fixados às extremidades da base superior da estrutura por meio de parafusos.

As polias movidas possuem furo central por onde são acoplados os eixos de agitação dos meios de fermentação. A rotação da polia motora é 52 rpm e das movidas, 104 rpm. Este sistema permite acionar simultaneamente os eixos de cada reator por transmissão por correias de secção circular. As correias foram dimensionadas de forma a impedir o deslizamento nas polias, garantindo a rotação de 104 rpm em cada eixo.

As colunas verticais que interligam as bases inferior e superior têm perfil “L” com 250 mm de altura, a uma barra horizontal em perfil “L” com 200 mm de comprimento. As barras de comprimento 200 mm foram fixadas numa base de madeira por parafuso, constituindo a base inferior da estrutura de suporte. Superiormente, as terminações das quatro barras metálicas foram fixadas em uma chapa metálica com perfil em “U” de 100 mm x 20 mm, que constitui a base superior da estrutura.

Na extremidade, onde se situa o reator 2 (magnetizado), a estrutura metálica inferior e vertical não foram prolongadas para evitar interferência magnética que o material constituinte da barra metálica poderia causar nos resultados obtidos, neste biorreator.

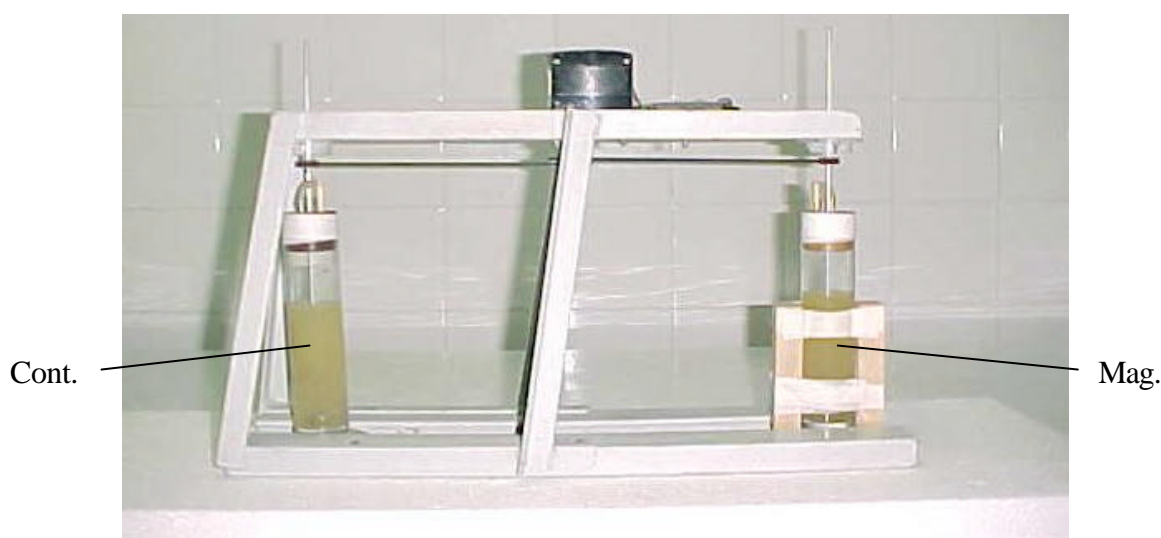


Figura 2 - Experimentos em biorreatores, dotados de agitação mecânica

3.1.2 - Experimentos em frascos

Os frascos colocados sobre uma base de isopor, foram agitados manualmente, apenas nos momentos das retiradas das amostras para análises. Nestes experimentos, foram usados dois frascos submetidos ao campo magnético e dois frascos como controle sem a presença do campo magnético.

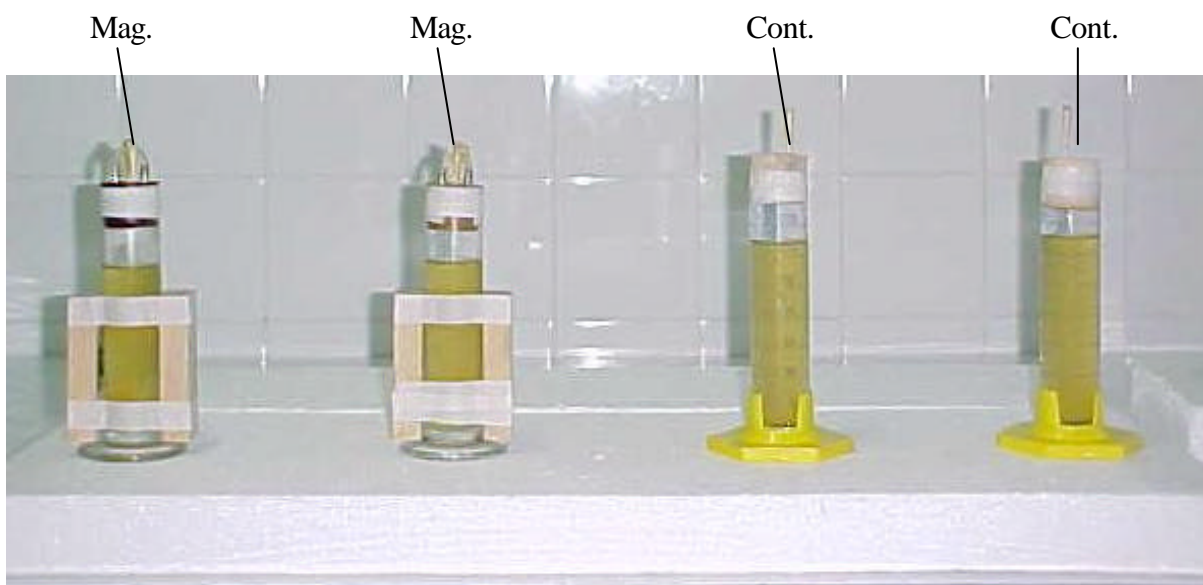


Figura 3 - Fermentações em frascos adaptados para utilização de campo magnético

3.1.3 - Campo magnético

3.1.3.1 - Geração do campo magnético

O campo magnético utilizado no experimento é do tipo estático, não homogêneo, de intensidade 2.650 Gauss, gerado com o auxílio de magnetos.

3.1.3.1.1. - Magnetos.

Os magnetos utilizados têm formato cilíndrico (Figura 4), constituídos da liga metálica NdFeB (Neodymium-Ferro-boro) com $\frac{1}{2}$ pol de diâmetro e $\frac{1}{4}$ pol de espessura (modelo 27DNE3208 Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc. USA) com densidade residual de fluxo $B_r = 12.300$ Gauss. 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 3.1 (Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc.).

$$B_x = \frac{B_r}{2} \left(\frac{L + X}{\sqrt{R^2 + (L + X)^2}} - \frac{X}{\sqrt{R^2 + X^2}} \right) \quad (3.1)$$

Onde: R – Raio da base do magneto, L – espessura do magneto (Figura 4)

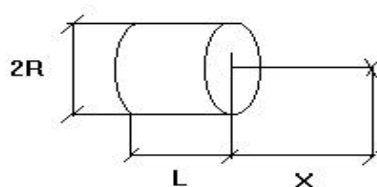


Figura 4 - Representação gráfica de um magneto cilíndrico de raio R e espessura L.

A equação 3.1 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.

3.1.4. - Microrganismo

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

3.1.5 - Meios de cultura

3.1.5.1 - Meio de manutenção

A levedura foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar. O meio foi preparado com pH ajustado para 5,6 e esterilizado em autoclave a 120°C, durante 15 minutos. Em seguida, foi então distribuído 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 2.

Tabela 2 - 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

3.1.5.2 - Meios de pré-fermentação e fermentação

Os meios de crescimento utilizados nas pré-fermentações foram os mesmos meios utilizados durante as fermentações. As fermentações Tipos X e Y foram realizadas, utilizando um meio, contendo extrato de levedura e glicose, denominado de meio A. O meio A foi preparado com pH ajustado para 5 e esterilizado em autoclave a 120°C, durante 15 minutos. Os componentes do meio A e suas respectivas concentrações estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes do meio de fermentação A

Componente:	Quantidade	Unidade
Extrato de levedura	5	g/L
Glicose	50	g/L
Água destilada	1000	mL

Nas fermentações Tipo Z foi utilizado um meio de crescimento, contendo sais minerais, glicose e extrato de levedura, denominado de meio B. No preparo do meio B, cada sal utilizado, foi previamente dissolvido em água e a seguir adicionado ao meio contendo glicose já dissolvida, permitindo assim uma homogeneização perfeita dos componentes. O meio teve o pH ajustado para 5 e foi esterilizado em autoclave a 120°C, durante 15 minutos. A Tabela 4 apresenta os componentes do meio B, com as suas respectivas concentrações.

Tabela 4 - Componentes do meio de fermentação B

Componente	Quantidade	Unidade
(Glicose) $C_6H_{12}O_6$	150	g/L
(Fosfato de Potássio Monobásico Anidro) KH_2PO_4	2	g/L
(Sulfato de Magnésio Hidratado) $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	1	g/L
(Sulfato de Amônio) $(NH_4)_2SO_4$	2	g/L
(Sulfato de Manganês Hidratado) $MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	g/L
(Sulfato de Cobre Hidratado) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01	g/L
(Cloreto de Cálcio) $CaCl_2$	0,05	g/L
(Sulfato Ferroso) $Fe SO_4$	0,01	g/L
Extrato de Levedura	5	g/L
Água destilada	1000	mL

3.1.6 – Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos, durante a realização dos ensaios:

- Espectrofotômetro Labormed, Inc, modelo Spectro UV-VISORS, EUA
- Balança Analítica Scaltec GMBH Heiligenstadt, modelo SBA31, precisão 0,0001g, Alemanha.
- Balança Semi Analítica Marte-Balanças e Equipamentos, modelo AS2000C, São Paulo, Brasil.
- Microscópio Binocular Carl Zeiss, Contraste de Fase, São Paulo, Brasil.
- Cromatógrafo à Gás Ciola & Gregori LTDA, modelo CG Máster, São Paulo, Brasil
- Potenciômetro Metrohm Herisau, modelo E350B, Suíça
- Estufas Microbiológicas Fanem LTDA, modelo002CB, São Paulo, Brasil.
- Autoclaves Ibacli-AS, São Paulo, Brasil.
- Gaussímetro F.W. BELL, modelo 9.500 EUA
- Estufa à Vácuo, Marconi Equipamentos para Laboratório, Modelo MA030, Piracicaba, SP, Brasil.
- Magnetos cilíndricos NdFeB, Magnet Sales & Manufacturing Company, Inc. modelo 27DNE3208 EUA

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Manutenção dos microrganismos

As culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, DAUFPE 1012, foram mantidas em meio sólido, Sabouraud Dextrose Ágar sob refrigeração a 4°C e repicadas para novos meios sólidos, a cada 60 dias. Depois de repicadas, as culturas foram mantidas em estufa, por dois dias, a 30°C e após o crescimento foram novamente refrigeradas a 4°C. Desta maneira, manteve-se sempre uma quantidade de células, em estoque suficiente, para satisfazer à demanda das fermentações.

3.2.2 - Preparo do inóculo

A fase de pré-fermentação consistiu na inoculação de células de *Saccharomyces cerevisiae*, retiradas do meio de manutenção (sólido) no meio de Pré-fermentação (líquido) estéril. As células inoculadas no meio de pré-fermentação eram mantidas em estufa a 30°C, por um período de 18 a 20 horas. Após este período, adicionava-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 todos os biorreatores, os volumes de pré-fermentação eram adicionados ao meio de fermentação, contido em um balão de fundo chato de capacidade 1000mL, obedecendo ao aumento de volume de cultivo na ordem de 10%(v/v). Produzia-se numa quantidade suficiente para abastecer a todos os biorreatores. A seguir o meio era homogeneizado e feita a distribuição para cada biorreator. Todas as etapas seguiram-se, obedecendo às técnicas de manuseio de microrganismos. O volume útil de cada biorreator era de 120mL. Durante a fermentação não houve controle de temperatura. A temperatura utilizada foi a temperatura ambiente, $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, tanto para o grupo teste (magnetizado), quanto para o controle.

3.2.3 - Obtenção de amostras

A retirada de material dos biorreatores para análises foi realizada através de um orifício na tampa de borracha, utilizando agulha de (120x2) mm acoplada a uma seringa de 5 mL. Os orifícios foram abertos, (destampados) apenas no momento da retirada do material e

sempre próximo a um bico de Bunsen. No início de cada fermentação, foram retirados 3mL do conteúdo de cada biorreator para análises. Das amostras seguintes, foi retirado apenas 1,5 mL de cada biorreator. Ao final de cada fermentação, foram retirados em média 12 mL do conteúdo de cada biorreator, o que equivale a 10% do volume inicial.

3.2.4 - Exposição ao campo magnético

Os biorreatores teste foram submetidos ao campo gerado por cinco pares de magnetos cilíndricos (modelo 27DNE3208 NdFeB fabricados por Magnet Sales & Manufacturing, Inc.) os quais se defrontavam com os pólos opostos. A exposição ao campo magnético, foi projetada, obedecendo a dois esquemas, os quais foram chamados de arranjo 1 e arranjo 2. No arranjo 1, cinco magnetos de mesma polaridade foram instalados na superfície externa das paredes do biorreator e no lado diametralmente oposto, mais cinco magnetos de polaridade contrária, também foram instalados, conforme esquematizado na Figura 5.

Para construção desta estrutura, foram encaixados cinco magnetos de cada lado do biorreator, em um suporte de madeira, com espaçamento de 13 mm entre os centros de cada magneto.

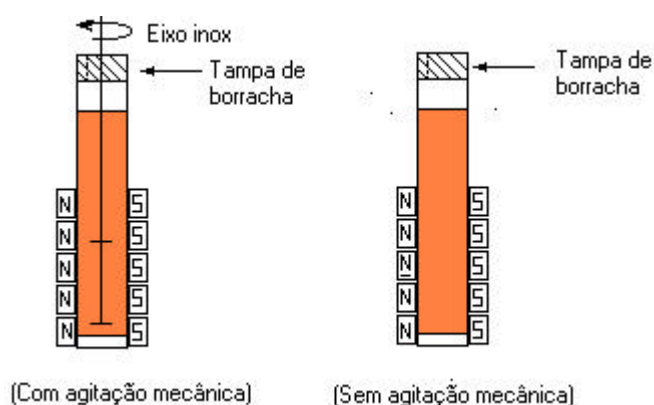


Figura 5 - Arranjo 1 dos biorreatores expostos a campo magnético gerado por magnetos cilíndricos

O campo magnético, gerado na parede interna do biorreator, próximo aos magnetos, era de 2650 Gauss e no ponto médio da distância entre cada par de magnetos no eixo central do biorreator, era de 450 Gauss, originando um gradiente de campo horizontal de 2.200 Gauss entre o centro e a superfície interna, adjacente a cada par de magneto.

O arranjo 2, apresentado na Figura 6, mostra os magnetos na parede do biorreator com os pólos opostos se defrontando alternadamente, originando no interior do biorreator campos magnéticos adjacentes de sentidos opostos entre cada par de magnetos. O campo gerado por cada par de magnetos, compete com o do par vizinho, chegando praticamente a se anularem no interior no biorreator.

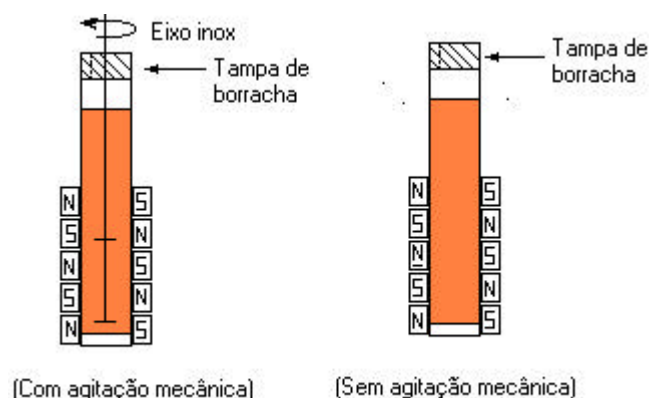


Figura 6 - Arranjo 2 dos biorreatores, expostos a campo magnético, gerado por magnetos cilíndricos

Neste trabalho foram estudados três Tipos de fermentação, combinando a forma de magnetização com o meio de crescimento, que chamaremos de Tipos X, Y e Z relacionadas na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Tipos de fermentação utilizados nos experimentos

FERMENTAÇÕES	MEIOS DE CRESCIMENTO	FORMAS DE MAGNETIZAÇÃO
TIPO X	A	ARRANJO-1
TIPO Y	A	ARRANJO-2
TIPO Z	B	ARRANJO-1

3.2.5 - Análises de acompanhamento da fermentação

3.2.5.1 - Biomassa

Para determinar a concentração de células, ao longo do tempo de cada fermentação, foi utilizado o método fotométrico. As leituras das absorbâncias foram

realizadas no espectrofotômetro Labomed inc, modelo Spectro UV-Visors. Foi utilizada água como branco, em comprimento de onda de luz visível de 660nm. A absorvância foi relacionada com a concentração celular, através da curva de calibração de absorvância, versus concentração celular obtida por peso seco em g/L.

3.2.5.1.1 - Peso seco

O peso seco se faz necessário para construção da curva de calibração (Absorvância x Biomassa). Para obtenção de peso seco de células foi seguido os seguintes procedimentos:

- Foi colocado três pesa filtros por 3 horas em estufa a 80°C.
- O mosto final da fermentação foi centrifugado (2000 rpm/5min).
- Em seguida, três amostras de 3 mL deste mosto foi centrifugado nas mesmas condições, anteriormente descritas, e todo o sobrenadante, descartado. O sedimento foi resuspendido em água e centrifugado duas vezes.
- Após a última centrifugação, a massa celular foi resuspendida em água e colocada nos pesa filtros, item a, após os mesmos terem passado, 10 min no dessecador para estabilizar a umidade, seguido de pesagem em balança analítica.
- Em seguida, os pesa filtros foram levados para a estufa à vácuo, até peso constante.
- O final foi obtido o peso seco correspondendo a 3 mL do mosto concentrado, qual pode ser expresso em (mg/mL) ou (g/L).

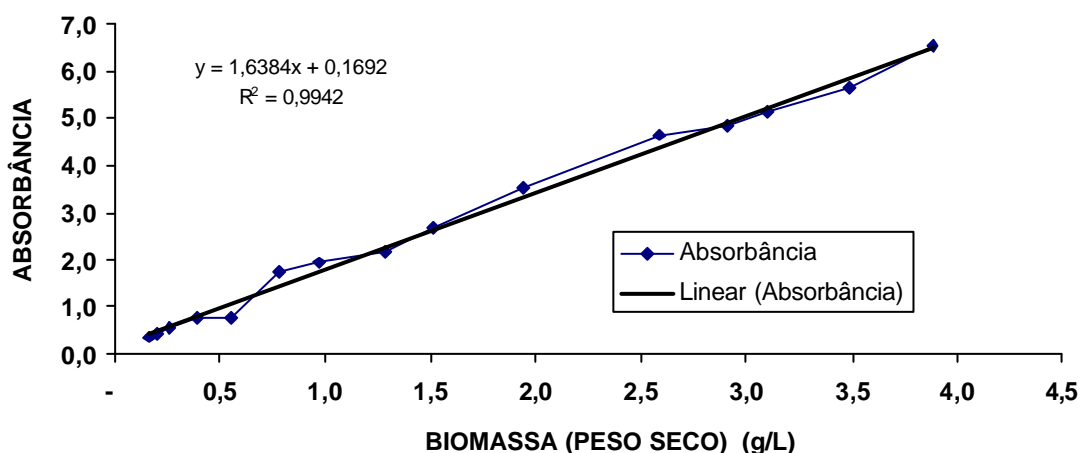


Figura 7 - Curva de calibração, absorvância, versus concentração celular

3.2.5.2 - Dosagem de açúcares redutores (Miller, 1959)

A determinação dos açúcares redutores ao longo das fermentações foi realizado pela adaptação do método do Ácido Dinitrosalicílico, (DNS) segundo Miller (1959). Este método determina a concentração de açúcares redutores, por fotometria, através da variação de cor do ácido DNS, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Esta relação permanece linear para concentrações de açúcares redutores que variam dentro da faixa de 0 a 1,8 g/L.

3.2.5.2.1 - Método do ácido dinitrosalicílico

Prepara-se uma solução padrão a 1,8 g/L de glicose e constrói-se uma curva padrão para DNS. De posse da curva padrão, escolhe-se a alíquota cuja concentração de glicose está próxima do ponto médio do intervalo de transmitância, $30 < T < 70$. Para o nosso caso, trabalhamos alíquotas de 0,2 mL cuja transmitância foi 44,7. representada na curva padrão para DNS, mostrada na Figura 10.

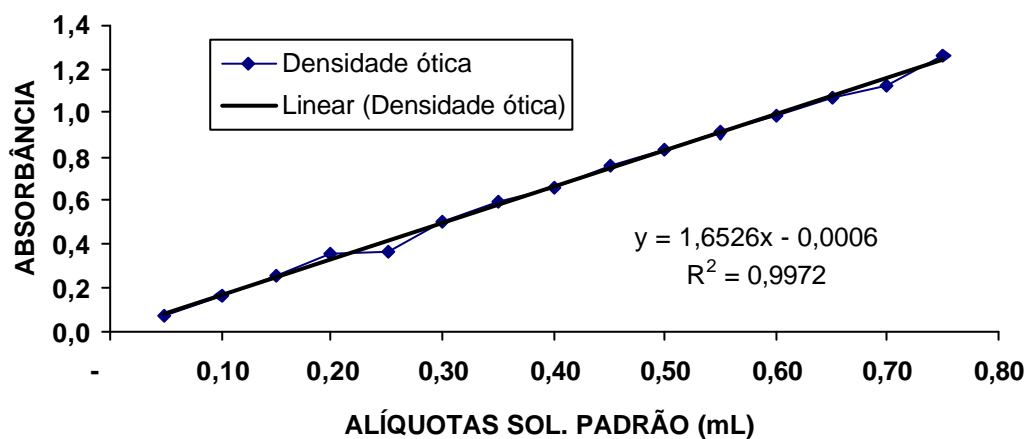


Figura 8 - Curva padrão para DNS (absorbância versus concentração glicose)

Escolhida a alíquota de 0,2 mL através da curva padrão, executam-se os procedimentos:

1. Foram colocados em cada tubo de Folin-Wu, alíquotas com 0,2 mL da solução padrão, da solução utilizada como branco e dos meios de fermentação, já feitas as devidas diluições em água para que a concentração de açúcares redutores do meio, esteja na faixa de 0 a 1,8 g/L de glicose.

2. As alíquotas foram completadas com 0,55 mL de água destilada, perfazendo assim 0,75 mL.
3. Foram adicionados 0,5 mL do reagente, contendo ácido DNS, em cada tubo.
4. Os tubos foram homogeneizados e aquecidos por 5min em banho de água a 100°C (ebulição).
5. Em seguida, foram resfriados imediatamente em banho de gelo.
6. O volume de cada tubo foi completado com água elevando-se para 12,5mL.
7. Foram feitas as leituras no espectrofotômetro a 540nm, tendo ensaio em branco como referência (sem glicose) e um ensaio padrão a 1,8 g/L de glicose.
8. Depois de executadas as leituras no espectrofotômetro, as concentrações de glicose das amostras são determinadas através de regras de três simples.

3.2.5.3 - Dosagem de etanol.

A determinação da concentração de etanol das amostras foi realizada através de cromatografia gasosa, utilizando o Cromatógrafo, modelo CG MASTER, Ciola & Gregori, São Paulo, Brasil.

3.2.5.4 - Monitoramento do pH.

A determinação do pH das amostras foi feita utilizando o potenciômetro, modelo E350B, Metrohm Herisau, Suíça

3.2.5 – Análises estatísticas.

Foram calculados: médias aritméticas, desvios padrão e testes T de Student, para os grupos controle e magnetizado das variáveis estudadas. Os Testes estatísticos estão apresentados no apêndice B.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta e discute os resultados obtidos nos ensaios de aplicação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, em fermentações alcoólicas. A influência do campo magnético foi avaliada através do acompanhamento da biomassa, da produção de etanol, do consumo de glicose e do pH nos biorreatores magnetizados e controle, sem a presença de campos magnéticos externos.

4.2 – FERMENTAÇÃO TIPO X

A Fermentação Tipo X, (meio A, arranjo 1) como apresentada na Tabela 5 foi realizada utilizando pré inóculo de 20 horas e o pH ajustado para 5, com e sem agitação mecânica de 104 rpm. A biomassa inicial dos dois grupos estudados foi sempre a mesma em cada fermentação, uma vez que, o volume do pré-inóculo era adicionado a um recipiente único, contendo o meio de crescimento, que depois de homogeneizado, era distribuído para os biorreatores.

Foram realizadas quatro repetições da fermentação do Tipo X em dias diferentes. As repetições denominadas de X_1 , e X_2 , foram realizadas com agitação mecânica, enquanto que as repetições X_3 e X_4 em condições estáticas, agitadas apenas no momento da retirada de amostra para análises. A fermentação X_1 apresentada na Figura 9 mostra que ao longo de 24 horas foi observado um elevado incremento na biomassa e na produção de etanol. A biomassa do grupo magnetizado, a partir de 5 horas de fermentação, foi sempre superior a do controle, e com 24 horas, este aumento atingiu 135% a mais. A produção de etanol também passou a ser superior à do controle, a partir de 5 horas de fermentação e com 24 horas foi 95% maior.

Em consequência do crescimento microbiano e da produção de etanol, o consumo de glicose por *Saccharomyces cerevisiae* foi mais acentuado na fermentação magnetizada que no controle. Em torno de 24 horas de fermentação, o grupo magnetizado havia consumido praticamente todo o substrato, enquanto que, a glicose residual do controle era 12,23 g/L.

O pH desta fermentação variou entre 4 e 5, intervalo este considerado pela literatura especializada, como ótimo para fermentações alcoólicas, como relatado por

Underkofler e Hickey (1954). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi percebida no acompanhamento do pH.

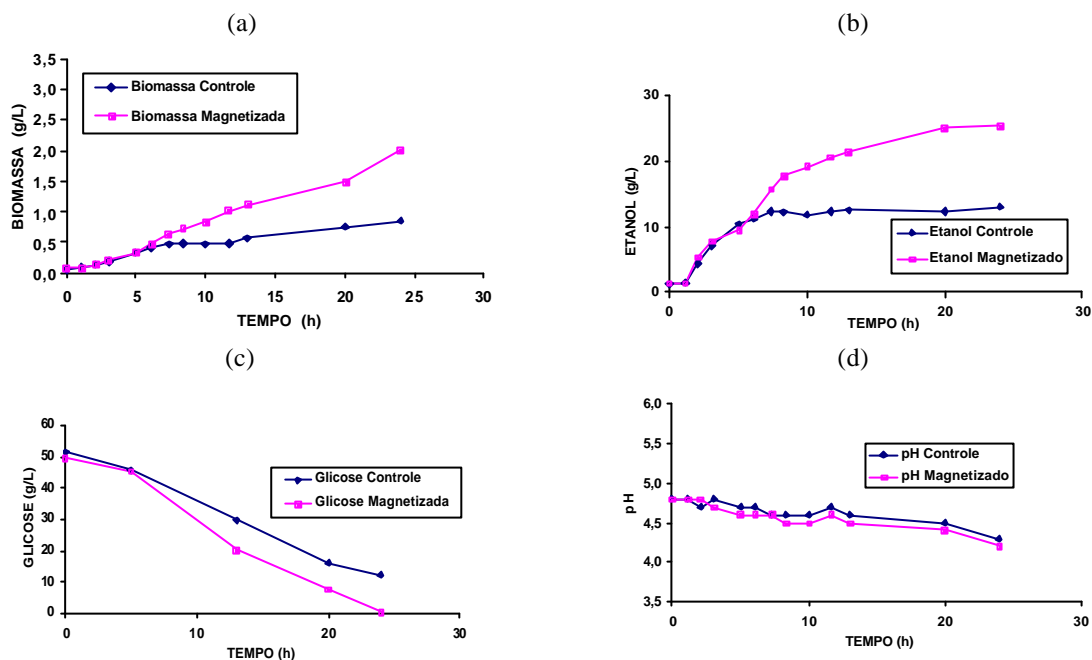


Figura 9 – Fermentação X_1 : curvas das variáveis monitoradas durante a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

O aumento da biomassa, produção de etanol e consumo de glicose observados na fermentação X_1 foram reproduzidos nas três fermentações seguintes realizadas sob as mesmas condições. As Figuras 15, 16 e 17 apresentadas no Apêndice C mostram os resultados destas fermentações X_2 , X_3 e X_4 , realizadas em dias diferentes.

Belossi e Duclos (1973), trabalhando com campos magnéticos de 5.200 Gauss, em meio de crescimento semelhante aos utilizados na fermentação X , afirmam terem obtido um aumento de 26 % na taxa de brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após 3 horas de exposição. Entretanto foi observado na fermentação tipo X que o aumento na biomassa só foi perceptível depois de 5 horas de exposição ao campo magnético. Possivelmente, a escolha da intensidade de campo de 5.200 Gauss, utilizada pelos autores, que corresponde ao dobro da utilizada neste experimento, tenha contribuído de forma mais eficaz para este estímulo inicial.

Moskwa e Roskowska (1965) utilizando campos magnéticos similares ao deste trabalho (2.400 a 3.600 Gauss), com *Saccharomyces cerevisiae*, em intervalos de tempo de 35 a 90 minutos de exposição, não verificaram nenhum efeito positivo sobre a biomassa e produção de etanol. Os resultados destas autoras podem estar relacionados com o pequeno

tempo de exposição, utilizado em seu experimento (35 a 90 minutos), uma vez que nos nossos resultados, com 5 horas de exposição a campos magnéticos similares, também não foi observado nenhum incremento. Por isto, um maior tempo de exposição será necessário para que se tenha um incremento na biomassa e produção de etanol.

Trabalho mais recente de Motta *et al.* (2001) utilizando campo magnético similar, observaram um aumento de 84% na biomassa, enquanto que neste nosso trabalho o incremento obtido para as mesmas condições foi de 109%. Este resultado mostra a grande potencialidade do campo magnético para a fermentação alcoólica.

A análise dos gráficos de biomassa e de etanol (Figuras 9a e 9b; 15a e 15b, 16a e 16b, 17a e 17b) permite verificar que a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* está associada ao aumento da biomassa, ou seja, nesses casos onde a biomassa do grupo magnetizado cresceu mais do que o controle, a produção de etanol também foi maior do que a do controle. Em fermentações alcoólicas por *Zymomonas mobilis* também pode ser observado fenômeno similar, como enfatiza Vigants *et. al.* (1996).

O catabolismo da glicose pela via anaeróbia (fermentativa) é dado através da equação química simplificada, mostrada abaixo, chamada de equação de Gay-Lussac:



Por esta equação, verifica-se que para cada molécula de etanol produzida, obtém-se também uma molécula de CO₂. Na prática, sabemos que não seria possível chegar a esse resultado, pois, além de CO₂ e etanol, formam-se produtos secundários como glicerina e ácido lático, além do consumo de açúcar destinado ao crescimento celular. Porém, esta equação serve como base para afirmar que a produção de etanol numa fermentação alcoólica está diretamente ligada à produção de gás carbônico. Esta observação é para enfatizar que muitos trabalhos com campos magnéticos usam a produção de CO₂ como parâmetro para verificar o aumento da eficiência da fermentação.

Muitos são os relatos que afirmam que a produção de gás CO₂ por *Saccharomyces cerevisiae*, foi estimulada pela ação de campos magnéticos estáticos, com intensidades semelhantes às utilizadas neste experimento. Entre eles, podemos destacar Montenegro (1999) que afirma que fermentações alcoólicas por *Saccharomices cerevisiae*, submetida à ação de campos magnéticos de 2.200 Gauss, produziram 72 % mais CO₂ que o controle (sem a presença do campo), após 24 horas de exposição.

Motta *et al.* (2001) realizando fermentações em frascos, sem agitação mecânica, sob a ação de campos magnéticos externos de 2.200 Gauss, conseguiram um aumento de 36,1% na produção CO_2 , após 24 horas de exposição ao campo. Trabalhando com fermentações contínuas e com intensidades de campos semelhantes às usadas neste experimento, Ivanova *et al.* (1996) conseguiram bons resultados em fermentações alcoólicas, ao submeterem leveduras imobilizadas em reator com leito estabilizado magneticamente, utilizando campos magnéticos externos de 800 Gauss a 2.600 Gauss. Os autores afirmam ter verificado que a produção de etanol foi 1,5 vezes maior e que a taxa de consumo de glicose nos reatores magnetizados foi 27% maior que nos reatores de leito convencional (reator de leito fixo sem a presença de campos magnéticos externos), indicando que houve um aumento no metabolismo da levedura exposta ao campo.

Estes trabalhos mostram que campos magnéticos em torno de 2.200 Gauss, correspondem a campos que promovem uma boa resposta na produção de biomassa e etanol.

A Figura 10 mostra os resultados médios da fermentação tipo X.

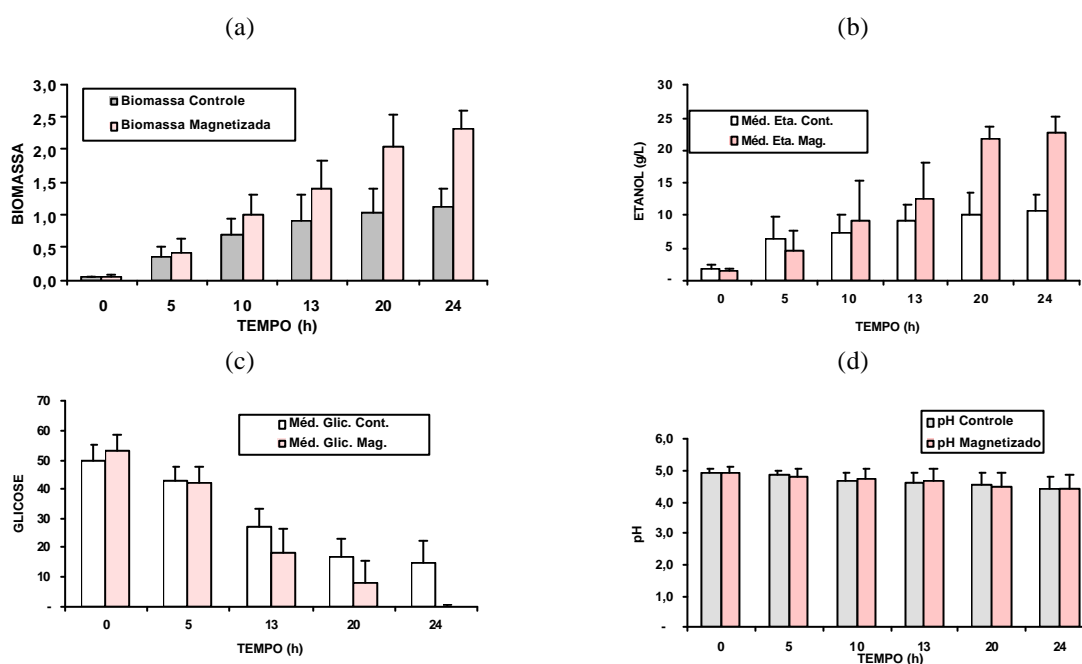


Figura 10 – Fermentação Tipo X: Curvas dos valores médios das variáveis monitoradas nas Fermentações alcoólicas por *Saccharomyces cerevisiae*, em função do tempo de fermentação, com suas respectivas barras de erro (desvios padrão): a – Biomassa, b – Produção de Etanol, c- Consumo de glicose, d- Acompanhamento do pH.

Os resultados médios das quatro repetições Tipo X podem ser observados na figura 10. Após 24 horas de fermentação, a biomassa e a produção de etanol do grupo magnetizado foram 109% e 114% superiores à do controle, respectivamente. Ao final da

fermentação, restavam em média no grupo controle, 14,7 g/L de glicose residual. Estes resultados são estatisticamente significantes, a nível de 5%, calculados através do Teste T. As diferenças entre os grupos magnetizados e controle, foram estatisticamente significantes a partir de 20 horas de fermentação para biomassa e produção de etanol e a partir de 24 horas para o consumo de glicose. O pH dos dois grupos não teve qualquer correlação. Os testes estatísticos estão representados no Apêndice B desta dissertação.

4.3 - FERMENTAÇÃO TIPO Y

Na fermentação Tipo Y foram utilizados magnetos cilíndricos arranjo 2, meio de crescimento A, como descrito anteriormente em Materiais e Métodos e pH ajustado para 5. Foram realizadas quatro repetições da fermentação Tipo Y em dias diferentes: duas com agitação mecânica de 104 rpm e duas sem.

O campo magnético resultante, gerado no interior dos biorreatores na fermentação Y foi bem inferior ao da fermentação X. A Figura 11 apresenta os resultados da fermentação Y_1 , realizada sem agitação mecânica. Durante o experimento, a biomassa do grupo magnetizado oscilou entre incrementos e inibições, desprezíveis em relação ao controle A produção de etanol e o consumo de glicose nos dois grupos também se mantiveram sem diferenças significativas, bem como o pH, que se manteve sem oscilação entre os grupos experimentais, ficando dentro dos limites que melhor favorece o crescimento celular, ou seja, 4 a 5. Portanto, não aconteceram diferenças significativas nos parâmetros estudados entre os grupos magnetizados e controle. Isso possivelmente se deve ao uso do arranjo 2 como forma de magnetização. Este arranjo produziu um campo magnético resultante, no interior do biorreator praticamente nulo, o que, possivelmente, impediu o aparecimento de algum efeito biológico no interior do biorreator magnetizado. As Figuras 18, 19 e 20 apresentadas no Apêndice C mostram os resultados das Fermentações Y_2 , Y_3 , e Y_4 , que como pode ser observado, não ocorre nenhuma diferença entre a fermentação magnetizada e o controle.

A forma de magnetização utilizada poderá ser a explicação para o não aparecimento de diferenças significativas nos parâmetros estudados. Uma vez que, o campo magnético nulo no interior do biorreator, resultante da interação de campos magnéticos adjacentes de sentidos contrários, poderá estar impedindo a rotação de partículas do sistema, que se comportam como dipolos magnéticos e sofrem influência da ação do campo. Segundo Galar e Sanchez (1985), este comportamento pode está relacionado com o crescimento da

levedura, ou seja, o campo magnético nulo não induz a um incremento na multiplicação celular

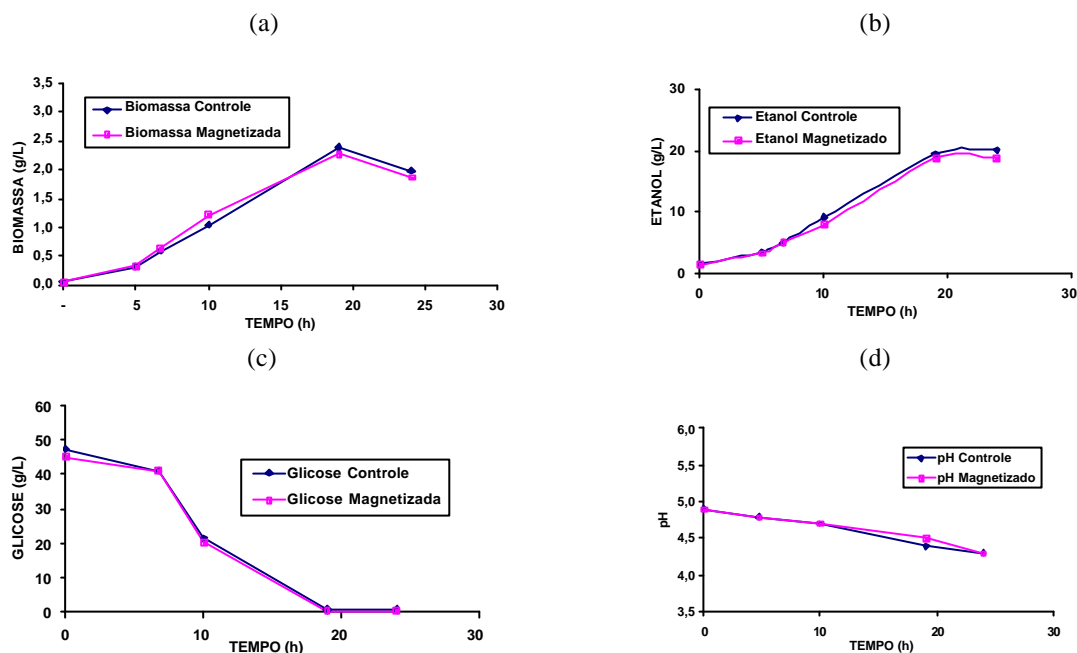


Figura 11 – Fermentação Y_1 : curvas das variáveis monitoradas na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

Nas quatro fermentações Tipo Y realizadas, não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e magnetizados das variáveis acompanhadas. Foram calculados as médias, os desvios padrão e aplicados Teste T, entre as médias dos grupos controle e magnetizado em cada variável acompanhada. Não houve diferenças entre as médias estudadas. Os testes estatísticos das fermentações Y estão apresentados no Apêndice B.

4.4 - FERMENTAÇÃO TIPO Z

Na fermentação Tipo Z, foram utilizados magnetos cilíndricos, arranjo 1, meio de crescimento B como apresentado na Tabela 4 (Materiais e Métodos), pré-inóculo como estabelecido nas fermentações X e Y, pH ajustado para 5, com e sem agitação mecânica de 104 rpm. Foram realizadas três repetições da fermentação Tipo Z, em dias diferentes, com o objetivo de verificar a influência da adição de sais minerais e aumento da concentração de

glicose do meio de fermentação para 150 g/L. A Figura 18 apresenta os resultados da Fermentação Z_1 .

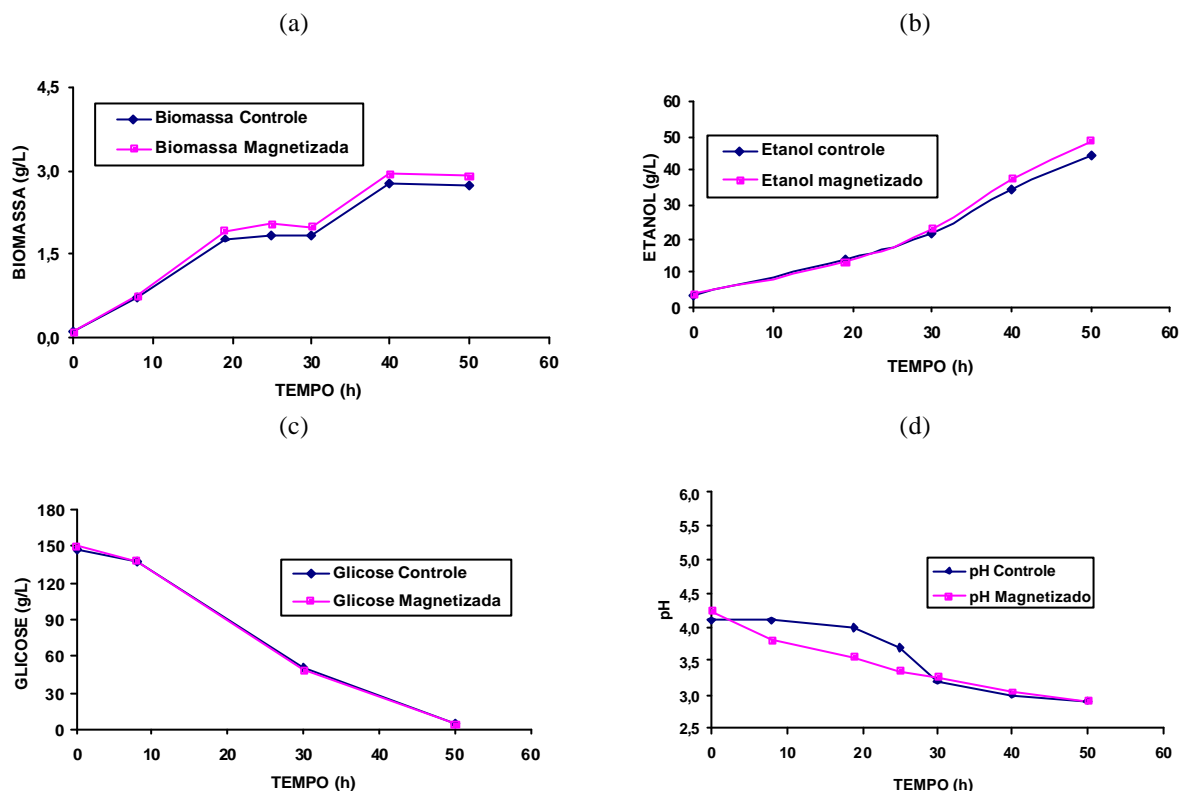


Figura 12 – Fermentação Z_1 : curvas das variáveis monitoradas na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

A fermentação Z_1 foi realizada com agitação mecânica. A biomassa cresceu um pouco a partir de 10 horas de fermentação e foi observado pequeno aumento em relação ao controle na produção de etanol, a partir de 20 horas de fermentação. A glicose residual não sofreu alteração neste tipo experimento – fermentação Z. Foi observada intensa acidificação, cujo pH atingiu 2,8, ao final de 50 horas. Este experimento tipo Z mostra que o meio com sais minerais não mostrou uma boa eficiência para a produção de biomassa e etanol. Possivelmente este fraco desempenho está relacionado com o baixo pH do processo.

As repetições Z_2 , e Z_3 deste experimento podem ser observadas nas Figuras 21 e 22 apresentadas no Apêndice C. Nas mesmas não foram observadas diferenças significativas.

Os efeitos biológicos, encontrados nas variáveis estudadas na fermentação Tipo X, não se reproduziram com a mesma intensidade na Fermentação Tipo Z. A biomassa do grupo magnetizado, nesta fermentação cresceu um pouco mais que a do grupo controle, embora em proporções não estatisticamente significantes. O mesmo ocorrendo com a produção de etanol.

O consumo de glicose e o acompanhamento do pH dos dois grupos estudados, não esboçaram nenhuma diferença que pudesse ser levada em consideração.

Houve uma acidificação muito acentuada do meio de crescimento. O pH ao final de 50 horas de fermentação, em alguns casos, chegou a 2,8 e segundo Amorim (1977), este fato pode contribuir para aumentar a taxa de morte celular e tornar a fermentação mais lenta. Este fenômeno observado na fermentação tipo Z pode ter contribuído para o não aparecimento de diferenças significativas, entre os grupos magnetizados e controle das variáveis estudadas. A adição de sulfato de amônio pode ter contribuído para liberação de muitos íons H^+ , durante a fermentação e conseqüentemente baixado o pH.

A figura 13 apresenta os resultados médios das variáveis estudadas na fermentação tipo Z, com suas respectivas barras de desvios padrão, em função do tempo de fermentação.

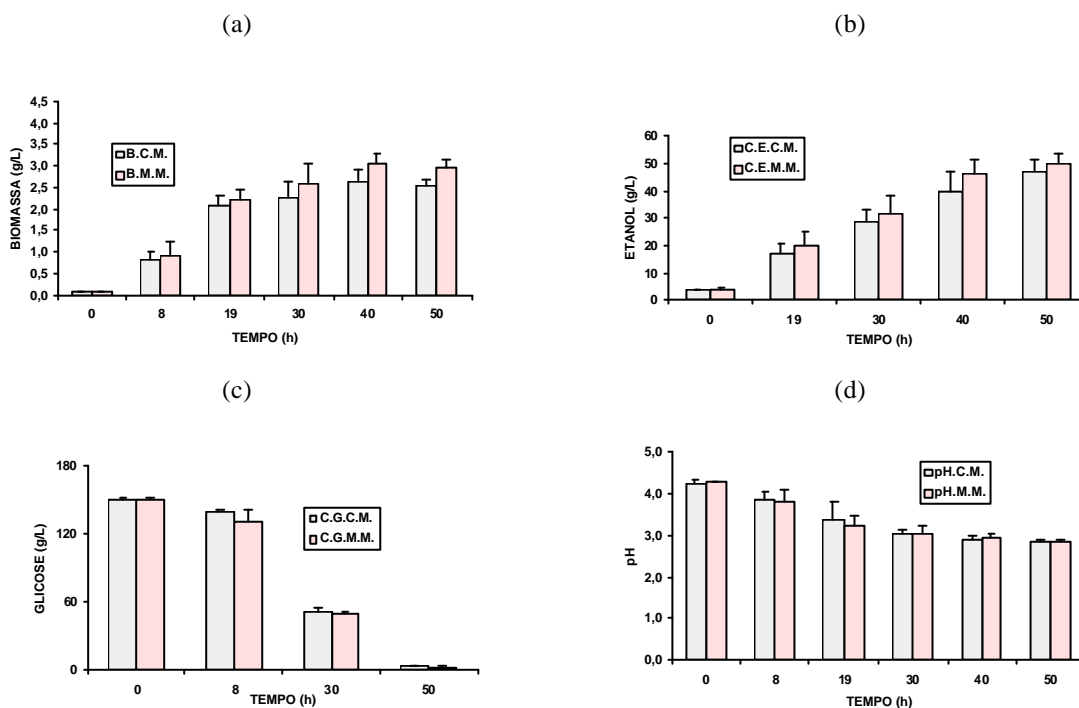


Figura 13 – Fermentação Tipo Z: gráficos dos valores médios das variáveis monitoradas nas fermentações alcoólicas por *Saccharomyces cerevisiae*, em função do tempo de fermentação, com suas respectivas barras de erro (desvios padrão): a – Biomassa, b – Produção de Etanol, c- Consumo de glicose, d- Acompanhamento do pH.

Os resultados médios das variáveis estudadas nas três repetições da fermentação Tipo Z, observados na figura 13, mostra que embora tenha havido um incremento na biomassa e na produção de etanol, estes incrementos não foram estatisticamente significantes.

O consumo de glicose e o pH dos dois grupos se mantiveram praticamente iguais. Os testes estatísticos da fermentação Z estão no Apêndice B desta dissertação.

Neste trabalho, não foram observados uma relação linear entre a concentração inicial de glicose no meio e a velocidade de crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae*, fato este já relatado por Gutiérrez *et al.*(1988). Foram utilizados meios contendo glicose como fonte de carbono em concentrações iniciais de 50 g/L nas fermentações Tipos X e Y, e 150 g/L na fermentação Tipo Z. A velocidade de crescimento da levedura manteve-se praticamente a mesma, em todos os casos, ou seja, não houve um aumento na velocidade de crescimento em decorrência do aumento da concentração inicial de glicose do meio.

A figura 14 apresenta os gráficos dos valores médios da biomassa e do etanol ao longo das primeiras 24 horas, nas fermentações Tipos X e Z.

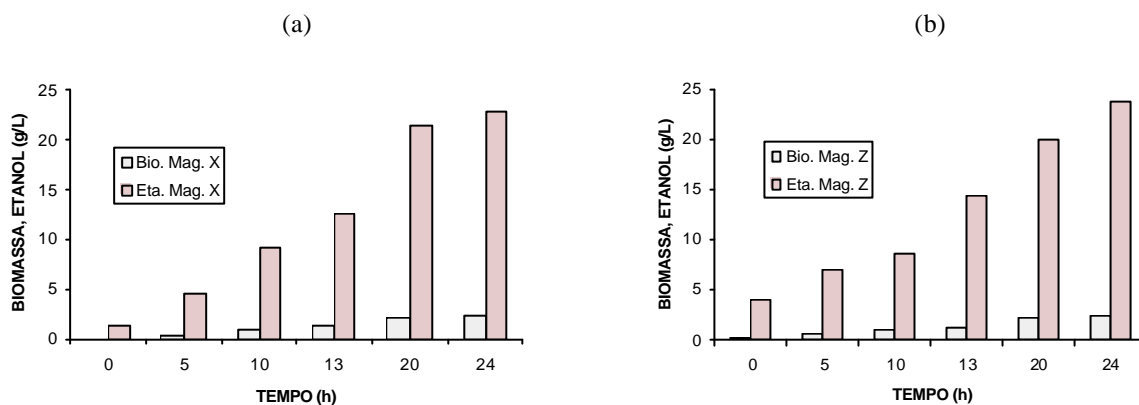


Figura 14 Gráficos dos valores médios da biomassa e etanol, nas fermentações alcoólicas por *Saccharomyces cerevisiae*, em função do tempo de fermentação. A – Biomassa e etanol fermentação X., b – Biomassa e etanol fermentação Z.

Os gráficos “a” e “b” da Figura 14 mostram que o campo magnético de 2.650 Gauss apresenta um melhor rendimento, quando aplicado em meio pobre e com baixa concentração de glicose; onde atua como um verdadeiro “enriquecedor”, indicando, assim, que o processo é viável economicamente, quando aplicado em meios com essas características.

O meio B, utilizado nas fermentações Tipo Z, foi acrescido de sais minerais, com a finalidade de atender às necessidades nutricionais do microrganismo, conforme relata Rose (1961) e conseqüentemente favorecer às reações enzimáticas, desencadeadas pela levedura que pudessem estar inibidas na ausência destes compostos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

1. O campo magnético estático, não homogêneo, de 2.650 Gauss aplicado no formato denominado arranjo 1, favorece o aumento da biomassa e a produção de etanol em *Saccharomyces cerevisiae*.
2. A agitação mecânica, durante os experimentos, não teve nenhuma influência na produção final de biomassa e etanol.
3. A forma de magnetização que permitiu um gradiente de campo de 2.200 Gauss, entre o centro e as paredes internas do biorreator, teve influência marcante nos resultados das variáveis estudadas neste trabalho.
4. A magnetização, denominada arranjo 2, não tem influência nas variáveis estudadas.
5. A magnetização, utilizada na Fermentação Tipo Z, (arranjo 1), não produziu efeitos estatisticamente significantes, em decorrência do baixo pH.
6. A Fermentação Tipo X com arranjo 1 e concentração de glicose a 50 g/L foi a que produziu os melhores resultados, quanto à produção de biomassa e etanol.

PERSPECTIVAS

O uso deste processo em grande escala, bem como descobrir os efeitos provocados pelo campo magnético na atividade metabólica do *Saccharomyces cerevisiae* ou mesmo possíveis alterações genéticas desta levedura pela presença de campos magnéticos, serão as sugestões para trabalhos futuros.

1. Verificar a viabilidade de aplicação deste processo em grande escala, utilizando derivados de cana de açúcar como meio de fermentação e arranjo 1, como forma de magnetização.
2. Investigar a ação de campos magnéticos na expressão de proteínas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Investigar a atividade enzimática da levedura sob a presença de campos magnéticos estáticos.

4. Estudar possíveis alterações no transporte de membranas na levedura exposta a campos magnéticos estáticos.
5. Investigar possíveis alterações genéticas, provocadas por campos magnéticos nas leveduras.

APÊNDICE A – Tabelas de resultados das fermentações

Tabela 6 - Resultados fermentação X₁

T (h)	BC	BM	EC	EM	GC	GM	pH C	pH M
0	0,068	0,07	1,37	1,48	51,28	49,6	4,8	4,8
1,13	0,09	0,10	1,40	1,47	-	-	4,8	4,8
2,1	0,14	0,14	4,41	5,39	-	-	4,7	4,8
3,08	0,20	0,21	7,25	7,76	-	-	4,8	4,7
5	0,32	0,33	10,4	9,59	45,70	45,30	4,7	4,6
6,1	0,40	0,48	11,23	12,00	-	-	4,7	4,6
7,33	0,46	0,66	12,47	15,74	-	-	4,6	4,6
8,33	0,49	0,73	12,22	17,79	-	-	4,6	4,5
10,0	0,48	0,84	11,96	19,30	-	-	4,6	4,5
11,67	0,49	1,01	12,38	20,64	-	-	4,7	4,6
13,0	0,56	1,12	12,50	21,59	29,69	20,3	4,6	4,5
20	0,76	1,48	12,37	25,12	15,95	7,68	4,5	4,4
24	0,86	2,02	13,01	25,39	12,23	0,30	4,3	4,2

Tabela 7 - Resultados fermentação X₂

T (h)	BC	BM	EC	EM	GC	GM	pH C	pH M
0	0,04	0,04	0,98	1,44	56,75	60,57	5	5
2,18	0,09	0,09	1,22	1,26	-	-	4,9	5
5,00	0,23	0,23	9,22	2,52	49,04	50,12	4,9	4,9
7,58	0,52	0,54	6,16	3,26	-	-	4,7	4,9
10,00	0,57	0,88	6,09	4,92	-	-	4,7	4,8
13,00	0,63	1,23	9,04	6,65	34	30,74	4,6	4,8
15,27	0,64	1,30	9,25	11,11	-	-	4,6	4,6
16,60	0,677	1,62	13,11	12,22	-	-	4,5	4,5
17,78	0,70	1,80	12,01	10,64	14,12	20,56	4,5	4,4
18,77	0,78	1,95	5,69	16,72	-	-	4,4	4,6
19,73	0,82	2,15	6,22	13,92	-	-	4,6	4,2
20,00	0,78	2,26	8,92	16,66	-	-	4,3	4,3
21,53	0,81	2,41	7,32	17,92	-	-	4,3	4,3
24	0,91	2,44	7,13	24,49	12,34	0	4,2	4,3

Tabela 8 - Resultados fermentação X₃

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,03	0,03	1,01	0,97	50,02	49,97	4,8	4,8
2,83	0,09	0,09	1,45	2,04	-	-	-	-
5,00	0,31	0,37	1,74	2,56	36,81	36,07	4,8	4,7
10,00	0,68	0,86	4,53	4,39	27,56	25,57	4,3	4,4
13,00	0,82	1,20	5,63	9,24	27,40	12,45	4,2	4,2
20,0	1,01	1,94	7,7	20,8	27,38	2,56	4,1	4,2
22,90	0,96	2,14	6,73	19,44	27,37	0	-	-
24,00	1,06	2,20	9,43	19,56	27,09	0	4	4,1

Tabela 9 - Resultados fermentação X₄

T (H)	D.C.C.	D.C.M.	E.C.	E.M.	G.C.	G.M.	pH C.	pH M.
0	0,09	0,09	2,95	1,61	41,4	43,4	5,2	5,2
5,00	0,62	0,74	3,26	3,90	40,35	36,45	5,1	5,1
10	1,11	1,47	6,20	7,99	26,2	23,15	5,1	5,1
13	1,57	2,03	9,41	12,64	18,49	10,83	5,1	5,1
20	1,64	2,58	14,40	20,46	9,68	1,17	5,1	5,0
24	1,61	2,63	12,97	21,91	7,12	0,03	5,1	5,0

Tabela 10 - Resultados fermentação Y₁

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,05	0,05	1,76	1,55	47,28	45,00	4,9	4,9
5,00	0,32	0,33	3,50	3,36	-	-	4,8	4,8
6,73	0,59	0,64	5,16	5,15	40,96	40,96	-	-
10,00	1,04	1,22	9,19	8,05	21,65	20,45	4,7	4,7
19,00	2,39	2,28	19,38	18,80	0,59	0,40	4,4	4,5
24,00	1,98	1,87	20,18	18,82	0,55	0,40	4,3	4,3

Tabela 11 - Resultados fermentação Y₂

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,23	0,23	2,40	2,57	46,6	48,29	5	5
5,00	0,79	1,05	8,07	6,24	-	-	4,6	4,8
10,00	1,78	1,97	11,96	11,80	12,5	12,7	4,2	4,4
18,17	2,54	2,64	12,46	14,94	0,88	0,92	4,1	4,1
19,00	2,20	2,31	16,70	17,58	-	-	4,1	4
24,00	2,41	2,48	17,49	17,53	0,39	0,39	4,1	4

Tabela 12 - Resultados fermentação Y₃

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,16	0,16	1,98	1,32	43,3	44	4,7	4,7
5,00	0,67	0,82	3,97	3,74	-	-	4,9	4,9
10,00	1,54	1,62	9,61	9,78	17,04	18,18	4,8	4,7
19,00	2,68	2,76	16,12	16,83	10,89	9,1	4,6	4,5
21,80	2,29	2,36	16,68	16,35	1,47	0,24	4,4	4,7
24,00	2,71	2,71	16,54	16,25	0,24	0,24	4,4	4,5

Tabela 13 - Resultados fermentação Y₄

T (H)	D.C.C.	D.C.M.	E.C.	E.M.	G.C.	G.M.	pH C.	pH M.
0	0,14	0,06	1,88	2,34	45	47,4	4,8	4,8
5,00	0,88	0,79	4,13	5,25			4,8	4,8
10,00	1,25	1,26	10,23	7,16			4,8	4,8
15,83	2,53	2,58	16,12	14,23	4,0	2,50	4,8	4,8
19,00	2,64	2,72	15,96	17,40			4,8	4,8
20,92	2,59	2,77	17,14	16,75	0,16	0,04	4,8	4,8
24	2,18	2,18	17,02	16,91	0,04	0,04	4,7	4,7

Tabela 14 - Resultados fermentação Z₁

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,10	0,10	3,21	3,83	147	150,4	4,1	4,3
8,00	0,70	0,74	-	-	138	138,20	4,1	3,8
19,00	1,79	1,91	13,83	13,14	-	-	4	3,6
25,00	1,83	2,03	-	-	-	-	3,7	3,4
30,00	1,85	1,98	21,8	22,77	50,20	48,40	3,2	3,3
40,0	2,76	2,96	34,5	37,53	-	-	3	3,1
50,00	2,75	2,92	44,8	48,58	4,36	3,60	2,9	2,9

Tabela 15 - Resultados fermentação Z₂

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,07	0,07	3,97	4,47	151,4	149	4,3	4,3
8,00	0,65	0,65	-	-	142,3	136	3,9	4,2
19,00	2,34	2,47	16,80	21,01	-	-	3,1	3,2
23,00	2,55	2,74	-	-	-	-	3,0	3,0
26,00	2,73	2,75	-	-	-	-	3,0	3,0
30,00	2,76	3,10	32,27	35,15	48,50	40,84	3,0	2,9
40,00	2,87	3,35	35,70	40,41	-	-	2,9	2,9
44,00	2,79	3,40	-	-	-	-	2,8	2,9
50,00	2,83	3,22	42,64	46,35	4,29	2,68	2,8	2,9

Tabela 16 - Resultados fermentação Z₃

T (h)	B C	B M	E C	E M	G C	G M	pH C	pH M
0	0,09	0,09	3,78	3,37	153	152	4,3	4,3
8	1,10	1,35	9,15	13,43	138	118,68	3,6	3,5
19	2,16	2,24	21,41	25,79	-	-	3,0	3,1
30	2,14	2,63	31,64	36,96	56,02	52,9	2,9	2,9
33	2,01	2,57	40,79	42,52	-	-	2,9	2,9
40	2,26	2,85	49,92	51,74	-	-	2,8	2,9
50	2,36	2,77	52,98	54,72	3	2	2,9	2,8

APENDICE B - Testes estatísticos

Tabela 17 – Fermentação Tipo X: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

t (H)	Méd. Biom. Cont.	Méd. Biom. Mag.	D.P.C.	D.P.M.	Teste T
0	0,06	0,06	0,02	0,02	0,99
5	0,37	0,42	0,15	0,23	0,74
10	0,71	1,01	0,24	0,30	0,19
13	0,89	1,41	0,40	0,42	0,15
20	1,05	2,07	0,35	0,47	0,02
24	1,12	2,32	0,30	0,27	0,00

Tabela 18 – Fermentação Tipo X: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.

T (h)	Méd. Eta. Cont.	Méd. Eta. Mag.	DPC	DPM	Teste T
0	1,58	1,38	0,81	0,24	0,70
5	6,16	4,64	3,72	2,91	0,60
10	7,20	9,15	2,83	6,02	0,64
13	9,15	12,53	2,43	5,65	0,39
20	10,17	21,58	3,33	2,07	0,00
24	10,64	22,84	2,49	2,28	0,00

Tabela 19 - Fermentação Tipo X: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e TesteT

t (h)	Méd. Glic. Cont.	Méd. Glic. Mag.	DPC	DPM	Teste T
0	49,86	53,38	5,50	5,09	0,50
5	42,99	41,99	4,74	5,97	0,83
13	27,40	18,58	5,66	7,88	0,17
20	16,28	7,99	6,53	7,65	0,18
24	14,70	0,08	7,46	0,13	0,04

Tabela 20 - Fermentação Tipo X: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

T (h)	pH Méd.Cont.	pH Méd. Mag.	DPpHC	DPpHM	Teste T
0	4,95	4,93	0,17	0,19	0,87
5	4,88	4,80	0,15	0,22	0,65
10	4,68	4,70	0,29	0,27	0,92
13	4,63	4,65	0,32	0,34	0,93
20	4,58	4,45	0,36	0,33	0,67
24	4,40	4,40	0,42	0,35	1,00

Tabela 21 – Fermentação Tipo Y: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

T (h)	Méd. Bio. Cont.	Méd. Bio. Mag.	D.P.B.C.	D.P.B.M	Teste T
0	0,15	0,13	0,06	0,08	0,70
5	0,66	0,75	0,21	0,26	0,68
10	1,40	1,52	0,28	0,31	0,65
19	2,48	2,52	0,19	0,22	0,81
24	2,32	2,32	0,27	0,30	0,99

Tabela 22 - Fermentação Tipo Y: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.

T (h)	Méd. Eta. Cont.	Méd. Eta. Mag.	D.P.E.C.	D.P.E.M.	Teste T
0	2,01	1,95	0,28	0,60	0,86
5	4,92	4,65	2,12	1,34	0,84
10	10,23	9,20	1,22	2,05	0,42
19	17,04	17,65	1,59	0,83	0,53
24	17,81	17,39	1,63	1,09	0,68

Tabela 23 - Fermentação Tipo Y: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e Teste T

T (h)	Méd. Glic. Cont.	Méd. Glic. Mag.	D.P.G.C.	D.P.G.M.	Teste T
0	45,54	46,17	1,54	1,74	0,66
10	17,30	17,08	3,26	2,82	0,93
19	3,13	2,62	4,49	3,76	0,88
24	0,31	0,27	0,19	0,15	0,79

Tabela 24 - Fermentação Tipo Y: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

T (h)	pH Cont. Méd.	pH Mag. Méd	D.P.pH.C.	D.P.pH.M.	Teste T
0	4,85	4,85	0,11	0,11	1,00
5	4,78	4,83	0,11	0,04	0,50
10	4,63	4,65	0,25	0,15	0,89
19	4,48	4,48	0,26	0,25	1,00
24	4,38	4,38	0,22	0,26	1,00

Tabela 25 – Fermentação Tipo Z: biomassa média dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

T (h)	Méd. Biom. Cont.	Méd. Biom. Mag.	D.P.B.C.	D.P.B.M.	Teste T
0	0,09	0,09	0,01	0,01	0,77
8	0,82	0,91	0,20	0,31	0,74
19	2,10	2,21	0,23	0,23	0,66
30	2,25	2,57	0,38	0,46	0,50
40	2,63	3,05	0,27	0,21	0,16
50	2,65	2,98	0,17	0,19	0,17

Tabela 26 - Fermentação Tipo Z: produção média de etanol dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T.

T(h)	Méd. Eta. Cont.	Méd. Eta. Mag.	D.P.E.C.	D.P.E.M.	Teste T
0	3,65	3,89	0,32	0,45	0,58
19	17,35	19,98	3,12	5,21	0,58
30	28,57	31,63	4,80	6,31	0,62
40	40,04	46,07	7,00	5,66	0,49
50	46,81	49,88	4,45	3,54	0,49

Tabela 27 - Fermentação Tipo Z: consumo médio de glicose dos grupos controle e magnetizado, desvio padrão e Teste T

T (h)	Méd. Glic. Cont.	Méd. Glic. Mag.	D.P.G.C.	D.P.G.M.	Teste T
0	150,47	150,80	2,54	1,66	0,89
8	139,43	131,69	2,03	9,20	0,36
30	51,54	49,90	3,25	2,12	0,59
50	3,88	3,07	0,63	0,75	0,31

Tabela 28 – Fermentação Tipo Z: pH médio dos grupos controle e magnetizado, desvios padrão e Teste T

T (h)	pH Cont. Méd.	pH Mag. Méd.	D.P.pH.C.	D.P.pH.M.	Teste T
0	4,23	4,30	0,09	0,00	0,42
8	3,87	3,83	0,21	0,29	0,90
19	3,37	3,23	0,45	0,26	0,74
30	3,03	3,03	0,12	0,19	1,00
40	2,90	2,97	0,08	0,09	0,49
50	2,87	2,87	0,05	0,05	1,00

APÊNDICE C - Gráficos de fermentações

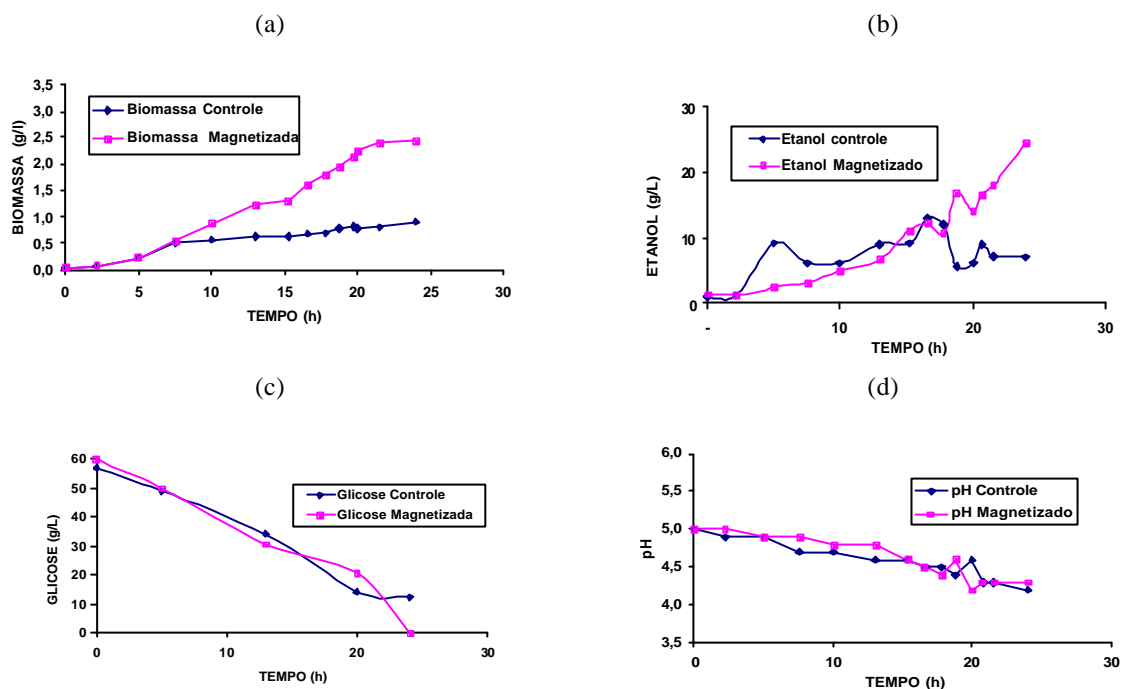


Figura 15 – Fermentação X₂: curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

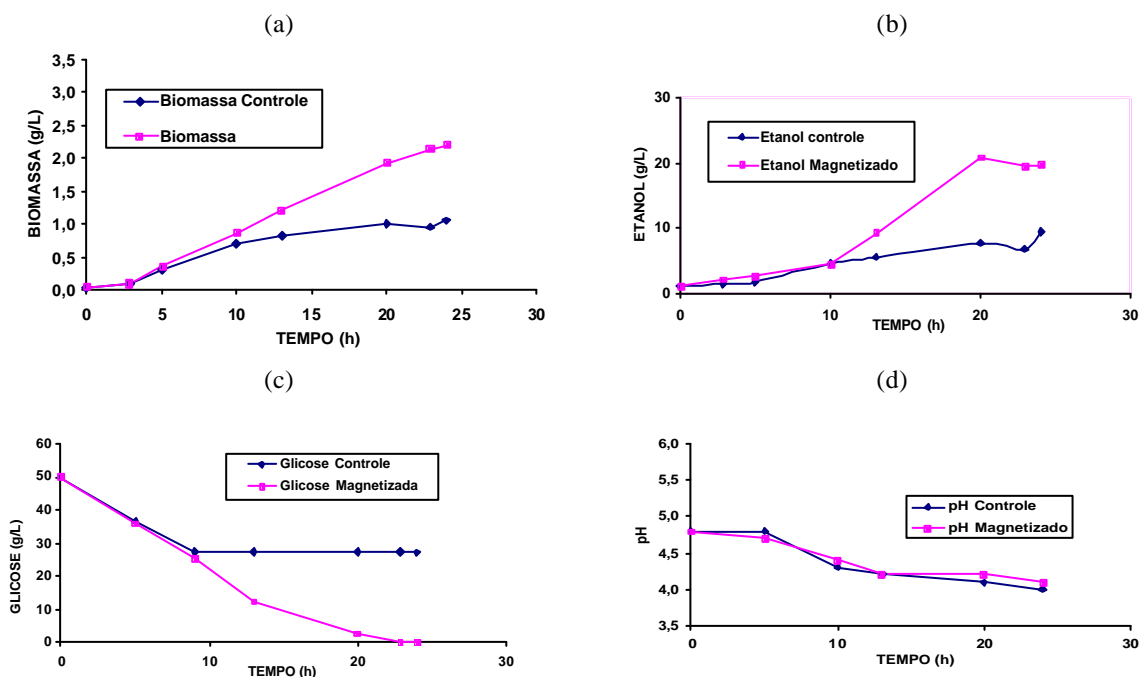


Figura 16 – Fermentação X₃: curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

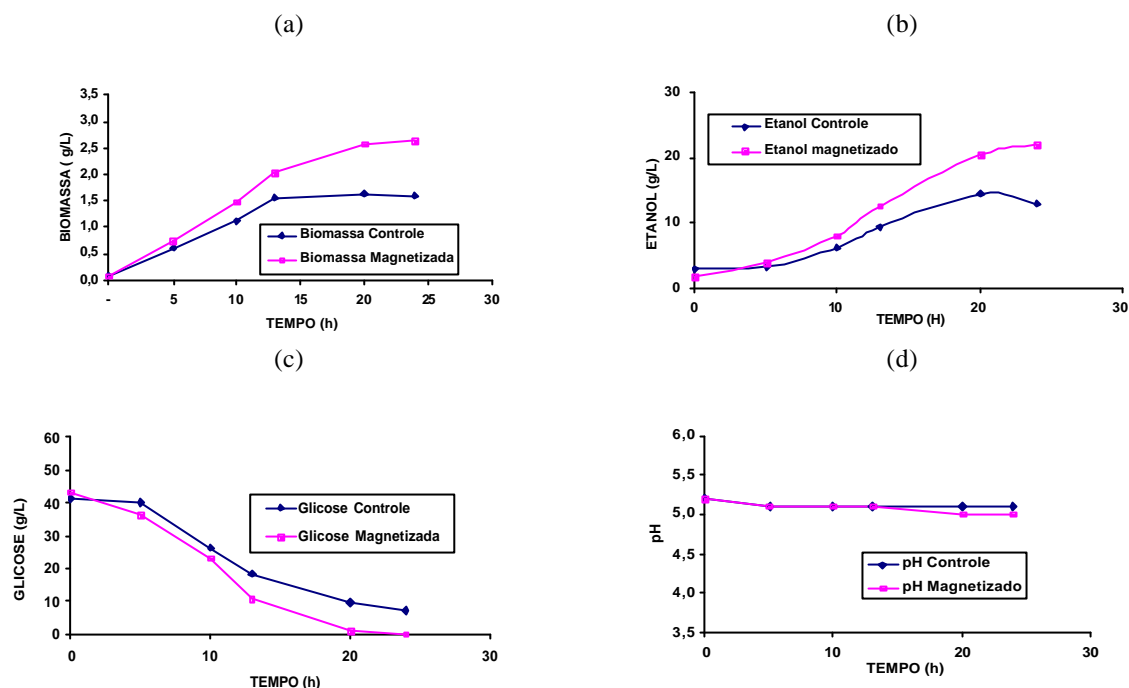


Figura 17 – Fermentação X_1 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

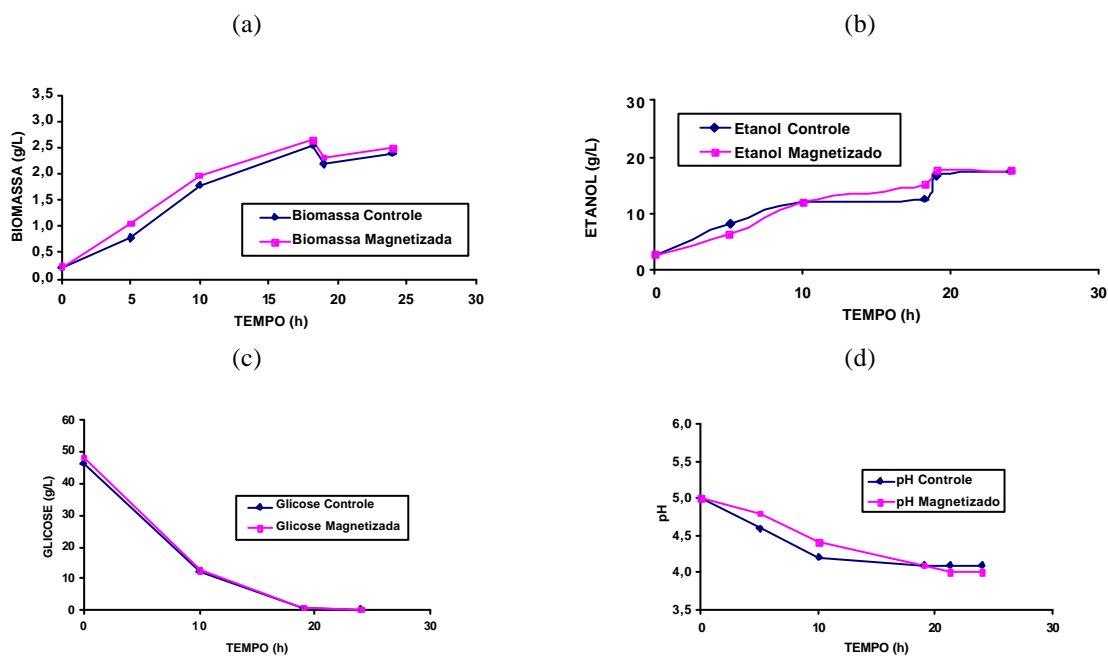


Figura 18 – Fermentação Y_2 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

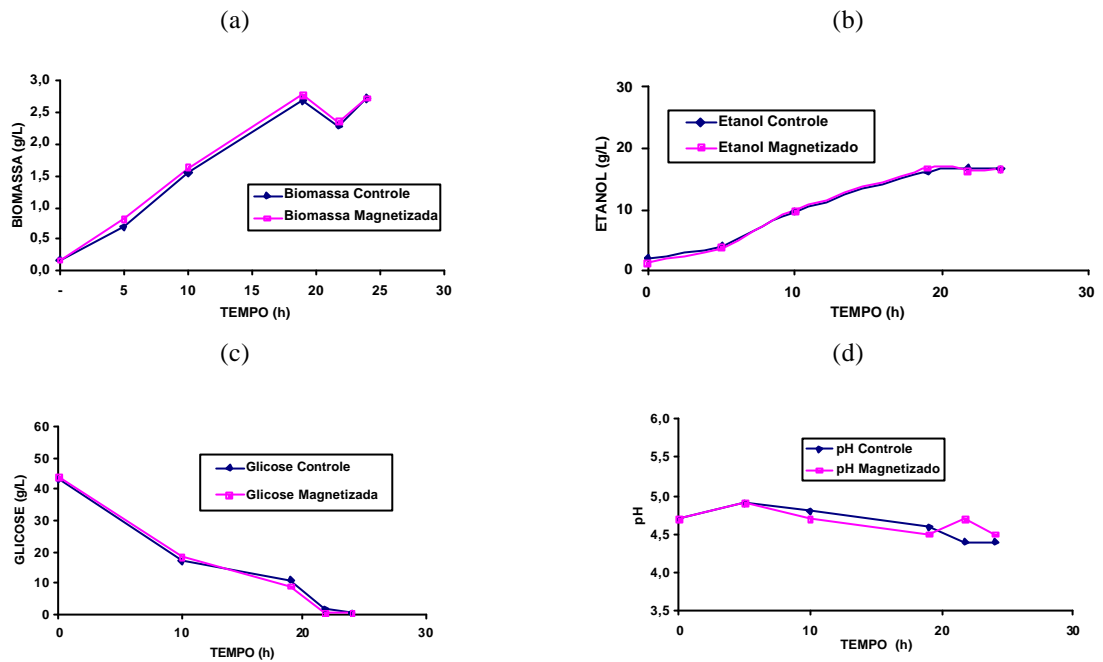


Figura 19 – Fermentação Y_3 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

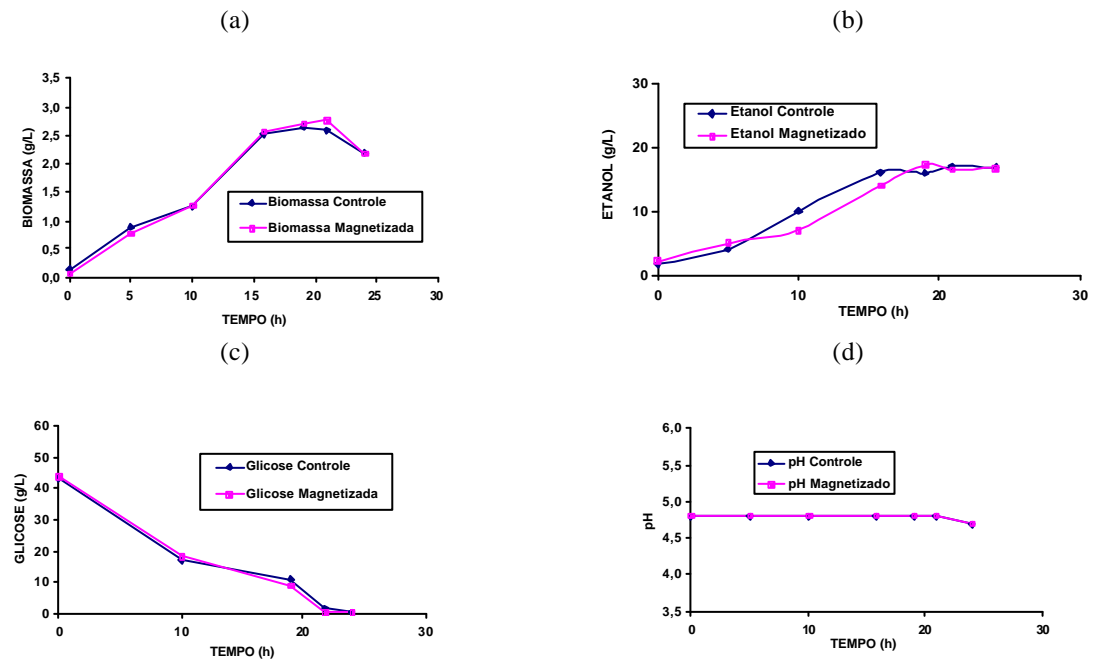


Figura 20 – Fermentação Y_4 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH. (4ª Fermentação Y).

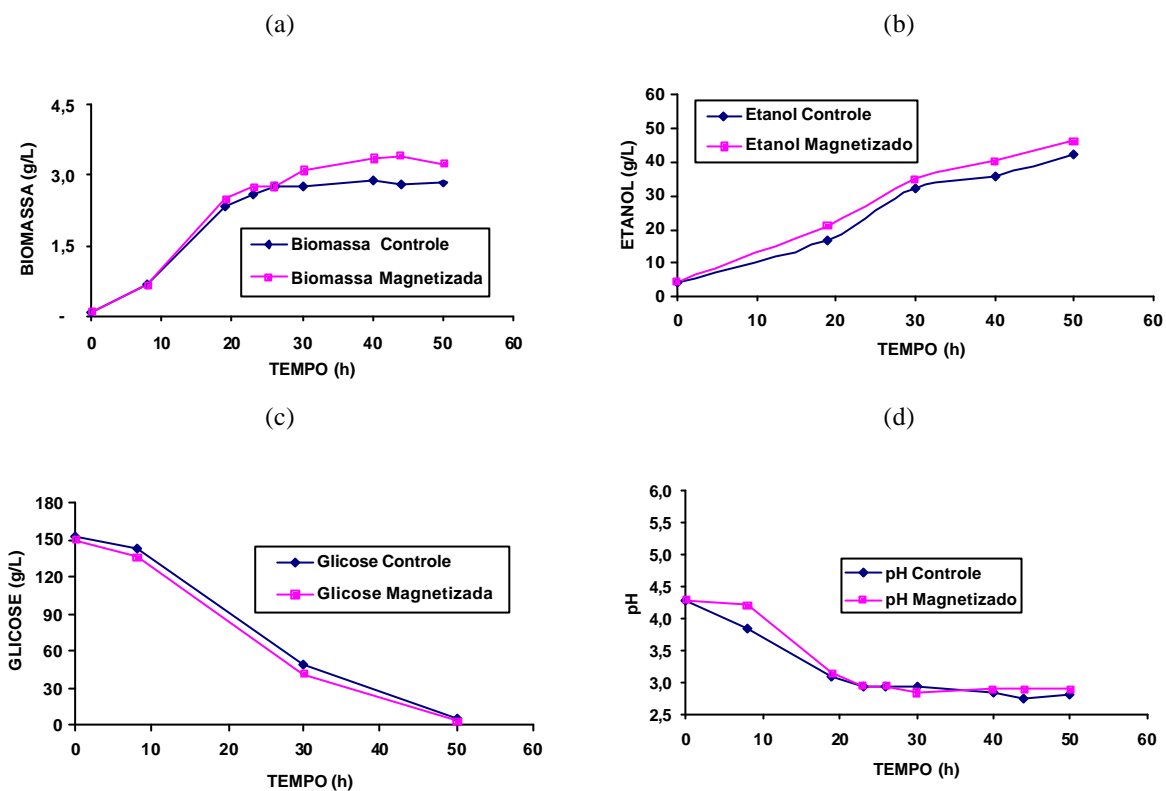


Figura 21 – Fermentação Z_2 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, sem agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH. (2ª Fermentação Z).

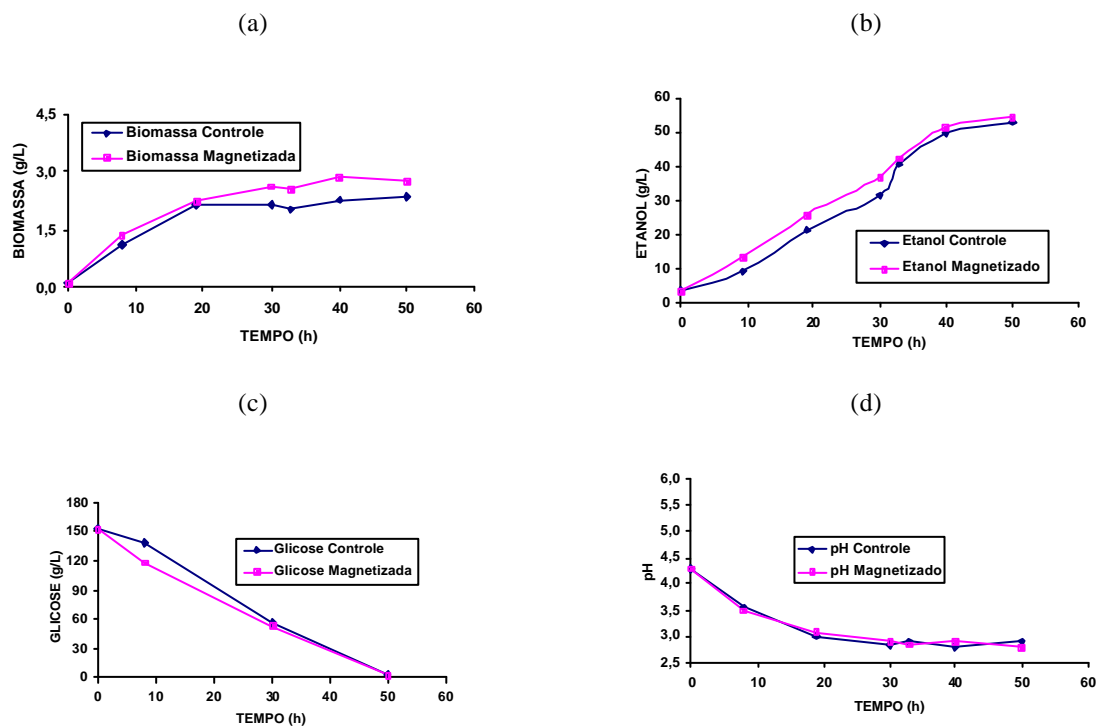


Figura 22 – Fermentação Z_3 : curvas das variáveis monitoradas, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, com agitação mecânica, em função do tempo de fermentação: a – Biomassa (Peso seco), b – Produção de etanol, c – Consumo de glicose, d – Acompanhamento do pH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGER, D.D., RADUL, J.A. Effect of 60-Hz magnetic fields on ultraviolet light-induced mutation and mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 283, 279-286 (1992).
- AKOYUNOGLU, G. Effect of a magnetic field on carboxidismutase. *Nature* 202, 452-454 (1964).
- AMABIS, J.M., MARTHO, G.R. *Fundamentos da Biologia Moderna*, Vol. 1, Ed. 2 (Moderna LTDA, São Paulo; 2001).
- BARNOTHY, M.F. First biomagnetic symposium. *Nature* 193, 1243-1244 (1962).
- BELLOSI, A., DUCLOS, M. Effects d'un champ magnétique uniforme sur la levure de boulangerie. *Société de Biologie de L'ouest-Africain* 72, 984-986 (1973).
- BINNINGER, 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 (1996).
- BISCUOLA, G.J., BOAS, N.V., DOCA, R.H. *Tópicos de Física*, Vol. 3, Ed. 8 173 (Saraiva, São Paulo; 1992).
- BLAKEMORE, R. Magnetostatic bacteria. *Science* 190, 377-379 (1975).
- BLANK, M., SOO, L., PAPSTEIN, V. Effects of low frequency magnetic fields on Na,K-ATPase activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 38, 267-273 (1995).
- BONJORNO, J.R., BONJORNO, R.A., BONJORNO, V., RAMOS, C.M. *Física Fundamental*, Vol. 1, Ed. 1 560-563 (FTD S.SA., São Paulo; 1999).
- COOK, E.S., FARDON, J.C., NUTINI, L.G. *Biological effects of magnetic fields*, Vol. 2 67-78 (Plenum Press, New York-London; 1969).
- DAMPIER, W.C. *Pequena história da ciência*, Vol. 1, Ed. 1 117-131 (Ibrasa, São Paulo; 1961).
- GALAR, I., SÁNCHEZ, J.L.M. Efectos de campos magnéticos variables sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Lat-amer Microbiol* 27, 283-291 (1985).

- GERENCSEK, V.F., BARNOTHY, M.F. & BARNOTHY, J.M. Inhibition of bacterial growth by magnetic field. *Nature* 196, 539-541 (1962).
- GONÇALVES, D. Física do científico e do vestibular, Vol. 3, Ed. 1 149-158 (Ao Livro Técnico S. A., Rio de Janeiro; 1966).
- GUTIÉRREZ, L., GIRALDINO, L., CAMACHO, M. Estudio del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y su mutante antibiótico-resistente en diferentes fuentes de carbono. *Rev Lat-amer Microbiol* 30, 133-137 (1988).
- HABERDITZI, W. Enzyme activity in high magnetic fields. *Nature*, 72-73 (1967).
- HORIUCHI, S.I., ISHIZAKI, Y., OKUNO, K., ANO, T., SHODA, M. Drastic high magnetic field effect on suppression of *Escherichia coli* death. *Bioelectrochemistry* 53, 149-153 (2001).
- IVANOVA, V., HRISTOV, J., DOBREVA, E., AL-HASSAN, Z., PENCHEV, I. Performance of magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59, 187-198 (1995).
- JENNISON, M.W. The growth of bacteria, yeast, and molds in strong magnetic field. *Journal of Bacteriology* 33, 15-16 (1937).
- KIMBALL, G.C. The growth of yeast in magnetic field. *Journal of Bacteriology* 35, 109-122 (1937).
- LABES, M.M. A possible explanation for the effect of magnetic fields on biological systems. *Nature* 211, 968 (1966).
- LIBOFF, R.L. Biological effects of magnetic fields, Vol. 2 171-175 (Plenum Press, New York-London; 1969).
- LODDER, J. The yeasts, Vol. 1 555 (North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London; 1970).
- LODDER, J. The Yeasts, Vol. 1 597-601 (North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London; 1970).
- LOPES, S. Bio, Vol. 1, Ed. 11 225-239 (Saraiva, São Paulo; 2001).
- MACEDO, L.C.H. Álcool etílico hidratado, Vol. 1, Ed. 1 13-29 (Ícone, São Paulo; 1993).
- MALKO, J.A., CONSTANTINIDIS, I., DILLEHAY, D., FAJMAN, W.A. Search for

Influence of 1,5 tesla magnetic field on growth of yeast cells. *Bioelectromagnetics* 15, 495-501 (1994).

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428 (1959).

MILLER, M. B., LITSKY, W. *Industrial microbiology* (Mcgraw-Hill Book Company, New York, 1976)

MONTENEGRO, E. J. N. Alterações metabólicas induzidas em *Saccharomyces cerevisiae* por campos magnéticos contínuos, Dissertação de Mestrado, UFPE, 1999.

MOORE, R.L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 25, 1145-1151 (1979).

MORAIS, S.M.F., AQUARONE, E., ROSE, A.H., BEAVAN, M.J. Efeito do etanol na atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Microbiol* 17, 371-375 (1986).

MORAES, J. O. F, *Bioquímica da fermentação alcoólica por leveduras*, Vol. I, UFPE, 2001

MOSKWA, W. & ROSTKOWSKA, J. Effect of a constant magnetic field on the fermentation and sensitivity to toxins of yeast. *Acta Physiologica Polonica* 16, 474-479 (1965).

MOTTA, M.A., MONTENEGRO, E.J.N., STAMFORD, T.L.M., SILVA, A.R., SILVA, F.R. Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields. *Biotechnol. Prog.* 17, 970-973 (2001).

NOSTRAN, F.E.V., REYNOLDS, R.J., HEDRICK, H.G. Effects of a high magnetic field at different osmotic pressures and temperatures on multiplication of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology* 15, 561-563 (1967).

OKUNO, K., ANO, T., SHODA, M. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 13, 745-750 (1991).

PAULINO, W.R. *Biologia Atual*, Vol. 2, Ed. 6 52-58 (Ática S.A., São Paulo; 1991).

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., EDWARDS, D.D., PELCZAR, M.F. *Microbiologia Conceitos e Aplicações*, Vol. 1, Ed. 2 61-63 (Makron Books, São Paulo; 1996).

RENO, V.R., NUTINI, L.G. Effect of magnetic field on tissue respiration. *Nature* 198, 204-205 (1963).

- RESNICK, R., HALLIDAY, D. Física, Vol. 2 (Ao Livro Técnico S.A., Rio de Janeiro; 1971).
- RETTORI, D., VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo do *Saccharomyces cerevisiae*. Química Nova 23, 257-261 (1999).
- ROSE, A. H. Industrial microbiology, (Butterhorth & Co. Publishers Ltd, London, 1961)
- RONAN, C.A. História ilustrada da ciência, Vol. 1, Ed1. 1 39-40 (Jorge Zahar, Rio de Janeiro; 1987).
- SAMPAIO, J.L., CALÇADA, C.S. Universo da Física, Vol. 3, Ed. 1 2-19 (Atual, São Paulo; 2001).
- SCHAARSCHMIDT, B., LAMPRECHT, I. Influence of a magnetic field on the UV-sensitivity in yeast. Notizen 29, 447- 448 (1974).
- SEARS, F.W., ZEMANSKY, M.W. Física Eletricidade Magnetismo e Tópicos de física Moderna, Ed. 2 (Ao Livro Técnico S.A., Rio de Janeiro; 1973).
- SENFLE, F.E., HAMBRIGHT, W.P. Biological effects of magnetic fields, Vol. 2 261-305 (Plenum Press, New York-London; 1969).
- SHIGEKIYO, T.C., YAMAMOTO, K., FUKU, L.F. Os alicerces da Física, Vol. 3, Ed. 1 235-247 (Saraiva, São Paulo; 1996).
- SHODA, M. Effect of high magnetic field on microbial activities measured under a newly constructed superconducting magnet biosistem. Physica B 216, 409-411 (1996).
- TATON, R. História Geral das Ciências, Vol. 1, Ed. 1 78-96 (Difusão Européia do Livro, São Paulo; 1960).
- TIPLER, P.A. Física, Vol. 2, Ed. 1 903-905 (Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro; 1978).
- TIPLER, P.A. Física, Vol. 2, Ed. 2 851-852 (Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro; 1984).
- TRABULSI, L.R., TOLEDO, M.R.F., SILVA, N.P. Microbiologia, Vol. 1, Ed. 1 225-232 (Parma Ltda, São Paulo; 1986).
- UNDERKOFER, L. A., HICKEY, R. J. Industrial fermentations, Ed 1 17-136 (Chemical Publishing Co Inc; 1954)
- UZUNIAN, A., BIRNER, E. Biologia, Vol. 1, Ed. 1 313-320 (Harbra, São Paulo; 2001).

VIGANTS, A., ZIKMANIS, P., BEKERS, M. Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zimomonas* Culture. *Acta Biotechnol* 16, 321-327 (1996).

WHITTAKER, E. A history of the theories of aether and electricity, (Dover Publications, New York; 1989).

