

EFEITOS BIOLÓGICOS DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE  
*Saccharomyces cerevisiae*: PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM  
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

**CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

EFEITOS BIOLÓGICOS DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE  
*Saccharomyces cerevisiae*: PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM  
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

**CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Victor Haber Perez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A553

Andrade, Cristilane Macharete de.

Efeitos biológicos do campo magnético sobre *Saccharomyces cerevisiae* : produção de bioetanol em biorreator assistido por campo magnético / Cristilane Macharete de Andrade. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

132 f. : il.

Bibliografia: 3 - 23.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.  
Orientador: Victor Haber Perez.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Campo magnético. 3. Fermentação. 4. Bioetanol. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

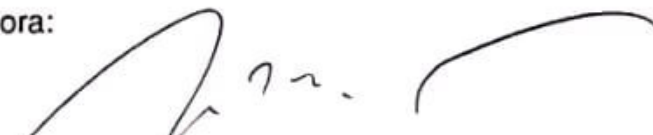
EFEITOS BIOLÓGICOS DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE  
*Saccharomyces cerevisiae*: PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM  
BIORREATOR ASSISTIDO POR CAMPO MAGNÉTICO

**CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal

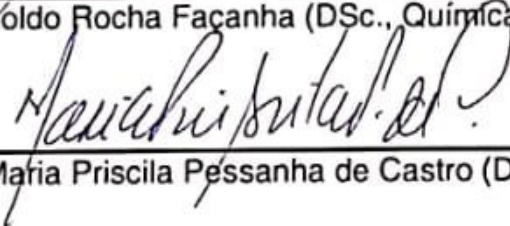
Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:



---

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (DSc., Química Biológica) - UENF



---

Profa. Drª. Maria Priscila Pessanha de Castro (DSc., Física) - UENF



---

Dr. Geraldo Ferreira David (DSc., Produção Vegetal) - UFES



---

Prof. Dr. Victor Haber Perez (DSc., Engenharia Química) – UENF  
(Orientador)



## **DEDICO**

A Deus.

Aos meus pais Margarida e Sebastião.

Aos meus irmãos Cristiana, Leandro e Ronilson.

Aos meus sobrinhos amados Yasmim, Annah Vithória e Raí.

E ao meu grande amor Rafael.

Os maiores incentivadores da minha carreira profissional,  
obrigada por todo apoio na realização desse sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer é um gesto humano, contudo, dizer muito obrigado é algo muito especial para as pessoas que acompanharam nestes últimos.

Agradeço primeiramente a DEUS, ao me conceder força, saúde e discernimento para a realização e conclusão deste trabalho;

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela concessão da bolsa, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Setor de Engenharia de Processos, pela oportunidade de realização deste curso;

Agradeço imensamente ao professor orientador Dr. Victor Haber Perez, pela orientação, dedicação, confiança e conhecimentos transmitidos. Meu muito obrigada pela atenção e contribuição para o meu crescimento acadêmico e pessoal!

Ao Professor Arnoldo Rocha Façanha do Centro de Biociências e Biotecnologia pela colaboração na realização desta pesquisa;

À Professora Anna Anna Lev Okorokova Façanha do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismo do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB/UENF) por ceder, gentilmente, a cepa da levedura utilizada neste estudo.

Ao querido amigo e parceiro de experimentos Antônio Jesus Dorighetto Cogo, por toda ajuda, conhecimento, atenção, disposição e responsabilidade na realização e colaboração nesta pesquisa.

Aos amigos, Geraldo, em especial, Antônio e Thays que me ajudaram em uma das etapas mais difíceis do mestrado pra mim, as 8, 10, 12, 14 e 16 horas de experimentos. Até mesmo distantes, me ajudaram de alguma forma, sempre me encorajando e me fazendo acreditar que no fim tudo daria certo. Sem vocês não teria sido possível realizar as inúmeras fermentações.

Aos amigos de tantos estados e até mesmo países que a UENF, o Laboratório de Engenharia de Processos e a minha querida República “Nossa Casa” me proporcionaram e que quero levar pra toda vida. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelas risadas, foram momentos incríveis e de grande aprendizado.

Agradeço aos meus familiares pela imensa força, apoio, paciência, compreensão nas horas difíceis e, pelo amor compartilhado, superando toda e qualquer dificuldade.

Ao meu grande amor Rafael, pela paciência, amor e pelo apoio em todos os momentos.

E a todas as pessoas que de alguma forma direta ou indireta contribuíram na realização deste sonho e conclusão desta etapa da minha vida acadêmica.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 Fermentação alcoólica</b> .....	3
<b>2.2 Aspectos gerais sobre magnetismo</b> .....	6
<b>2.3 Aplicações biotecnológicas de campos magnéticos</b> .....	8
<i>2.3.1 Processos fermentativos e produção de metabólicos</i> .....	9
<i>2.3.2 Inativação de micro-organismos</i> .....	13
<b>2.4 Sistemas de exposição aos campos magnéticos</b> .....	16
<b>2.5 Generalidades das membranas celulares</b> .....	19
<b>2.6 Conclusões da pesquisa bibliográfica</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	24
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1 Materiais</b> .....	26
<b>4.2 Procedimentos experimentais</b> .....	26
<i>4.2.1 Meio de manutenção</i> .....	26

4.2.2	<i>Preparo do inóculo</i>	26
4.2.3	<i>Obtenção da biomassa</i>	27
4.2.4	<i>Planejamento experimental para avaliar a produção de etanol sob campo magnético</i>	27
4.2.5	<i>Fermentação para produção de etanol</i>	28
4.2.6	<i>Experimentos com campo magnético</i>	29
<b>4.3</b>	<b>Métodos analíticos</b>	31
4.3.1	<i>Contagem de células em câmara de Neubauer</i>	31
4.3.2	<i>Análise de crescimento celular por Densidade óptica (DO)</i>	31
4.3.3	<i>pH do meio</i>	31
4.3.4	<i>Análise do consumo de substrato e produção de metabólitos por HPLC</i>	31
4.3.5	<i>Determinação da densidade do fluxo de prótons</i>	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
<b>5.1</b>	<b>Biorreator assistido por campo eletromagnético - sistema axial</b>	33
5.1.1	<i>Resultados da calibração do sistema gerador de campo magnético</i>	33
<b>5.2</b>	<b>Cinética de fermentação alcoólica</b>	34
5.2.1	<i>Análise do monitoramento da temperatura das bobinas</i>	41
5.2.2	<i>Análise da produção de etanol</i>	55
5.2.3	<i>Análise do consumo de glicose</i>	58
5.2.4	<i>Análise da produção de glicerol</i>	61
5.2.5	<i>pH</i>	63
<b>5.3</b>	<b>Análise dos resultados do planejamento experimental</b>	66
5.3.1	<i>Determinação do rendimento de etanol (<math>Y_p/s</math>)</i>	66
5.3.2	<i>Determinação da densidade de fluxo de prótons</i>	67
5.3.3	<i>Análise do planejamento experimental</i>	76
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	83
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	85
	<b>ANEXO A</b>	92
	<b>ANEXO B</b>	93
	<b>ANEXO C</b>	94

## RESUMO

ANDRADE, Cristilane Macharete de, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2018. Efeitos biológicos do campo magnético sobre *Saccharomyces cerevisiae*: produção de bioetanol em biorreator assistido por campo magnético. Orientador: Prof. Victor Haber Perez.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de *S. cerevisiae* X2180 sob campos magnéticos durante a fermentação anaeróbica para produção de bioetanol. A cultura da levedura foi realizada em um biorreator auxiliado por campo eletromagnético com linhas de campo magnético na direção axial, em relação à altura do reator. A cinética de fermentação foi realizada em intervalos regulares monitorando o crescimento celular, o pH, o consumo de substratos, a produção de etanol e a formação de subprodutos como o glicerol. Além disso, medições simultâneas da densidade do fluxo de prótons foram feitas para verificar possíveis efeitos do campo magnético na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase nas células durante a exposição. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental fatorial completo de face centrada com dois níveis e três pontos centrais. Assim, as variáveis independentes codificadas foram definidas como: X<sub>1</sub> - sistema de reciclo para exposição externa as suspensões celulares ao campo magnético (espiral, biorreator e sistema U) e X<sub>2</sub> - densidade de fluxo magnético - B (5, 10 e 15 mT) enquanto, as variáveis dependentes foram: R<sub>1</sub> - rendimento de etanol para o substrato (Y<sub>p/s</sub>) e R<sub>2</sub> - densidade média de fluxo

de prótons sensível ao vanadato ( $\mu\text{mol}/\text{min cm}^2$ ). Os resultados mostraram uma redução no tempo de fermentação em 2h nos experimentos com a aplicação de campo. Os melhores resultados foram observados quando o biorreator foi operado usando um reciclo externo a 10 mT. Comparativamente, nessa condição, o tempo final de fermentação foi reduzido em 2 h e o rendimento de etanol foi em torno de 20% superior em relação ao controle. Além disso, verificou-se que o campo magnético afetou significativamente a densidade de fluxo de prótons ( $p < 0,1$ ). Os resultados obtidos corroboram nossos estudos anteriores sobre o potencial dessa tecnologia não convencional. No entanto, mais estudos devem ser realizados para entender os mecanismos biológicos desses efeitos e avaliar os desafios e desvantagens de ampliar essa tecnologia para a produção de bioetanol e outros processos para a indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, campo magnético, fermentação, bioetanol.

## ABSTRACT

ANDRADE, Cristilane Macharete de, M.Sc., State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, February of 2018. Biological effects of magnetic field on *Saccharomyces cerevisiae*: production of bioethanol in magnetic field assisted bioreactor. Advisor: Prof. Victor Haber Perez.

The aim of this work was to evaluate the performance of *S. cerevisiae* X2180 under magnetic fields during anaerobic fermentation for bioethanol production. The yeast culture was carried out in a bioreactor assisted by electromagnetic field with magnetic field lines in the axial direction, in relation to the reactor height. The fermentation kinetic was carried out at regular intervals monitoring the cell growth, pH, substrate consumption, ethanol production and by-products formation like glycerol. In addition, simultaneously proton flux density measurements were made to verify possible effects of magnetic field on the H<sup>+</sup>-ATPase activity in the cells during exposition. The experiments were performed according to a complete factorial experimental design of face centered with two levels and three central points. Thus, the coded independent variables were defined as: X<sub>1</sub>- recycle system for external exposure the cellular suspensions to the magnetic field (spiral, bioreactor and U-system) and X<sub>2</sub> - magnetic flux density - B (5, 10 and 15 mT), whereas the dependent variables were: R<sub>1</sub>- ethanol yield for the substrate (Y<sub>p</sub>/s) and R<sub>2</sub> - mean density of proton fluxes sensitive to vanadate (pmol/min cm<sup>2</sup>). The



best results were observed when bioreactor was operated using an external recycle at 10 mT. Comparatively, at this condition the final fermentation time was reduced in 2 h and ethanol yield was around 20% higher than to the control. Also, was verified that the magnetic field significantly affected the proton flux density ( $p < 0,1$ ). The attained results corroborate the our previous studies about the potential of this unconventional technology. However, further studies must be carried out to understand the biological mechanisms of these effects and evaluated the challenges and drawbacks to scale up this technology for bioethanol production and other processes for the food industry.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, magnetic field, fermentation, bioethanol.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo de processos assistidos por campos magnéticos têm despertado a atenção da comunidade científica desde o século passado em virtude das potencialidades de seus efeitos biológicos reportados (Albuquerque *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007; Nývák *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Justo *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004). Estudos relatam que estes campos podem induzir diversos efeitos sobre os micro-organismos, dessa forma tem despertado interesse considerável tanto na biologia celular quanto na biotecnologia (Hunt *et al.*, 2009, Lei e Berg, 1998).

Em bioprocessos a aplicação desta tecnologia tem apresentado respostas que vão desde alterações nas taxas de crescimento (inibição ou estimulação) até produção de metabólitos (Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006).

Embora campos magnéticos tenham sido explorados em diversas aplicações biotecnológicas, ainda não foram totalmente estabelecidos os parâmetros que expliquem como os campos magnéticos interagem com sistemas biológicos. Ao mesmo tempo, muitos estudos que abordam a sua aplicação sob micro-organismos são controversos (Albuquerque *et al.*, 2016, Perez *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007). Dessa forma, entender os efeitos desta tecnologia sobre o comportamento de micro-organismos representa um passo de grande importância

para a biotecnologia e mais pesquisas serão necessárias para esclarecer os efeitos dos campos nas células microbianas que justifiquem estas alterações.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo entender o comportamento de *Saccharomyces cerevisiae* sob a aplicação de campos magnéticos de baixa frequência e intensidade tomando como modelo de estudo a produção de bioetanol visando contribuir para a melhoria deste processo com o entendimento dos fenômenos que explicam a interação destes campos com a matéria viva através de estudos da atividade de enzimas ATPase em nível celular.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

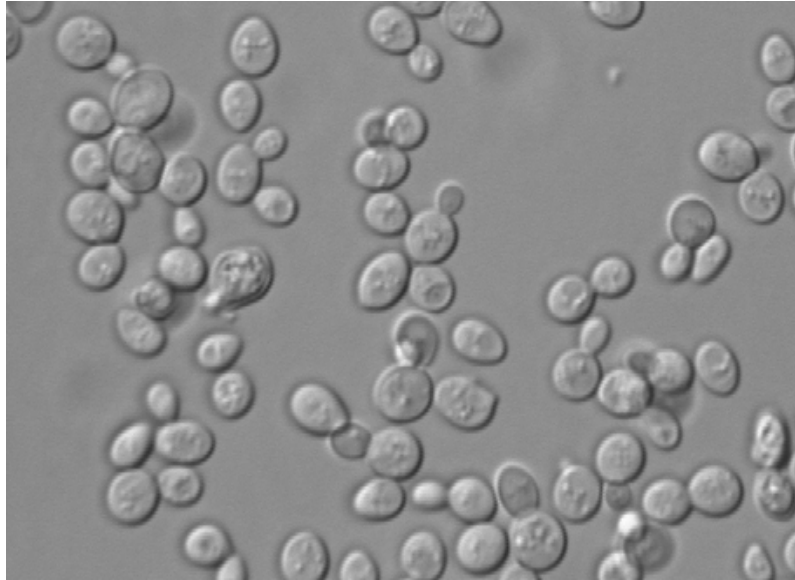
### 2.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico para produção de energia que ocorre com degradação de carboidratos e formação de etanol e dióxido de carbono como compostos principais e, como subprodutos glicerol, ácido pirúvico e succínico e alcoóis superiores. Este processo é realizado por leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces* e bactérias como a *Zymomonas mobilis* (Crocomo e Gutierrez, 2001; Lima *et al.*, 2001; Borzani *et al.*, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é basicamente um dos organismos eucarióticos mais intensivamente estudados na biologia celular, cujo metabolismo é o mais conhecido. As células dessa levedura (Figura 1) são redondas a ovóide e possuem de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e se reproduzem por brotamento. Podem utilizar diferentes açúcares para seu crescimento dependendo do tipo de cultivo. Utilizada há muito tempo pelo ser humano, esta levedura possui ampla utilização industrial como na panificação, produção de etanol e vinhos, além do uso na indústria farmacêutica (Hristov e Perez, 2011, Lima *et al.*, 2001).

Esta levedura é um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Portanto, os produtos finais do metabolismo do açúcar dependerão das condições em que a levedura se

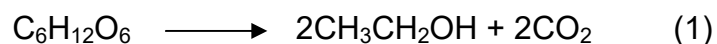
encontra. Em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, já em anaerobiose a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub>. A conversão de açúcar em etanol ocorre através de reações enzimáticas complexas no citoplasma celular (Lima *et al.*, 2001).

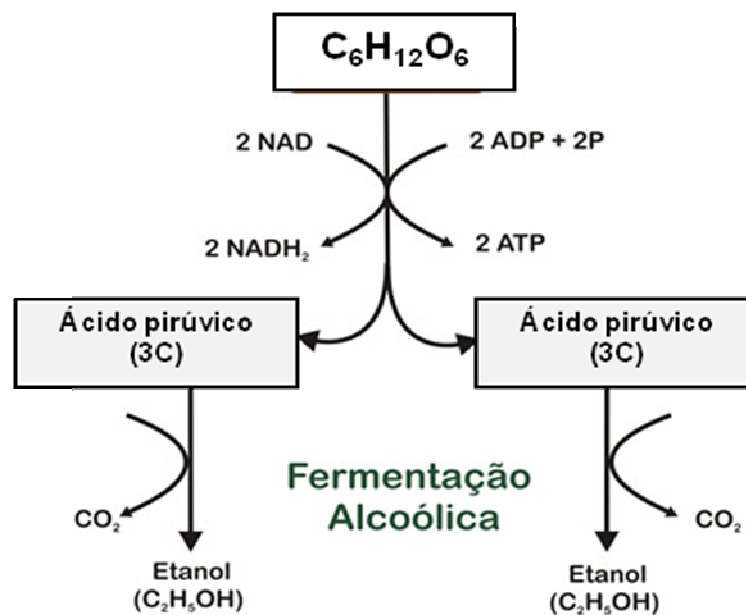


**Figura 1.** Microscopia óptica de células de *S. cerevisiae* em microscópio Zeis Axio Imager A.2 com aumento de 630x. Fonte: Arquivo pessoal

*S. cerevisiae* é a levedura mais utilizada na fermentação para a produção de etanol, devido sua capacidade de crescimento em altas concentrações de açúcar e etanol, taxa de crescimento específico, baixa geração de co-produtos, operação em anaerobiose parcial e principalmente pelo seu alto rendimento de etanol (Ko *et al.*, 2016).

Em condições anaeróbicas, a principal via metabólica usada pelas leveduras é a glicólise, para cada molécula de glicose são produzidas duas moléculas de piruvato (Equação 1), que então é reduzido a etanol com liberação de duas moléculas de CO<sub>2</sub> (Crocomo e Gutierrez, 2001).A Figura 2 exemplifica como ocorre o processo de fermentação alcoólica.





**Figura 2.** Esquema simplificado do metabolismo da glicose da fermentação alcoólica.

O rendimento teórico na produção de etanol é de 0,511 e 0,489 para  $CO_2$  (Vásquez *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2008). Entretanto, juntamente com o etanol e o  $CO_2$ , o metabolismo anaeróbico permite a formação de vários subprodutos durante a fermentação, bem como a excreção de glicerol, ácidos orgânicos, alcoóis superiores, entre outros compostos. Simultaneamente, ocorre o crescimento das leveduras/formação de biomassa (Lima *et al.*, 2001).

Estes produtos secundários acabam diminuindo o rendimento na produção de etanol. De acordo com Lima *et al.* (2001), estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para formação de produtos secundários, resultando num rendimento de 95% em etanol em condições adequadas de fermentação. Todavia, em condições industriais, em que fatores químicos, físicos e microbiológicos podem afetar a levedura, rendimentos de até 90% normalmente são obtidos, resultando em desvio de 10% do açúcar processado para a formação de outros produtos que não seja o etanol.

A produção de etanol por processos fermentativos é uma tecnologia bem estabelecida, entretanto o desenvolvimento de novas tecnologias e processos por rotas não convencionais que resultem soluções atrativas do ponto de vista

tecnológico deve ser melhor explorado. Neste sentido, diversos pesquisadores têm estudado processos fermentativos para produção de etanol assistido por campos eletromagnéticos e, portanto, diversos dispositivos foram desenvolvidos a fim de expor sistemas biológicos a estes campos (Perez *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Nývák *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004; Ruíz-Gomes *et al.*, 2004).

Na literatura verifica-se uma intensa atividade investigativa sobre os efeitos biológicos de campos magnéticos sobre a levedura *S. cerevisiae* na fermentação para produção de etanol (Lopes *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2004). Estes estudos abordam diferentes condições e parâmetros de exposição aos campos, bem como diferentes resultados obtidos que serão descritos detalhadamente nos próximos tópicos desta revisão.

## 2.2 Aspectos gerais sobre magnetismo

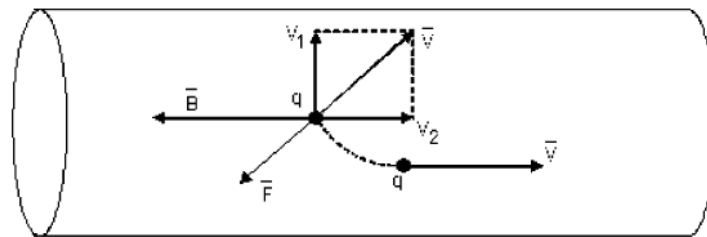
Independente da sua forma, um ímã tem dois pólos, o pólo norte (N) e o pólo sul (S) que exercem forças um sobre o outro de maneira análoga à das cargas elétricas, sendo assim, pólos do mesmo nome se repelem e os pólos de nomes opostos se atraem. Além disso, magnetismo e eletricidade se relacionam, de forma que um campo elétrico variável provoca um campo magnético e vice-versa (Nussenzveig, 1997; Serway, 1996).

O campo magnético exerce força sobre cargas em movimentos e essa força é proporcional à carga e à magnitude da velocidade da partícula. Sendo assim, experimentalmente, quando uma partícula com carga elétrica “ $q$ ”, passa numa certa velocidade  $\vec{v}$  por um campo magnético constante e uniforme  $B$  em uma região do espaço, sofre a ação de uma força perpendicular à  $\vec{v}$  e  $\vec{B}$ . A força  $\vec{F}_L$  é dada pela Equação 2. A unidade SI de campo magnético é o Tesla (T), mas também pode ser representada em Gauss (G), que corresponde a  $10^{-4}$  T (Tipler, 2000; Serway, 1996).

$$\vec{F} = q (\vec{v} \times \vec{B}) \quad (2)$$

Em que:  $\vec{F}$  é a força de Lorentz,  $\vec{B}$  é a densidade de fluxo magnético,  $q$  é a carga da partícula e  $\vec{v}$  é a velocidade da partícula.

Se tratando de soluções aquosas contendo elementos químicos ionizáveis, como no caso dos meios de cultura e soluções de processos fermentativos, que geralmente são ricos em sais e outros nutrientes, os quais circulam a determinada velocidade  $\vec{v}$  por um tubo reto, cujas paredes não são condutoras na presença de um campo  $\vec{B}$ , provocam a aceleração centrípeta sobre as partículas carregadas no líquido descrevendo sua trajetória helicoidal (Figura 3) (Reitz, 1967).



**Figura 3.** Movimento de partícula carregada em meio de fermentação atingindo o equilíbrio dinâmico sob campo eletromagnético. Fonte: Perez *et al.*, 2007.

Esta trajetória helicoidal depende apenas da carga eletrostática da partícula e de sua massa. Desta forma, em um tubo reto onde se aplica um campo há a separação das maiores partículas carregadas (íons negativos) e menores (íons positivos), criando uma trajetória helicoidal. Assim é criada uma redistribuição iônica na suspensão celular, a qual acompanha um aumento da diferença de potencial elétrico no interior do líquido tratado magneticamente e estabelecendo um campo elétrico não uniforme com circulação de corrente no meio condutor (Reitz, 1967).

Em processos assistidos por campos eletromagnéticos algumas das variáveis que devem ser levadas em consideração são: força do campo (indução e intensidade magnética), frequência, tipo de campo (constante e pulsante) e tempo de exposição (Perez *et al.*, 2009).

Atualmente o magnetismo aplicado em processos biotecnológicos é considerado como um assunto de caráter inovador e emergente que tem despertado o interesse da comunidade científica devido aos efeitos biológicos reportados na literatura (Albuquerque *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Justo *et al.*, 2006).



### 2.3 Aplicações biotecnológicas de campos magnéticos

Por muitos anos, os cientistas acreditavam que os campos magnéticos de baixa frequência não produziam efeitos biológicos significativos. Entretanto, nas últimas décadas diversos estudos foram realizados com o objetivo de verificar a influência dos campos elétricos e/ou magnéticos de baixa frequência (<300 Hz) em sistemas biológicos (Perez *et al.*, 2009; Justo *et al.*, 2006).

Cada vez mais a atenção tem sido dirigida para aos efeitos biológicos dos campos magnéticos (Li *et al.*, 2007). Dessa forma, têm sido explorados em diversas aplicações biotecnológicas, uma vez que, podem induzir diversos efeitos sobre os micro-organismos (Hunt *et al.*, 2009). Estes efeitos têm recebido atenção considerável na comunidade científica, pois os mecanismos de interação desses campos com sistemas biológicos ainda não são claros e não foram comprovados (Perez *et al.*, 2007).

Dessa forma, tanto a estimulação quanto a inibição de processos celulares representa considerável interesse na biologia celular e na biotecnologia, não só para estabelecer os mecanismos básicos dessa interação, mas também devido aos potenciais de aplicações práticas (Lei e Berg, 1998). Embora a aplicação de campo magnético tenha sucesso em muitas áreas, os estudos que abordam a sua aplicação aos micro-organismos são controversos (Albuquerque *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2007).

Ainda não foram estabelecidos parâmetros que esclareçam a questão de como os campos magnéticos podem inibir ou estimular o crescimento dos micro-organismos, entretanto de acordo com Fojt *et al.* (2004) e Strašák *et al.* (2002) campos magnéticos podem afetar a permeabilidade dos canais iônicos na membrana, afetando assim o transporte de íons para dentro das células acarretando alterações biológicas nos organismos.

Segundo Hunt *et al.* (2009), estes campos podem provocar: aumento na permeabilidade da membrana; aumento da circulação e valorização seletiva do fluxo de íons, taxa de reações bioquímicas; alteração na taxa de ligação de íons de cálcio para enzimas ou receptores; mudança da distribuição de proteínas e lipídios e nas associações proteína-lipídio; alteração na distribuição molecular interna de carga eletrônica dentro de moléculas lipídicas na bicamada da membrana; na expressão de genes específicos e na atividade da enzima.

De acordo com Albuquerque *et al.* (2016), a presença do campo magnético pode provocar efeitos relacionados à direção da migração de certos micro-organismos, ao crescimento e à reprodução, no aumento da síntese de DNA, na orientação de biomoléculas, redução do número de células.

Na literatura são encontrados trabalhos com aplicações biotecnológicas de campos magnéticos com diferentes parâmetros de campo. E fatores como: a intensidade do campo, que vão desde baixas intensidades (mT) e de altas intensidades (T), tipo de campo, frequência, tempo de exposição, parâmetros operacionais dos dispositivos geradores de campo, direção das linhas de campo, geometria do sistema, dentre outros fatores, também influenciam nos efeitos encontrados em resposta ao tratamento com campo magnético (Albuquerque *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2009; Tenuzzo *et al.*, 2009).

Conforme David *et al.* (2016), Albuquerque *et al.*(2016) e Lopes *et al.*(2010)os efeitos biológicos variam de acordo com o tipo de micro-organismo, a composição do meio, a concentração microbiana e as condições do meio de cultura. Para Ruíz-Gomes *et al.* (2004), o estado biológico das células também poderia influenciar os possíveis efeitos dos campos magnéticos em sistemas biológicos. Dessa forma, as dificuldades para compreender a influência real dos campos magnéticos nas células tornam-se mais complexas uma vez que, os experimentos envolvem uma gama de condições de exposição (Tenuzzo *et al.*, 2009, Hunt *et al.*, 2009).

### *2.3.1 Processos fermentativos e produção de metabólicos*

De acordo com Hristov e Perez (2011), se tratando de processos fermentativos, os resultados disponíveis na literatura relacionados à aplicação de campos magnéticos mostram duas tendências: a supressão do crescimento celular e efeitos positivos na fermentação com o aumento da biomassa e produção de metabólitos. Sendo assim, os campos podem forçar ou desacelerar o crescimento e a produção metabólica dos organismos vivos. Além disso, campos magnéticos podem penetrar a membrana e alcançar o interior da célula, afetando toda a célula.

Segundo David *et al.*, (2016), os efeitos biológicos do campo magnético ainda estão sob intensos estudos e maiores esforços serão necessários para avaliar o comportamento complexo dos sistemas biológicos mediante a aplicação

desta tecnologia. Portanto, o crescimento de micro-organismos pode ser estimulado ou inibido, dependendo da intensidade do campo, frequência, tempo de exposição, tipo de micro-organismo, entre outros fatores mencionados anteriormente (Moore, 1979).

Em um estudo realizado por Alvarez *et al.* (2006) a combinação de tempo de exposição, a indução do campo magnético e a velocidade de reciclo e a aplicação de campo magnético sobre a suspensão celular de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* intensificaram a produção de nisina durante o processo de fermentação. Nas melhores condições de tratamento com o campo, o rendimento de nisina no que diz respeito ao consumo de substrato e da biomassa formada foram respectivamente, três e cinco vezes maiores que os valores encontrados nos experimentos controle.

Motta *et al.* (2004) observaram um aumento de 3,4 vezes na concentração de etanol através da aplicação de campos magnéticos estáticos durante 24 h de exposição a 220 mT durante a fermentação alcoólica realizada por *S. cerevisiae*. Em estudo com *S. cerevisiae* ATCC 7754 para a produção de glutatona, Santos *et al.* (2010) avaliaram a influência das variáveis como, tempo de exposição (8 - 16 h) e densidade de fluxo magnético (25,0 - 34,3 mT) no aumento da produção de biomassa e glutatona. Os resultados indicaram que o maior rendimento foi obtido com maior tempo de exposição (16 h) e menor densidade de fluxo magnético (25 mT). Demonstrando que longos tempos de exposição a campos magnéticos não são necessários, uma vez que, 16 h ou menos de exposição foram suficientes para estimular a produção de biomassa e glutatona (Santos *et al.*, 2010).

Com o objetivo de avaliar os efeitos de campos magnéticos de baixa frequência (5-20 mT) na produção de etanol pela *S. cerevisiae* utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato, Perez *et al.* (2007) comprovaram a eficácia do tratamento com campos magnéticos em processos de fermentações, uma vez que a fermentação foi concluída em menos tempo quando comparado com o experimento controle, além disso foi verificado um aumento de 17% na produção de etanol nas melhores condições do processo (velocidade de reciclo de 0.9-1.2 m s<sup>-1</sup> e intensidade de 20 mT).

Lopes *et al.* (2010) estudaram a influência do campo magnético gerado por condicionador magnético (25 e 42 mT) e por pares de ímãs (500 mT) sobre a fermentação alcoólica descontínua (batelada) de *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Entretanto, nas condições estudadas por estes autores, não foi possível comprovar algum benefício ocasionado pela presença de campo magnético no processo de produção de etanol em batelada, ou seja, o uso desta tecnologia não resultou em diferença significativa em todas as condições estudadas.

De modo semelhante, os resultados encontrados por Ruiz-Gomes *et al.* (2004) indicaram que a aplicação de campo magnético não induziu alterações no crescimento da *S. cerevisiae*. Estes autores avaliaram os efeitos no crescimento de *S. cerevisiae* WS8105-1C com aplicação de campos magnéticos estáticos homogêneos. Os experimentos foram realizados com uma intensidade de campo entre 0,35 e 2,45 mT, durante 24 e 72 h.

Segundo (Li *et al.*, 2007) tratamentos com campos magnéticos podem influenciar na taxa de crescimento, no acúmulo de biomassa e na biossíntese da cultura microbiana. Dessa forma, entender os efeitos desta tecnologia sobre micro-organismos representa um passo de grande importância para a biotecnologia de alimentos (Alvarez *et al.*, 2006).

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados diferentes estudos sob o efeito de campos magnéticos aplicados a processos biotecnológicos e os efeitos produzidos nos micro-organismos. Na Tabela 1 estão apresentados resumidamente alguns estudos relacionados aos efeitos do campo magnético sobre células de *S. cerevisiae*.

**Tabela 1.** Leveduras sob o efeito de campos magnéticos

Micro-organismo	Parâmetros de campo magnético	Resultados e observações	Referência
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	Densidade de fluxo magnético de 20 mT por 24, 48 e 72h de exposição.	Aumento de 2,63% na produção de biomassa e de 32,1% na produção de glutatona.	Santos <i>et al.</i> (2012)
<i>S. cerevisiae</i> comercial	Densidade de fluxo magnético de 25 e 42 mT (condicionador magnético) e 500mT (pares de ímãs).	Nenhum benefício ocasionado pela presença do campo no processo de produção de etanol.	Lopes <i>et al.</i> (2010)
<i>S.cerevisiae</i> WS8105-1C	Densidade de fluxo magnético de 0,35 e 2,45 mT e frequência de 50 Hz durante 24 e 72 h.	Não provocou alterações no crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .	Ruíz-Gomes <i>et al.</i> (2004)
<i>S. cerevisiae</i>	Densidade de fluxo magnético de 14 T durante 16 h.	Diminuição da taxa de proliferação da levedura.	Iwasaka <i>et al.</i> (2004)
<i>S.cerevisiae</i> CCY 21-4-59	Campo magnético ( $B_m \leq 10$ mT, $t \leq 60$ min, $F= 50$ Hz).	Destruição de uma fração das células das leveduras e em outros casos não apresentou nenhuma influência.	Novák <i>et al.</i> (2007)
<i>S. cerevisiae</i>	Densidade de fluxo magnético de 5 a 20 mT	Aumento de 17% na produção de etanol e redução no tempo de fermentação.	Perez <i>et al.</i> (2007)

### 2.3.2 Inativação de micro-organismos

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm se dedicado a estudar os possíveis efeitos ocasionados pela exposição aos campos magnéticos na inativação de micro-organismos. No entanto, os resultados encontrados na literatura mostram que o crescimento microbiano relacionado à inativação também é contraditório e conflitante (Albuquerque *et al.*, 2016).

De acordo com El May *et al.* (2009) o campo magnético pode afetar as funções biológicas de organismos por alterações no crescimento celular, proliferação e viabilidade celular. Além disso, tem a capacidade de alterar as características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos micro-organismos, entretanto a natureza destes efeitos depende dos parâmetros do campo aplicado às células (Pichko e Povalyaeva, 1996).

Segundo Tsuchiya *et al.* (1996) campos magnéticos podem afetar células bacterianas em diferentes aspectos, pois as células contêm muitos componentes sensíveis a altos campos magnéticos, tais como proteínas, ácidos nucleicos, membranas, entre outros. Além disto, as mudanças metabólicas (quantidade de nutrientes, condições químicas) entre células nas fases logarítmicas e estacionárias podem apresentar diferentes respostas sob a presença do campo.

Segundo Novák *et al.* (2007), bactérias são mais sensíveis à exposição a campos magnéticos que as leveduras. Além disso, a diferença no efeito do campo entre as estirpes bacterianas pode ser causada pela sua diferente forma, pelo tipo de célula (eucariótico ou procariótico), morfologia (Fojt *et al.*, 2007; Strašák *et al.*, 2005), bem como da estirpe (Fojt *et al.*, 2004).

Ma *et al.* (2009) estudaram campo magnético de até 4,5T em *E. coli* 8099 e verificaram que após o tratamento, a taxa de sobrevivência do micro-organismo diminuiu significativamente. Estes autores também constataram que a fase exponencial (Log) de crescimento de *E. coli* foi a fase de maior sensibilidade ao tratamento. Segundo os mesmos autores, devido à sua uniformidade na morfologia, constituição química, propriedades fisiológicas e à sua elevada sensibilidade a estímulos externos bactérias em fase logarítmica de crescimento são mais sensíveis à exposição ao campo.

Além da inibição no crescimento e na propagação das células da *Escherichia coli*, Ji *et al.* (2009) também verificaram danos na superfície da célula

(na parede celular) ao investigar a morfologia da célula com auxílio de microscopia eletrônica de varredura após exposição ao campo. Dessa modo, a superfície das células não tratadas com o campo era homogênea, enquanto a superfície das células crescidas sob o efeito do campo magnético apresentou deformações principalmente nas extremidades das células (Ji *et al.*, 2009).

Em alguns estudos o crescimento celular não é afetado pelo campo (Albuquerque *et al.*, 2016). Conforme estudo realizado por Harte *et al.* (2001) não foram observados efeitos inativadores ou danos à célula de *E. coli* ATCC 11775 na presença de campos magnéticos pulsados (50 pulsos, 10-15kHz de frequência e 18 T intensidade por 30  $\mu$ s) em combinação com outras tecnologias não-térmicas (ultrassom, alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado e antimicrobianos como nisina e lisozima).

Embora os resultados encontrados por estes autores não tenham demonstrado efeito na inativação, ainda não é possível tirar conclusões gerais sobre a capacidade desta tecnologia para inativar micro-organismos, uma vez que, muitos estudos têm comprovado os efeitos inativadores dos campos magnéticos (San Martin *et al.*, 2001).

Portanto, resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos em pesquisa com campos magnéticos que dificultam o entendimento sobre os possíveis mecanismos de interação entre os campos e organismos vivos (Novák *et al.*, 2007; Ruiz-Gómez *et al.*, 2004). Por isso, a busca por melhores condições experimentais e parâmetros que expliquem os efeitos destes campos magnéticos sobre micro-organismos (Santos *et al.*, 2010; Mittenzwey *et al.*, 1996).

Na Tabela 2 estão apresentados alguns estudos envolvendo bactérias sob campos magnéticos, bem como os efeitos produzidos sobre as células expostas.

**Tabela 2.** Bactérias sob o efeito de campos magnéticos.

Micro-organismo	Parâmetros de campo magnético	Resultados e observações	Referência
<i>Escherichia coli</i> 10032	Densidade de fluxo magnético de 45 a 3500 mT por 60 min.	Diminuição do número de UFCs com aumento do tempo de exposição e danos na superfície da célula.	Ji <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	Densidade de fluxo magnético de 30, 60, 80 e 100 mT por 24h.	Inibição do crescimento de todas as espécies expostas de acordo com a intensidade do campo magnético.	Kohno <i>etal.</i> (2000)
<i>E. coli</i> B	Campo magnético homogêneo com densidade de fluxo magnético de 7 T e não homogêneo de 5.2-6.1 T e T 3.2-6.7.	Afetou negativamente o crescimento dependendo da fase de crescimento.	Tsuchiya <i>et al.</i> (1996)
<i>E. coli</i> , <i>Leclercia adecarboxylatae</i> , <i>S. aureus</i>	Densidade de fluxo magnético de 10 mT por 30 min e frequência de 50 Hz.	O número de UFCs diminuiu com o tempo de exposição em todas as estirpes.	Fojt <i>et al.</i> (2004)
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar Hadar	Densidade de fluxo magnético de 200 mT por 13 h de exposição.	Não alterou o crescimento celular, mas induziu a diminuição de colônias (UFCs) entre 3 e 6 horas.	El May <i>et al.</i> (2009)
<i>E. coli</i> e <i>Paracoccus denitrificans</i>	Densidade de fluxo magnético de 10 mT e 50 Hz de frequência por 1h de exposição.	Não foi observada qualquer alteração na superfície e na morfologia de nenhuma das espécies estudadas.	Fojt <i>et al.</i> (2009)



## 2.4 Sistemas de exposição aos campos magnéticos

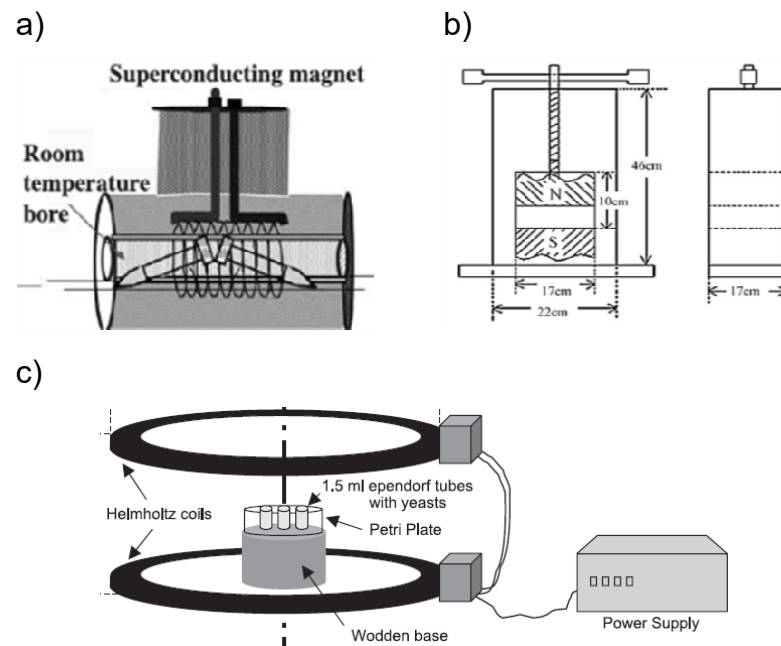
Os dispositivos geradores de campo magnético desenvolvidos para estudo dos efeitos sobre materiais biológicos permitem expor as culturas de células na irradiação do campo magnético em pequenos sistemas, tais como placas de Petri, tubos ou pequenos frascos e recipiente para suspensões celulares (Justo *et al.*, 2006).

De acordo com Alvarez *et al.* (2006) a aplicação de campos magnéticos em escala industrial infelizmente ainda é uma técnica economicamente inviável, uma vez que, normalmente os dispositivos geradores do campo do magnético são projetados para cobrir a totalidade ou a maior parte de um fermentador e tratar pequenos volumes de amostras. Na Figura 4 estão apresentados alguns exemplos de sistemas de exposição a campos magnéticos de culturas estáticas em escala laboratorial.

A Figura 4a apresentada um sistema gerador de campo magnético configurado por um ímã supercondutor com uma densidade máxima de fluxo magnético de 14 T e colocação do tubo com a cultura de levedura utilizada por Iwasaka *et al.*, (2004).

No estudo realizado por Ji *et al.* (2009), os campos magnéticos estáticos foram gerados por ímãs permanentes Nd-Fe-B com indução de 450 mT a 3500 mT e gerados por discos magnéticos (8 cm de diâmetro e 4 cm de espessura) com indução de 45 mT e 450 mT (Figura 4b).

No sistema desenvolvido por Ruiz-gomes *et al.* (2004) (Figura 4c), os campos magnéticos foram gerados por um par de bobinas Helmholtz (40 cm de diâmetro e com 154 voltas de fio de cobre) montadas em uma armação de madeira. As bobinas foram separadas 20 cm que produzem um campo magnético homogêneo na direção vertical na área central com densidade de fluxo magnético variando de 0,1 a 3,5 mT.



**Figura 4.** Sistemas de exposição a campos magnéticos de culturas microbianas estáticas gerados por: a) Ímã supercondutor (Iwasaka *et al.*, 2004), b) Ímãs permanentes Nd-Fe-B (Ji *et al.*, 2009) e c) Bobinas Helmholtz (Ruiz-Gómez *et al.*, 2004).

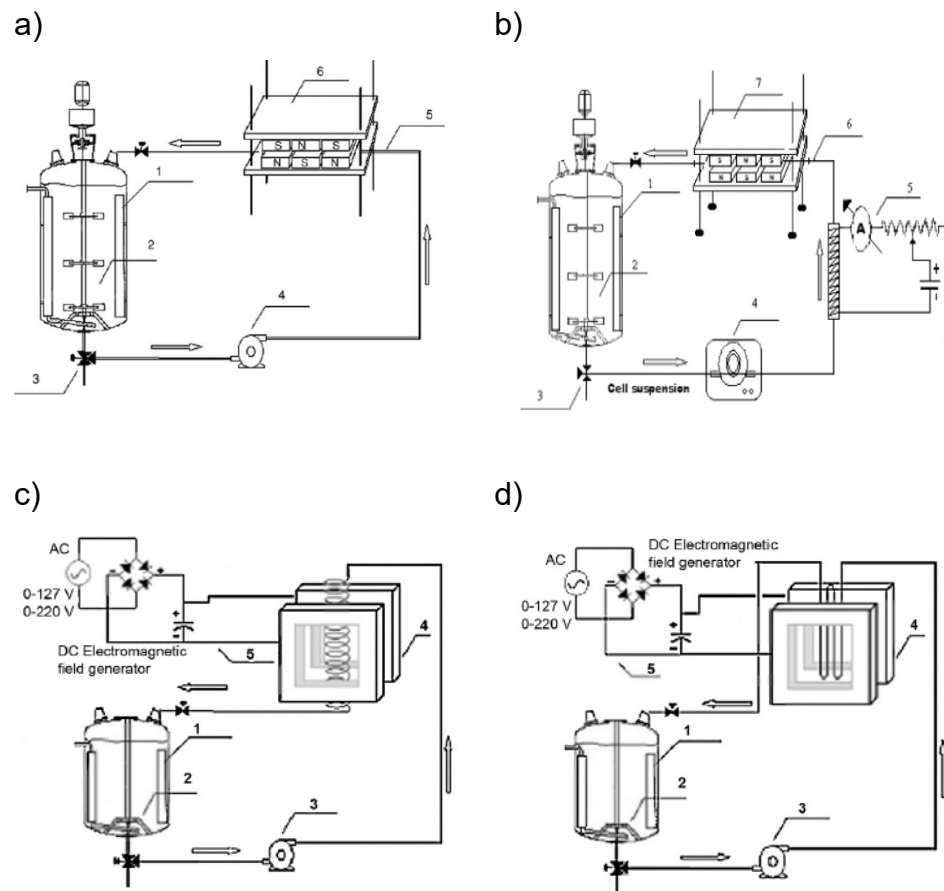
Os sistemas para tratamento magnético de suspensões celulares foram desenvolvidos basicamente para processos de fermentação. Na Figura 5 estão apresentados alguns sistemas de exposição a campos magnéticos de suspensões celulares. Este tipo de sistema foi idealizado para operar de forma dinâmica o reciclo de suspensões celulares através de um campo eletromagnético externo e pode ser usado para controlar tanto para o crescimento celular e/ ou inibição. Desta forma, é possível sua implementação em escala industrial independente do tipo de processo ou do tamanho da planta ou do equipamento (Justo *et al.*, 2006).

Alvarez *et al.* (2006) realizaram o reciclo do meio de fermentação em um tubo de aço inoxidável sob campo magnético gerado por três pares com pólos opostos (Figura 5a) com distâncias reguladas de forma que a obter densidade de fluxo magnético de 20, 12,5 e 5mT, com linhas de campo perpendiculares ao movimento do fluido.

De modo semelhante, no estudo realizado por Perez *et al.* (2007) o biorreator foi acoplado com dois aparelhos geradores de campo eletromagnético (Figura 5b): o primeiro constituído por seis ímãs, dispostos com pólos opostos voltados ajustados fornecendo densidade de fluxo magnético de 5-20 mT, com linhas de campo perpendiculares ao movimento do fluido em uma frequência extremamente baixa. No segundo aparelho, utilizou-se um solenóide de dupla camada de 0,20 m de comprimento, o que permitiu estabilizar a fonte de corrente de 2 A e densidade de fluxo magnético de aproximadamente 8 mT.

Na Figura 5c é apresentado o sistema utilizado por David *et al.* (2016), no qual os campos magnéticos homogêneos foram gerados por bobinas Helmholtz suportadas por um quadro não magnético (de madeira) com um balanço de pêndulo com várias orientações da direção do campo (axial para transversal). As bobinas foram energizadas por uma corrente contínua fornecida por um retificador Greutz e controlado por um medidor digital.

Nas últimas décadas, uma variedade de geradores de campos magnéticos e eletromagnéticos foi desenvolvida para tratar diversos materiais biológicos (Perez *et al.*, 2009; Justo *et al.*, 2006). Além dos fatores mencionados anteriormente nesta revisão, outro fator que aumenta os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade de pesquisas com esta tecnologia é que não existem sistemas e/ou equipamentos comercialmente disponíveis (Hunt *et al.*, 2009), desta forma estes equipamentos são desenvolvidos pelos seus respectivos grupos de pesquisa não havendo uma padronização dos sistemas geradores.



**Figura 5.** Esquemas experimentais de sistemas de exposição a campos magnéticos de suspensões celulares gerados por: a) Três pares de ímãs com pólos opostos (Alvarez *et al.*, 2006), b) Seis ímãs, dispostos com pólos opostos e um solenóide de dupla camada de 0,20 (Perez *et al.*, 2007), c) Bobinas Helmholtz com campo na direção transversal e reciclo em espiral (David *et al.*, 2016) e d) Bobinas Helmholtz com campo na direção transversal e reciclo em U (David *et al.*, 2016).

## 2.5 Generalidades das membranas celulares

As membranas celulares servem como barreira seletiva a passagem de substâncias do meio extracelular para o intracelular e vice-versa. Essa função permite que a célula mantenha concentrações de solutos no citosol diferentes daquelas no fluido extracelular. No entanto, para fazer uso dessa barreira, as células desenvolveram meios para transferir moléculas específicas e íons através da membrana para ingerir nutrientes essenciais, excretar produtos metabólicos e regular concentrações intracelulares de íons (Alberts *et al.*, 2010).

As células de leveduras, assim como demais células vivas, são unidades circundadas por cargas elétricas reguladas por correntes geradas a partir do influxo e efluxo de átomos e moléculas eletricamente carregadas. O fluxo localizado na membrana plasmática proporciona a formação do potencial elétrico da membrana, o qual é modulado dinamicamente por proteínas transmembranares que funcionam como canais ou bombas de ânions e cátions através da membrana (Alberts *et al.*, 2010).

As proteínas de transporte são responsáveis pela transferência de solutos através das membranas celulares. Essas proteínas permitem a passagem de solutos na membrana de forma passiva, na direção do seu gradiente eletroquímico, e ativa, no qual ocorre o bombeamento contra o gradiente eletroquímico. No transporte ativo, as proteínas transportadoras, também chamadas de bombas, estão acopladas a uma fonte de energia metabólica, como a hidrólise de ATP ou gradiente de íons (Alberts *et al.*, 2010).

Os gradientes de íons desempenham um papel importante nas células, uma vez que conduzem vários processos essenciais de transporte. As bombas de íons que utilizam a energia de hidrólise de ATP são responsáveis, principalmente, pelo estabelecimento e pela manutenção do gradiente eletroquímico da célula. As bombas acionadas por ATP, chamadas de transportadoras *ATPases*, hidrolisam ATP em ADP e fosfato e usam a energia para bombear íons ou outros solutos através da membrana (Alberts *et al.*, 2010).

O potencial de membrana de uma célula é o resultado de gradientes de cargas separados pela membrana plasmática. Os valores dos potenciais de membrana em repouso podem variar de -10 mV a -150 mV em grande parte das células (Chang e Minc, 2014).

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática desempenha um papel essencial na fisiologia das células de fungos e leveduras. Ela gera um grande gradiente eletroquímico que impulsiona o transporte de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos. A extrusão de H<sup>+</sup> catalisada por esta enzima contribui para a regulação do pH intracelular e extracelular da levedura, uma vez que pode bombear aproximadamente 100 prótons por segundo na membrana (Chang e Minc, 2014; Lobão *et al.*, 2007).

No estudo realizado por Lobão *et al.*, (2007), as alterações no pH do meio produzido pelas células *Y. lipolytica* sob o estresse de alumínio foram consistentes com a estimulação induzida por alumínio na translocação de H<sup>+</sup>. Portanto, fica evidente que estresse provocado pelo alumínio influencia no pH extracelular ativando o bombeamento de H<sup>+</sup> na membrana plasmática. Além disso, segundo estes autores, o pH da superfície celular atua como determinante da morfogênese desta levedura e fazendo com que a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática atue como fator chave neste processo.

Além disso, outros fatores podem alterar a atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase. Por exemplo, o etanol pode provocar um efeito inibidor na ATPase da membrana plasmática (Cartwright *et al.*, 1987). Cartwright *et al.* (1986) constataram que etanol inibiu a atividade da ATPase em membranas de *S. cerevisiae* NCYC 431. Embora esta seja, em geral, mais tolerante ao etanol do que outras leveduras, quando as concentrações se aproximam de 2 M ocorre uma inibição mesmo para as cepas mais tolerantes.

Pela membrana plasmática atuar como um isolante acreditava-se que campos elétricos não afetam diretamente as proteínas citoplasmáticas, entretanto estes campos exercem sim efeitos nos componentes da membrana ou em componentes extracelulares (Minc e Chang, 2010).

Campos magnéticos aplicados em processos biotecnológicos provocam alterações nas células, resultando em diversas respostas macroscópicas. De acordo com Perez *et al.* (2007), acredita-se que essas respostas estão relacionadas a alterações no metabolismo das leveduras devido à influência do campo magnético sobre as membranas celulares, alterando assim a permeabilidade e a passagem de nutrientes para o interior das células.

Dessa forma, quando se aumenta a permeabilidade, o transporte de substrato no interior da célula também aumenta e conseqüentemente proporciona uma maior produção de etanol. Outro possível efeito é de que campos magnéticos influenciam de alguma forma as enzimas (catalisadores biológicos), tornando a conformação mais favorável para reagir com o substrato e com outros compostos do processo (Lopes *et al.*, 2010).

Para Hunt *et al.* (2009) e Pazur *et al.* (2007), além de alterações na membrana plasmática, os efeitos provocados por campos magnéticos em microorganismos estão associados com mudanças na conformação de cromatina e proteínas, na expressão gênica, e na atividade de diversas enzimas. A exposição de células a campos eletromagnéticos altera a fluidez (Dihel *et al.*, 1985), a permeabilidade (Hunt *et al.*, 2009) e a distribuição de domínios protéicos e lipídicos na bicamada, bem como causa mudanças conformacionais nas associações lipídeo-proteína (Pilla, Markov, 1994; Hunt *et al.*, 2009). Essas mudanças estruturais na membrana representam uma transferência de informação eletroquímica, pois alteram as propriedades de transporte da célula e desencadeiam uma resposta enzimática específica (Pilla *et al.*, 1987). Dentre as quais, estão as alterações na atividade de transportadores e canais iônicos e, conseqüentemente, no potencial elétrico da membrana (Ikehara *et al.*, 1998; Zablotskii *et al.*, 2016).

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática é uma das proteínas mais abundantes da membrana, constituindo de 15-20% de todas as proteínas encontradas na membrana de leveduras e plantas (Eraso *et al.*, 1987) e com a capacidade de transportar de 20-100 H<sup>+</sup> para fora da célula por segundo. Dessa forma, a H<sup>+</sup>-ATPase representa um dos principais elementos de transporte iônico e reguladores do potencial elétrico de membrana em células de leveduras (Chang e Minc, 2014; Volkov, 2015).

O genoma da *S. cerevisiae* codifica duas isoformas, a principal H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1p) é essencial e mais expressa, enquanto a segunda isoforma (Pma2p) é fracamente expressa e não-essencial (Schlessler *et al.*, 1988). A Pma1p é fundamental na fisiologia desses organismos por gerar a força motriz para a captação de nutrientes como aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos pelo mecanismo simporte e atuar na extrusão de cálcio e sódio pelo mecanismo antiporte (Goffeau e Slayman, 1981; Serrano, 1988). Além disso, a regulação do pH intra- e extracelular por essa bomba protônica tem se mostrado importante na modulação do crescimento polarizado (Cogo *et al.*, 2018; Minc e Chang, 2010) e na longevidade celular de leveduras (Henderson *et al.*, 2014; Deprez *et al.*, 2018).

Essas características tornam a Pma1p um importante alvo de estudo quando leveduras são expostas aos efeitos de campos eletromagnéticos externos.

Minc e Chang (2010) estudaram proteínas transmembranares que respondessem ao campo elétrico e concluíram que a resposta ao campo elétrico é dependente da enzima H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. Estes autores avaliaram um gene mutante da enzima em células de *Schizosaccharomyces pombe* e concluíram que quando crescidas na presença de um campo elétrico as células mutantes apresentaram uma orientação diferente das células sem a modificação genética. Entretanto, estes campos não alteraram a localização da enzima, acredita-se que estes campos podem afetar diretamente o fluxo de prótons e assim modificando o potencial transmembranar em torno da célula.

## **2.6 Conclusões da pesquisa bibliográfica**

Processos assistidos por campos eletromagnéticos tem sido alvo de diversas investigações por parte da comunidade por conta do seu potencial e influência em diversas aplicações. Na literatura estão reportadas diversas evidências de que campos magnéticos aplicados a processos biotecnológicos demonstram impactos positivos sobre micro-organismos, tanto em processos fermentativos e de produção de metabólitos (Santos *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004) como em processos inibitórios (Ji *et al.*, 2009; Iwasaka *et al.*, 2004; Fojt *et al.*, 2004), bem como outras aplicações.

É evidente que a aplicação de campos magnéticos tem apresentado respostas macroscópicas favoráveis na biotecnologia. Entretanto, vale ressaltar a importância de estudar o organismo exposto ao campo, a nível celular, a fim de entender e justificar as possíveis alterações microscópicas e os complexos efeitos sobre as células microbianas.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento de *Saccharomyces cerevisiae* sob a aplicação de campos magnéticos de baixa frequência e intensidade tomando como modelo de estudo a produção de bioetanol visando contribuir para a melhoria deste processo, com o entendimento dos fenômenos que explicam a interação destes campos com a matéria viva através de estudos da atividade de enzimas H<sup>+</sup>-ATPase em nível celular.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar a cinética de fermentação de *S. cerevisiae* X2180 sob a aplicação de campo magnético de baixa frequência e intensidade considerando como variáveis independentes: densidade de fluxo magnético e sistema de reciclo;
- Acompanhar o consumo de substrato, produção de etanol e a formação de subproduto (glicerol), pH do meio e crescimento celular;
- Avaliar o efeito de campo magnético sobre a atividade de H<sup>+</sup>-ATPase através de medidas de densidade de fluxo de prótons através das membranas celulares;
- Realizar experimento controle para fins comparativos;

- Realizar planejamento experimental para avaliar o efeito do campo sobre o rendimento de formação de etanol respeito ao substrato ( $Y_p/s$ ) e da densidade de fluxo de prótons. Neste caso, as variáveis independentes correspondem a: Indução eletromagnética e geometria do sistema de reciclo da suspensão celular através do sistema gerador de campo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* X-2180 utilizada neste estudo foi cordialmente fornecida pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/CBB/ UENF). Todos os reagentes usados como padrão, solventes e meios de cultura foram obtidos da Sigma-Aldrich, Merck e Neogen.

### 4.2 Procedimentos experimentais

#### 4.2.1 Meio de manutenção

A levedura *S. cerevisiae* X-2180 foi mantida em meio sólido constituído de extrato de levedura (10,0 g/L), peptona (20,0 g/L), glicose (20,0 g/L), ágar (20,0 g/L) e água destilada (Ruíz-Gomes *et al.*, 2004). O meio foi vertido em tubo de ensaio e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 30°C durante 72 horas em shaker modelo MA 832 (Marconi, SP-Brasil), e finalmente estocados a 4°C até a sua utilização (David *et al.*, 2012).

#### 4.2.2 Preparo do inóculo

A levedura mantida em meio sólido foi transferida para o meio líquido YPD composto de extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) e glicose (40 g/L) e autoclavado a 121 °C por 15 minutos (Ruíz-Gomes *et al.*, 2004). Para ativação

das células (pré-cultura), o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 1/5 volume de meio (25 mL), por aproximadamente 12 horas em incubadora tipo shaker com agitação a 200 rpm e 30 °C.

Para preparo do inóculo, 50 mL de meio foi vertido em Erlenmeyers de 250mL. Em seguida, foram transferidas assepticamente as células da pré-cultura (20%v/v) e incubadas em shaker modelo MA 832 (Marconi, SP-Brasil) operando a 200 rpm a 30°C até atingir uma contagem de  $10^7$  células/mL (David *et al.*, 2016).

#### 4.2.3 Obtenção da biomassa

Após obtenção do inóculo (item 4.2.2), as células da suspensão celular foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm durante 5 min e lavadas em água destilada esterilizada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa obtida foi armazenada em tubos Falcon de 50 mL a 4°C até a sua utilização.

#### 4.2.4 Planejamento experimental para avaliar a produção de etanol sob campo magnético

Para estudar o efeito do campo magnético na produção de bioetanol, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo de face centrada  $2^2$  com 3 pontos centrais, como apresentado na matriz experimental na Tabela 3. As variáveis independentes estudadas foram:  $X_1$  sistema de reciclo e  $X_2$  densidade de fluxo magnético em biorreator assistidos por campos magnéticos com linhas de campos na direção axial. O efeito das variáveis ( $X_1$  e  $X_2$ ) foi avaliado sobre as variáveis respostas:  $R_1 - Y_{p/s}$  - Rendimento de etanol (%) e  $R_2$  - Densidade Média de fluxo de prótons ( $\mu\text{mol}/\text{mim cm}^2$ ) sensível ao vanadato.

Foram retiradas amostras em tempos pré-determinados para avaliar o consumo de substrato (glicose), produção de metabólicos, crescimento celular, pH, morfologia da célula e a densidade de fluxo de prótons  $\text{H}^+$  através da membrana plasmática.

**Tabela 3.** Matriz experimental do planejamento de face centrada  $2^2$  com 3 pontos centrais.

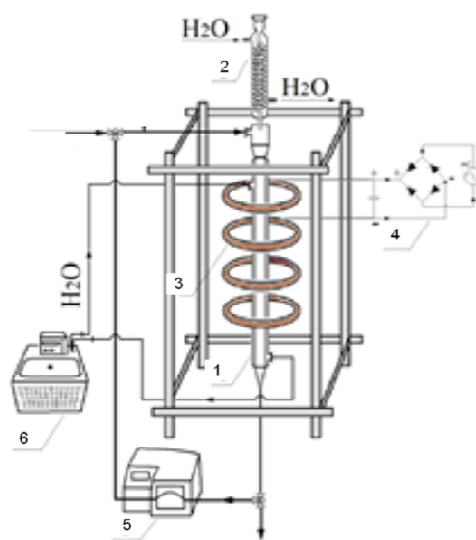
VARIÁVEIS INDEPENDENTES		NÍVEIS		
Variáveis reais	Variáveis codificadas	-1	0	1
Sistema de reciclo	$X_1$	Reciclo em Espiral	Reciclo externo	Reciclo em U
Densidade de fluxo magnético	$X_2$	5 mT	10 mT	15 mT

#### 4.2.5 Fermentação para produção de etanol

Os experimentos para avaliar a produção de etanol foram realizados em meio de cultura contendo os seguintes nutrientes: 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 70 g/L de glicose.

A biomassa (obtida conforme relatado no item 4.2.3) foi pesada assepticamente em balança semi-analítica e inoculada no meio de cultivo. A concentração inicial de células inoculadas na fermentação para produção de etanol foi de 20 g/L em relação ao volume de meio de cultura.

As fermentações foram conduzidas em condições anaeróbicas no biorreator assistido por campo magnético (Figura 6) com sistema de linhas de campo na direção Axial, com reciclo do meio de cultura com fluxo de 102 mL/min utilizando uma bomba peristáltica e temperatura de 30°C controlada por banho ultra termostático. Amostras foram retiradas a cada 2 horas e realizadas as análises descritas no item 4.3. Os experimentos foram conduzidos até consumo total da glicose para fins de comparativos.



**Figura 6.** Sistema de fermentação no Biorreator Assistido por Campos eletromagnéticos – Sistema Axial do Laboratório de Engenharia de Processos - Planta Piloto (LTA/CCTA). Esquema do Biorreator axial sendo: 1- biorreator de vidro; 2- Condensador; 3- bobinas geradoras de campo eletromagnético; 4- variador de tensão; 5- bomba peristáltica para o reciclo do meio de fermentação; 6- banho termostático para controle de temperatura da fermentação.

#### 4.2.6 Experimentos com campo magnético

Previamente, o sistema de geração de campo magnético foi calibrado para determinar as faixas de densidade de fluxo magnético e os parâmetros de operação que poderiam ser utilizados no sistema, a fim de verificar a distribuição do campo no biorreator. As medições de indução eletromagnética em função da posição dentro da câmara de tratamento magnético foram realizadas utilizando gaussímetro digital modelo 5180 (F.W. BELL, USA).

A avaliação foi realizada principalmente no centro das bobinas (localização do biorreator de fermentação e dos sistemas de reciclo), na qual a medição da indução de campo foi medida em relação à altura (0, 15, 30, 45 e 60 cm) e distribuição das bobinas com correntes que variaram de 1 a 7 A.

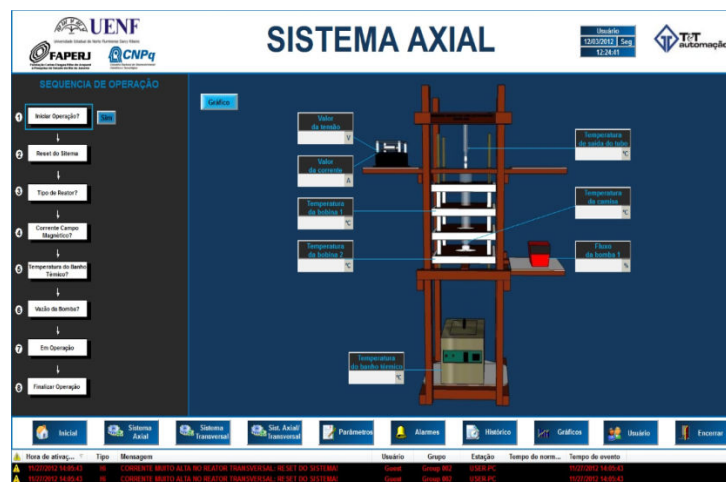
Os experimentos no biorreator de campo magnético foram conduzidos em fermentador protótipo de 300 mL de leite vertical de vidro acoplado a um condensador em espiral. O volume de trabalho foi de 300 mL para biorreator no

centro das bobinas e reciclo externo, 340 mL para reciclo em U e 390 mL para reciclo em espiral. O meio de cultura foi inoculado com biomassa úmida (75% de umidade de modo que a concentração inicial foi de 20 g/L).

Os ensaios com aplicação de campo magnético foram conduzidos com linhas de campo na direção axial utilizando diferentes densidades de fluxo magnético e sistema de reciclo. A suspensão celular foi recirculada com auxílio de uma bomba peristáltica operando a 120 rpm e fluxo de 102 mL/min. Os experimentos controle foram realizados sem aplicação de campos magnéticos nas mesmas condições dos sistemas de cultivo conduzidos sob a exposição ao campo magnético.

Devido ao aquecimento da câmara de tratamento magnético (60°C), foi adotado como estratégia operacional, um esquema tipo on/off, ou seja, exposição com intervalos de tempo de 1h ligado/desligado, durante a fermentação (David, 2012). O monitoramento do aquecimento das bobinas geradoras de campo eletromagnético foi realizado utilizando uma câmera de termovisor com infravermelho modelo E40 FLIR. Para o sistema gerador de campo foi utilizado o Biorreator Assistido por Campo Eletromagnético–Sistema Axial.

O monitoramento das variáveis de processo como temperatura do banho termostático, fluxos de substratos, densidade de fluxo magnético (pela variação da corrente elétrica previamente retificada), aquecimento das bobinas (através do monitoramento da temperatura na sua superfície) foi realizado através de uma plataforma computacional (Figura 7) desenvolvida pelo Laboratório de Engenharia de Processos - Planta Piloto (LTA/CCTA-UENF), que interage com o sistema de automação do biorreator.



**Figura 7.** Estrutura computacional do software de controle da operação dos biorreator assistido por campo eletromagnético – Sistema axial.

### 4.3 Métodos analíticos

#### 4.3.1 Contagem de células em câmara de Neubauer

A contagem de células do inóculo foi determinada pelo método de contagem direta utilizando uma câmara de Neubauer espelhada em um microscópio trilocular Nikon Eclipse E200 acoplado com câmera digital (Moticam 1000).

#### 4.3.2 Análise de crescimento celular por Densidade óptica (DO)

O crescimento celular foi monitorado pela turvação do meio medindo-se a densidade óptica a 600 nm usando um espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific). Quando necessário, as amostras foram diluídas.

#### 4.3.3 pH do meio

O pH do meio e de cada amostra foi determinado através de um pHmetro de bancada (BEL Engineering, Modelo W3B).

#### 4.3.4 Análise do consumo de substrato e produção de metabólitos por HPLC

A análise do consumo de substrato (glicose) e produção de metabólitos (etanol e glicerol) durante a fermentação foi monitorada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), modelo YL9100 HPLC System (Young Lin) equipado



com uma coluna Rezex RCM–Monosaccharide  $\text{Ca}^{+2}$  (8%). Água de Milli-Q foi usada como fase móvel com um fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 60°C. Utilizou-se um detector de Índice de Refração (David *et al.*, 2016). Previamente foi realizada uma curva de calibração com intervalo de linearidade dos compostos analisados entre 1 a 4 g/L para glicose e etanol e de 0,2 a 1,0 g/L para glicerol, os gráficos estão apresentados na Figura A1 (Anexo A).

#### 4.3.5 Determinação da densidade do fluxo de prótons

As amostras retiradas durante o processo fermentação foram conduzidas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos do Centro de Biociências e Biotecnologia (LFBM/CBB-UENF) e o fluxo de  $\text{H}^+$  foi mensurado por meio de micro-eletrodos não-invasivos, usando a técnica “*Scanning Ion-selective Electrode Technique*” (SIET), descrita por Ramos *et al.* (2008). Os micro-eletrodos foram preenchidos até um comprimento de 10-20 mm da ponta com eletrólito (40 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 40 mmol/L KCl, pH 6,0) e, em seguida, com uma coluna de 10-15 mm de coquetel íon-seletivo para  $\text{H}^+$  (Sigma, hydrogen ionophore I, Cocktail B, N°25293). A calibração do aparelho foi realizada em tampão de pH 5,0, 6,0 e 7,0 antes de iniciar todas as leituras.

Alíquotas de 2 mL de amostra (em duplicata) foram coletadas diretamente do biorreator e imediatamente centrifugadas a 5.000 x g por 5 min. O *pellet* de células foi imobilizado em placa de Petri contendo meio sólido (10 g/L de extrato de levedura, 70 g/L de glicose e 20 g/L de ágar). Após 5 a 10 min, os micro-eletrodos foram posicionados próximos às superfícies das células imobilizadas e adicionado cuidadosamente o meio líquido (10 g/L de extrato de levedura, 70 g/L de glicose) a fim de evitar o deslocamento das células.

O fluxo de  $\text{H}^+$  foi imediatamente aferido até atingir a estabilidade quando foi adicionado 1 mM de ortovanadato de sódio (pH 7,2, Sigma-Aldrich). Toda a análise do fluxo de  $\text{H}^+$  foi aferida por um período médio de 10-15 min em uma distância de excursão de 15 mm, num ciclo completo de 1-2 seg. As medidas controle foram realizadas a 1-2 mm de distância das células e subtraídas das medidas próximas às superfícies celulares.

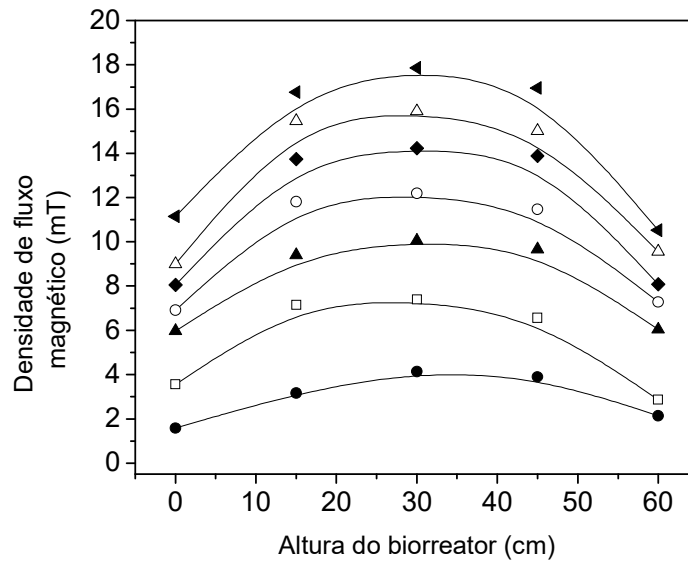
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Biorreator assistido por campo eletromagnético - sistema axial

#### 5.1.1 Resultados da calibração do sistema gerador de campo magnético

A Figura 8 apresenta a distribuição da densidade de fluxo magnético ao longo da direção axial no sistema de geração de campo magnético acoplado ao biorreator. Este gráfico foi construído explorando a intensidade de corrente retificada de 1 a 7 Amperes (A) fornecida ao sistema e medindo a densidade de fluxo magnético em vários pontos. Neste contexto, pode-se verificar que no centro das bobinas do sistema apresentou uma distribuição de campo eletromagnético homogênea. Isto é relevante porque justamente o biorreator é posicionado no centro deste sistema com linhas de campo na direção axial, assim se espera uma incidência uniforme do campo na suspensão celular presente no biorreator.

Além disso, foi verificado que no centro das bobinas, mais precisamente entre 30 e 45 cm (altura do biorreator) os valores de densidade de fluxo magnético são maiores para todas as correntes avaliadas. Sendo assim, os sistemas de reciclo, bem como o biorreator de vidro ficaram dispostos no centro destas bobinas.

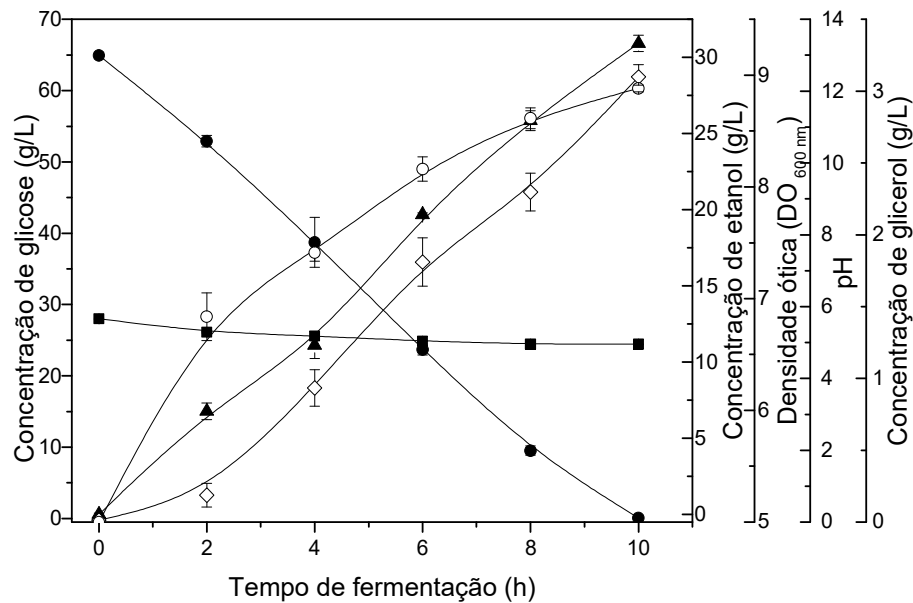


**Figura 8.** Representação gráfica do perfil da densidade de fluxo magnético no centro das bobinas do biorreator assistido por campos eletromagnéticos – sistema axial. Símbolos: ● 1 A; □ 2 A; ▲ 3 A; ○ 4 A; ◆ 5 A; △ 6 A; ▶ 7 A.

## 5.2 Cinética de fermentação alcoólica

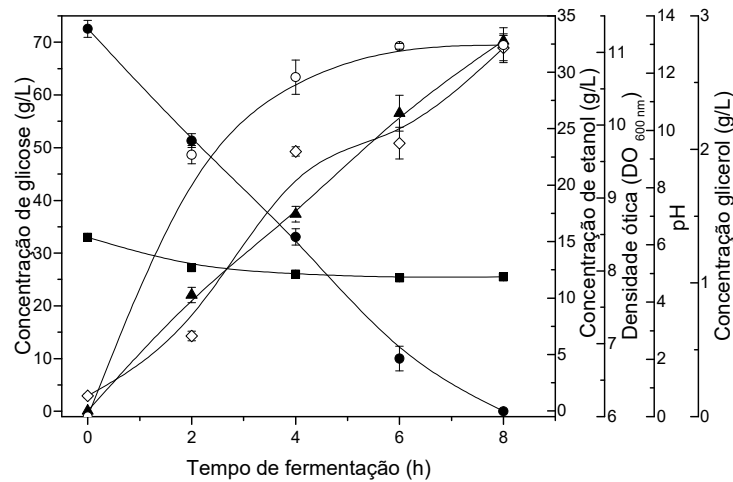
Os resultados das fermentações do controle e sob campo magnético estão apresentados na Figura 9 e nas Figuras 10 a 20, respectivamente, os quais correspondem a cada experimento da matriz experimental. O experimento controle foi realizado no mesmo sistema experimental acoplado ao gerador de campo magnético, porém em ausência de campo magnético para fins comparativos com aqueles assistidos com campo magnético. Desta forma, será possível verificar os efeitos biológicos do campo sobre o desempenho deste processo.

Como podem ser observadas na Figura 9, as curvas de consumo de substrato, formação de produto, pH e densidade óptica mostraram um perfil típico da cinética de fermentação anaeróbica. Assim, por exemplo, a concentração de etanol atingiu 30,92 g/L, correspondendo a um rendimento de 93,18% em relação ao rendimento teórico (51.11%). A fermentação foi conduzida até o consumo total do substrato (glicose), totalizando 10 horas de fermentação.

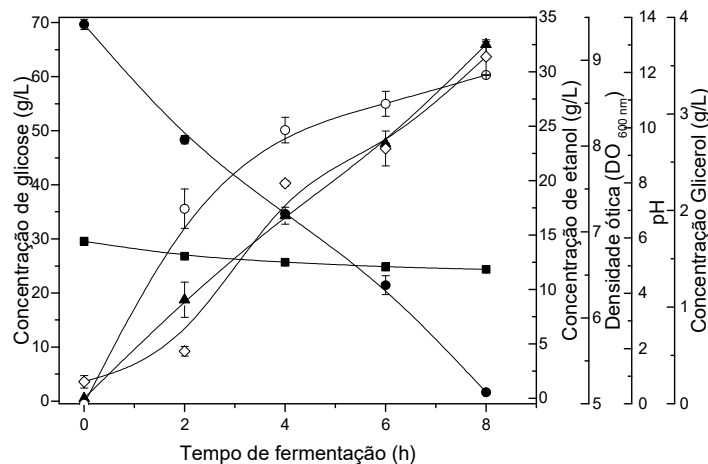


**Figura 9.** Cinética da fermentação de *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C sem aplicação de campo magnético (CONTROLE – Experimento nº 0). Biorreator no centro das bobinas com reciclo externo (102 mL/mim). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica ( $DO_{600\text{ nm}}$ ); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

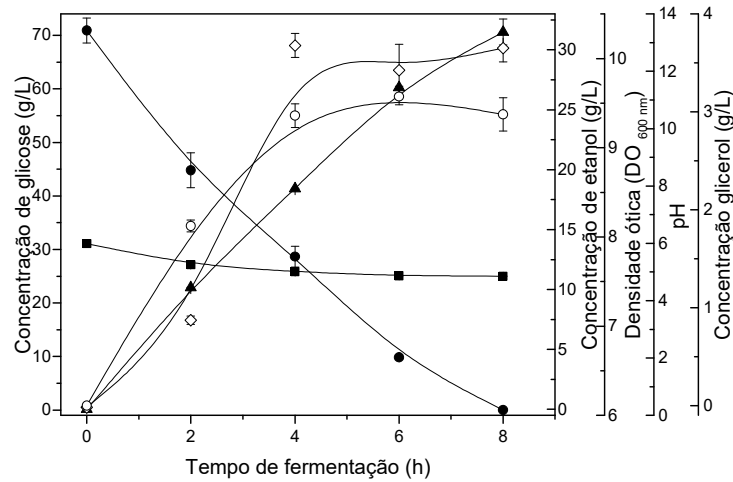
No caso das fermentações assistidas por campo magnético se pode verificar que a exposição ao magnético demonstrou-se eficaz, uma vez que as fermentações (Figuras 10 a 20) atingiram seu estágio final em menos tempo, isto é, com 8 horas de fermentação, 2 horas a menos quando comparadas com a experiência de controle. Perez *et al.*, (2007) haviam reportado resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, pois observaram uma diminuição no tempo de fermentação de 2 h para experimentos expostos a campos magnéticos de 20 mT respeito ao seu controle. Embora em sistema de fermentação, com sistema de geração de campo com características diferentes.



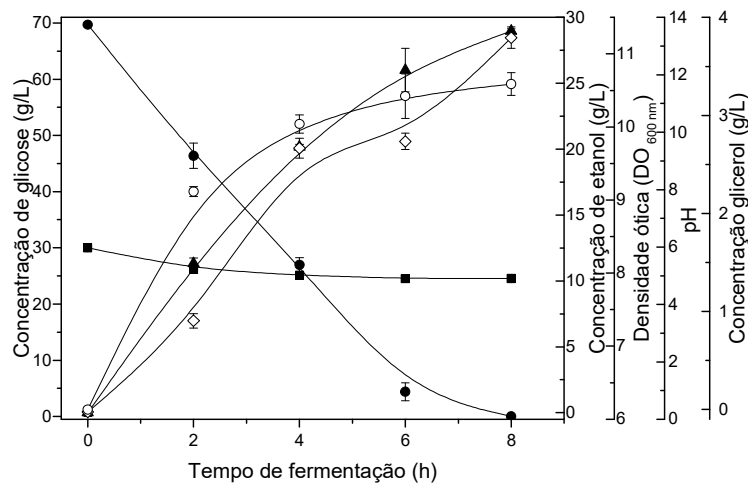
**Figura 10.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em espiral (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 5 mT. (Experimento. nº1). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



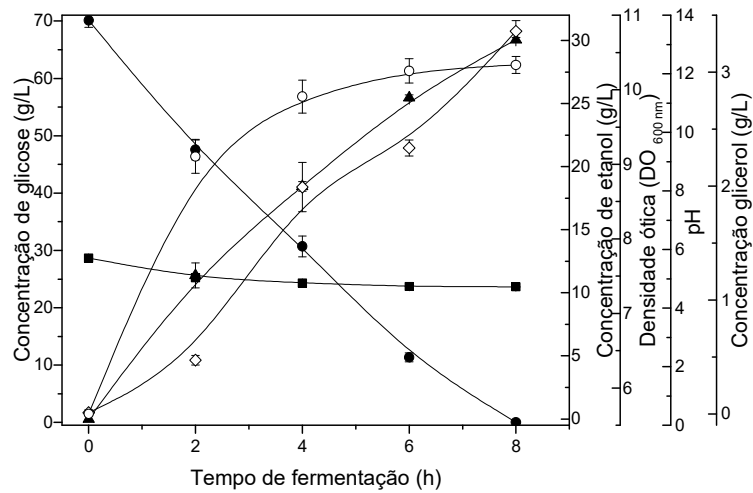
**Figura 11.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em U (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 5 mT. (Experimento nº2). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



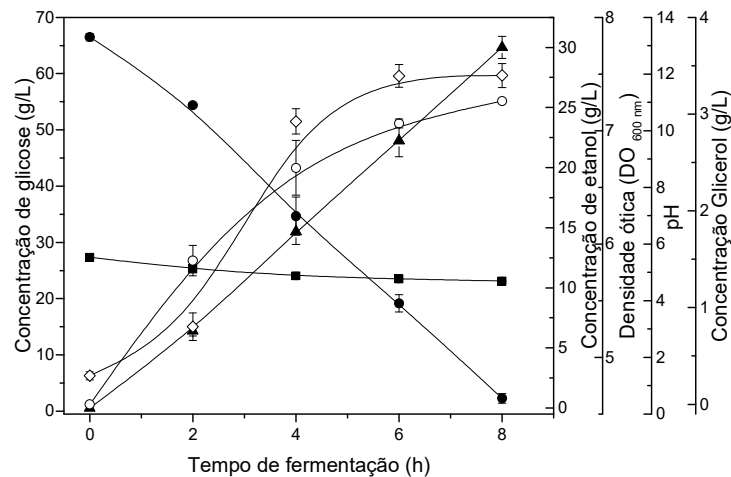
**Figura 12.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em espiral (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 15 mT. (Experimento nº3). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



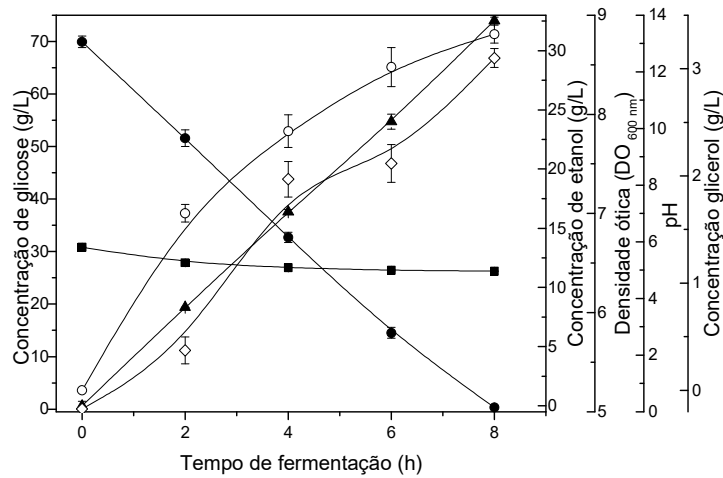
**Figura 13.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em U (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 15 mT. (Experimento nº4). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



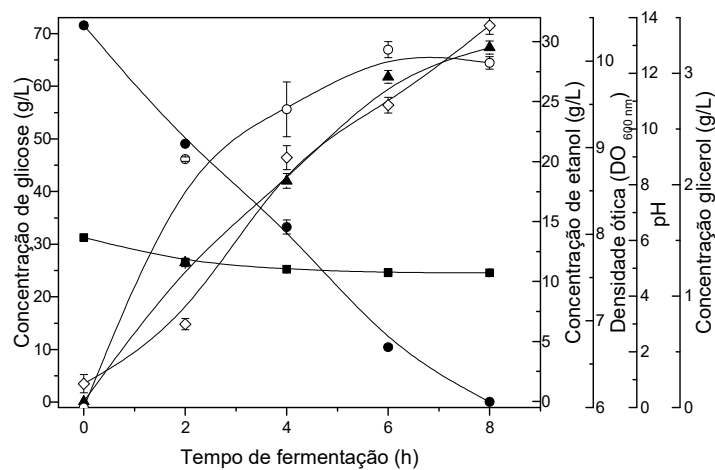
**Figura 14.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em espiral (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 10 mT. (Experimento n°5). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



**Figura 15.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial usando Sistema de reciclo em U (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 10 mT. (Experimento n°6). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

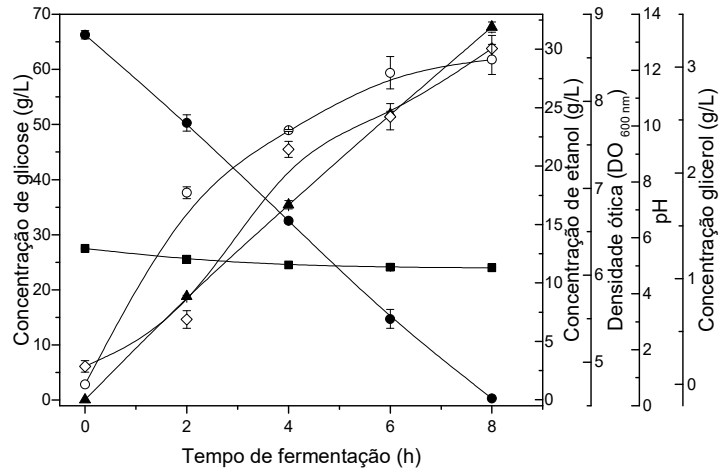


**Figura 16.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial com Reator no centro das bobinas e reciclo externo (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento. nº7). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

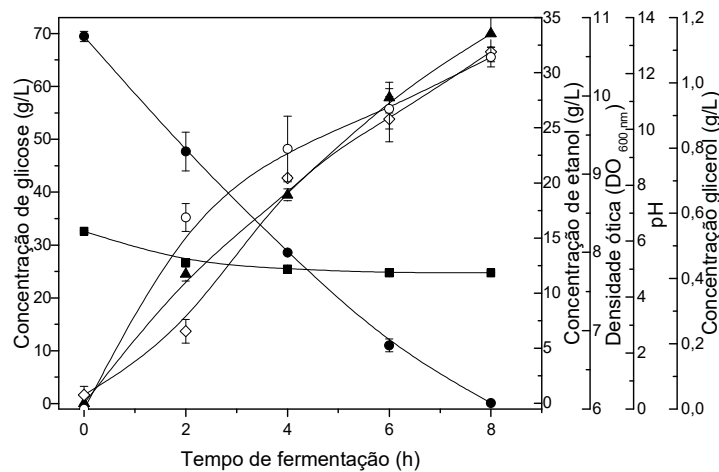


**Figura 17.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial com Reator no centro das bobinas e reciclo externo (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento nº8). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

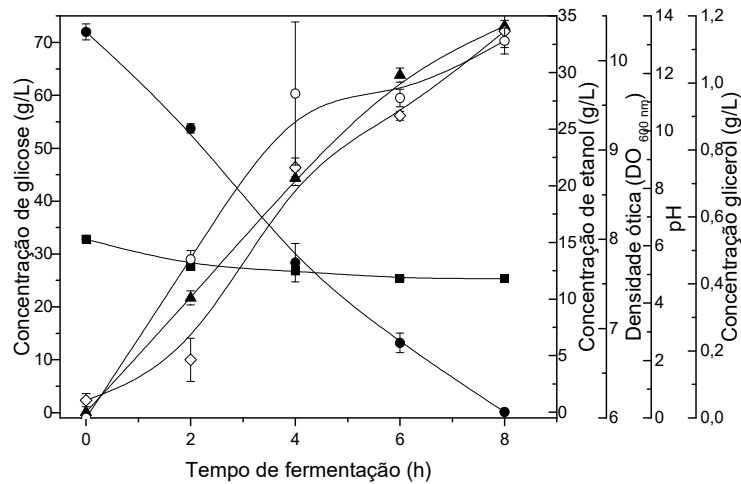




**Figura 18.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial com Reator no centro das bobinas e reciclo externo (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº9). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.



**Figura 19.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial com Reator no centro das bobinas e reciclo externo (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº10). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

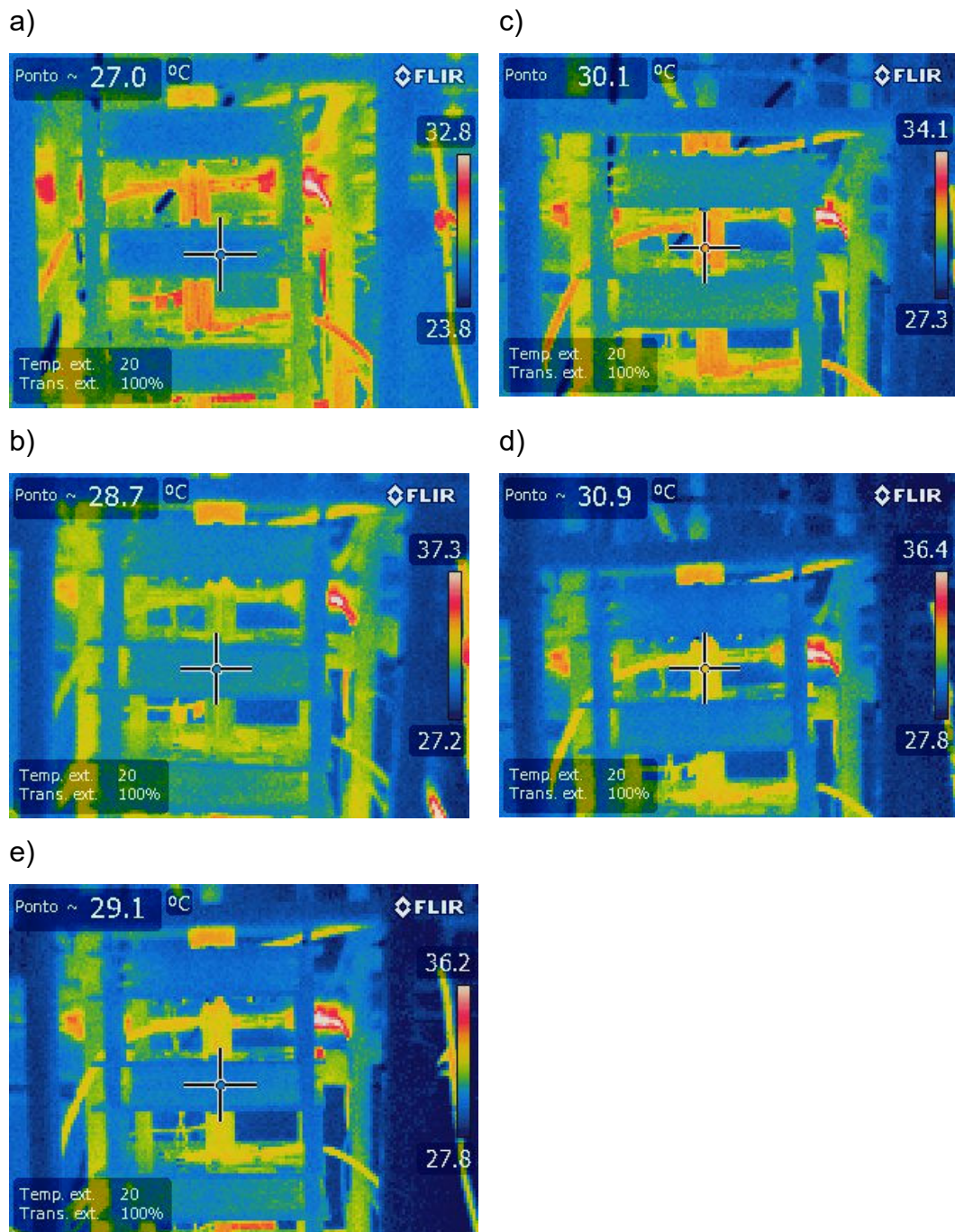


**Figura 20.** Cinética da fermentação da *S. cerevisiae* X2180 (20 g/L) na produção de etanol a 30°C em biorreator assistido por campo magnético – axial com Reator no centro das bobinas e reciclo externo (102 mL/min) e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº11). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica ( $DO_{600\text{ nm}}$ ); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

### 5.2.1 Análise do monitoramento da temperatura das bobinas

Com o aumento da intensidade da corrente também há um aumento na temperatura das bobinas, dificultando a dissipação do calor no sistema gerador de campo (Román, 2015), o que prejudica o processo de fermentação, uma vez que esta ocorre a 30°C. Portanto, além de adotar um sistema de campo ON/OFF (1h ligado/1h desligado) durante as fermentações para produção de etanol também monitorou-se a temperatura das bobinas e do meio de fermentação utilizando uma câmera de termovisor infravermelho.

Nas Figuras de 21 a 32 estão apresentadas fotografias dos sistemas de fermentação (reciclo em espiral, biorreator e reciclo em U) nas faixas de densidade de fluxo magnético estudadas, onde as cores representam a faixa de temperatura do sistema a cada 2h de experimento até o final da fermentação. Durante os experimentos controle a temperatura também foi monitorada (Figura 21) para comparação com os experimentos realizados sob campo magnético.



**Figura 21.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº0: Biorreator com reciclo externo sem aplicação de campo magnético (Controle), nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h, d) 8h e e) 10h.

Embora tenha sido utilizado banho ultratermostático para manutenção da temperatura ( $30^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) de fermentação, durante os experimentos para produção de etanol, o sistema foi fotografado a cada duas horas para verificar se o aquecimento das bobinas afetava a temperatura do meio de fermentação.

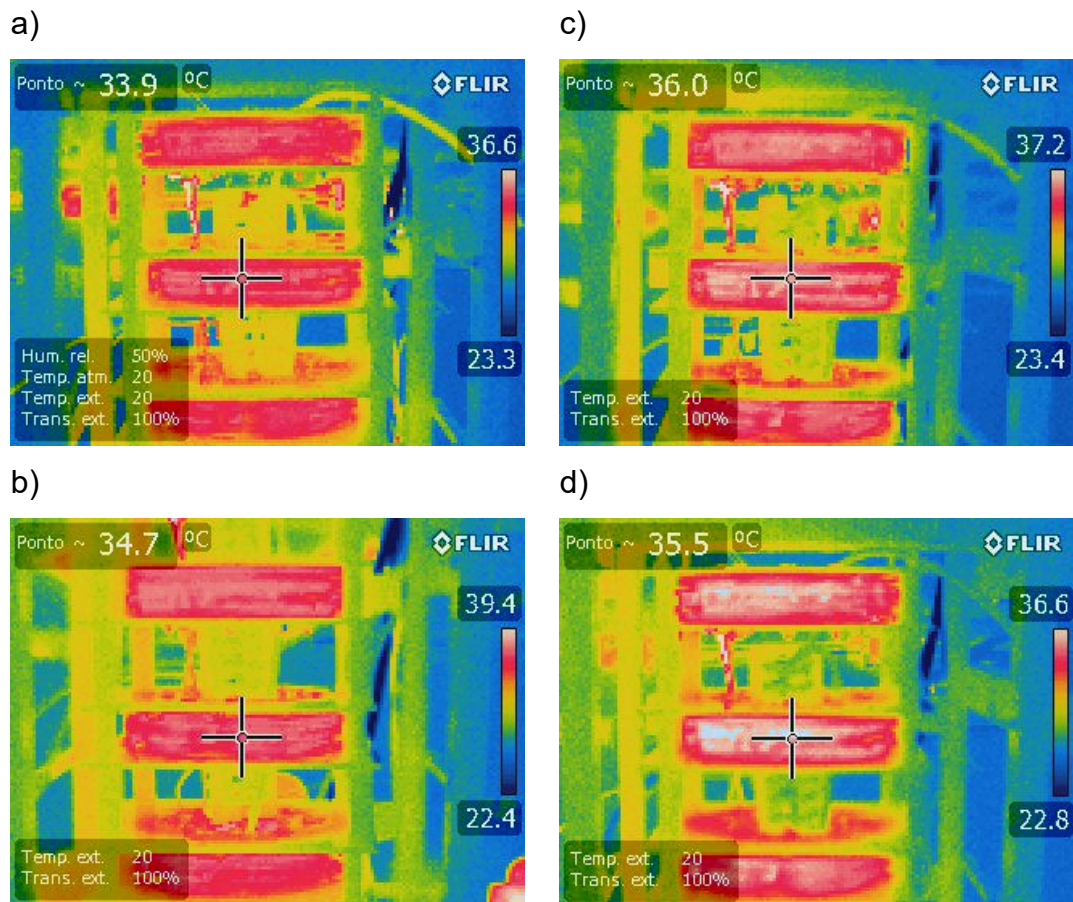
Como podemos observar, no experimento controle (Figura 21), sem aplicação de campo não houve aumento da temperatura das bobinas, uma vez que não havia corrente induzindo um campo magnético. As cores das bobinas indicavam temperaturas próximas a  $28^{\circ}\text{C}$  e no máximo  $30,9^{\circ}$  (Figura 21c) para o biorreator ao final do experimento (10 h de fermentação).

Já os experimentos com aplicação de campo magnético apresentaram comportamentos diferentes quando comparados ao controle, conforme previsto. Nas Figuras 22, 23 e 28, referentes aos experimentos 1, 2 e 7, os quais foram expostos a campos magnéticos com densidade de fluxo magnético de 5 mT (após 1h com campo ligado), as bobinas alcançaram temperaturas até aproximadamente  $36^{\circ}\text{C}$ .

Nos experimentos com densidade de fluxo magnético de 15 mT (Figuras 24, 25 e 29), referentes às fermentações 3, 4 e 8, podemos observar que as temperaturas das bobinas variaram de  $52,3^{\circ}\text{C}$  (Figura 29a) nas primeiras horas de fermentação, acompanhado de um aumento gradativo da mesma ao longo do experimento, até temperaturas de  $58,9^{\circ}\text{C}$  (Figura 29d) nas horas finais do experimento.

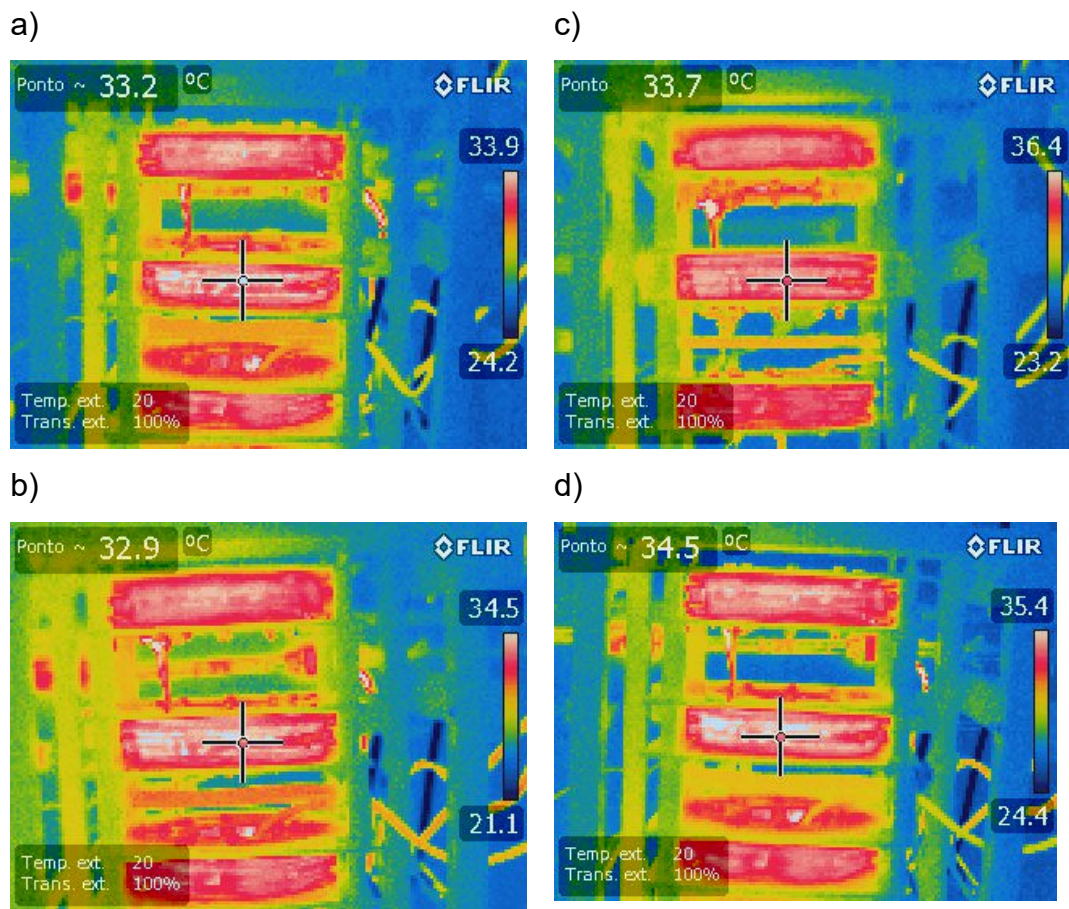
Já as Figuras 26, 27, 30, 31 e 32 (exp. nº 5, 6, 9, 10 e 11) apresentam as fotografias das bobinas nos experimentos com densidade de fluxo magnético de 10 mT. Observa-se que as temperaturas variaram de  $38,8^{\circ}\text{C}$  (Figura 30a) a  $43,2^{\circ}\text{C}$  (Figura 27a) nas horas iniciais até temperaturas finais de  $47,7^{\circ}\text{C}$  (Figura 27c).

Mesmo nas condições mais altas de corrente e densidade de fluxo magnético estabelecidas no planejamento experimental não houve influência da temperatura no processo de fermentação. Como podemos observar nas imagens, fica comprovado que o meio de fermentação não sofreu influência da radiação térmica proveniente do aquecimento das bobinas, mantendo a temperatura de fermentação.

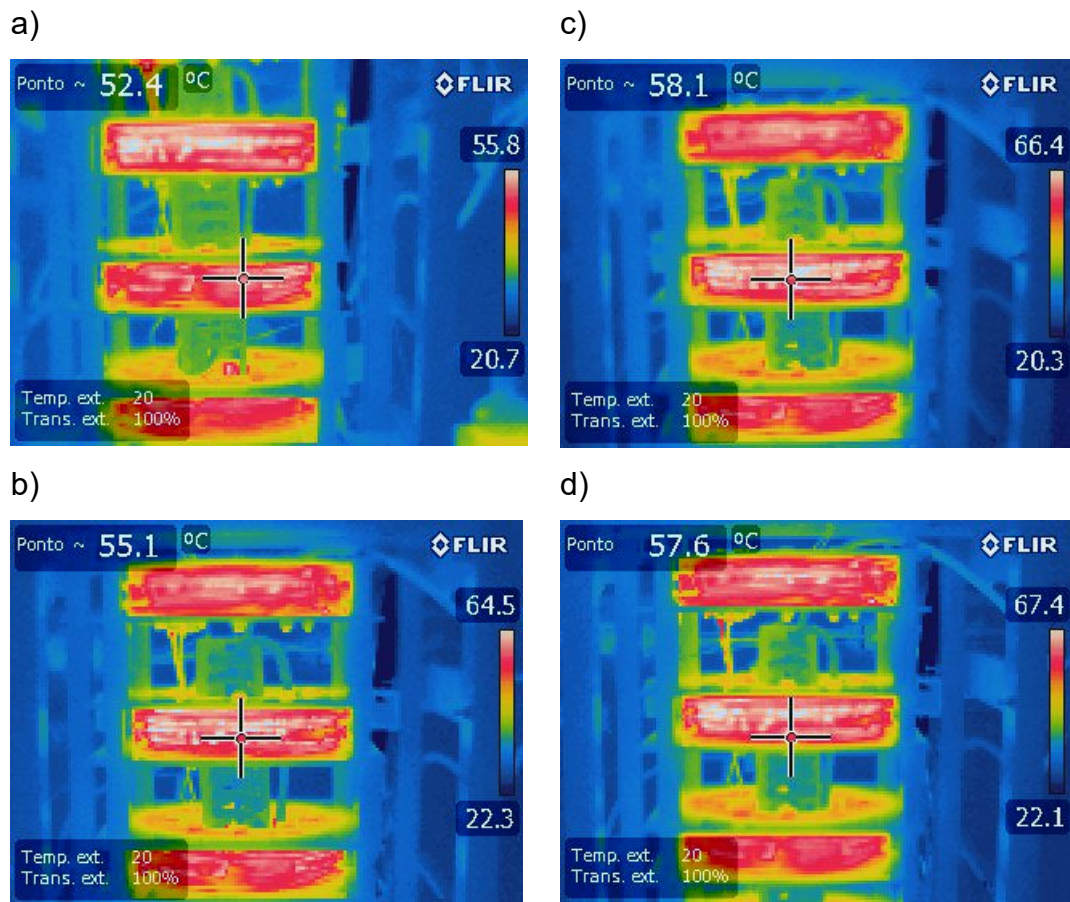


**Figura 22.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº1: biorreator com reciclo em espiral após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 5 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

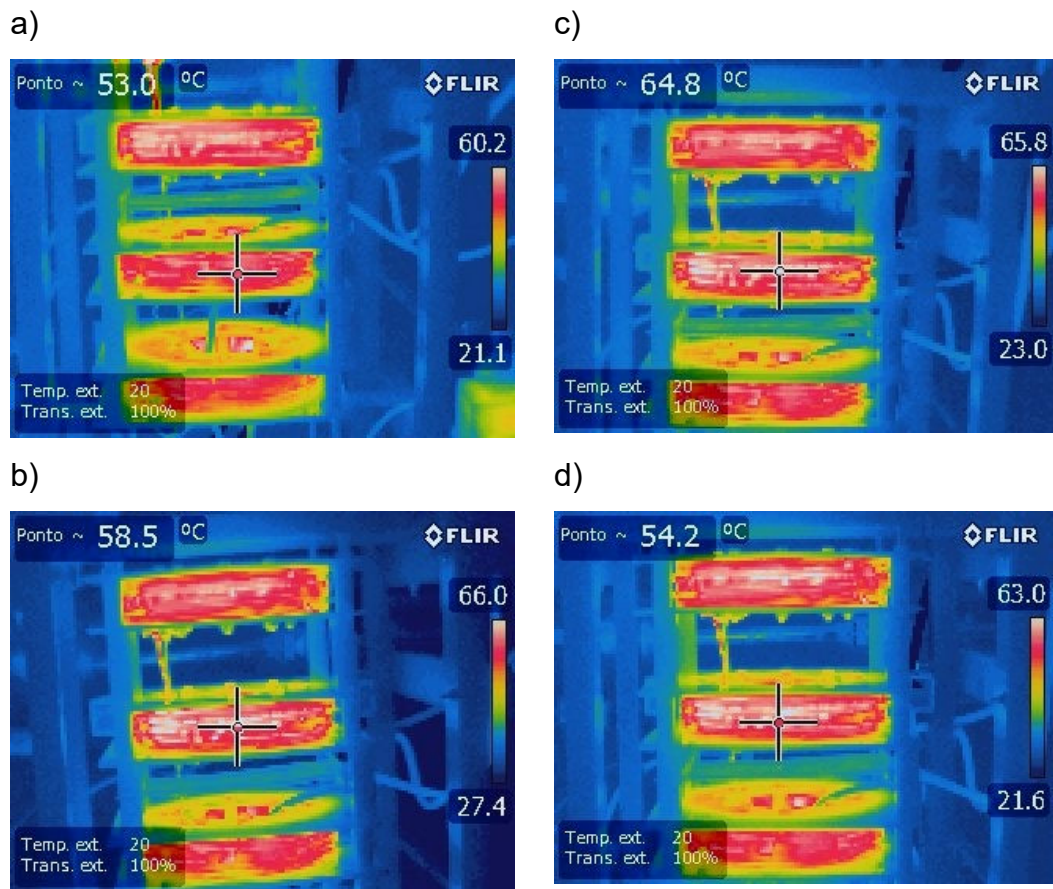




**Figura 23.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº2: biorreator com reciclo em U após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 5 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

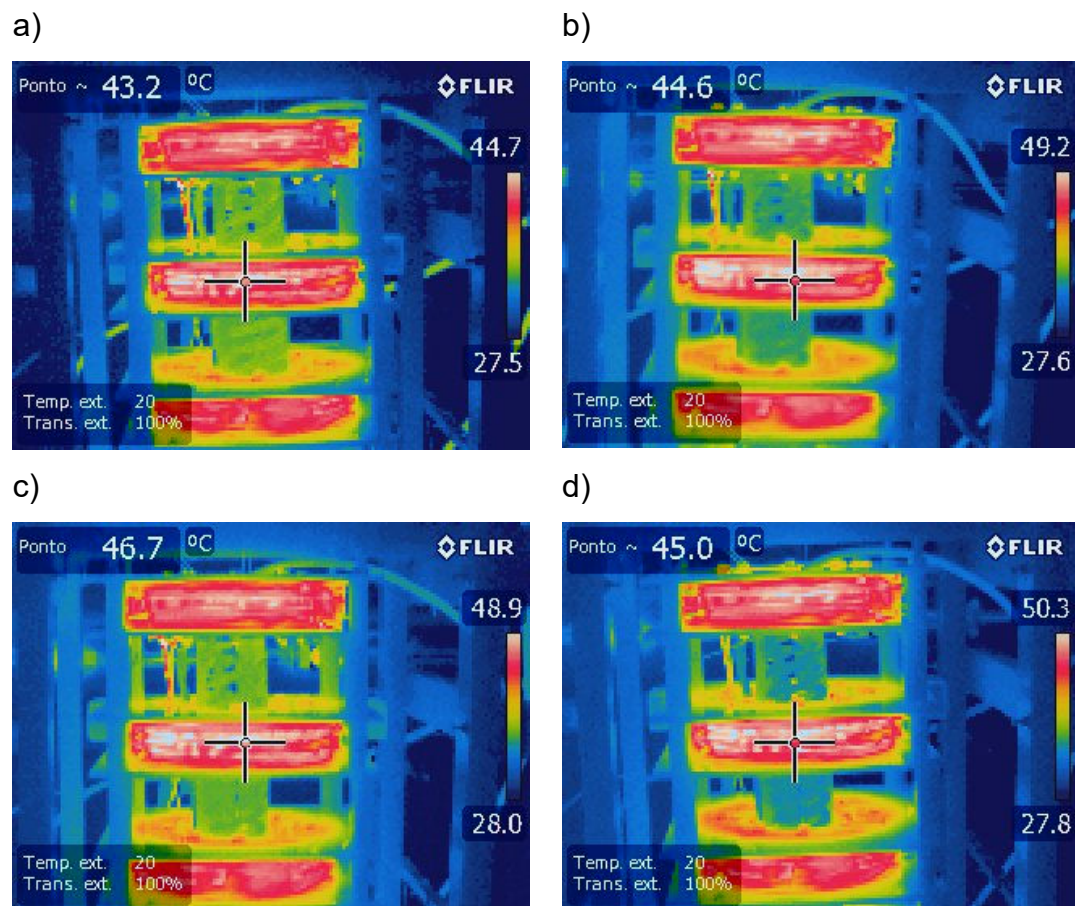


**Figura 24.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº3: biorreator com reciclo em espiral após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 15 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

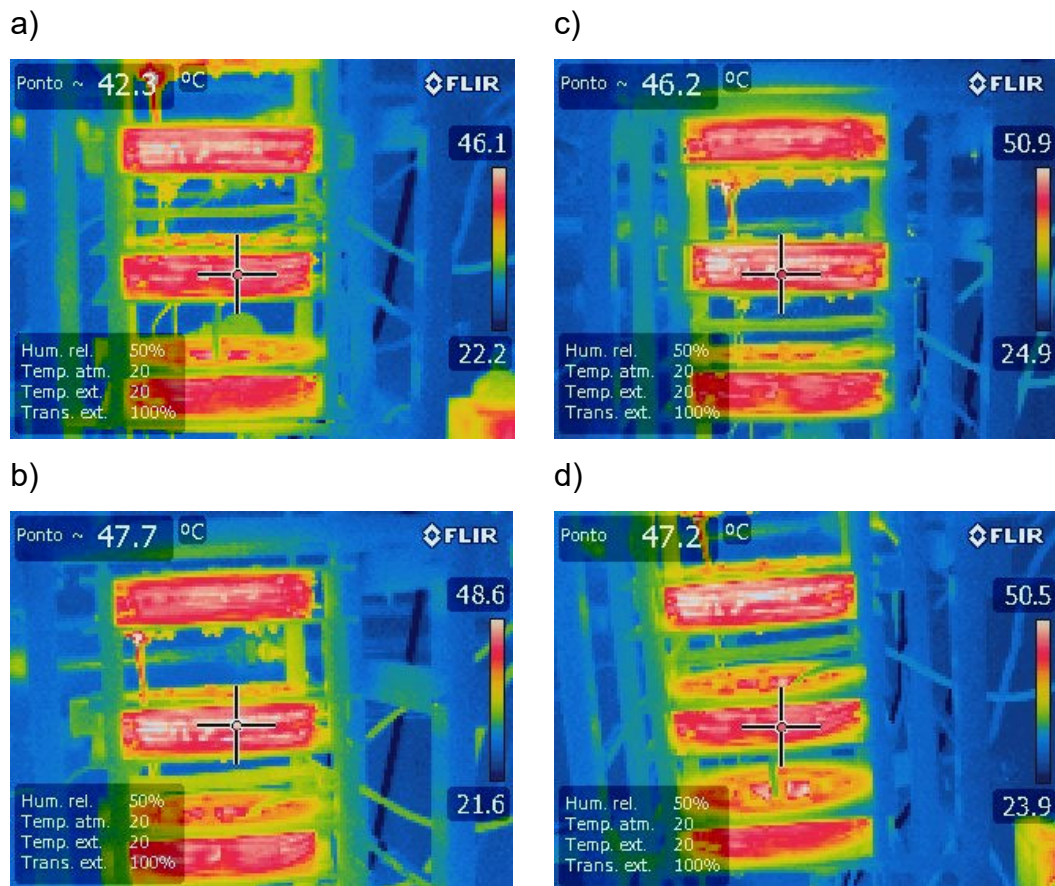


**Figura 25.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº4: biorreator com reciclo em U após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 15 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

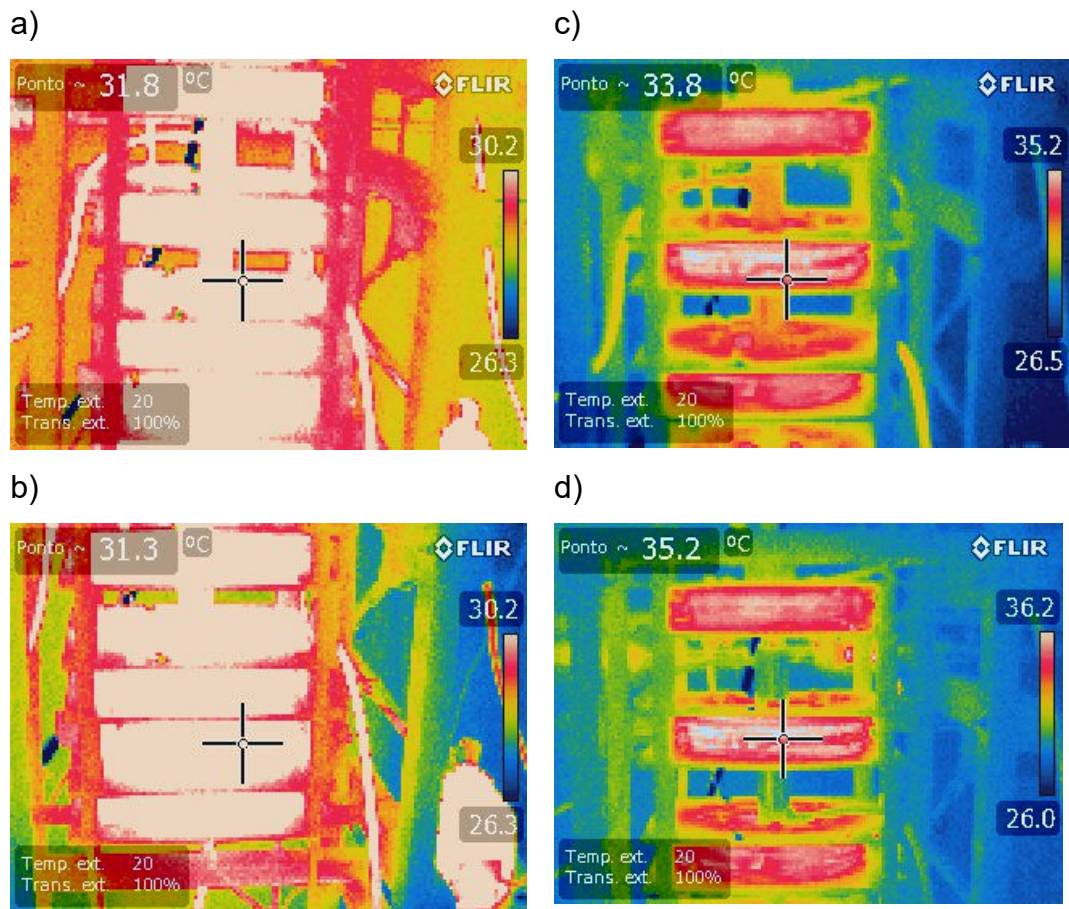




**Figura 26.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº5: biorreator com reciclo em Espiral após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 10 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

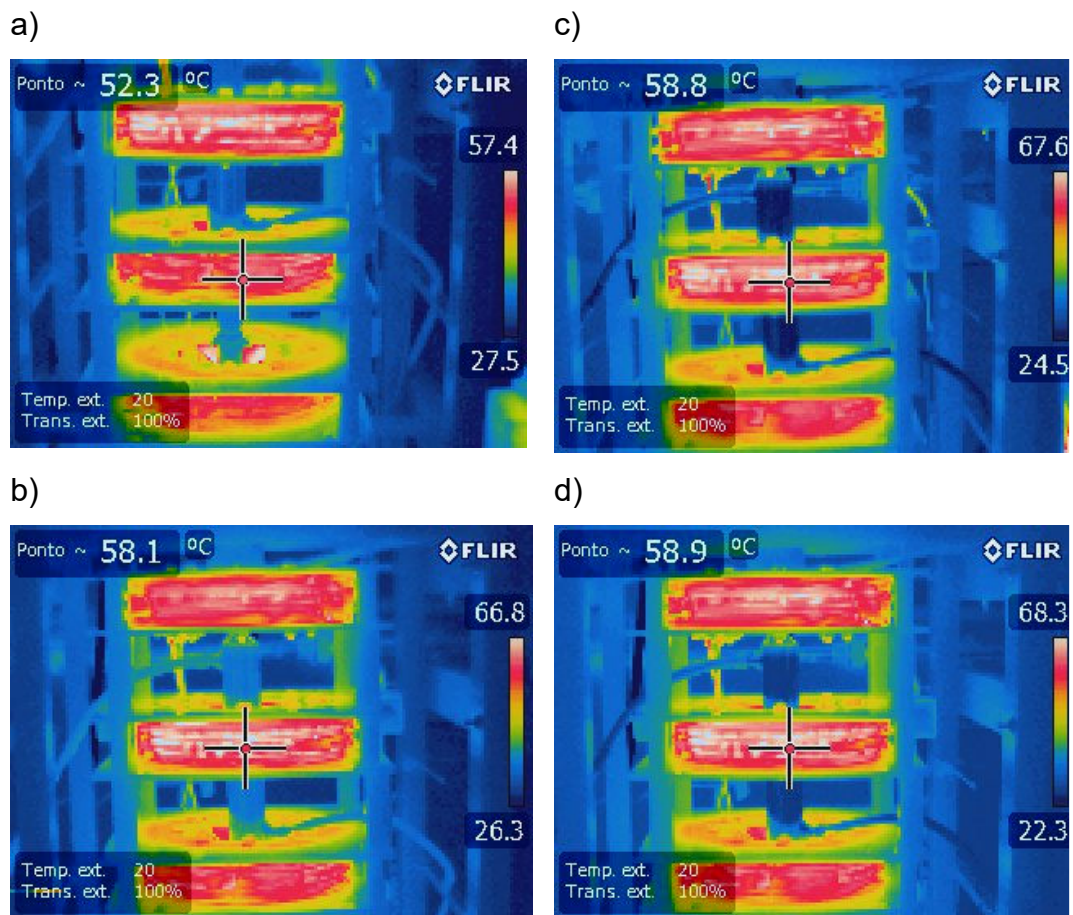


**Figura 27.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº6: biorreator com reciclo em U após intervalo de 1h do campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 10 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

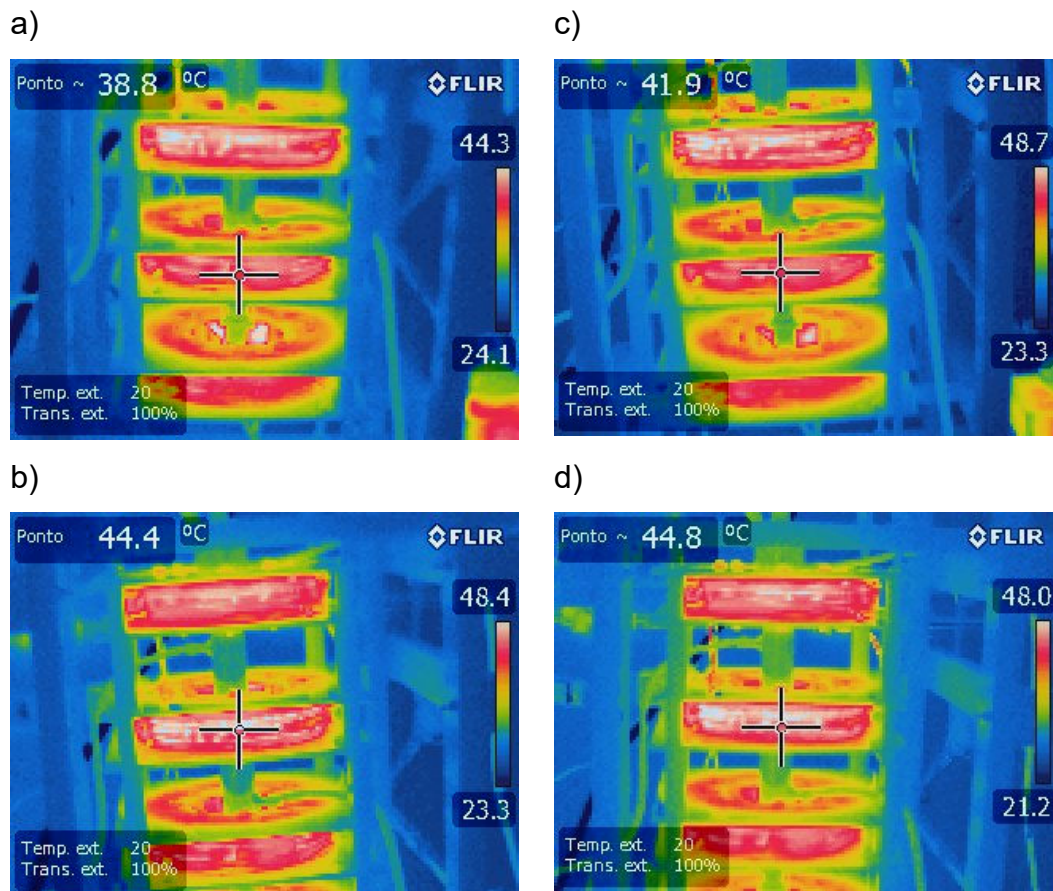


**Figura 28.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº7: biorreator com reciclo externo após intervalo de 1h de campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 5 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

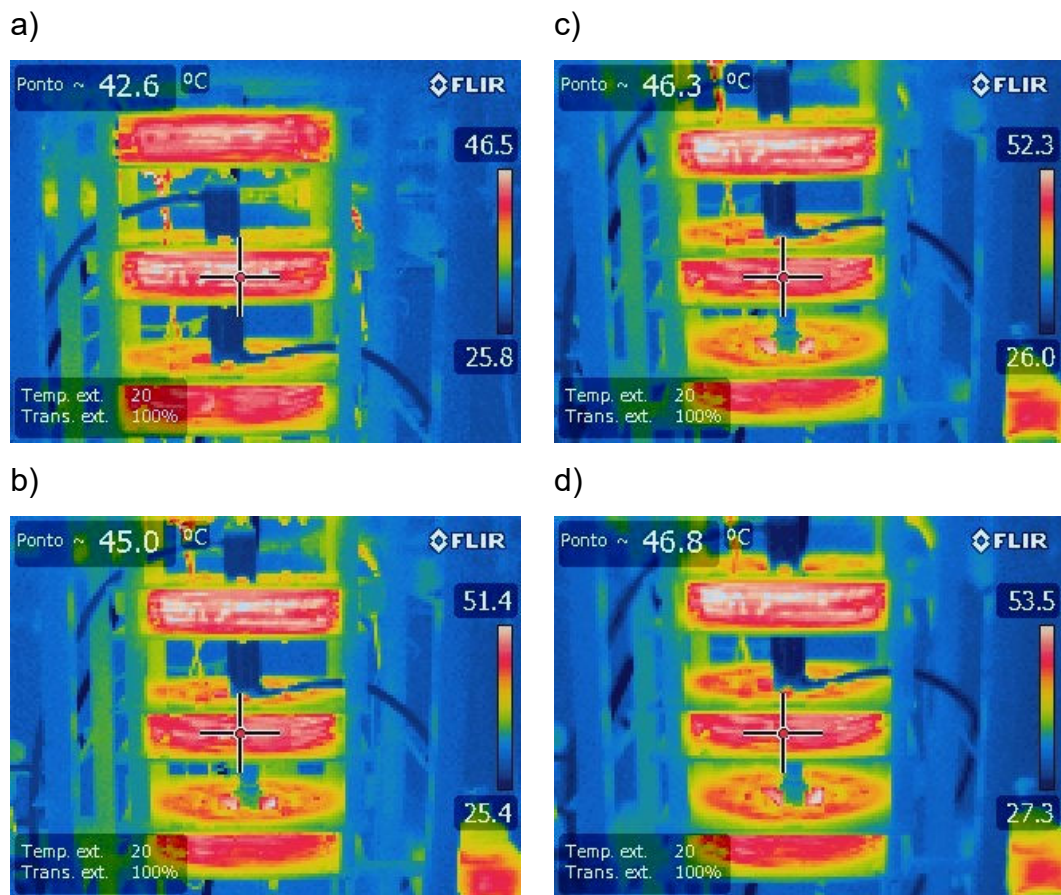




**Figura 29.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº8: biorreator com reciclo externo após intervalo de 1h de campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 15 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

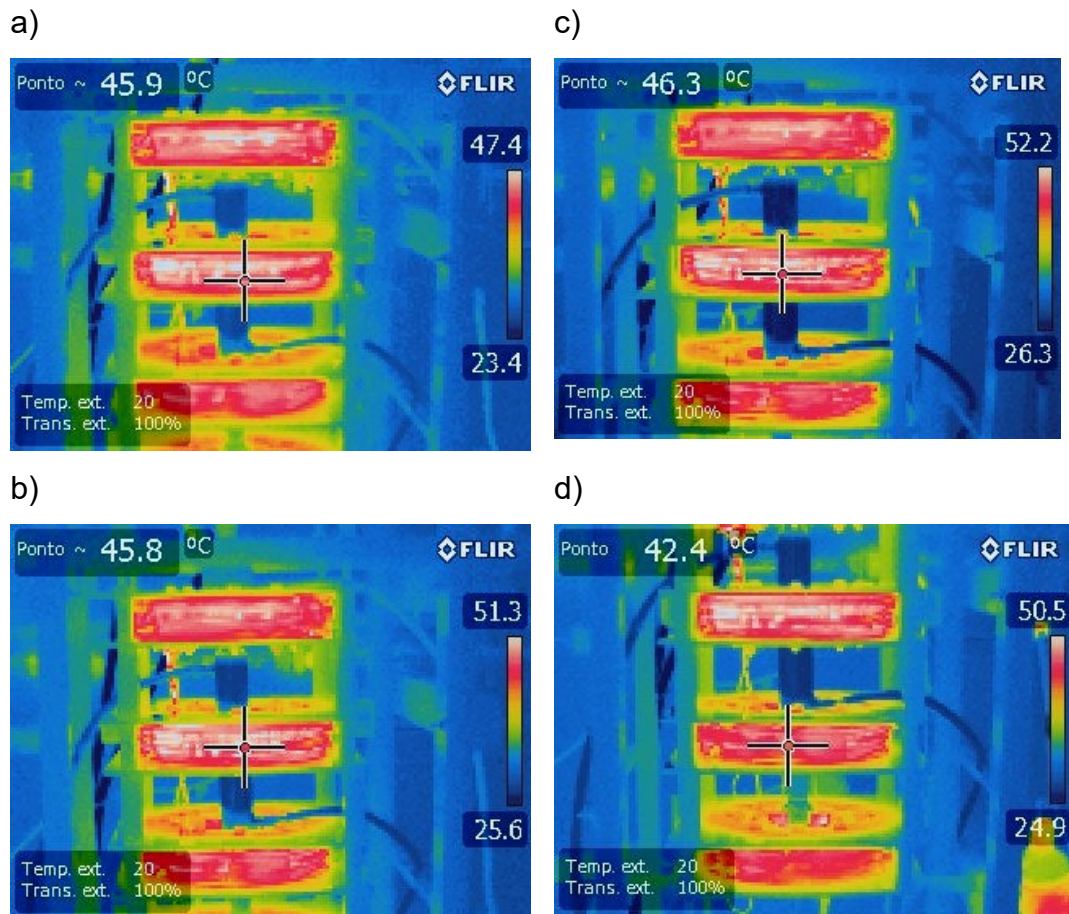


**Figura 30.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº9: biorreator com reciclo externo após intervalo de 1h de campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 10 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.



**Figura 31.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº10: biorreator com reciclo externo após intervalo de 1h de campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 10 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.



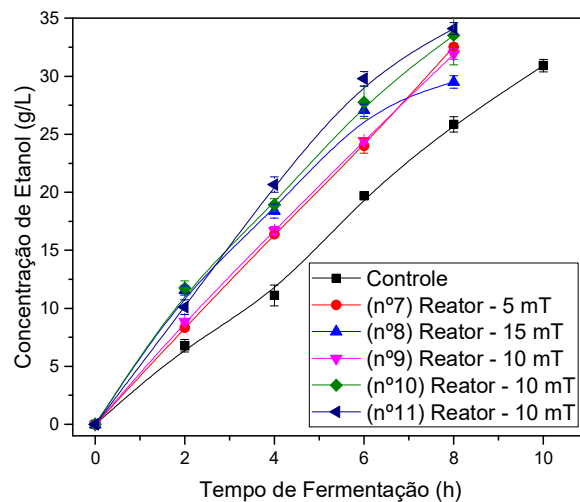


**Figura 32.** Monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR. Experimento nº11: biorreator com reciclo externo após intervalo de 1h de campo magnético ligado (esquema on/off) com densidade de fluxo magnético de 10 mT, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

### 5.2.2 Análise da produção de etanol

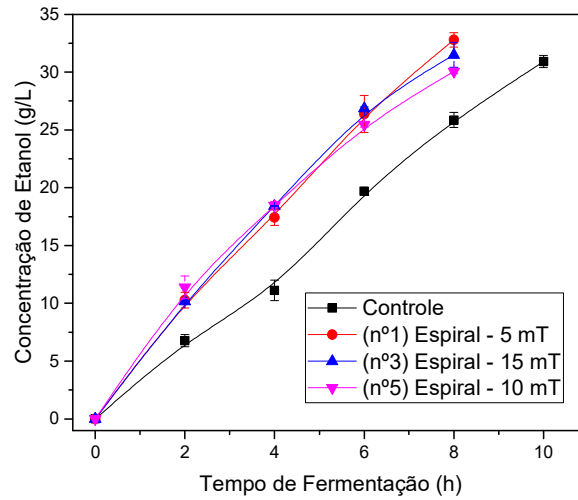
Nas Figuras 33, 34 e 35 estão apresentados os perfis cinéticos do etanol formado no decorrer da fermentação nos diferentes sistemas de reciclo comparados ao controle. Os resultados mostram que a máxima produção de etanol ocorreu com 8 horas nas fermentações assistidas por campo magnético, em contrapartida o experimento controle a máxima produção de etanol ocorreu 10 horas.

Podemos observar que além da redução do tempo de fermentação, com 8 horas de fermentação o experimento sem aplicação de campo magnético, em termos de concentração e rendimento de etanol, de 25,85 g/L e 77,91%, respectivamente, os valores se apresentam mais baixos que os experimentos com campo em todas as condições estudadas.

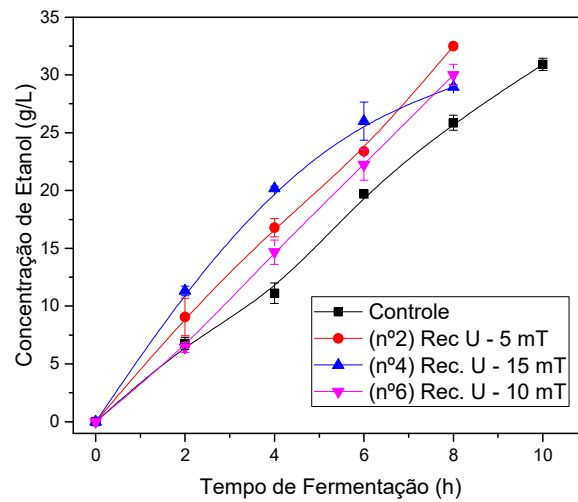


**Figura 33.** Gráfico cinético de produção de etanol durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo externo.





**Figura 34.** Gráfico cinético de produção de etanol durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo em espiral.



**Figura 35.** Gráfico cinético de produção de etanol durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo em U.

A Figura 36 apresenta o perfil cinético da produtividade volumétrica do etanol ( $Q_p$ ) no decorrer das fermentações para o experimento controle denominado nº 0 e para os experimentos com aplicação de campo (nº 1 ao 11).

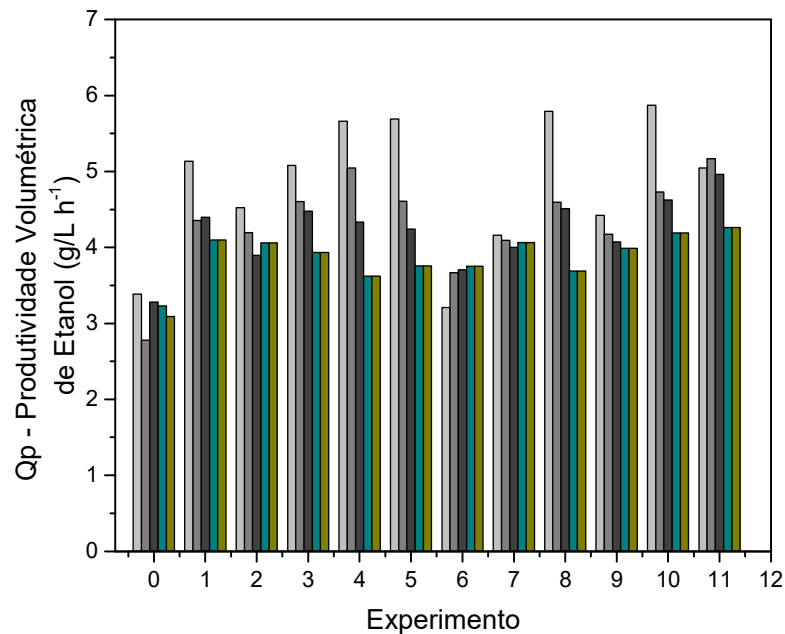
Os experimentos onde o biorreator foi colocado no centro das bobinas com densidade de fluxo magnético de 10 mT e reciclo externo (nº9, 10 e 11) apresentaram valores médios de produtividade volumétrica de etanol de aproximadamente 4,15 g/L h. Além disso, observa-se que os experimentos 1, 2 e 7 com densidade de fluxo magnético de 5 mT nos diferentes sistemas de reciclo (espiral, em U e biorreator) apresentaram valores de 4,10 g/L h, 4,06 g/L h e 4,07 g/L h, respectivamente. Já os experimentos com densidade de fluxo magnético de 15 mT (nº 3, 4 e 8) apresentaram valores de  $Q_p$  inferiores a 3,94 g/L h, 3,62 g/L h, e 3,69 g/L h respectivamente, quando comparados aos experimentos já mencionados neste tópico.

Vale ressaltar, que os sistemas de reciclo com geometria em espiral e em U aparentemente apresentaram os menores valores de produtividade volumétrica de etanol quando comparados aos experimentos com biorreator no centro das bobinas com reciclo externo. Entretanto, todos os experimentos com aplicação de campo apresentaram  $Q_p$  maior que o experimento controle 3,09 g/L h. Segundo Alvarez *et al.* (2006), a implementação de sistema de reciclo externo das suspensões celulares resulta em estresse para as células e de fato afeta a produtividade volumétrica de etanol. Entretanto os mesmos autores mostraram que quando aplicado um campo magnético externo este estresse é atenuado podendo superar a produtividade comparativamente com o controle.

Foi observado (Figura 36) que nas duas primeiras horas da fermentação os valores de  $Q_p$  foram maiores que os demais tempos do experimento. Entretanto no decorrer do tempo, estes valores diminuíram gradativamente ao longo do tempo de fermentação. Este comportamento pode ser explicado, pois no início há uma maior disponibilidade de nutrientes e uma menor competição por parte das células, resultando em valores maiores de etanol produzido. (Lima *et al.*, 2001).

E com decorrer do tempo estes nutrientes tenderam a diminuir, uma vez que as células utilizam estes nutrientes para suas funções biológicas e fisiológicas. Além disso, segundo Lima *et al.*, (2001) o aumento na concentração

de etanol pode provocar a inibição da fermentação, o que explica uma redução no  $Q_p$  no final do experimento.



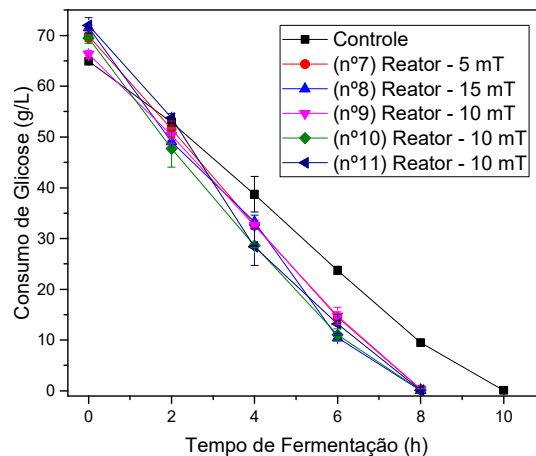
**Figura 36.** Representação gráfica da produtividade volumétrica de etanol  $Q_p$  durante os experimentos de fermentação. Experimento: nº 0 - Biorreator sem aplicação de campo (CONTROLE), nº 1 – Reciclo em espiral e campo de 5 mT; nº 2 - Reciclo em U e campo de 5 mT; nº 3 - Reciclo em espiral e campo de 15 mT; nº 4 - Reciclo em U e campo de 15 mT; nº 5 - Reciclo em espiral e campo de 10 mT; nº 6 - Reciclo em U e campos de 10 mT; nº 7 - Biorreator e campo de 5 mT; nº 8 - Biorreator e campo de 15 mT e nº 9, 10 e 11 - Biorreator e campo de 10 mT. Legenda: (■) 2h, (■) 4h, (■) 6h, (■) 8h e (■) para o tempo final.

### 5.2.3 Análise do consumo de glicose

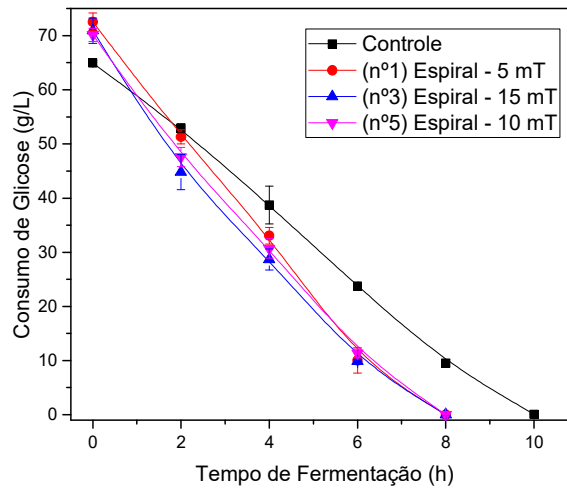
Nas Figuras 37, 38 e 39 estão apresentados os perfis cinéticos do consumo de glicose no decorrer da fermentação nos diferentes sistemas de reciclo. Os resultados mostram que o consumo total da glicose presente no meio nas fermentações assistidas por campo magnético se deu em 8 horas e 10 horas para o controle.

Para todos os experimentos com aplicação de campo magnético os valores de consumo volumétrico de glicose ( $Q_s$ ) foram superiores a 8,03 g/L h, poré, o experimento controle (nº0) apresentou um  $Q_s$  de 6,49 g/L h. Os experimentos com reciclo em espiral apresentaram um maior consumo volumétrico de açúcar de 39,77% para o experimento com indução de 5 mT (nº1), 35,12% para indução de 10 mT (nº5) e 36,68 % indução de 15 mT (nº3) maiores que o experimento sem aplicação de campo.

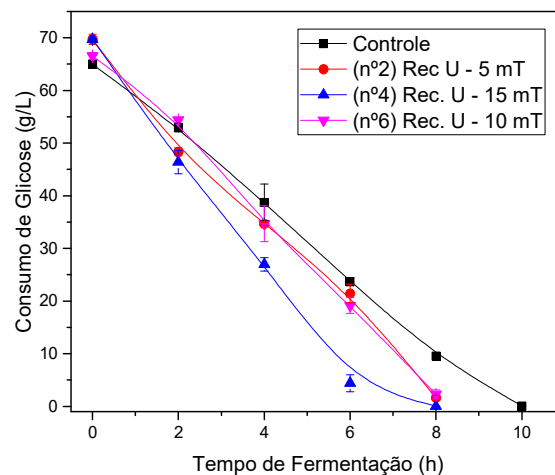
De acordo com Perez *et al.* (2007) a presença do campo pode aumentar a permeabilidade da membrana e, portanto o transporte de substrato no interior da célula também aumenta. Segundo Lopes *et al.* (2010) outro possível efeito é de que o campo influencia de alguma forma as enzimas, tornando sua conformação mais favorável para reagir com o substrato e com outros compostos.



**Figura 37.** Gráfico cinético do consumo de glicose durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo externo.



**Figura 38.** Gráfico cinético do consumo de glicose durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo em espiral.



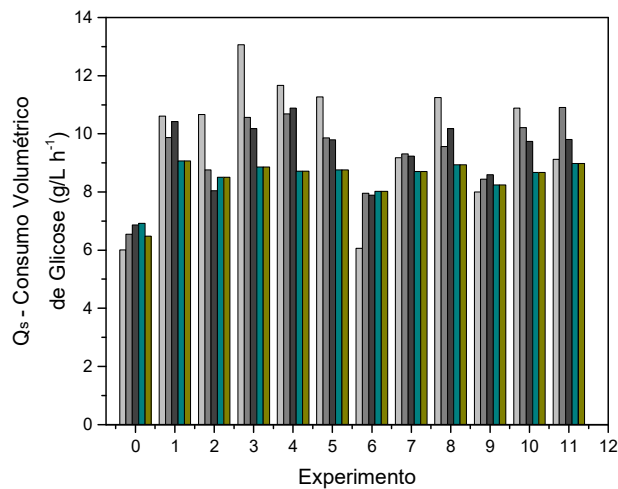
**Figura 39.** Gráfico cinético do consumo de glicose durante as fermentações assistidas por campos magnéticos na condição biorreator com reciclo em U.

Podemos observar na Figura 40 que o  $Q_s$  se comportou de maneira semelhante ao  $Q_p$ , nos quais os maiores valores foram vistos nas primeiras duas horas de fermentação, seguido de uma diminuição gradativa até uma possível estabilização dos valores no final da fermentação.

No início da fermentação há uma maior disponibilidade de nutrientes e fonte de carbono, entretanto no decorrer da fermentação a produção de

compostos do metabolismo da célula faz com que ocorra uma redução na eficiência do processo fermentativo (Lima *et al.*, 2001). Além disso, também ocorre a redução na concentração de glicose.

Nos experimentos nº 6, 7 e 9, os resultados mostram que os valores consumo volumétrico de glicose se mantiveram praticamente constantes, conforme ocorrido no experimento controle (nº0). Porém, os valores de  $Q_s$  apresentaram maiores de 23 a 34% que os experimentos sem a aplicação de campo magnético.



**Figura 40.** Representação gráfica do consumo volumétrico de glicose  $Q_s$  durante os experimentos de fermentação. Experimentos: nº 0 - Biorreator sem aplicação de campo (CONTROLE), nº 1 – Reciclo em espiral e campo de 5 mT; nº 2 - Reciclo em U e campo de 5 mT; nº 3 - Reciclo em espiral e campo de 15 mT; nº 4 - Reciclo em U e campo de 15 mT; nº 5 - Reciclo em espiral e campo de 10 mT; nº 6 - Reciclo em U e campos de 10 mT; nº 7 - Biorreator e campo de 5 mT; nº 8 - Biorreator e campo de 15 mT e nº 9, 10 e 11 - Biorreator e campo de 10 mT. Legenda: (■) 2h, (■) 4h, (■) 6h, (■) 8h e (■) para o tempo final.

#### 5.2.4 Análise da produção de glicerol

Na Figura 41 estão apresentadas as concentrações finais de glicerol para o experimento controle comparado àqueles experimentos submetidos ao campo. E na Tabela 4 a porcentagem de glicerol formado. No experimento controle a

concentração e a porcentagem de glicerol no final da fermentação foram de 3,02 g/L e 4,65%, respectivamente.

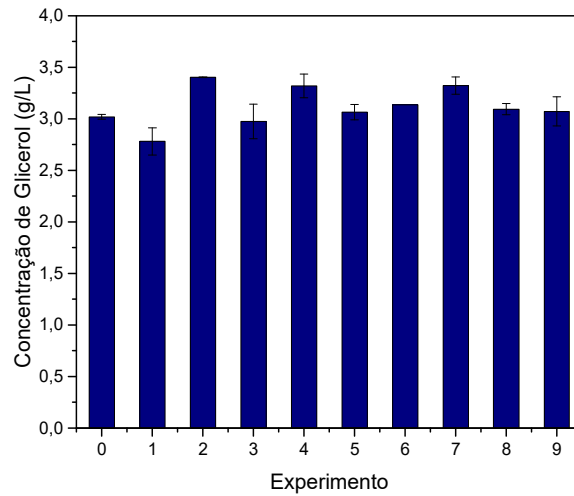
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 podemos observar que os valores de glicerol produzidos nos experimentos assistidos por campo magnético não apresentaram grandes diferenças quando comparados ao controle. Isto parece ser um fato interessante, pois o campo afetou a produção de etanol sem aumento de subprodutos indesejados como glicerol quando comparado com o controle.

Vale ressaltar que além do glicerol outros fatores podem afetar negativamente o rendimento de etanol, como por exemplo, o crescimento da célula que será discutido nos próximos tópicos. Segundo Lima *et al.*, (2001), juntamente com o etanol e o CO<sub>2</sub>, o metabolismo anaeróbico permite a formação e excreção de glicerol e outros secundários, que reduzem de 5 – 10% o rendimento do etanol.

Portanto este metabólito é um produto indesejável na fermentação, uma vez que reduz o rendimento de etanol. De acordo com os resultados, observa-se que o campo pode não ter influenciado na formação de glicerol.

**Tabela 4.** Porcentagem final de glicerol formado durante a fermentação.

FORMAÇÃO DE GLICEROL												
Experimento nº												
Glicerol (%)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	4,65	3,83	4,88	4,19	4,76	4,37	4,71	4,75	4,32	4,63	-	-



**Figura 41.** Gráfico da concentração final de glicerol formado (g/L). Experimentos: nº 0 - Biorreator sem aplicação de campo (CONTROLE), nº 1 – Reciclo em espiral e campo de 5 mT; nº 2 - Reciclo em U e campo de 5 mT; nº 3 - Reciclo em espiral e campo de 15 mT; nº 4 - Reciclo em U e campo de 15 mT; nº 5 - Reciclo em espiral e campo de 10 mT; nº 6 - Reciclo em U e campos de 10 mT; nº 7 - Biorreator e campo de 5 mT; nº 8 - Biorreator e campo de 15 mT e nº 9- Biorreator e campo de 10 mT.

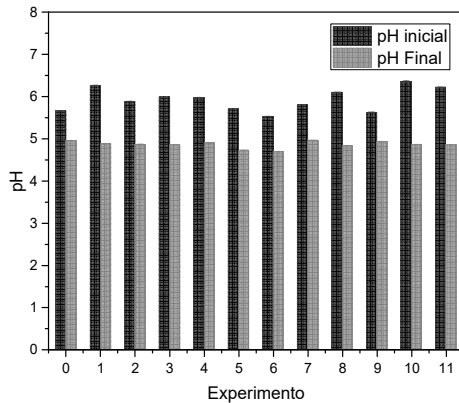
### 5.2.5 pH

A Figura 42 mostra o comportamento durante a fermentação. Podemos observar (Figura 42 a) que ao longo do processo fermentativo houve uma queda do pH até valores médios próximos a 4,86. Segundo Lima *et al.* (2001), este comportamento ocorre naturalmente no processo fermentativo, uma vez que ácidos orgânicos também são formados. Além disso, a queda do pH também pode estar associada à atividade da H<sup>+</sup>-ATPase, uma vez que esta enzima exsuda prótons e regula o pH intra e extracelular (Minc e Chang 2010; Lobão *et al.*, 2007).

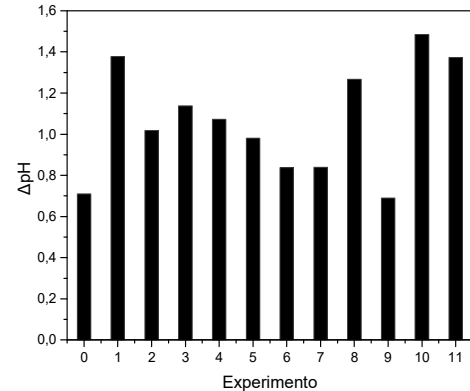
Normalmente, as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo mais adequada entre 4 a 5,5 (Lima *et al.*, 2001). Entretanto, quando observamos a diferença de pH no início da fermentação para o final verifica-se que a menor variação do pH foi no experimento controle (nº 0).



a)



b)



**Figura 42.** Gráficos de monitoramento do pH durante as fermentações. a) Queda do pH do início da fermentação (■), final da fermentação (■), b)  $\Delta$ pH - Diferença entre o pH inicial e o pH final (■). Experimento: nº 0 - Biorreator sem aplicação de campo (CONTROLE), nº 1 – Reciclo em espiral e campo de 5 mT; nº 2 - Reciclo em U e campo de 5 mT; nº 3 - Reciclo em espiral e campo de 15 mT; nº 4 - Reciclo em U e campo de 15 mT; nº 5 - Reciclo em espiral e campo de 10 mT; nº 6 - Reciclo em U e campos de 10 mT; nº 7 - Biorreator e campo de 5 mT; nº 8 - Biorreator e campo de 15 mT e nº 9, 10 e 11 - Biorreator e campo de 10 mT.

### 5.2.6 Crescimento celular

Previamente realizou-se a curva de crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* X2180 em shaker a 200 rpm e 30°C que se encontra no Anexo B (Figura B1). Também foi realizado um teste em shaker utilizando 20 g/L de biomassa úmida a fim de verificar o consumo de glicose nas fermentações. Foi observado que a levedura consumiu aproximadamente 13 g de glicose em 2 h de experimento. Diante disso, foram iniciados os experimentos no biorreator.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de Densidade ótica (DO) no início e no final da fermentação dos experimentos com aplicação de campos magnéticos, bem como os valores do experimento controle.

Observa-se que a DO quase dobrou em todos os experimentos, entretanto o enfoque primordial deste trabalho foi a produção de etanol, porém quando comparadas no mesmo tempo de fermentação (8h), fica evidente que o aumento da DO dos experimentos com aplicação de campo foram maiores que o experimento controle.

No experimento sem a aplicação de campo magnético (nº0) a D.O aumentou 1,59 vezes com 8 horas de fermentação em relação ao início do experimento. Podemos observar que além de um aumento no consumo de glicose, o campo também pode ter influenciado no crescimento das células, já que os experimentos com campo apresentaram um aumento da DO levemente superior ao controle.

Santos *et al.* (2012) observaram efeitos estimulantes no crescimento da levedura utilizando campos magnéticos com densidade de fluxo magnético de 20 mT por 24, 48 e 72h em *S. cerevisiae* ATCC 7754. Nas melhores condições do processo houve um aumento de 2,63% na produção de biomassa.

**Tabela 5.** Crescimento celular de *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação por densidade óptica.

<b>CRESCIMENTO CELULAR</b>		
<b>Nº Experimento</b>	<b>Densidade óptica (DO 600 nm)</b>	
	<b>DO inicial</b>	<b>DO final</b>
0	5,018±0,06	8,894±0,11
1	6,285±0,03	11,059±0,17
2	5,256±0,07	9,042±0,20
3	6,089±0,04	10,118±0,15
4	6,101±0,06	11,223±0,15
5	5,669±0,04	10,787±0,14
6	4,838±0,04	7,487±0,11
7	5,029±0,08	8,568±0,10
8	6,273±0,11	10,409±0,10
9	4,951±0,07	8,606±0,15
10	6,179±0,11	10,562±0,06
11	6,198±0,07	10,330±0,18

### 5.3 Análise dos resultados do planejamento experimental

#### 5.3.1 Determinação do rendimento de etanol ( $Y_p/s$ )

Em termos de rendimentos de etanol, na Tabela 6 estão apresentados os resultados ao longo do tempo de fermentação (a cada 2h). Assim como a produtividade volumétrica de etanol, com 8h de fermentação os melhores resultados para rendimento de etanol foram observados para os experimentos (nº 9, 10 e 11) conduzidos no biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT, com valores de 94,18%, 94,47% e 92,71, respectivamente. Estes valores foram semelhantes aos valores sugeridos por Lima *et al.* (2001).

O experimento controle apresentou um bom rendimento de etanol (93,18%) com 10 horas de fermentação. Entretanto, os maiores rendimentos dos experimentos com campo foram obtidos com 8 horas de fermentação. Neste tempo de fermentação o experimento controle apresentou um rendimento de 77,91%, relativamente inferior aos experimentos expostos aos campos.

Com oito horas de fermentação os experimentos com reciclo em U apresentaram melhores rendimentos que os experimentos com reciclo em espiral. Contudo, ao observar o tempo de 6h verificamos que os melhores rendimentos foram observados para reciclo em espiral, e não para reciclo em U. Embora ambos os sistemas tenham apresentado rendimentos semelhantes.

Resultados reportados na literatura sobre aplicação de campos magnéticos em fermentação são controversos. Por exemplo, a fermentação alcoólica realizada por *S. cerevisiae* sob efeito de campos magnéticos realizada por Motta *et al.* (2004) resultou em um aumento de 3,4 vezes na concentração de etanol após 24 h de exposição a campos de 220 mT. Enquanto, Perez *et al.* (2007) reportaram um aumento de 17% na produção de etanol nas melhores condições do processo (velocidade de reciclo de 0.9-1.2 ms<sup>-1</sup> e intensidade de 20 mT). Por outro lado, Lopes *et al.* (2010) não observaram benefícios ocasionados pela aplicação de campo magnético no processo de produção de etanol em batelada.

**Tabela 6.** Rendimento de etanol durante a fermentação - Yp/s (%).

Nº	Yp/s - RENDIMENTO DE ETANOL (%)				
	Tempo de fermentação				
	2h	4h	6h	8h	10h
0	20,40	33,49	59,33	77,91	93,18
1	27,70	47,00	71,15	88,44	--
2	25,41	47,13	65,67	91,25	--
3	28,03	50,80	74,10	86,87	--
4	31,78	56,63	72,96	81,30	--
5	31,75	51,44	71,03	83,86	--
6	18,89	43,17	65,45	88,27	--
7	23,29	45,84	67,18	91,04	--
8	31,68	50,28	74,05	80,72	--
9	26,13	49,27	72,16	94,18	--
10	33,09	53,30	78,18	94,47	--
11	27,42	56,16	80,93	92,71	--

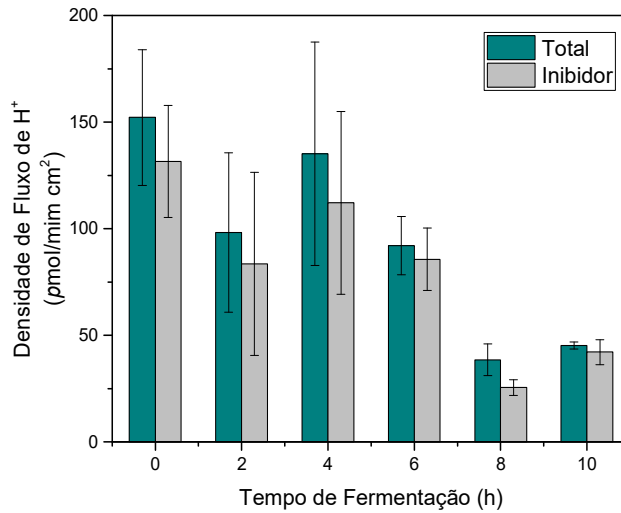
### 5.3.2 Determinação da densidade de fluxo de prótons

Nas Figuras 43 a 54 estão apresentados os resultados cinéticos da densidade de fluxo de prótons dos experimentos controle (Figura 43) e para os experimentos assistidos por campo magnético (Figuras 44 a 54). As quais apresentam as densidades de fluxo de prótons das amostras retiradas a cada 2 horas de fermentação durante os experimentos. Os gráficos de todas as leituras estão apresentados no Anexo C.

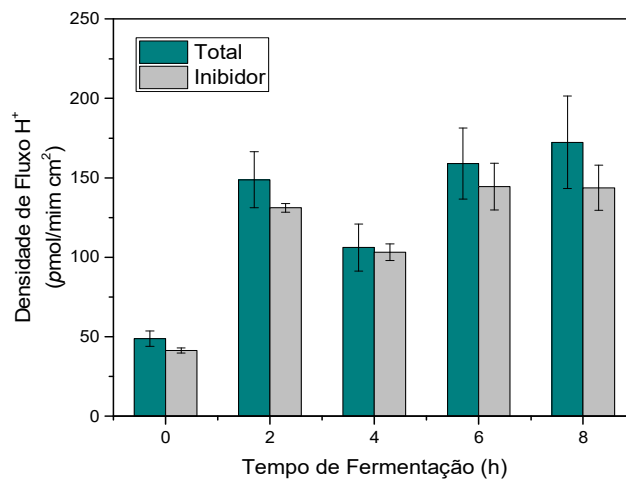
As medidas de densidade de fluxo  $H^+$  foram feitas sem a presença do vanadato, inibidor da  $H^+$ -ATPase e representando a densidade de fluxo total e com a presença do inibidor. Em todos os experimentos, foi observado que com a presença do inibidor a densidade de fluxo de prótons diminui, e esta redução foi atribuída majoritariamente à atividade da enzima  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática.

Segundo Chang e Minc, 2014, esta enzima da membrana plasmática bombeia prótons sendo responsável pela regulação do pH intracelular e extracelular da levedura, uma vez que gera um gradiente eletroquímico que impulsiona o transporte de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos. Portanto é

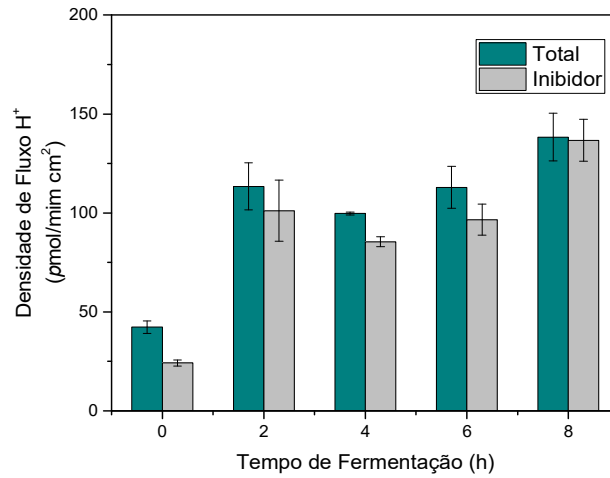
importante entender se o campo poderia afetar o desempenho desta enzima durante as fermentações assistidas por campo eletromagnético.



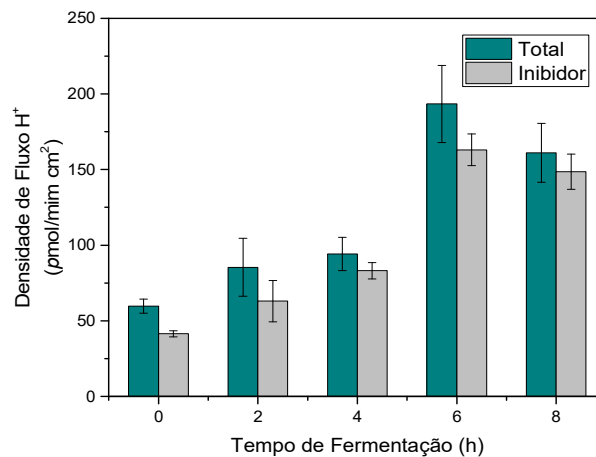
**Figura 43.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo externo s/ a aplicação de campo - CONTROLE (Experimento nº0). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



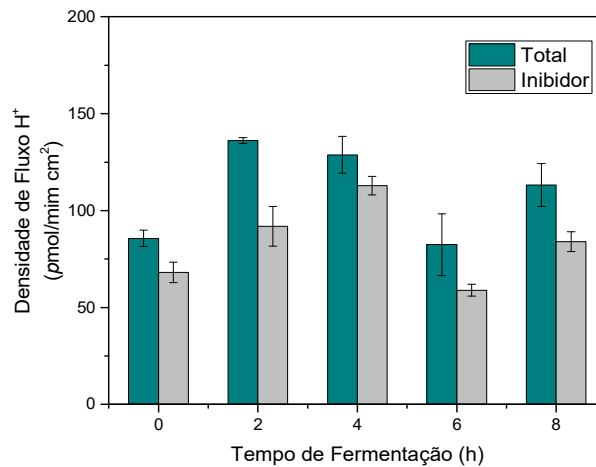
**Figura 44.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento nº1). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



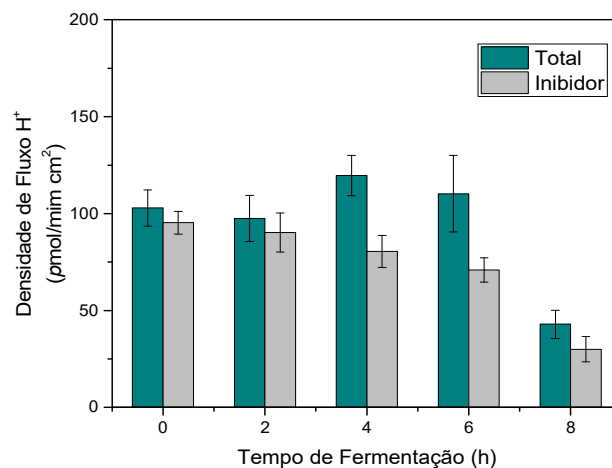
**Figura 45.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento nº2). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



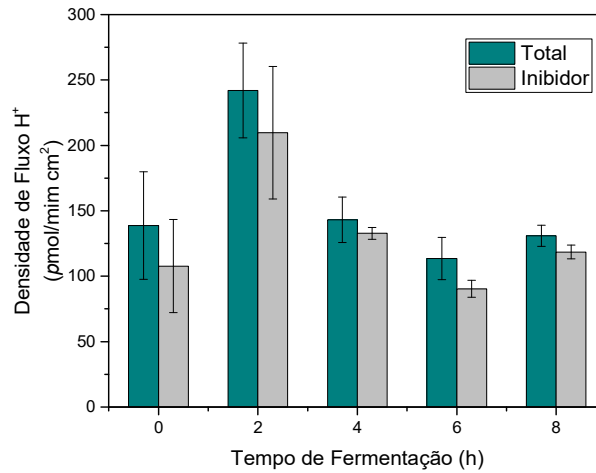
**Figura 46.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento nº3). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



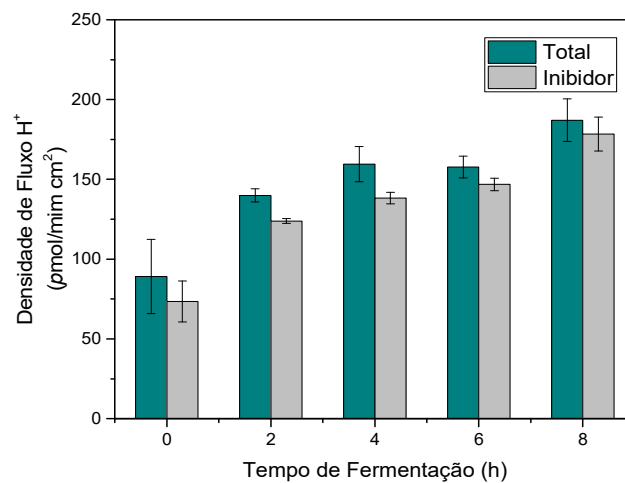
**Figura 47.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento n<sup>o</sup>4). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



**Figura 48.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação com reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento n<sup>o</sup>5). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).

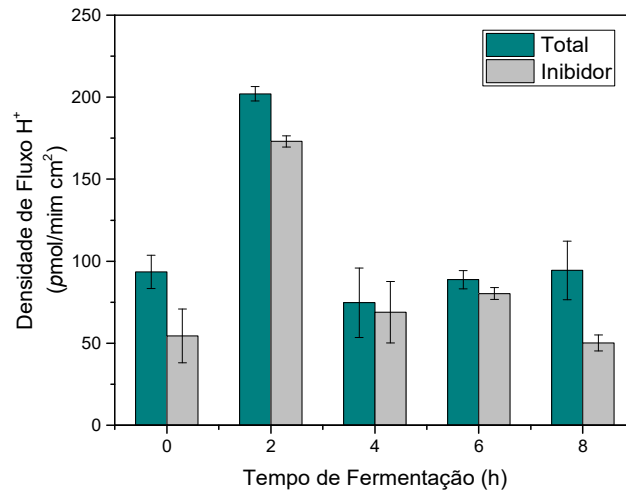


**Figura 49.** Densidade de fluxo de  $H^+$  durante a fermentação com reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº6). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  total e (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  com inibidor da ATPase (vanadato).

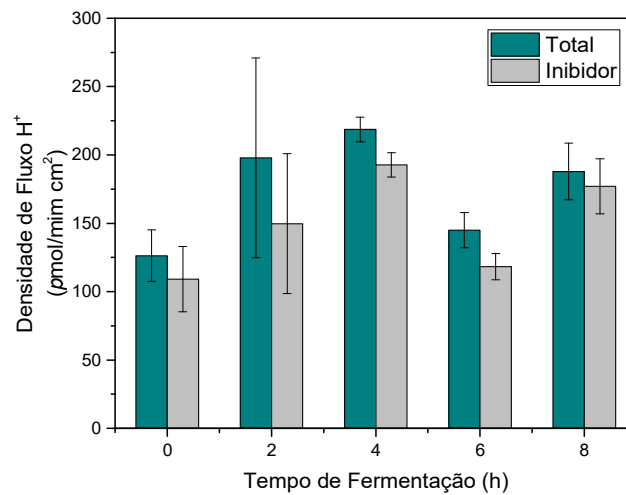


**Figura 50.** Densidade de fluxo de  $H^+$  durante a fermentação em biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento nº7). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  total e (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  com inibidor da ATPase (vanadato).

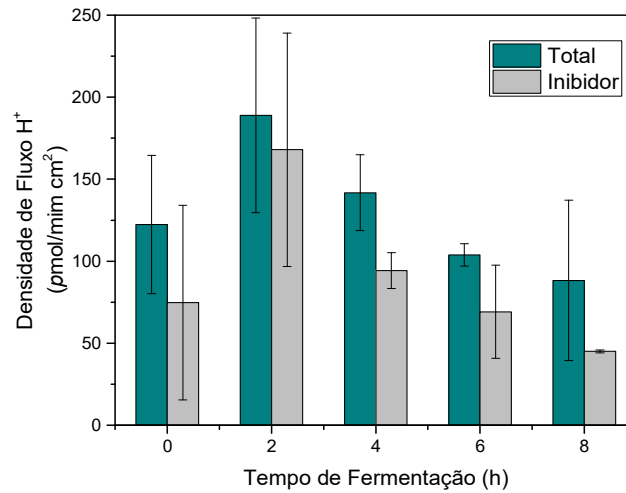




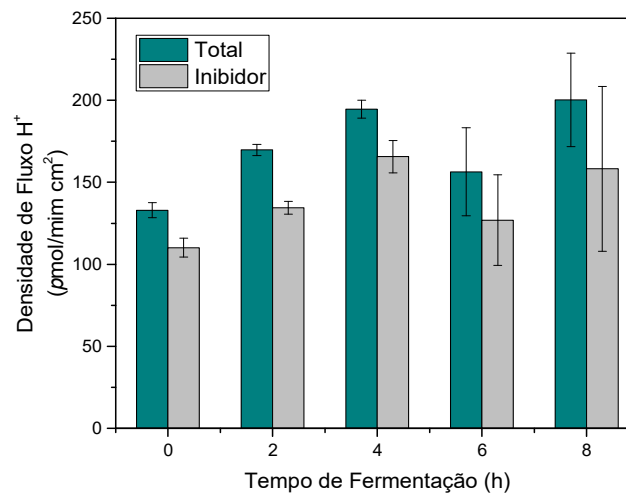
**Figura 51.** Densidade de fluxo de  $H^+$  durante a fermentação em biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento n<sup>o</sup>8). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  total e (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  com inibidor da ATPase (vanadato).



**Figura 52.** Densidade de fluxo de  $H^+$  durante a fermentação em biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento n<sup>o</sup>9). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  total e (■) Densidade de Fluxo de  $H^+$  com inibidor da ATPase (vanadato).



**Figura 53.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento n<sup>o</sup>10). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).



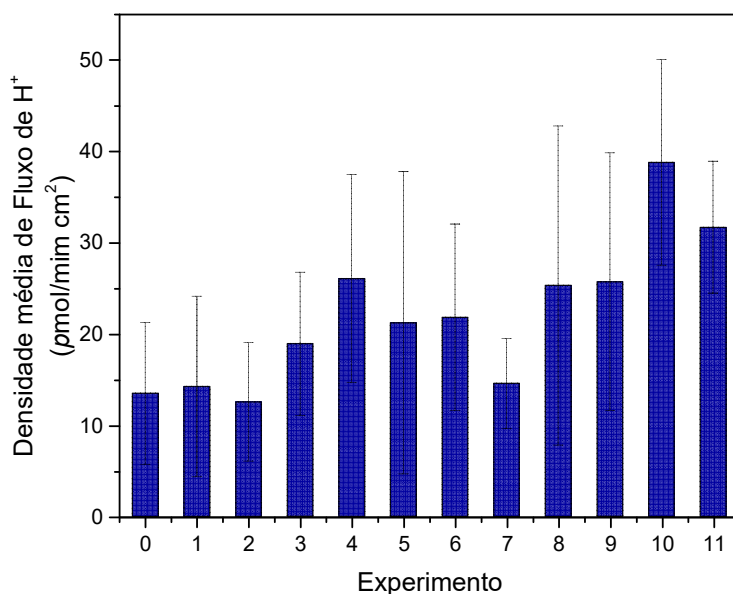
**Figura 54.** Densidade de fluxo de H<sup>+</sup> durante a fermentação em biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento n<sup>o</sup>11). Legenda: (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> total e (■) Densidade de Fluxo de H<sup>+</sup> com inibidor da ATPase (vanadato).

A partir da densidade de fluxo de  $H^+$  total e da densidade de fluxo de  $H^+$  com inibidor foi calculada, por diferença a densidade de fluxo de  $H^+$  sensível ao vanadato referente a cada leitura durante o experimento (0, 2, 4, 6 e 8 horas de fermentação), estes dados estão apresentados na Tabela 7. Em nível de comparação entre os experimentos foi calculada a densidade média vanadato sensível de cada fermentação, estes resultados estão apresentados na Figura 55.

Podemos observar (Figura 55) que o campo magnético influenciou na densidade média de fluxo de  $H^+$  sensível ao vanadato. O experimento sem aplicação de campo (nº0) apresentou uma densidade média de fluxo de 13,48  $\mu\text{mol}/\text{min cm}^2$ .

**Tabela 7.** Densidade de fluxo de prótons durante as fermentações de obtenção de etanol.

<b>Densidade de fluxo de prótons vanadato sensível (<math>\mu\text{mol}/\text{min cm}^2</math>)</b>						
<b>Nº</b>	<b>Tempo de fermentação (h)</b>					
	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
0	20,67	14,70	23,02	6,42	12,98	3,09
1	7,41	17,62	2,98	14,54	28,63	-
2	18,09	12,35	14,34	16,36	1,61	-
3	18,27	22,37	11,12	30,38	12,49	-
4	17,60	44,17	15,84	23,52	29,18	-
5	7,55	7,26	39,10	39,33	12,87	-
6	30,94	32,32	10,36	23,21	12,27	-
7	15,76	16,02	21,39	10,97	8,73	-
8	39,00	29,05	5,82	8,43	44,21	-
9	17,15	48,16	25,78	26,64	10,92	-
10	47,62	20,96	47,44	34,73	43,29	-
11	22,82	35,22	28,97	29,47	41,96	-



**Figura 55.** Gráfico da densidade média de fluxo de H<sup>+</sup> sensível ao vanadato. Experimentos: nº 0 - Biorreator sem aplicação de campo (CONTROLE), nº 1 – Reciclo em espiral e campo de 5 mT; nº 2 - Reciclo em U e campo de 5 mT; nº 3 - Reciclo em espiral e campo de 15 mT; nº 4 - Reciclo em U e campo de 15 mT; nº 5 - Reciclo em espiral e campo de 10 mT; nº 6 - Reciclo em U e campos de 10 mT; nº 7 - Biorreator e campo de 5 mT; nº 8 - Biorreator e campo de 15 mT e nº 9, 10 e 11 - Biorreator e campo de 10 mT.

Com a aplicação de campo, os valores de densidade média de fluxo de prótons sensível ao vanadato apresentaram valores maiores com densidade de fluxo magnético de 10 e 15 mT. Entretanto, observou-se que os experimentos 1, 2 e 7 com densidade de fluxo magnético de 5 mT apresentaram valores semelhantes ao controle de 14,23, 12,55 e 14,57 pmol/min cm<sup>2</sup>, respectivamente. Estes valores sugerem que o campo, nestas condições, provocou aumento na densidade de fluxo.

Nos experimentos 9, 10 e 11 foram observadas as maiores densidades médias de fluxo de prótons, sendo estes 25,73, 38,81 e 31,69 pmol/min cm<sup>2</sup>. Em média, nessa condição de biorreator com reciclo externo houve um aumento de 138% quando comparado ao controle.

De acordo com Minc e Chang (2010), as respostas provocadas em resposta ao campo elétrico na célula *S. pombe* foram associadas à atividade da H<sup>+</sup>-ATPase. Sugerindo que, assim como o campo elétrico, o campo magnético pode influenciar esta enzima a ponto de justificar os resultados positivos com aplicação de campo.

### 5.3.3 Análise do planejamento experimental

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da matriz experimental das fermentações assistidas por campos magnéticos. As variáveis resposta foram o rendimento de etanol e a densidade média de fluxo de prótons sensível ao vanadato. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o software Design Expert versão 9 como descrito previamente.

**Tabela 8.** Resultados do planejamento experimental fatorial completo de face centrada 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais para as variáveis resposta rendimento de etanol (Yp/s) e densidade média de fluxo de prótons.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL				
Nº	Variáveis codificadas		Variáveis resposta	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	R <sub>1</sub> : Yp/s (%)	R <sub>2</sub> : Densidade Média de Fluxo H <sup>+</sup> Vanadato sensível
1	-1	-1	88,44	14,23
2	1	-1	91,25	12,55
3	-1	1	86,87	18,93
4	1	1	81,30	26,06
5	-1	0	83,86	21,22
6	1	0	88,27	21,82
7	0	-1	91,04	14,57
8	0	1	80,72	25,30
9	0	0	94,18	25,73
10	0	0	94,47	38,81
11	0	0	92,71	31,69

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) para o nível de confiança de 90% ( $p < 0.10$ ) para a variável resposta rendimento de etanol, revelando que o modelo não foi significativo. Porém, a variável independente densidade de fluxo magnético ( $X_2$ ) influenciou significativamente no rendimento de etanol ( $R_1$ ). Já a variável reciclo não demonstrou nenhum efeito sob esta resposta. Estes resultados ficam melhor evidenciados nos gráficos de superfície de resposta e de contorno que estão ilustrados na Figura 56 para a resposta  $Y_{p/s}$  e sua interação com os dois fatores sob estudo.

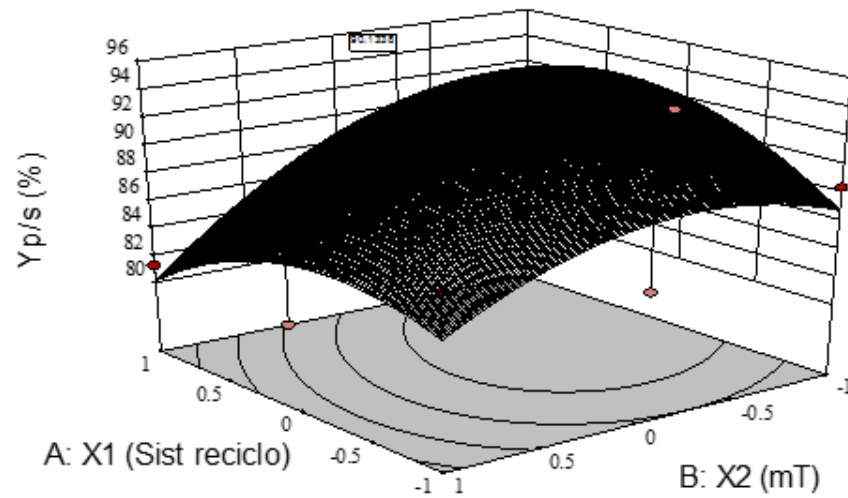
**Tabela 9.** Resultados da análise de variância (ANOVA) usando o programa Design Expert 9.0 referente à variável dependente ( $Y_{p/s}$ ) Rendimento de etanol (%), para nível de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ).

<b>ANOVA superfície resposta modelo quadrático</b>					
<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>Valor de <math>F_{\text{calculado}}</math></b>	<b>Prob&gt;F</b>
Modelo	167,37	5	33,47	2,43	0,1760
A-X1	0,45	1	0,45	0,033	0,8631
B-X2	79,50	1	79,50	5,77	0,0614*
AB	17,56	1	17,56	1,27	0,3101
A <sup>2</sup>	24,13	1	24,13	1,75	0,2429
B <sup>2</sup>	27,11	1	27,11	1,97	0,2195
Resíduo	68,87	5	13,77		
Falta de ajuste	67,09	3	22,36	25,11	0,0385*
Erro puro	1,78	2	0,89		
Total	236,24	10			

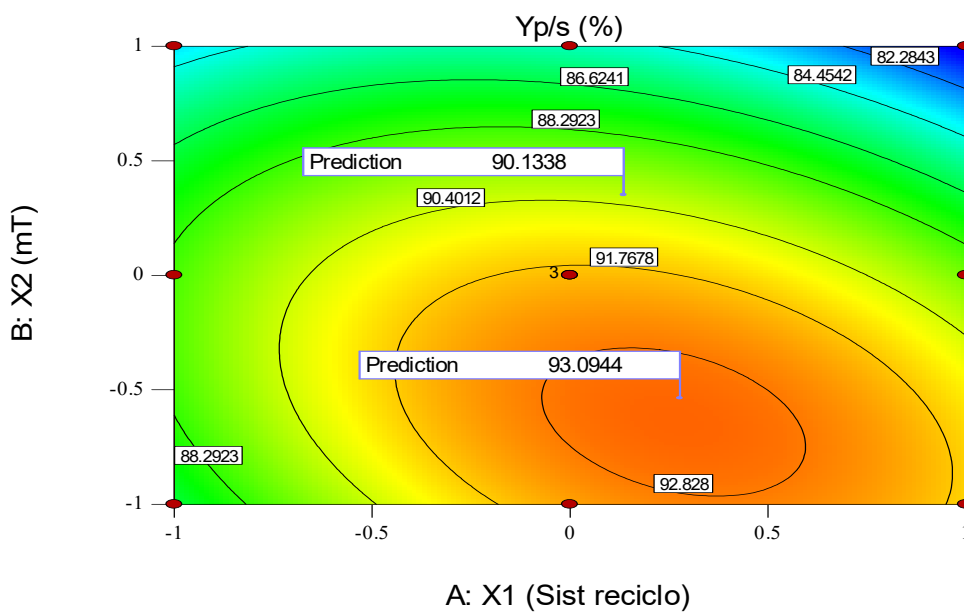
\*Valores estatisticamente significativos para o nível de 90% de confiança.

Nomenclatura: A-  $X_1$ ; B -  $X_2$ ;

a)



b)



**Figura 56.** Otimização numérica da resposta rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) para o planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  de face centrada com 3 pontos centrais realizada ao nível de confiança de 90% mostrando o efeito da interação entre as variáveis:  $X_1$ - sistema de reciclo e  $X_2$  – densidade de fluxo magnético. a) Gráfico tridimensional de superfície; b) Gráfico de contorno.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) para o nível de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ) para a variável resposta densidade média de fluxo de prótons, revelando que ambos, o modelo estatístico e a variável densidade de fluxo magnético foram significativos. Os gráficos de superfície de resposta e de contorno estão ilustrados na Figura 57, os quais mostram uma região de máximo entre 10 e 15 mT após realizar uma otimização numérica para a densidade média de fluxo de prótons como uma função das variáveis em estudo.

**Tabela 10.** Resultados da análise de variância (ANOVA) usando o programa Design Expert 9.0 referente à variável dependente densidade média de fluxo de prótons, em nível de confiança de 90% ( $P < 0,10$ ).

<b>ANOVA superfície resposta modelo quadrático</b>					
<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>Valor de <math>F_{\text{calculado}}</math></b>	<b>Prob&gt; F</b>
Modelo	491,10	5	98,22	3,65	0,0907*
A-X1	6,12	1	6,12	0,23	0,6534
B-X2	139,49	1	139,49	5,19	0,0718*
AB	19,45	1	19,45	0,72	0,4339
A <sup>2</sup>	92,74	1	92,74	3,45	0,1224
B <sup>2</sup>	147,70	1	147,70	5,49	0,0661*
Resíduo	134,46	5	26,89		
Falta de ajuste	48,69	3	16,23	0,38	0,7821
Erro puro	85,77	2	42,88		
Total	625,57	10			

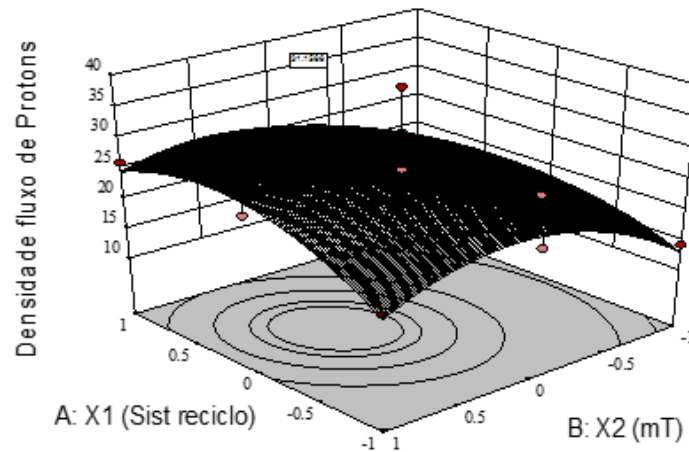
\*Valores estatisticamente significativo para o nível de 90% de confiança.  
Nomenclatura: A- X<sub>1</sub>; B - X<sub>2</sub>.

Visando determinar as condições mais favoráveis para alcançar os máximos níveis de rendimento de etanol e densidade média de fluxo de prótons, foi realizado um procedimento de otimização numérica (Figura 58) e gráfica (Figura 59) considerando uma função objetivo de “Desejabilidade” (D)

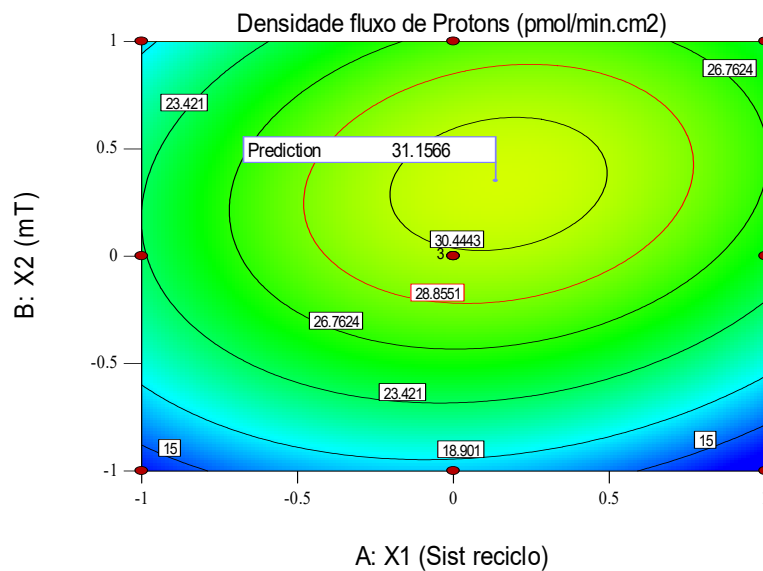


representada na Equação 3 segundo método descrito por Myers e Montgomery (1999) e implementado como ferramentas de otimização do programa computacional “Design Expert”.

a)

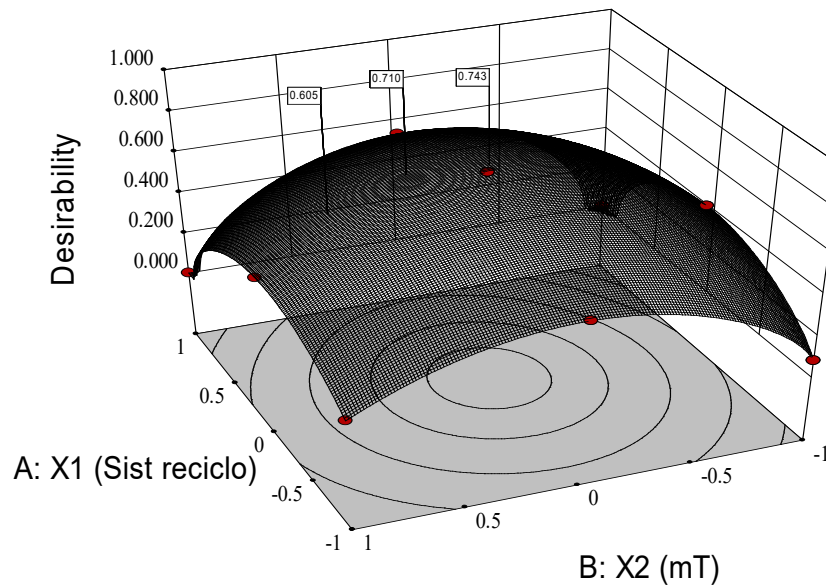


b)

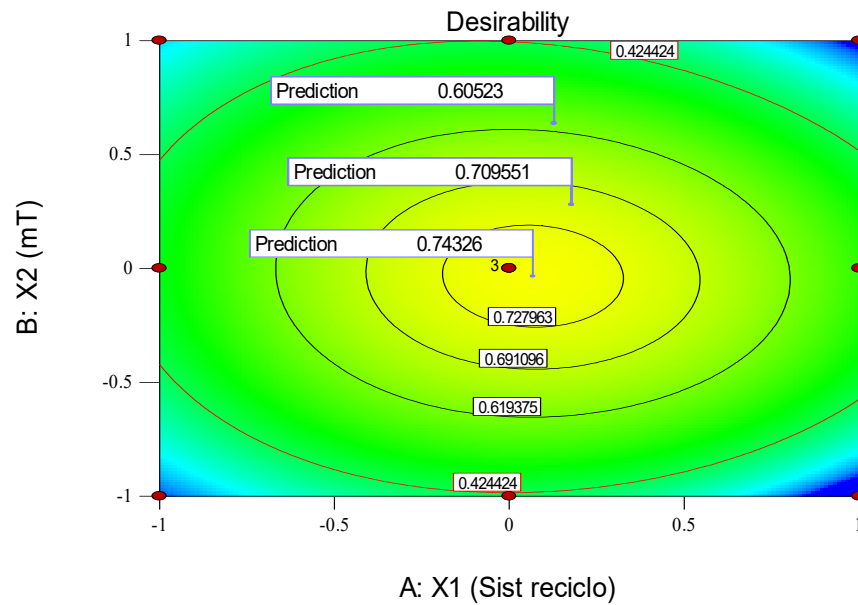


**Figura 57.** Otimização numérica da resposta densidade média de fluxo de prótons para o planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  de face centrada com 3 pontos centrais realizada ao nível de confiança de 90% mostrando o efeito da interação entre as variáveis:  $X_1$ - sistema de reciclo e  $X_2$  – densidade de fluxo magnético. a) Gráfico tridimensional de superfície; b) Gráfico de contorno.

a)



b)



**Figura 58.** Resultados da otimização numérica (função de desejabilidade) da análise simultânea para o rendimento de etanol ( $Yp/s$ ) e densidade média de fluxo de prótons dentro da região em estudo durante a fermentação de *S. cerevisiae* X2180 sob campos magnéticos. a) gráfico tridimensional de superfície resposta; b) Gráfico de contorno.

Esta função de desejabilidade varia na faixa de 0 a 1 (de menos desejável para mais desejável, respectivamente).

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_n)^{\frac{1}{n}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (3)$$

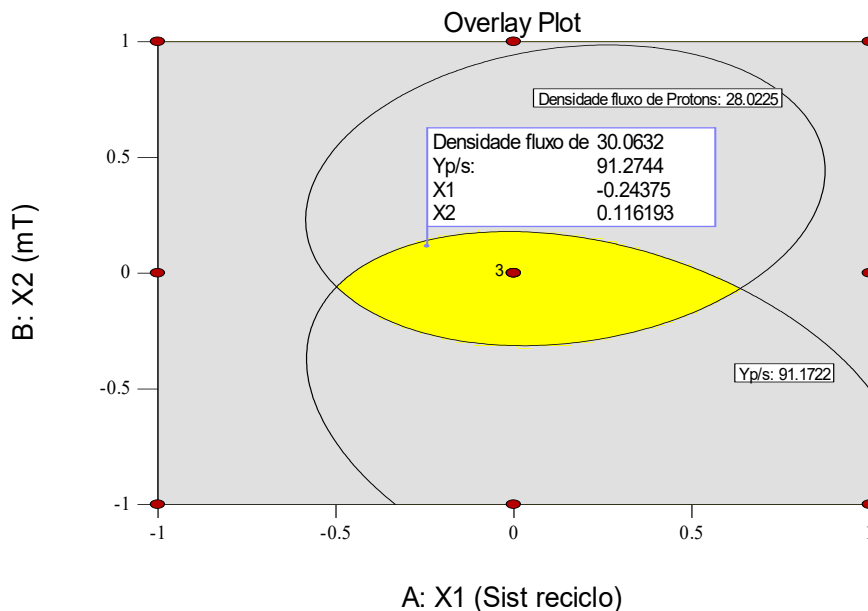
Em que  $n$  é o número de respostas na medida tendo como critérios de Máximo

$d_i = 0$  se a resposta <valor baixo

$0 < d_i < 1$  se as respostas variam de baixo para alto

$d_i = 1$  se a resposta >valor alto

Desta forma, na Figura 58 se observa que para um valor de  $D = 0,74$  se podem obter valores máximos de  $Y_p/s$  e Densidade de fluxo de prótons. Enquanto que a Figura 59 apresenta os resultados de otimização gráfica onde se pode observar uma região gráfica (amarela) na qual é possível alcançar rendimentos máximos de produção de etanol com alta atividade de  $H^+$ -ATPase para valores de campo magnético em torno de 10 mT.



**Figura 59.** Resultados da otimização gráfica da análise integrada (sobreposição) de rendimento de etanol ( $Y_p/s$ ) e a densidade média de fluxo de prótons dentro da região em estudo durante a fermentação para produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 sob campos magnéticos.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados alcançados no presente trabalho é possível concluir que:

- As fermentações por *S. cerevisiae* X2180 para produção de bioetanol assistidas por campo eletromagnético foram afetadas positivamente pela densidade de fluxo magnético. Primeiramente, observou-se a redução no tempo de fermentação em 2h quando comparado ao experimento controle, isto é, sem aplicação de campo.
- Nas melhores condições propostas do planejamento experimental, houve um aumento médio de aproximadamente 20% no rendimento de etanol. Em termos de produtividade volumétrica de etanol e do consumo volumétrico de glicose, houve um aumento de aproximadamente 30%, em ambos os parâmetros quando comparado ao experimento sem aplicação de campo magnético.
- Em relação à densidade média de fluxo de prótons, constatou-se que, com o aumento da densidade de fluxo magnético, o fluxo de prótons também aumentou. Este fato pode ser relevante para sustentar o transporte maior de nutrientes através da membrana celular que resultem na melhoria da produtividade de etanol.

- Estudos futuros ainda serão necessários para entender os efeitos em nível celular e realizar aplicações em processos em escalas maiores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- Albuquerque, W. S. C., Costa, R. M. P. B., Fernandes, T. S., Porto, A. L. F. (2016). Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 121: 16-28.
- Alvarez, D. C., Pérez, V. H., Justo, O. R., Alegre, R. M. (2006). Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. *Process Biochemistry*, 41: 1967–1973.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* 26: 89-105.
- Chang, F., Minc, N. (2014). Electrochemical Control of Cell and Tissue Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:317–336.
- Cartwright, C. P., Juroszek, J. R., Beavan, M.J., Ruby, F. M. S., Morais, S. M. F., Rose, A. H. (1986). Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132: 369-377.

- Cartwright, C. P., Veazey, F. J., Rose, A. H. (1987). Effect of Ethanol on Activity of the Plasma-membrane ATPase in, and Accumulation of Glycine by, *Saccharumyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 133: 857-865.
- Cubides, D. C. (2015). 141f. Produção de biodiesel por método não convencional em biorreator assistido por campo eletromagnético. Tese (Doutorado) – Produção vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, 2015
- Crocomo, O. J., Gutierrez, L. E. (2001). Caminhos metabólicos. In: Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*, vol. 1: Fundamentos, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.
- David, G. F. (2012). Proposta tecnológica de reuso de glicerina da produção de biodiesel: processo integrado. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)– Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 128p.
- David, G. F., Perez, V. H., Justo, O. R., Cubides, D. C., Cardona, C. A., Hristov, J. (2016). Glycerol bioconversion in unconventionalmagnetically assisted bioreactor seeking whole cellbiocatalyst (intracellular lipase) production. *Chemical Engineering Research and Design*, 3: 243–252.
- Deprez, M. A., Eskes, E., Wilms, T., Ludovico, P., Winderickx, J. (2018). pH homeostasis links the nutrient sensing PKA/TORC1/Sch9 ménage-à-trois to stress tolerance and longevity. *Microb. Cell*, 5 (3):119-136.
- Dini, L., Abbro, L. (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*, 36: 195-217.
- El May, A., Snoussi, S., Miloud, N. B., Maatouk, I., Abdelmelek, H., Aïssa, R. B., Landoulsi, A. (2009). Effects of static magnetic field on cell growth, viability, and differential gene expression in *Salmonella*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (5): 547-552.
- Eraso, P., Cid, A., Serrano, R. (1987). Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage. *FEBS Lett.*, 224: 193–197.
- Fojt, L., Klapetek, P., Strašák, L., Vetterl, V. (2009). 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bactéria. *Micron*, 40 (8): 918-922.

- Fojt, L., Strašák, L., Vetterl, V. (2007). Effect of electromagnetic fields on the denitrification activity of *Paracoccus denitrificans*. *Bioelectrochemistry*, 70 (1): 91-95.
- Fojt, L., Strašák, L., Vetterl, V., Šmarda, J. (2004). Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry*, 63 (1): 337-341.
- Goffeau, A., Slayman, C. W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, (3-4): 197-223.
- Harte, F., San Martín, M. F., Lacerda, A. H., Lelieveld, H. L. M., Swansow, B. G., Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Potential use of 18 Tesla static and pulsed magnetic fields on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Processing Preservation*, 25: 223-235.
- Henderson, K. A., Hughes, A. L., Gottschling, D. E. (2014). Mother-daughter asymmetry of pH underlies aging and rejuvenation in yeast. *eLife*, 3:e03504.
- Hristov, J., Perez, V. H. (2011). Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. *International Review of Chemical Engineering*, 3 (1): 3-20.
- Hunt, R. W., Zavalin, A., Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Das, K. C. (2009). Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology Biofuel and Bioenergy Applications. *International Journal of molecular science*, 10: 4515-4558.
- Ikehara, T., Yamaguchi, H., Miyamoto, H. (1998). Effects of electromagnetic fields on membrane ion transport of cultured cells. *The Journal of Medical Investigation*, 45 (1-4): 47-56.
- Iwasaka, M., Ikehata, M., Miyakoshi, J., Ueno, S. (2004). Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution, *Bioelectrochemistry*, 65: 59– 68.
- Ji, W., Huang, H., Deng, A., Pan, C. (2009). Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. *Micron*, 40: 894–898.



- Justo, O. R., Pérez, V. H., Alvaréz, D. C., Alegre, R. M., (2006). Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134 (2): 155-163.
- Ko, J.K., Um, Y., Woo, H.M., Kim, K.H., Lee, S-M. (2016). Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* 213 harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology* 209, 290–296.
- Kohno, M., Yamazaki, M., Kimura, I., Wada, M. (2000). Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Pathophysiology*, 7: 143–148.
- Lei, C., Berg, H. (1998). Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45 (2): 261-265.
- Lima, U. A., Basso, L. C., Amorim, H. V. (2001). In: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzanil, W., Schmidell, W. *Biotechnology Industrial*, Volume 3, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 593 p. il.
- Li, Z., Guo, S., Li, L., Cai, M. (2007). Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in air-lift photo bioreactor. *Bioresource Technology*, 98 (3): 700-705.
- Lobão, F. A., Façanha, A. R., Okorokov, L. A., Dutra, K. R., Okorokova-Façanha, A. L. (2007). Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H<sup>+</sup> Transport mediated by the plasmamembrane ATPase of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 274:17–23.
- Lopes, P., Borzani, W., Rodrigues, J. A. D., Ratuznei, S. M. (2010). Influência de campo magnético na fermentação alcoólica descontínua. *Brazilian Journal Food Technology*, 13 (1): 38-51.
- Ma, H., He, R., Luo, L., Wang, Z., Wang, H. (2009). Biological Window Effects of High-intensity Pulsed Magnetic Field Sterilization on *Escherichia Coli*. *Sciencepaper Online*. Disponível em: [http://www.paper.edu.cn/index.php/default/em\\_releasepaper/content/29044](http://www.paper.edu.cn/index.php/default/em_releasepaper/content/29044). Acessado em: 11 de julho de 2016.

- Myers, R.H.; Montgomery, D.C. (1999). *Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley-Intersciences Ed. 2<sup>nd</sup> Edition.
- Minc, N., Chang, F.(2010). Electrical Control of Cell Polarization in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology*,(20):710–716.
- Mittenzwey, R., Sübmuth, R., Mei, W. (1996). Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria-the question of a co-stressing factor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40 (1): 21-27.
- Moore, R. L. (1979). Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 25: 1145-1151.
- Motta, M. A., Muniz, J. B. F., Schuler, A., Motta, M. (2004). Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. *Biotechnology. Progress*, 20: 393-396.
- Novák, J., Strašák, L., Fojt, L., Slaninová, I., Vetterl, V. (2007). Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 70 (1): 115-121.
- Nussenzveig, H. M. (1997). *Curso de física básica*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1997. Cap 7, 127-137.
- Pazur, A., Schimek, C., Galland, P. (2007). Magnetoreception in microorganisms and fungi. *Central European Journal of Biology*, 2 (4): 597-659.
- Perez, V. H., Justo, O. R., Pereira, N. R. (2009). Obtención de biocombustibles en bioreactores asistidos por campos electromagnéticos. In: Alzate, C. A. C., Alzate, C. E. O. *Avances en la producción de biocombustibles*. 1 ed. Manizales: Editora Universidad Nacional de Colombia, 2009. Cap 12, 229-248.
- Perez, V. H., Reyes, A. F., Justo, O. R., Alvarez, D. C., Alegre, R. M. (2007). Bioreactor coupled with electromagnetic field generator: effects of extremely low frequency electromagnetic fields on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 23 (5): 1091-1094.
- Pichko, V. B., Povalyaeva, I. V. (1996). Electromagnetic stimulation of microorganism productivity: possible mechanisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 32 (4): 425-428.

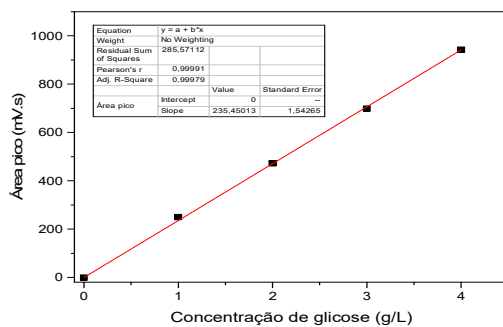
- Pilla, A. A., Kaufman, J. J., Ryaby, J. T. (1987). Electrochemical kinetics at the cell membrane: A physicochemical link for electromagnetic bioeffects. In: Blank M, Findl E, editors. *Mechanistic Approaches to Interaction of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems*. 39–61.
- Pilla, A. A., Markov, M. S. (1994). Bioeffects of weak electromagnetic fields, *Reviews on Environmental Health*, 10 (3-4).
- Ramos, A. C., Façanha, A. R., Feijó, J. A. (2008). Proton (H<sup>+</sup>) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178: 177–188.
- Reitz, J. R. (1967). *Foundations of electromagnetic theory*. 2 ed. Addison Wesley Publishing Company.
- Ruiz-Gómez, M. J., Prieto-Barcia, M. I., Ristori-Bogajo, E., Martínez-Morillo, M. (2004). Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 64 (2): 151-155.
- San Martín, M. F., Harte, F. M., Lelieveld, H., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (2001). Inactivation effect of an 18-T pulsed magnetic field combined with other technologies on *Escherichia coli*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2 (4): 273-277.
- Santos, L. O., Alegre, R. M., Garcia-Diego, C., Cuellar, J. (2010). Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 45: 1362–1367.
- Santos, L. O., Gonzales, T. A., Úbeda, B. T., Alegre, R. M. (2012). Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55:921-926.
- Schlessler, A., Ulaszewski, S., Ghislain, M., Goffeau, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, (36):19480–19487.
- Serrano, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, 947:1-28.

- Serway, R. A (1992). *Física 3 – Eletricidade, magnetismo e ótica. 3ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, cap 29: 152-170.*
- Strašák, L., Fojt, L., Vetterl, V.(2005). Effects of 50 Hz magnetic fields on the viability of different bacterial strains. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 24 (3): 293-300.
- Strašák, L., Vetterl, V., Šmarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 55 (1): 161-164.
- Tipler, P. A. (2000). *Eletricidade & Magnetismo e Ótica. 4ª Ed. Rio de Janeiro. LTC, Editora. 179 - 198.*
- Tenuzzo, B., Vergalho, C., Dini, L. (2009). Effect of 6 mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and in vitro aged human lymphocytes. *Tissue and Cell*, 41: 169–179.
- Tsuchiya, K., Nakamura, K., Okuno, K., Ano, T., Shoda, M. (1996). Effect of homogeneous and inhomogeneous high magnetic fields on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81 (4): 343-346.
- Vásquez, J. C. H., Alzate, C. A. C., Moreno, J. P. M., Vasco, J. M. N., Carantón, C. F. T. (2009). Estandarización y selección de microorganismos de interés para la producción de bioetanol In: Alzate, C. A. C., Alzate, C. E. O. *Avances en la producción de biocombustibles.1 ed. Manizales: Editora Universidad Nacional de Colombia, 2009. Cap 8, 229-248.*
- Volkov, V. (2015). Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. *Frontiers in Plant Science*, 6:425.
- Zablotskii, V., Polyakova, T., Lunov, O., Dejneka, A. (2016). How a high-gradient magnetic field could affect cell life. *Scientific Reports*, 6:37407.

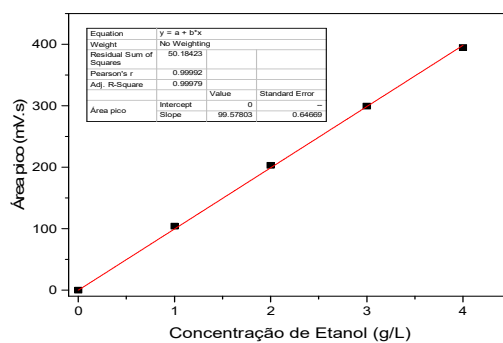
## ANEXO A

Curva de calibração para a determinação de consumo de glicose, formação de etanol e de glicerol.

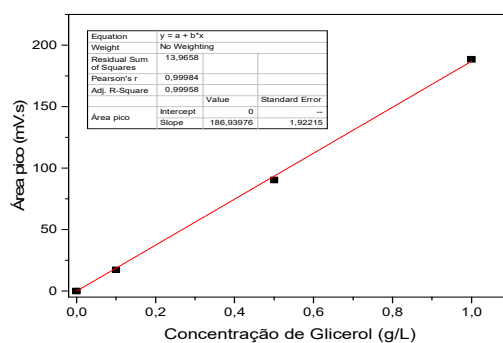
a)



b)



c)

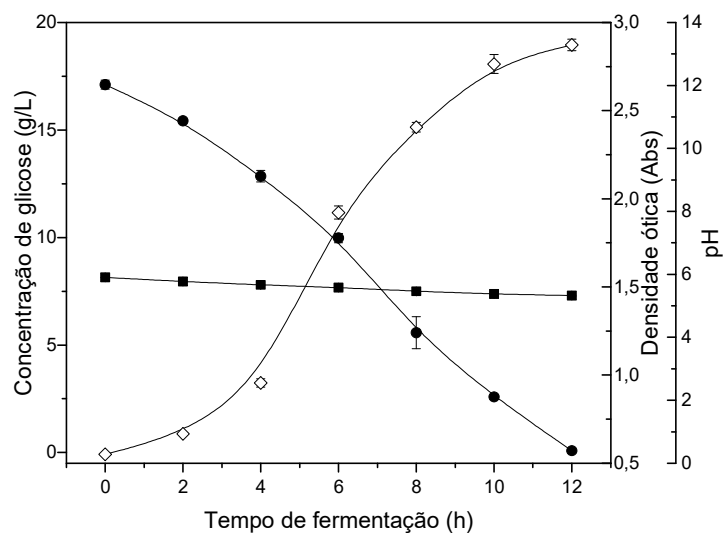


**Figura A1.** Curvas de calibração usadas para determinar a concentração (g/L) do substrato e produto por cromatografia líquida (HPLC) a) Glicose, b) Etanol e c) Glicerol.

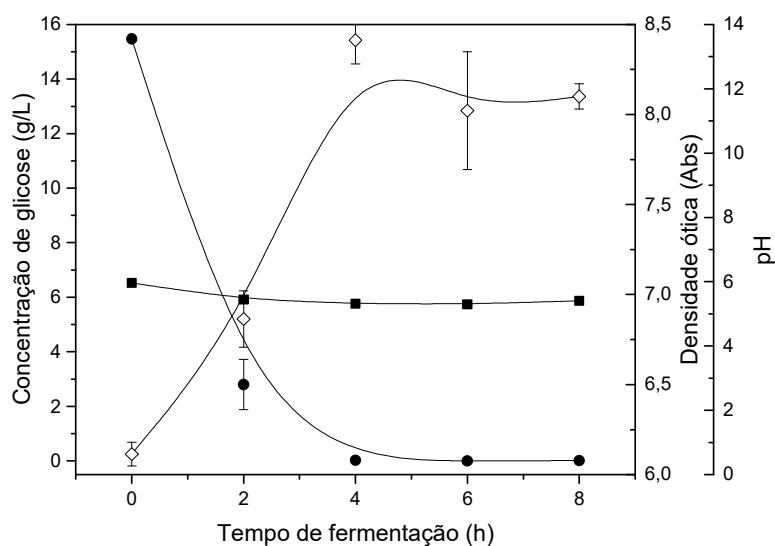
## ANEXO B

Curva de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* X2180.

a)



b)

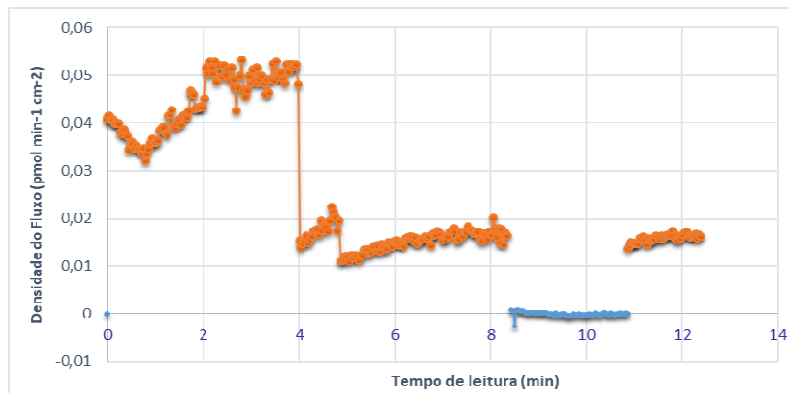


**Figura B1.** Crescimento celular de *S. cerevisiae* X2180 em shaker a 30°C e 200 rpm. **a)** utilizando 20% (v/v) do inóculo, **b)** utilizando 20 g/L de biomassa úmida. Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ◇ Densidade óptica (DO<sub>600 nm</sub>); ■ pH.

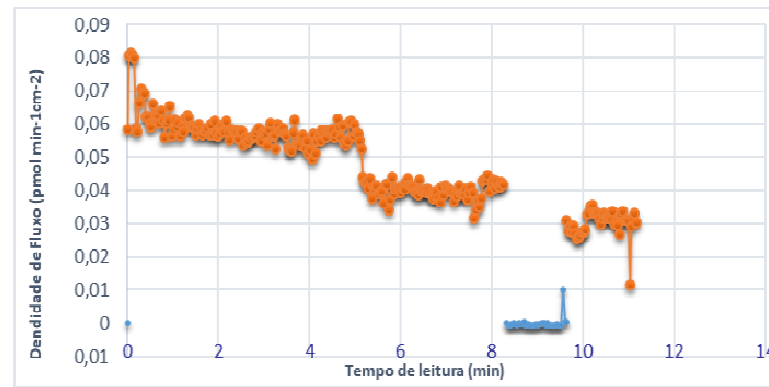
## ANEXO C

Gráficos da densidade de fluxo de prótons usando a técnica “*Scanning Ion-selective Electrode Technique*”(SIET)

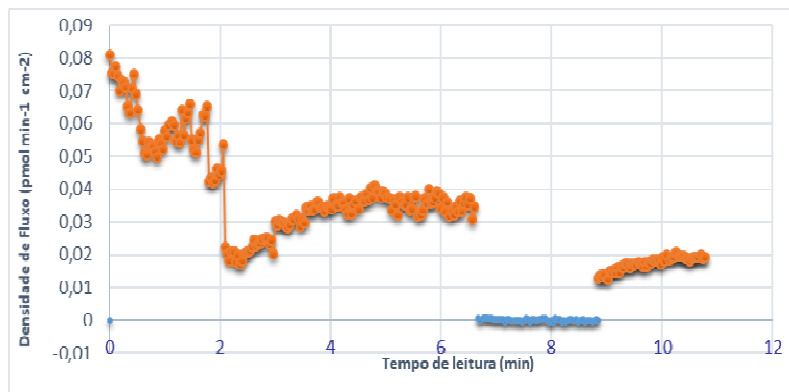
a)



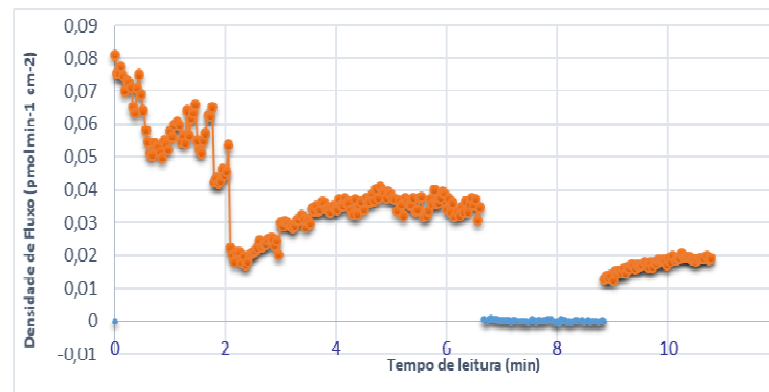
a')



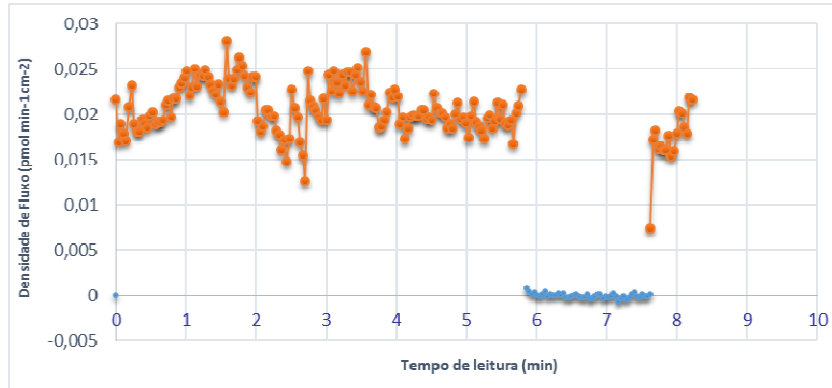
b)



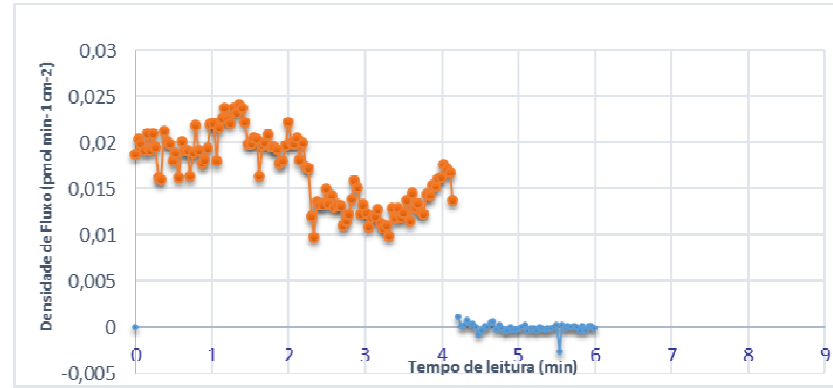
b')



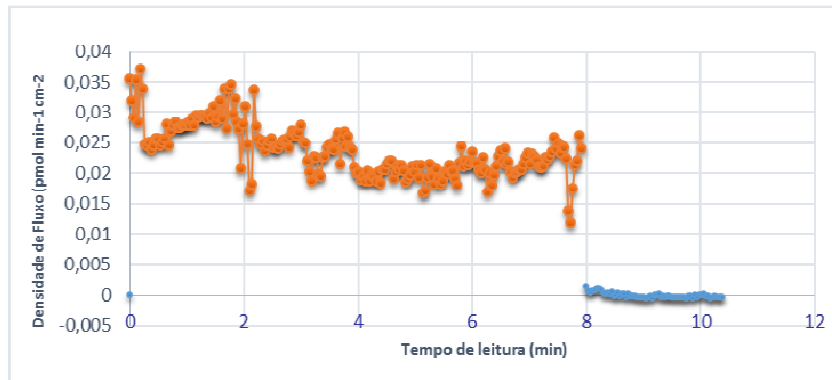
c)



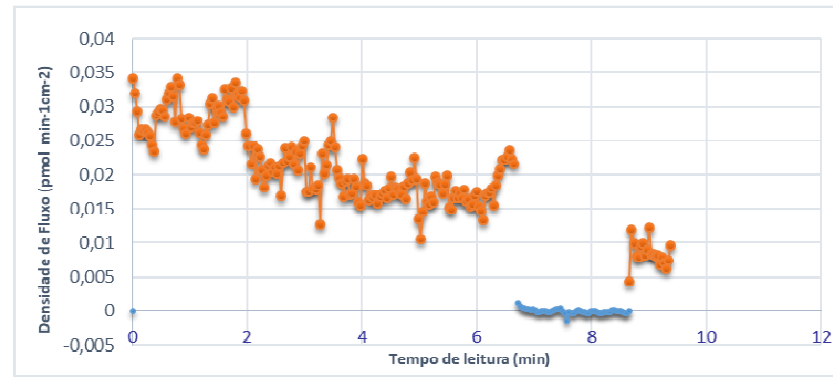
c')



d)

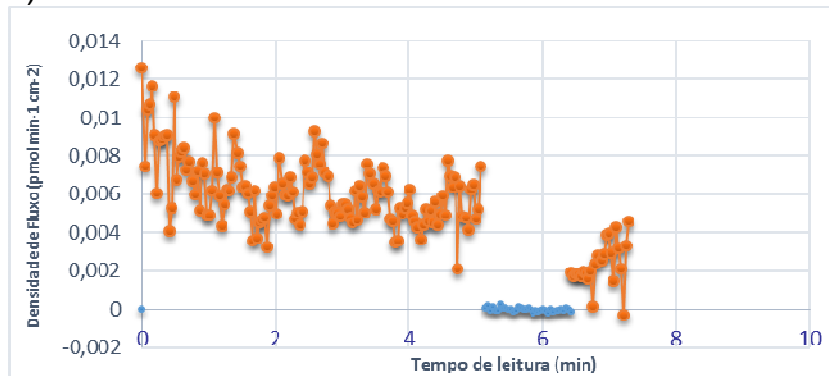


d')

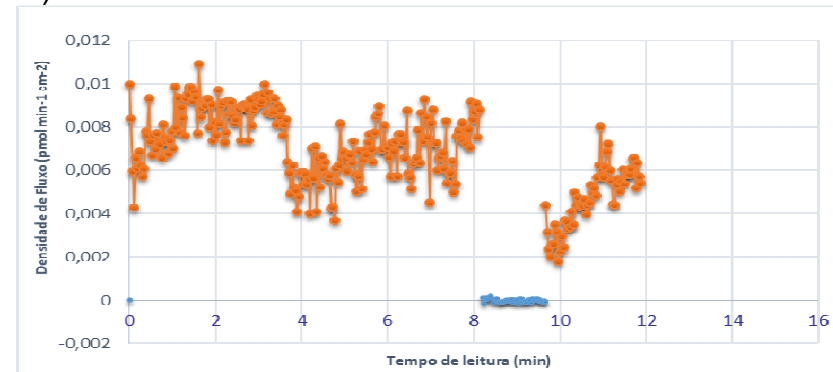




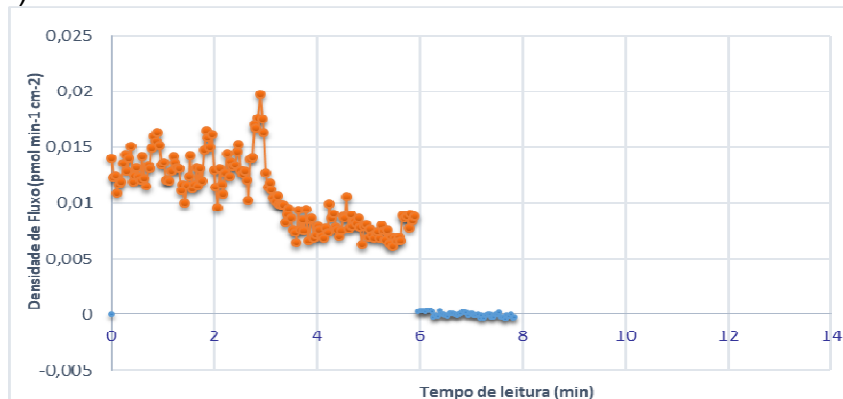
e)



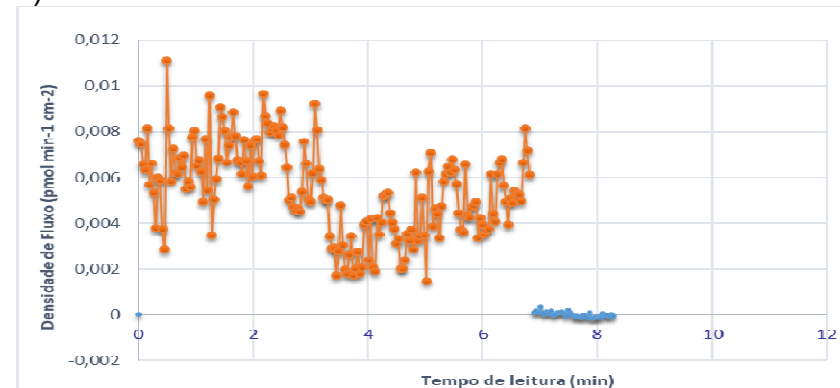
e')



f)

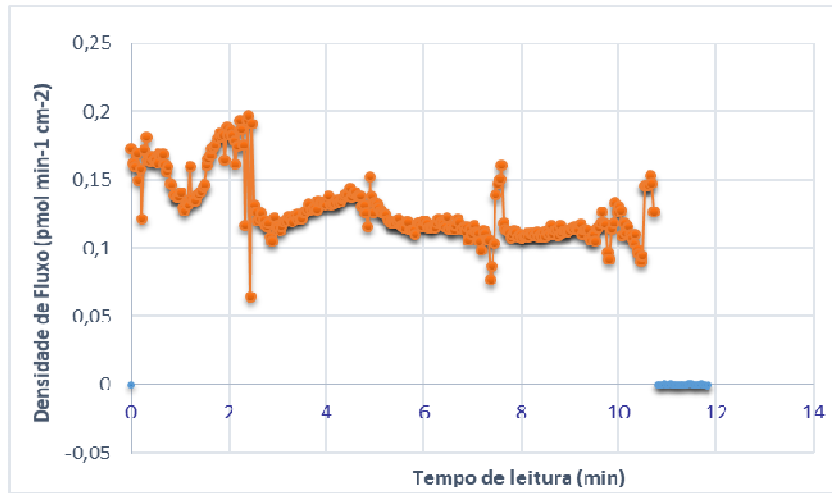


f')

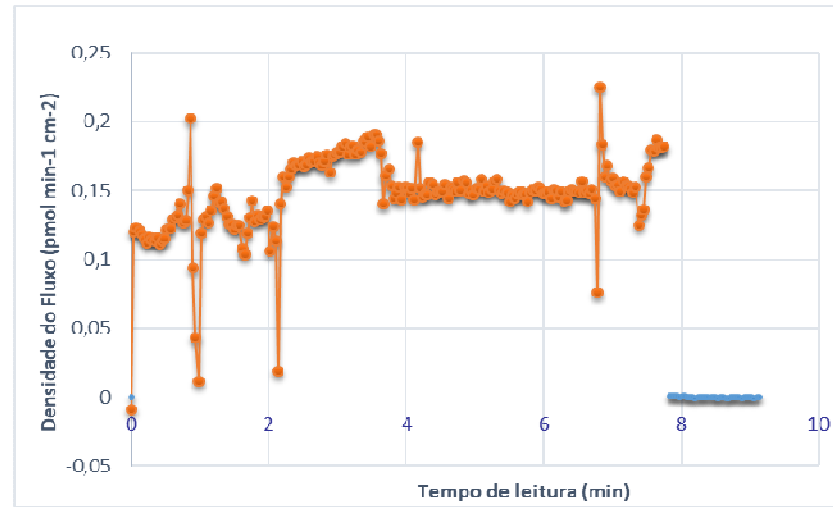


**Figura C1.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator sem aplicação de campo magnético – CONTROLE (Experimento nº 0 - repetição 2) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e'); 10 h (f e f').

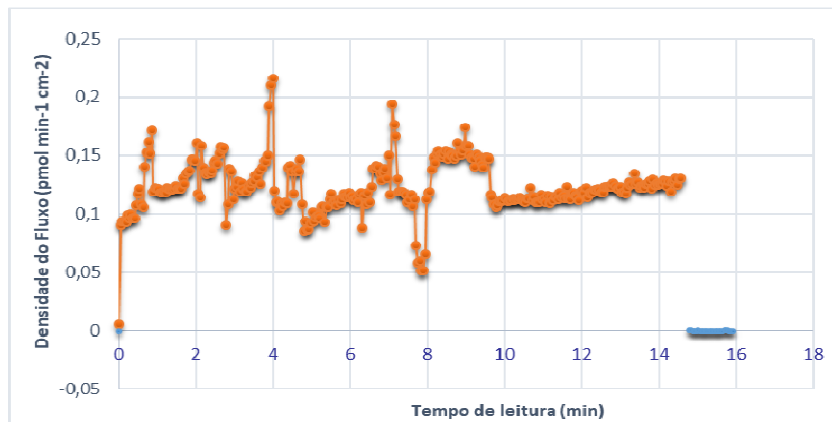
a)



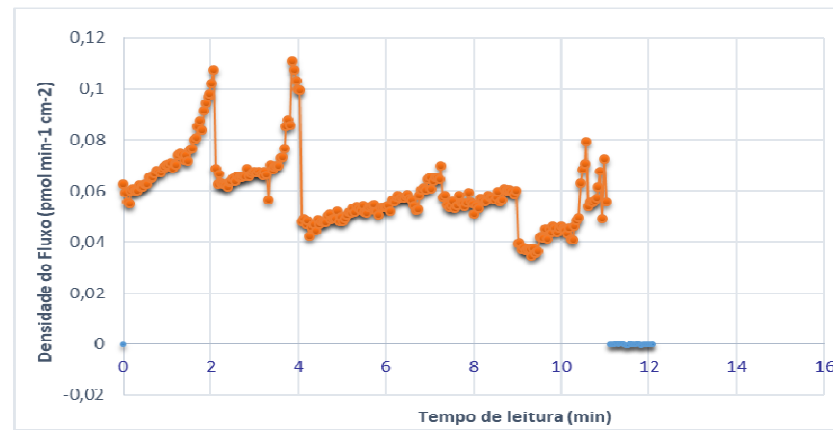
a')



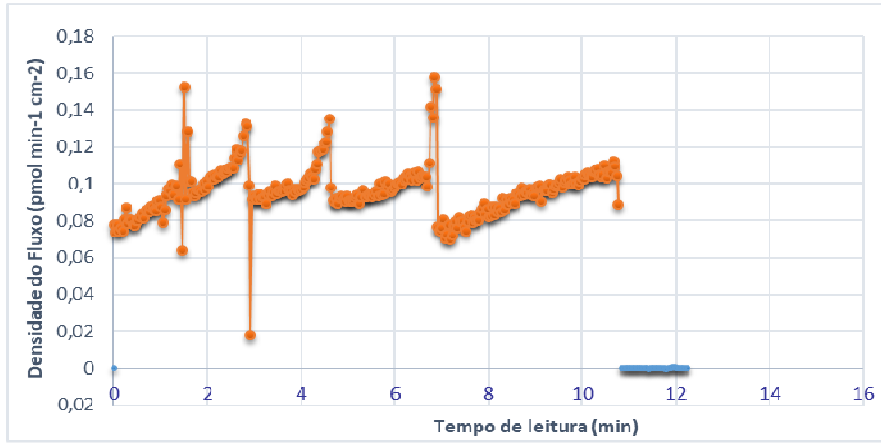
b)



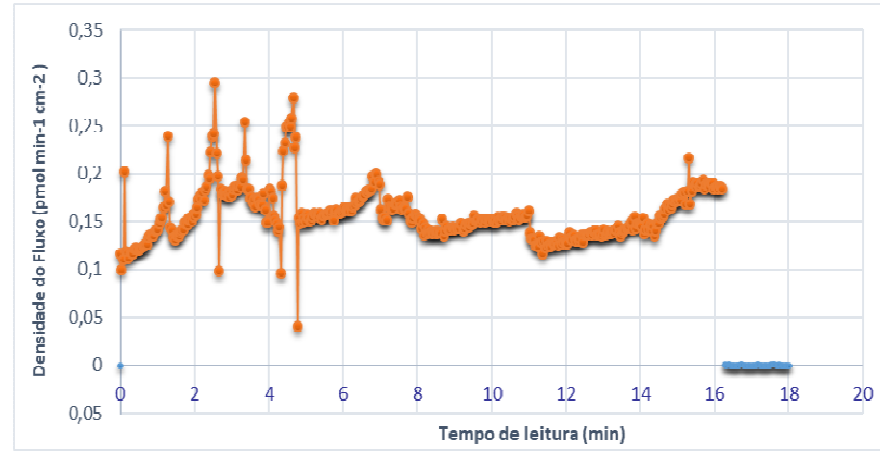
b')



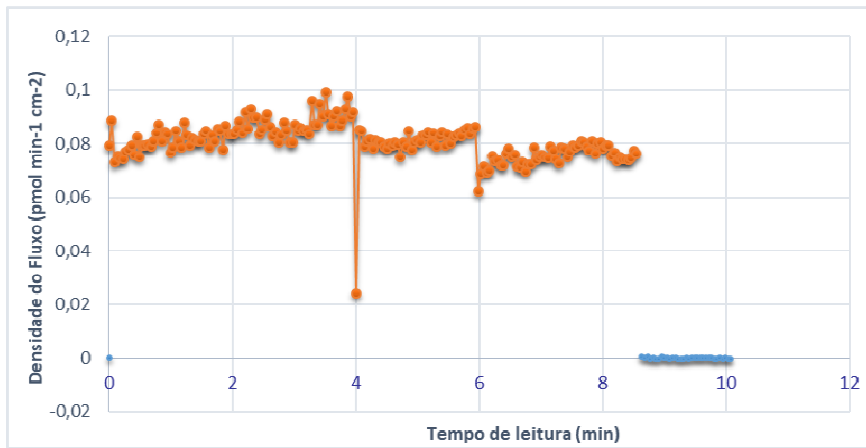
c)



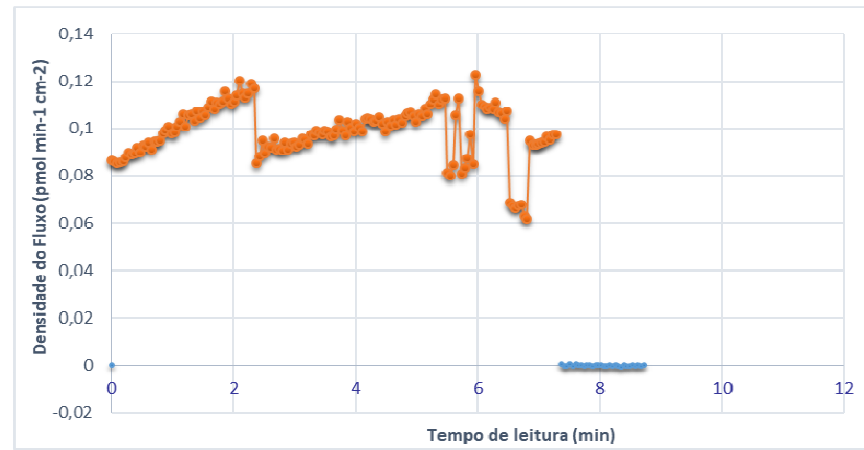
c')



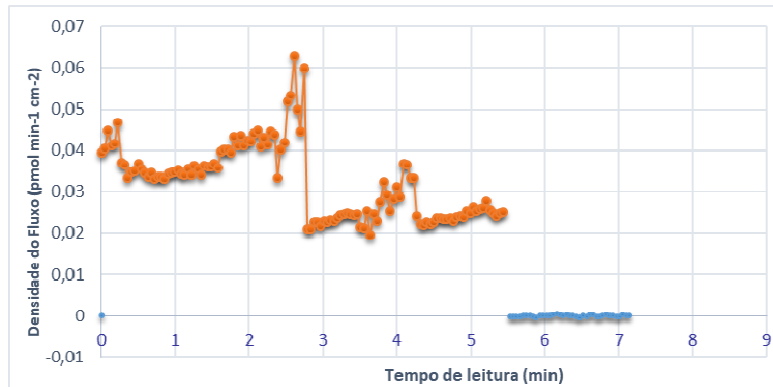
d)



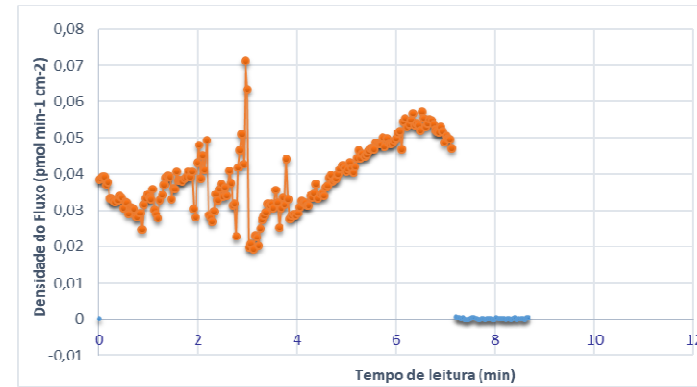
d')



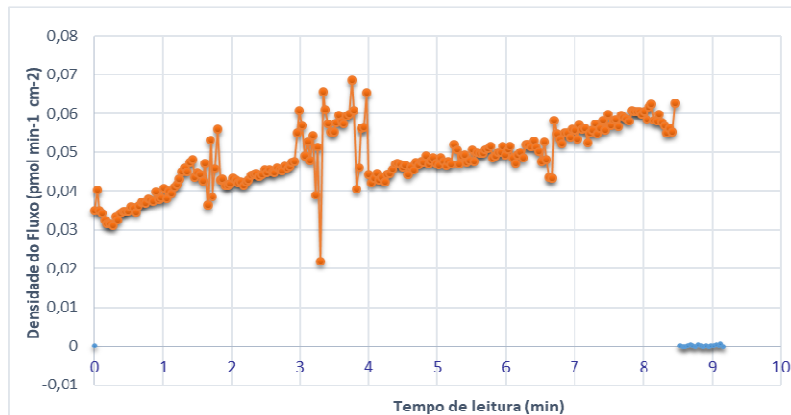
e)



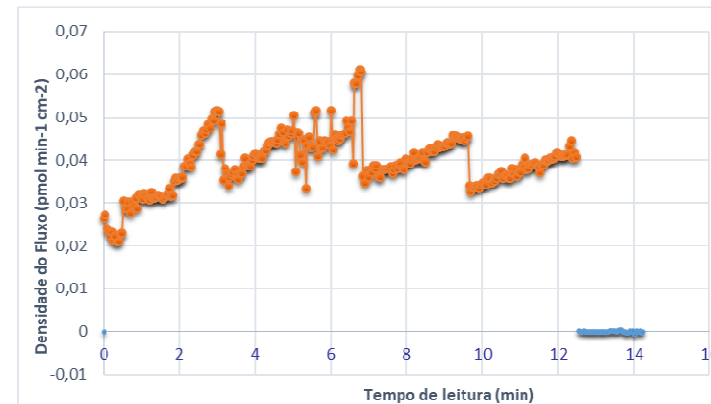
e')



f)

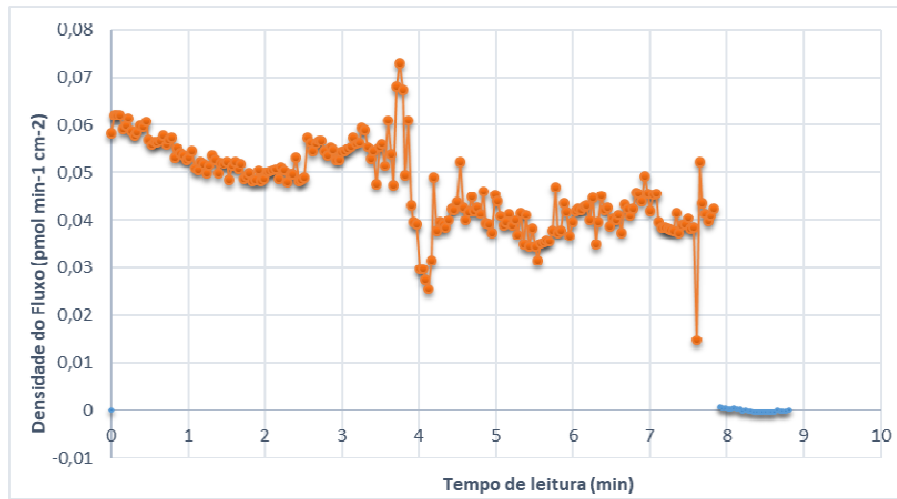


f')

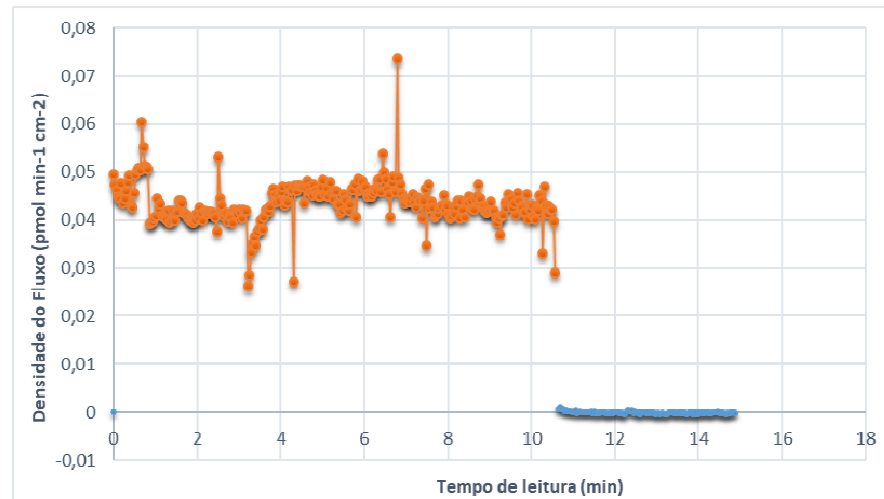


**Figura C2.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator sem aplicação de campo magnético – CONTROLE (Experimento nº0 - repetição 1) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e'); 10 h (f e f').

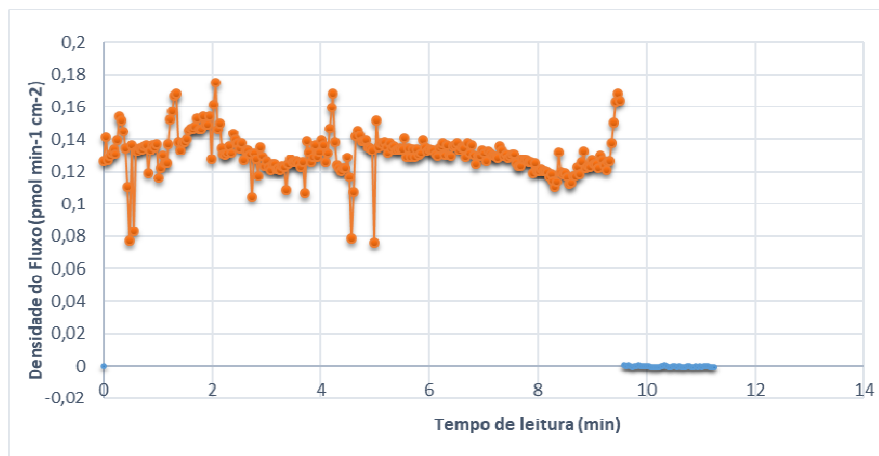
a)



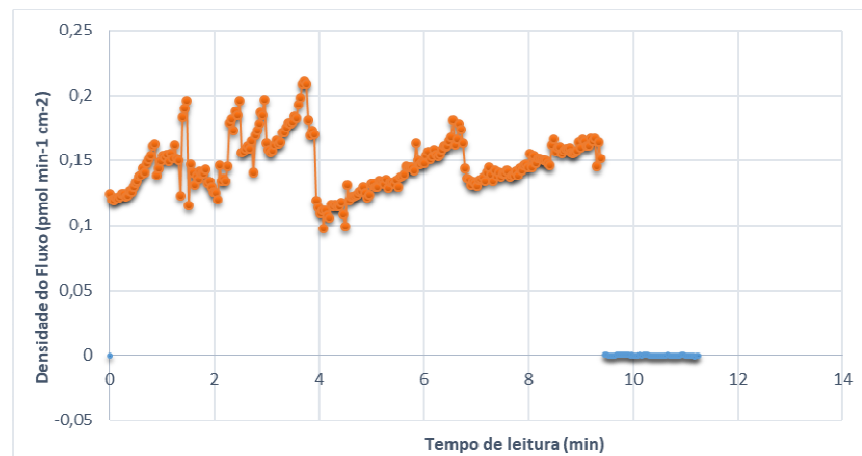
a')



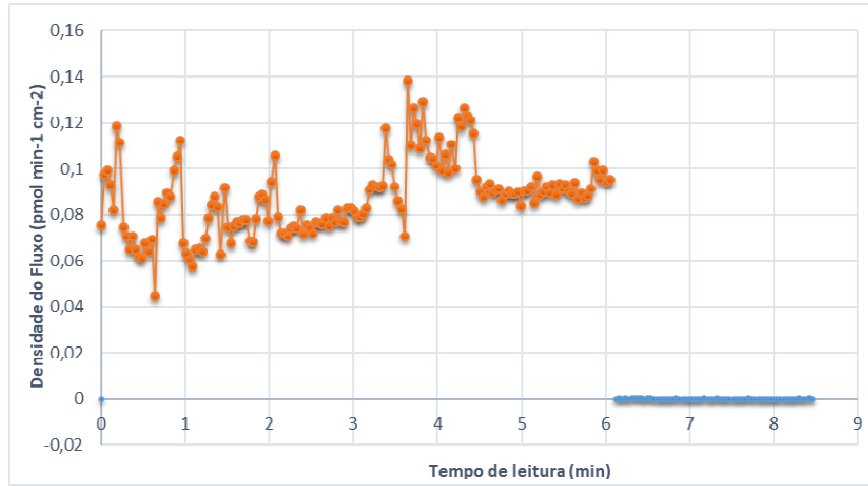
b)



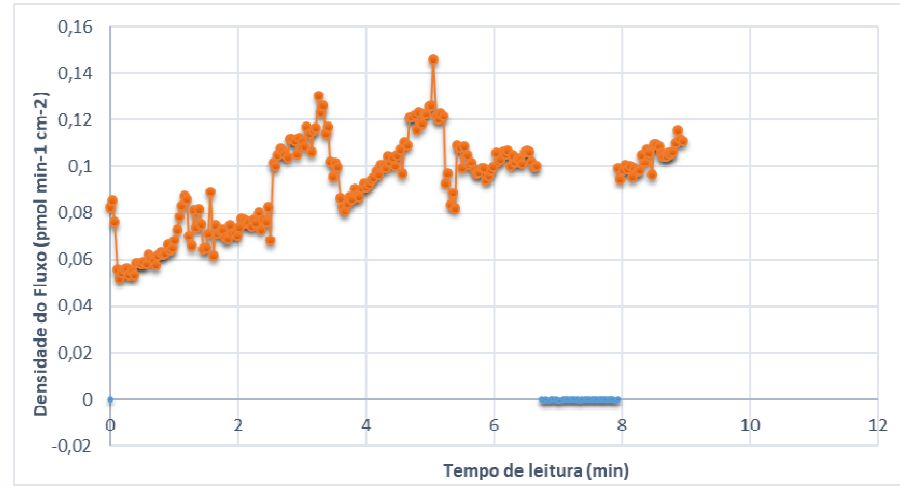
b')



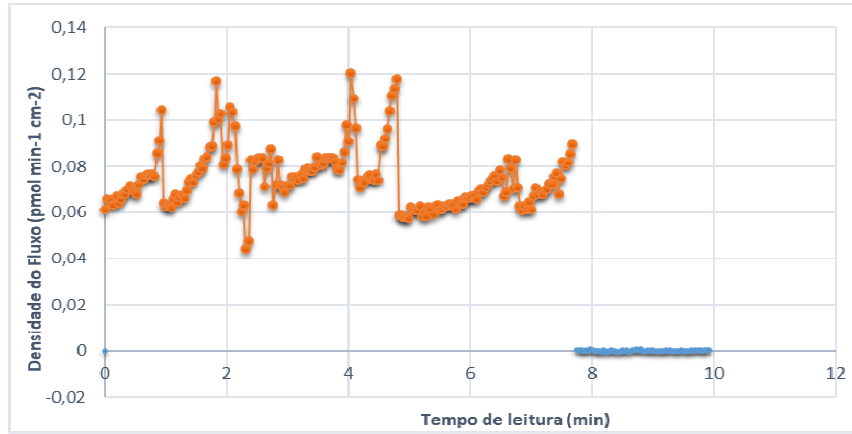
c)



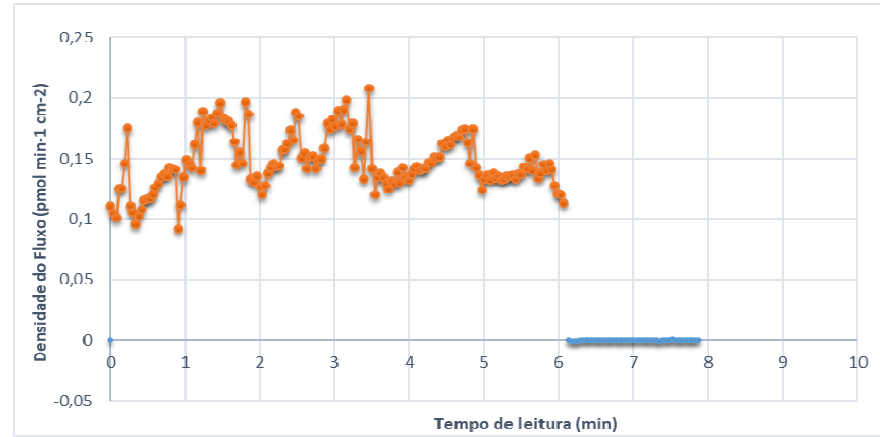
c')



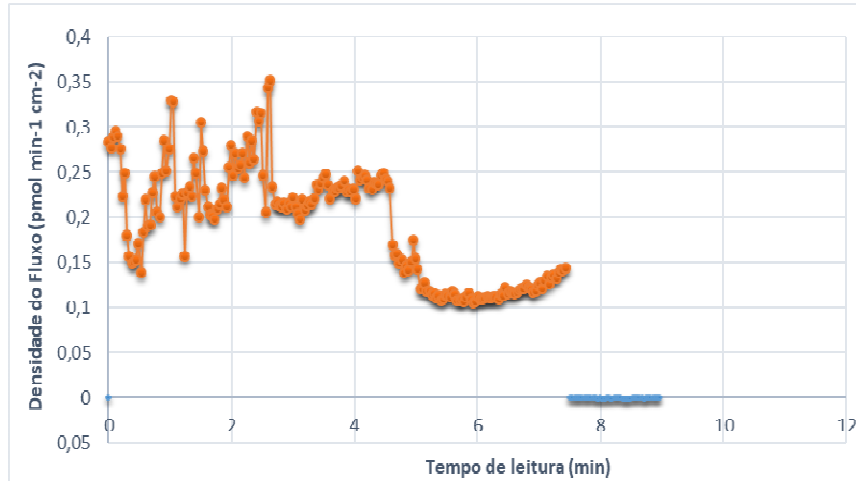
d)



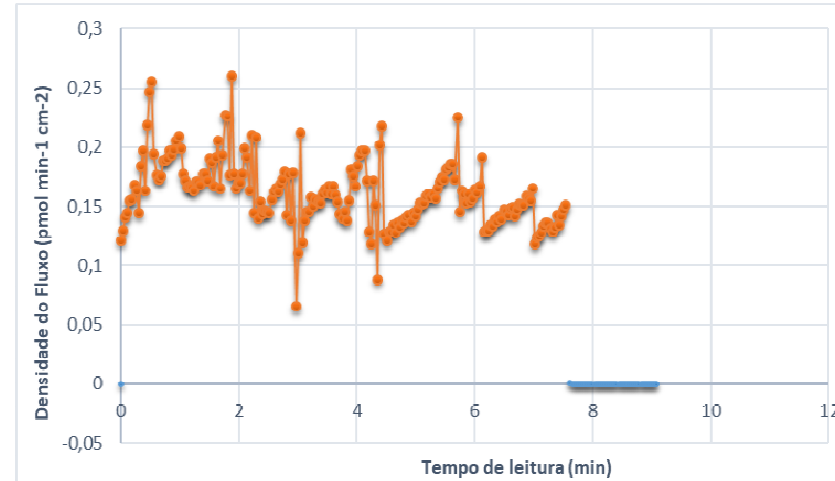
d')



e)

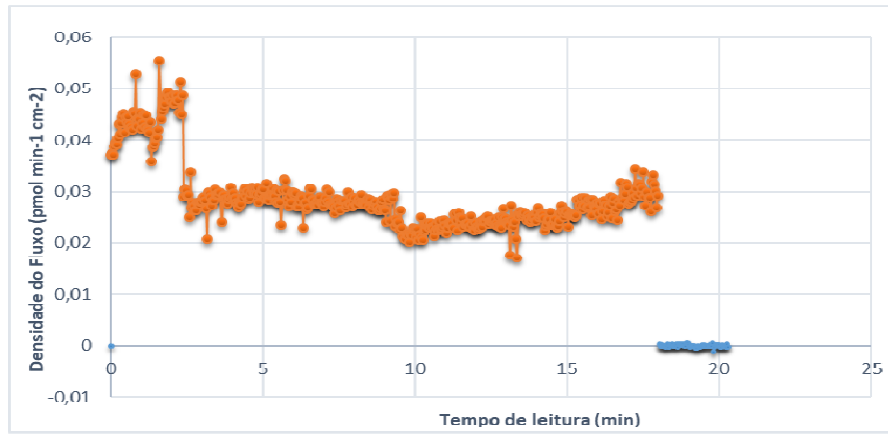


e')

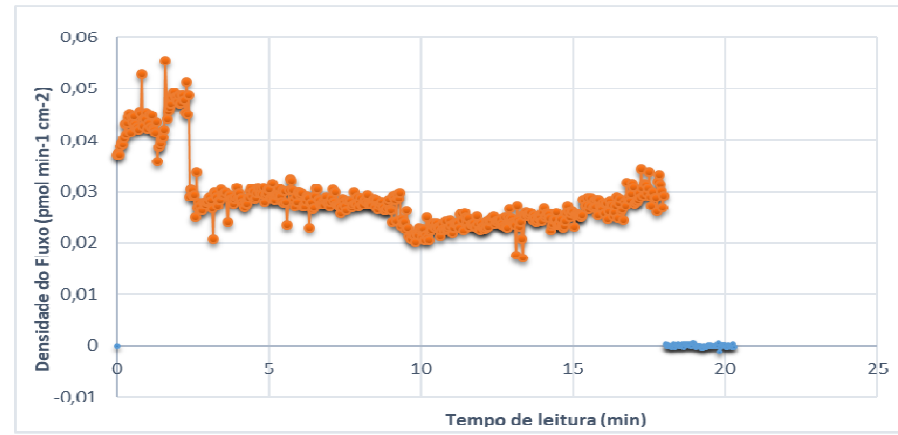


**Figura C3.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento n°1) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

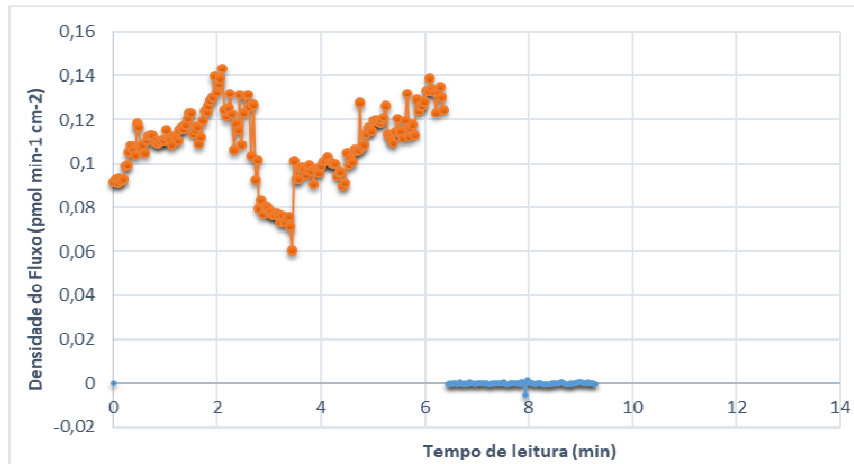
a)



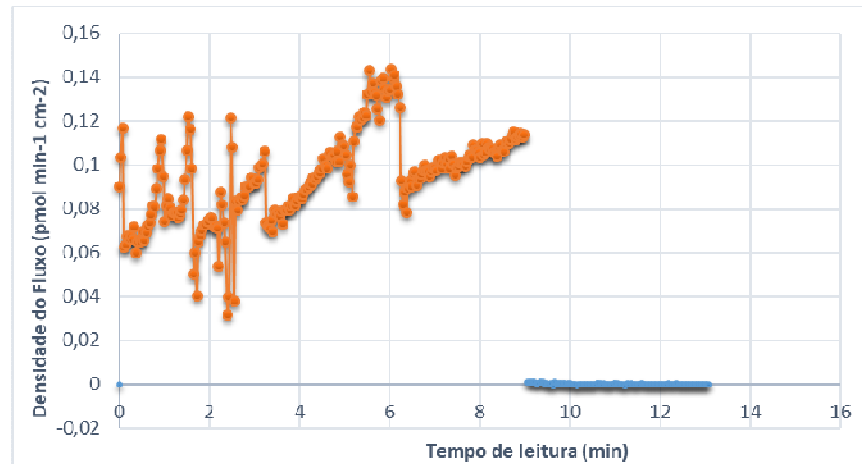
a')



b)

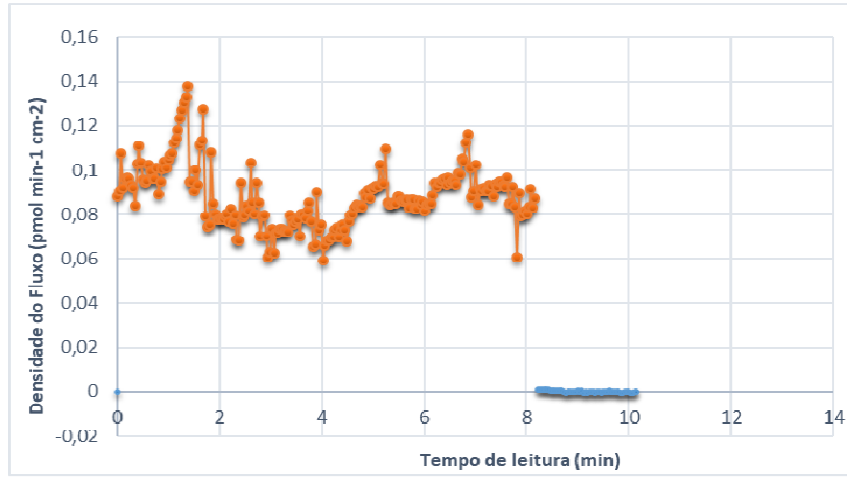


b')

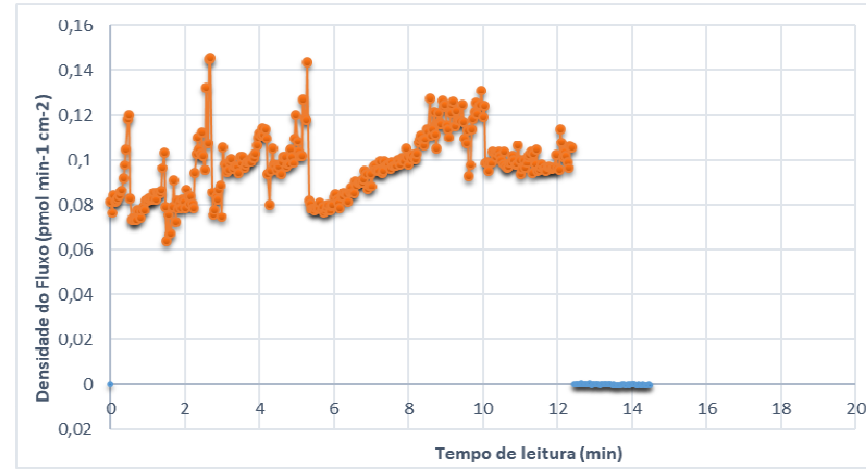




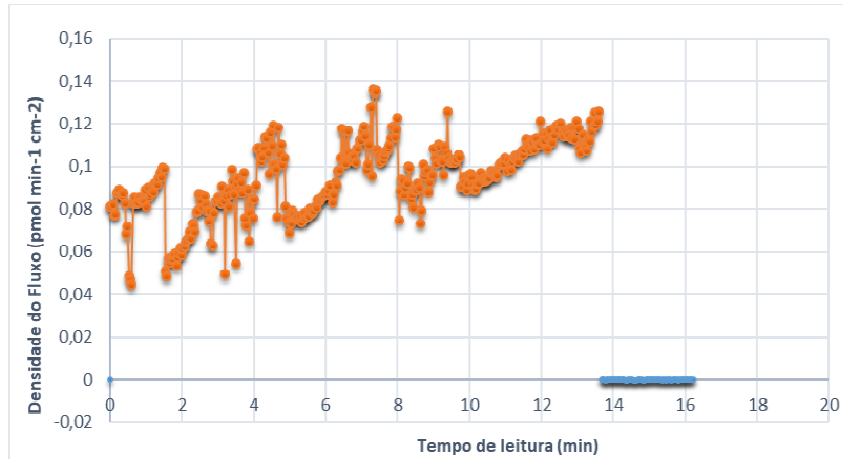
c)



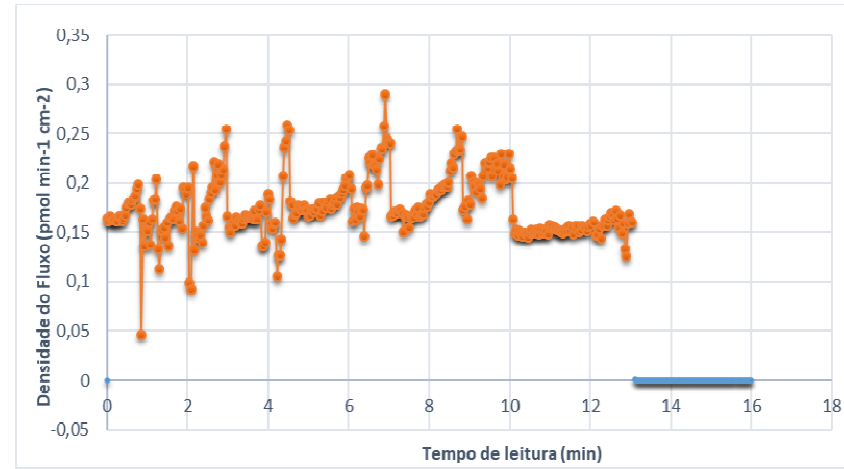
c')



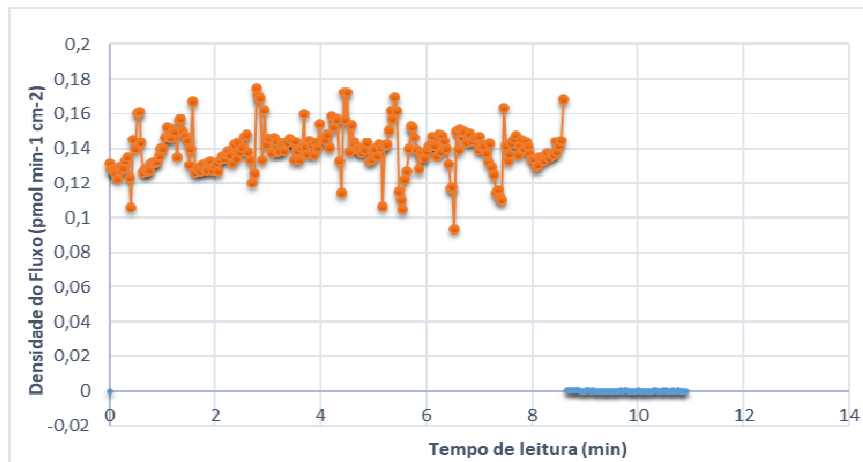
d)



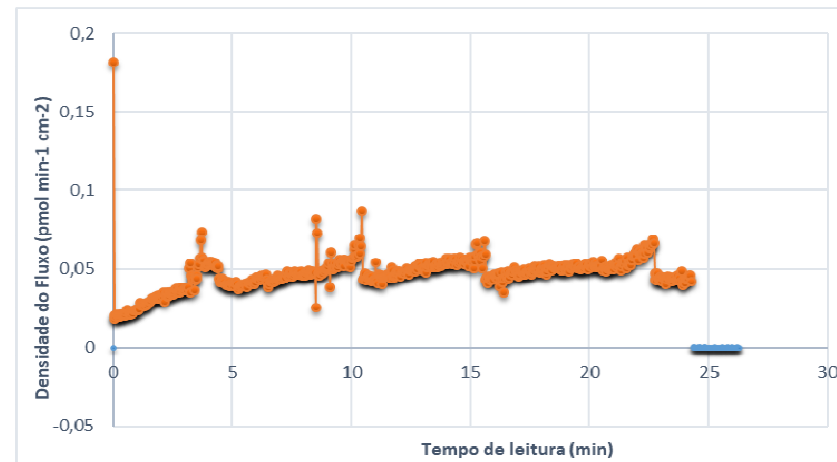
d')



e)

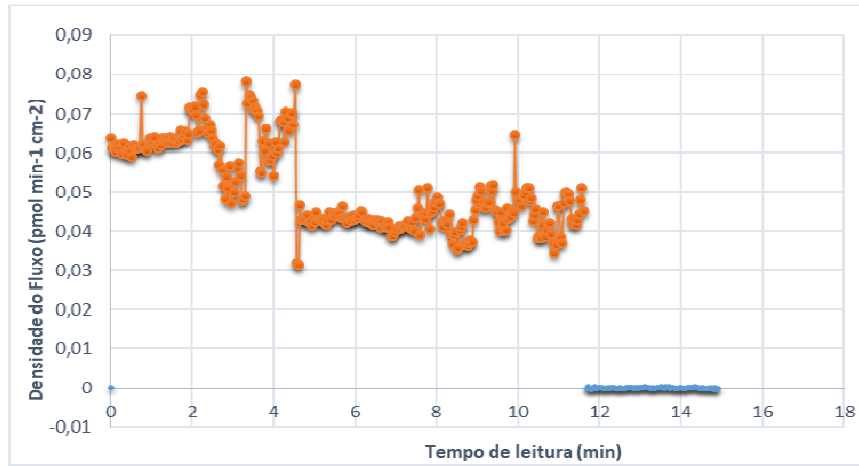


e')

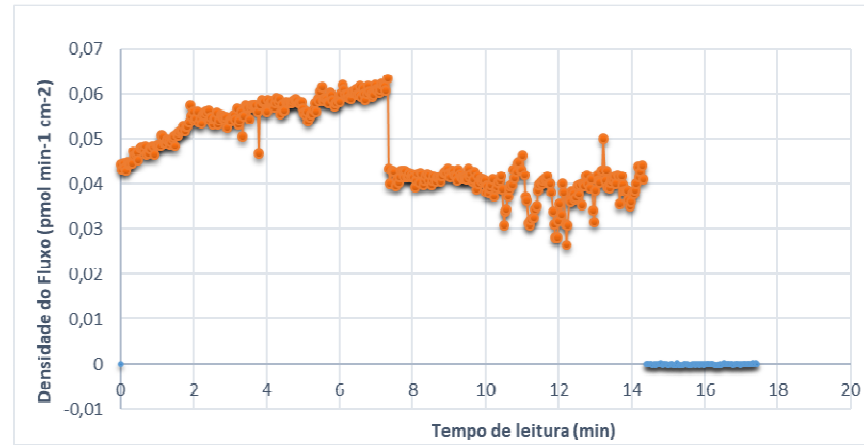


**Figura C4.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento nº2) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

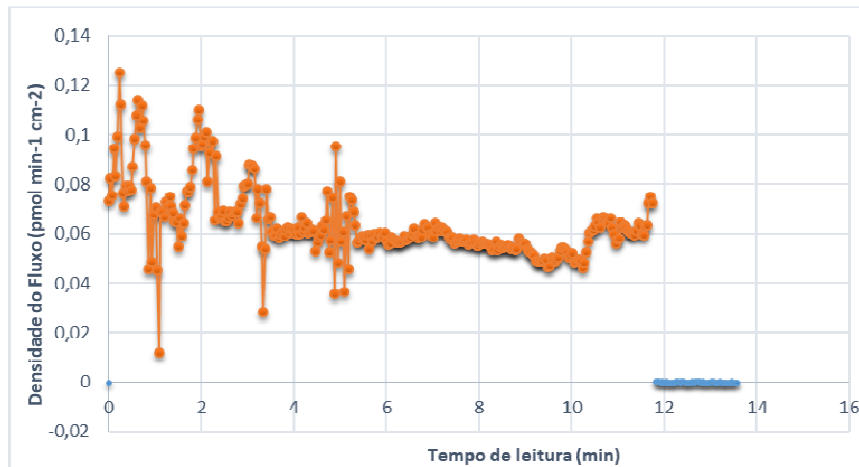
a)



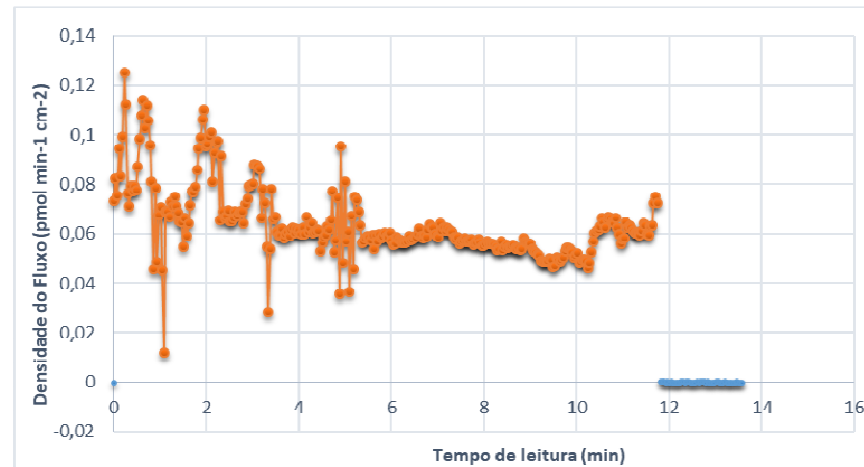
a')



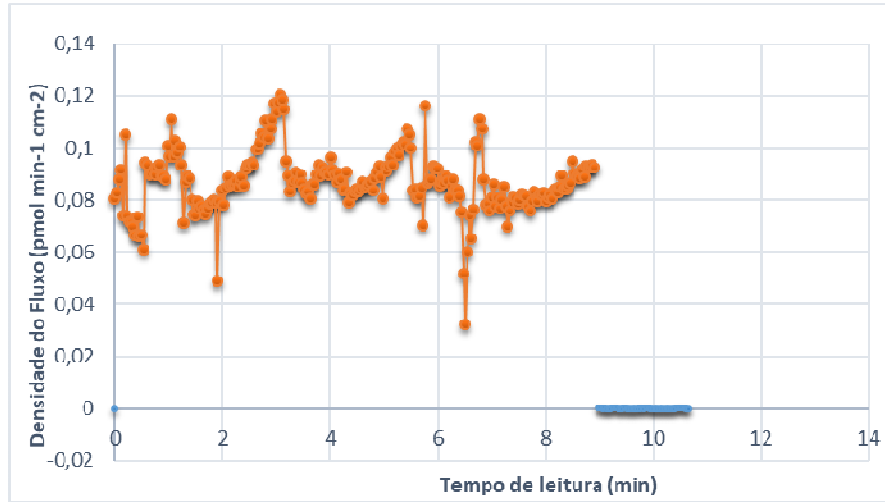
b)



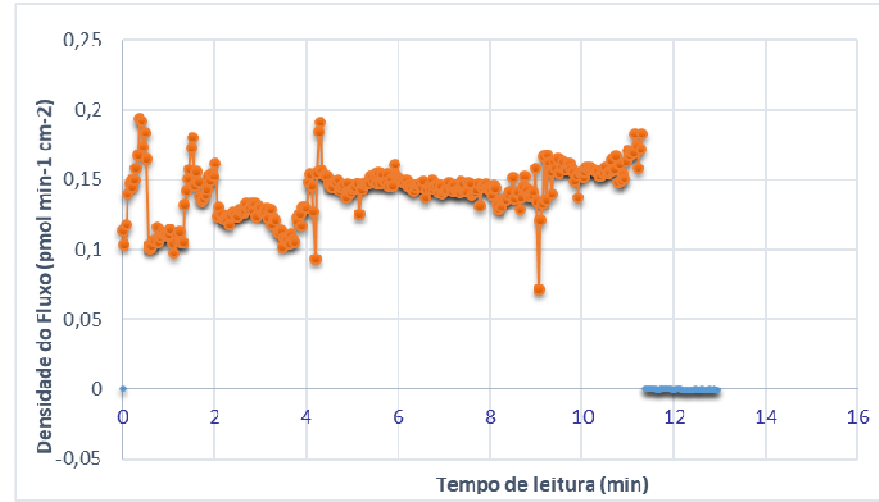
b')



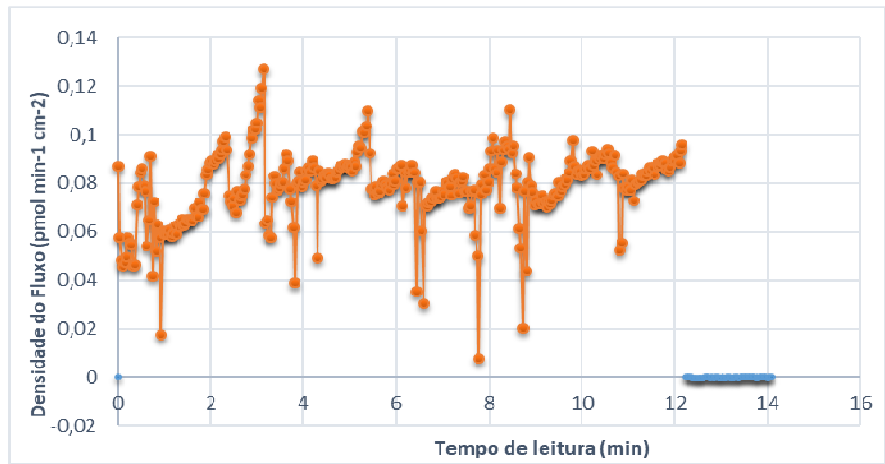
c)



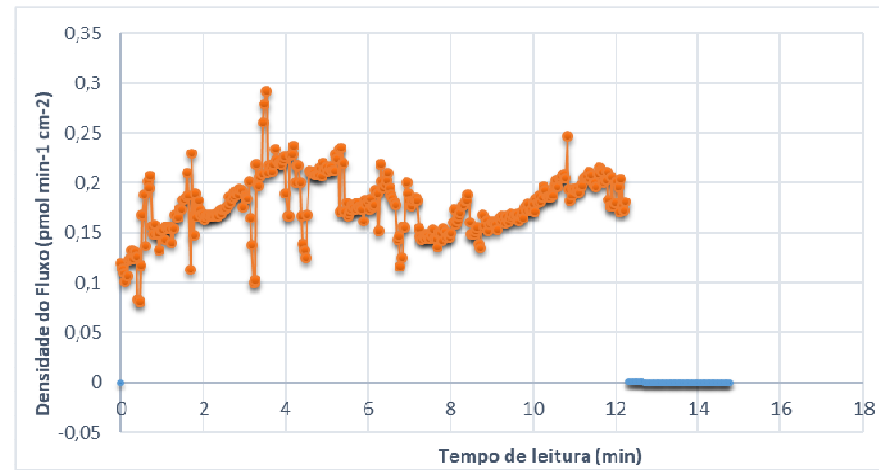
c')



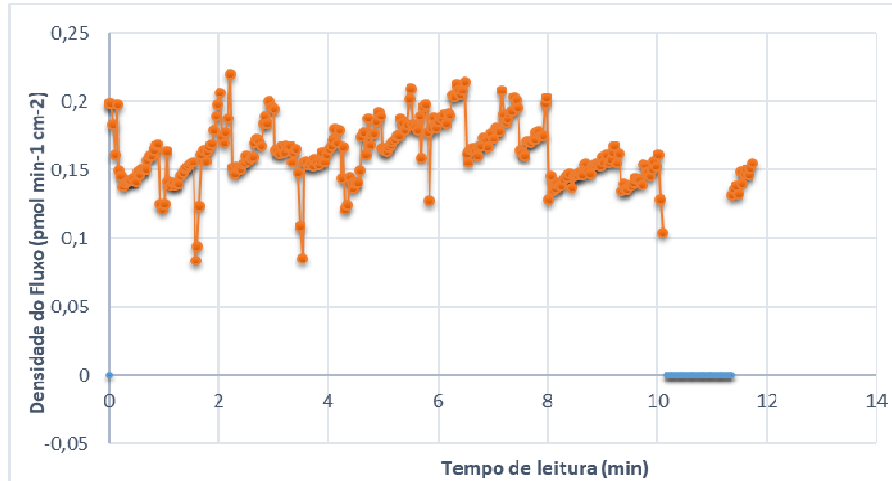
d)



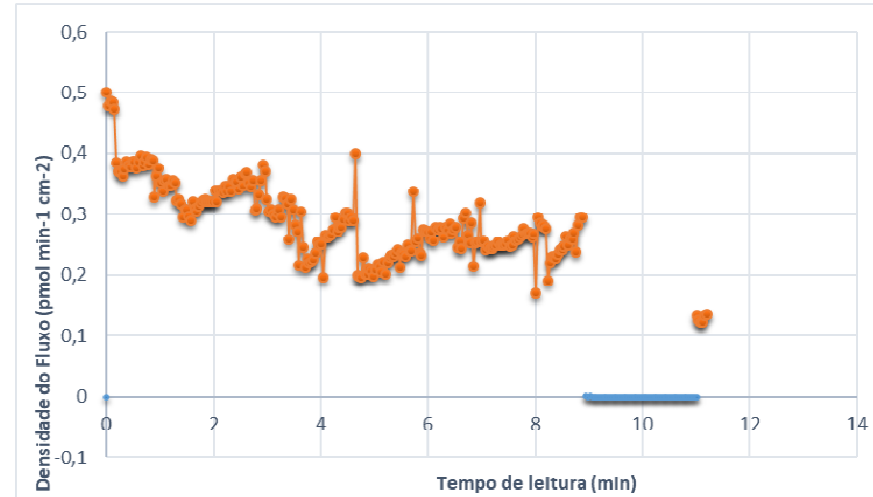
d')



e)

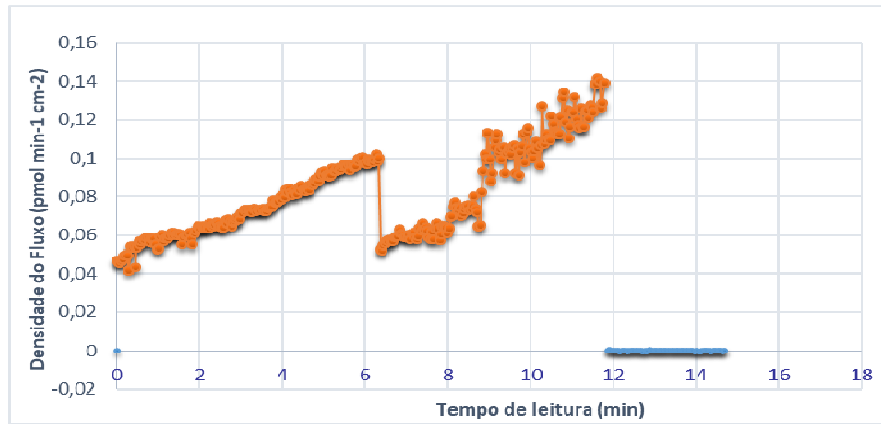


e')

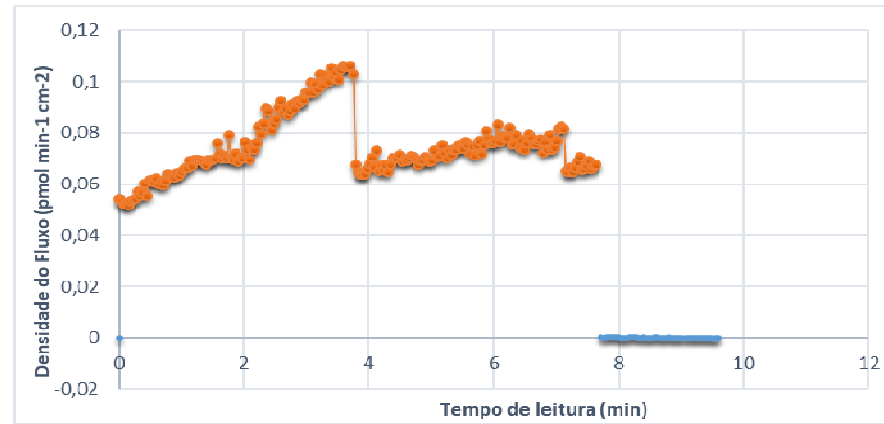


**Figura C5.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento nº3) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

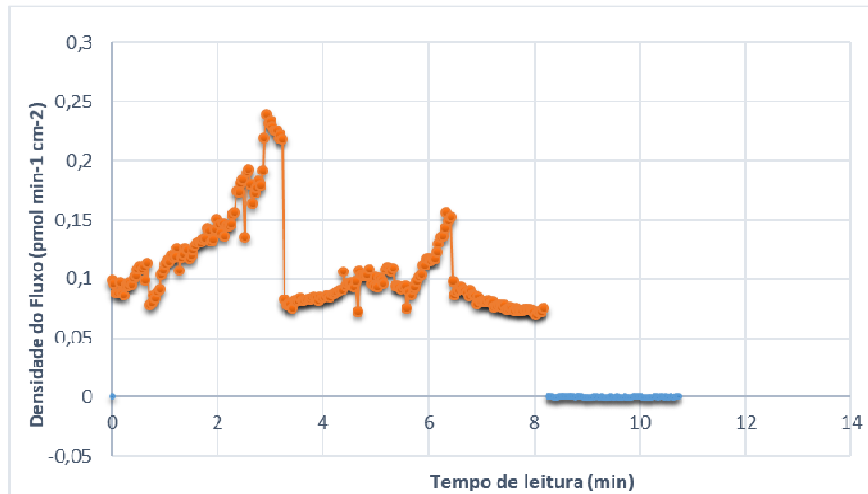
a)



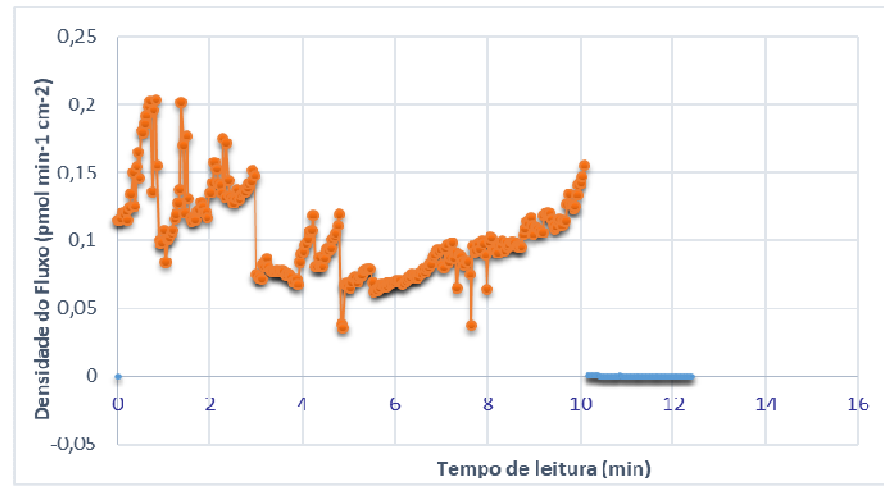
a')



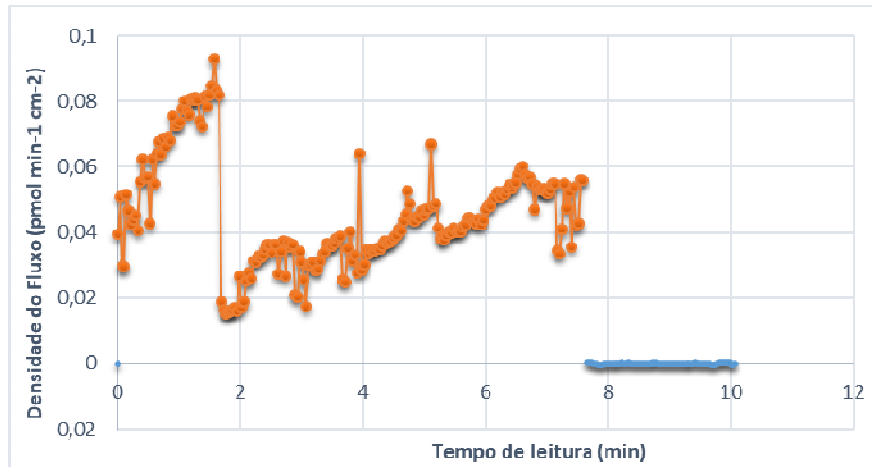
b)



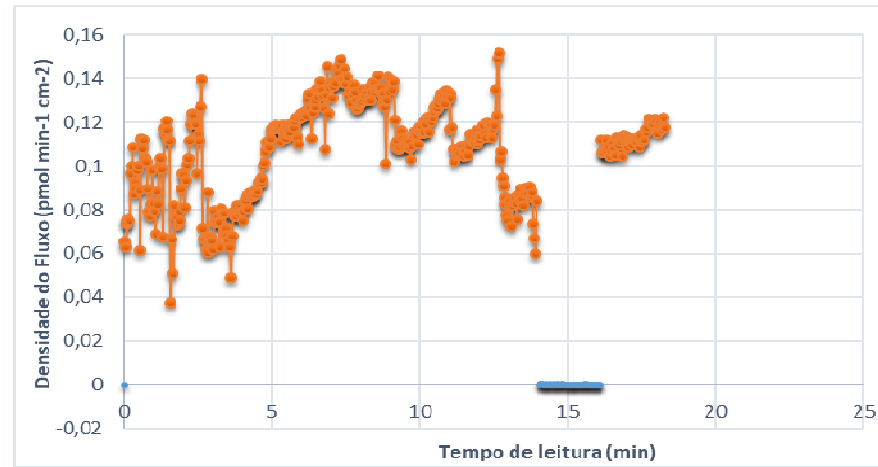
b')



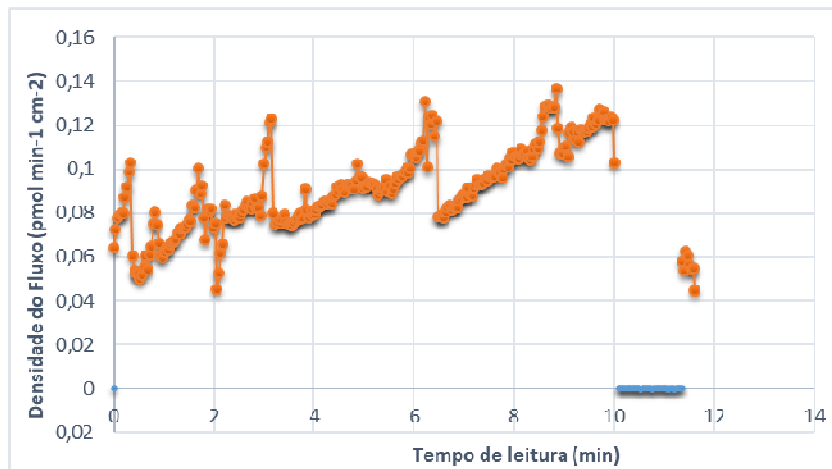
c)



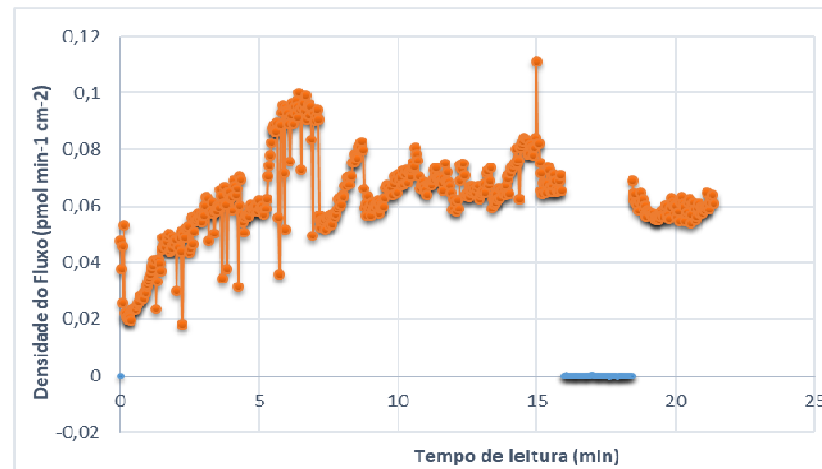
c')



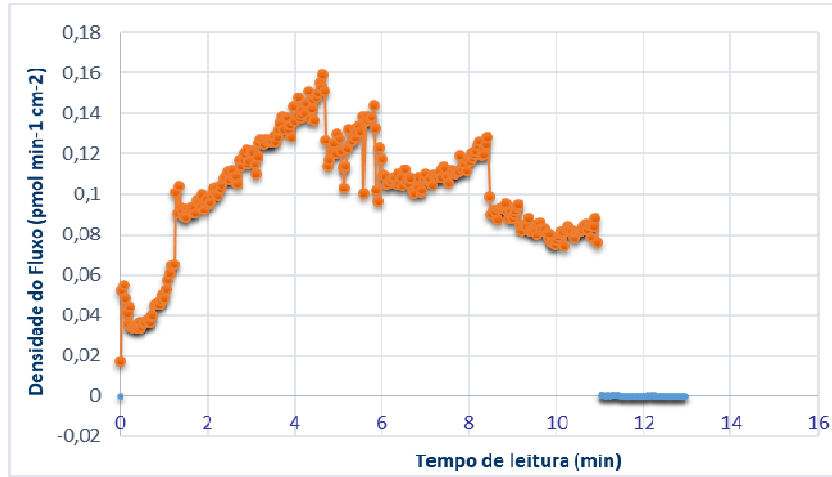
d)



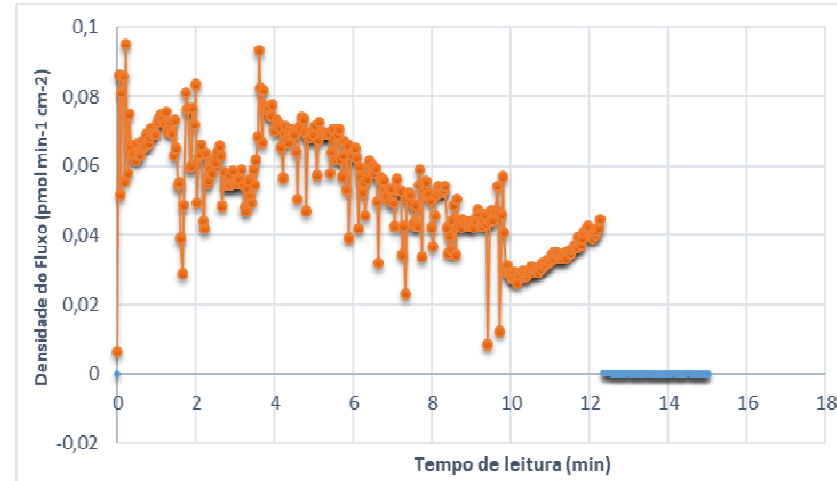
d')



e)



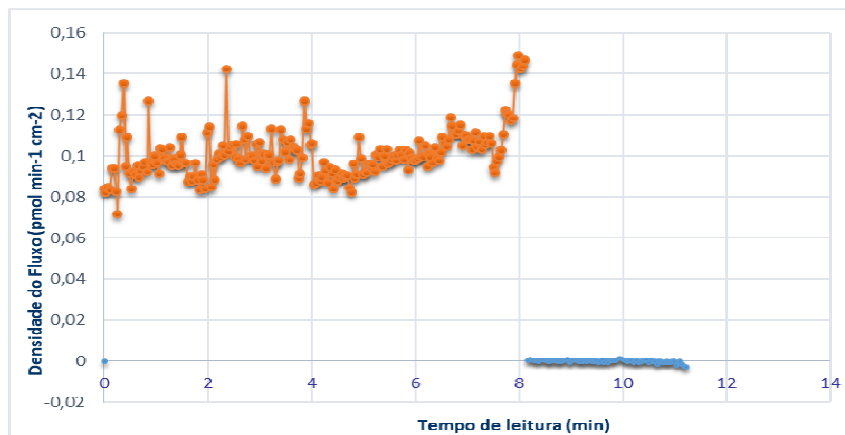
e')



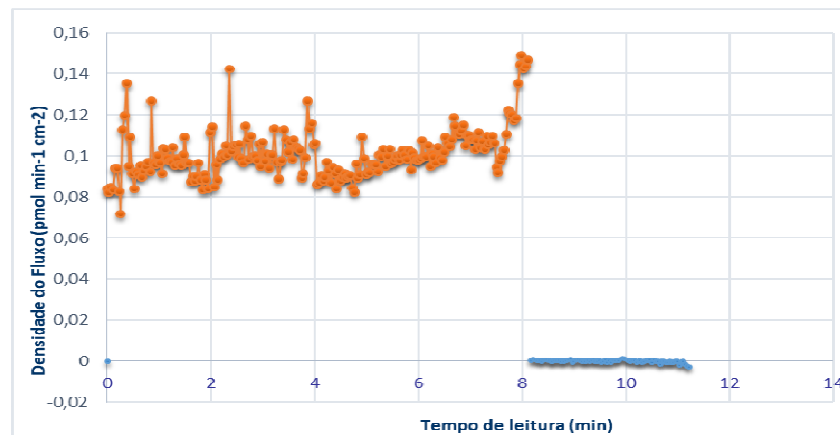
**Figura C6.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento n<sup>o</sup>4) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e').



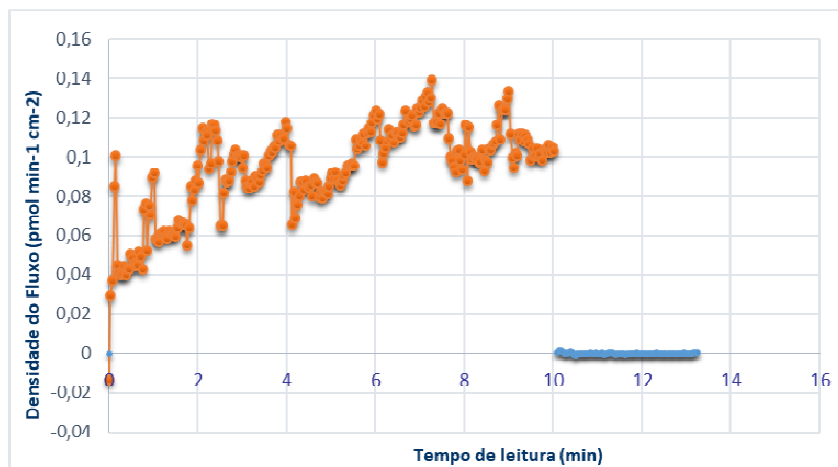
a)



a')



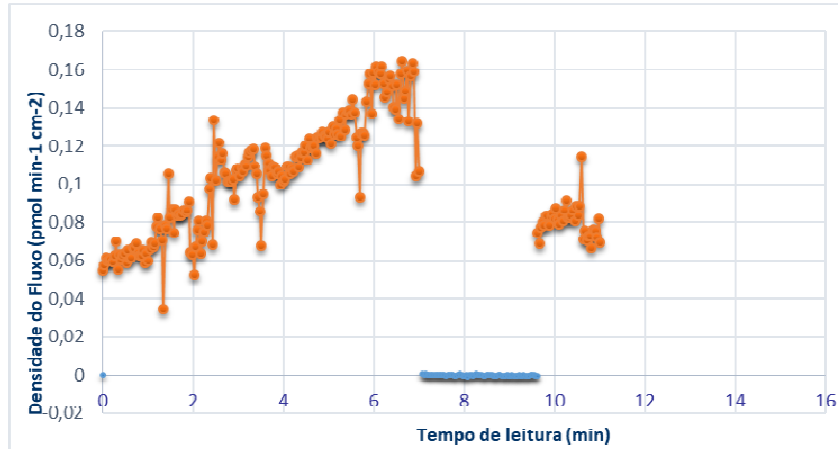
b)



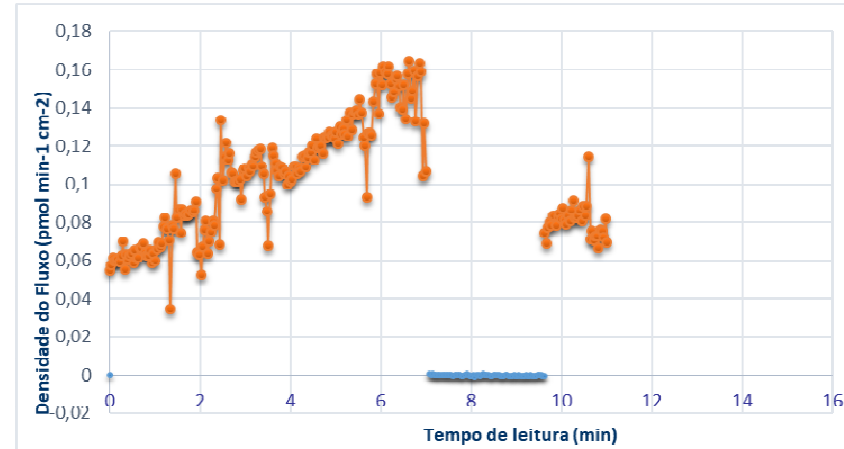
b')



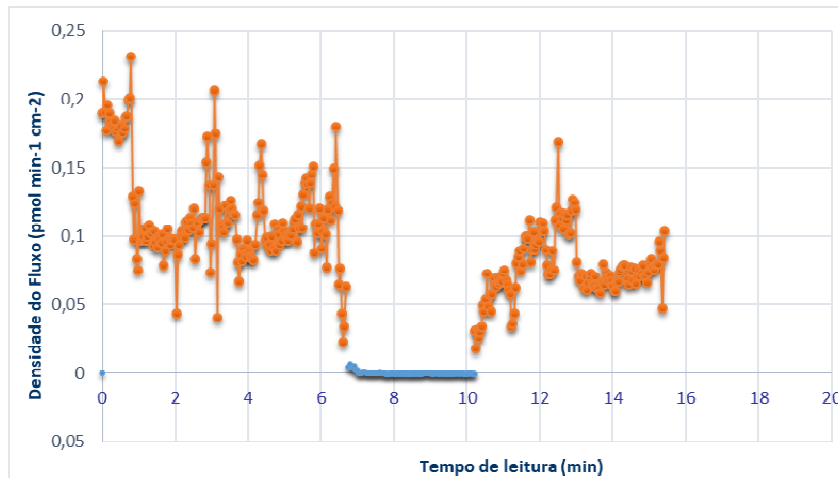
c)



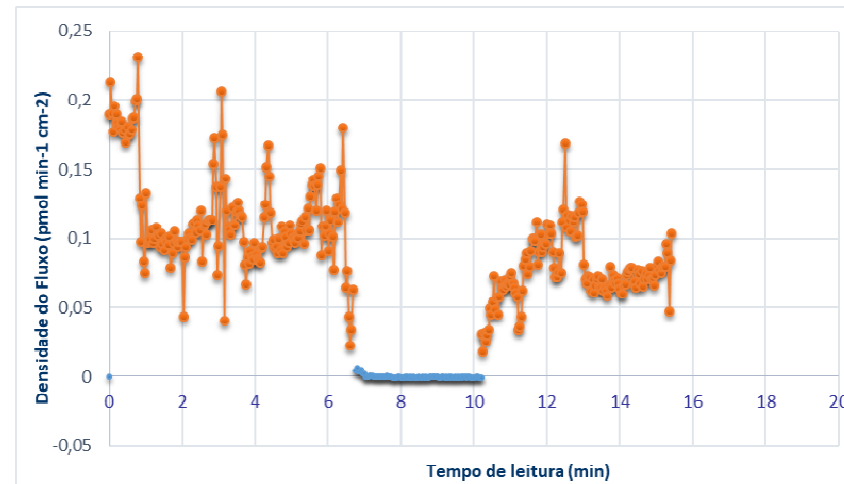
c')



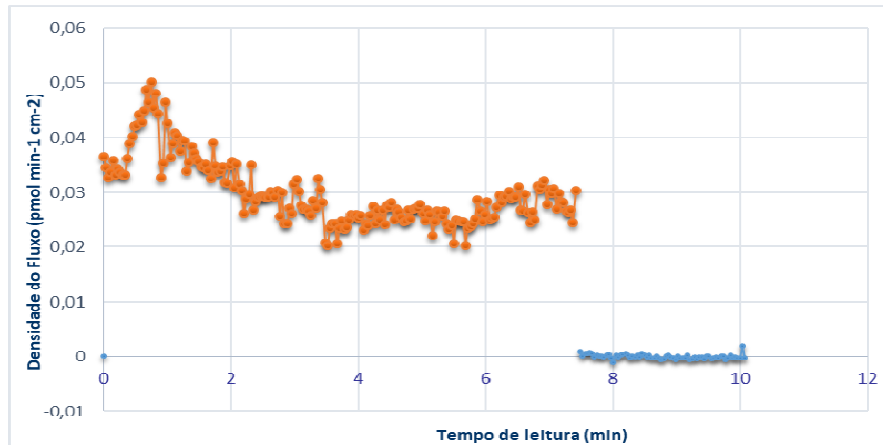
d)



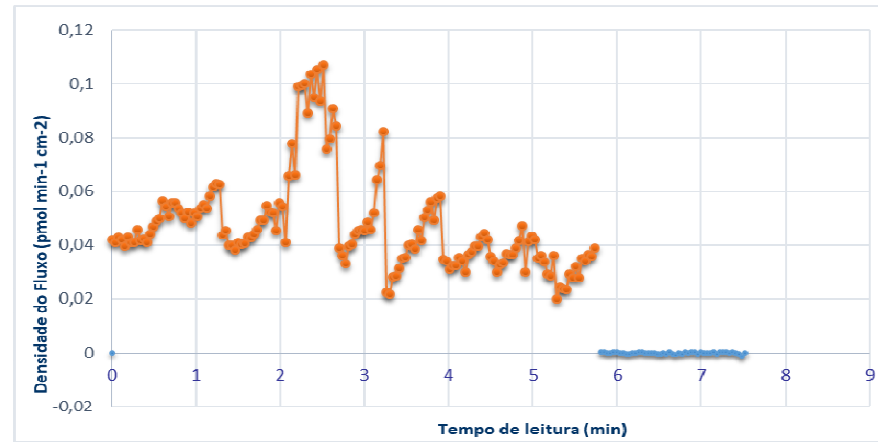
d')



e)

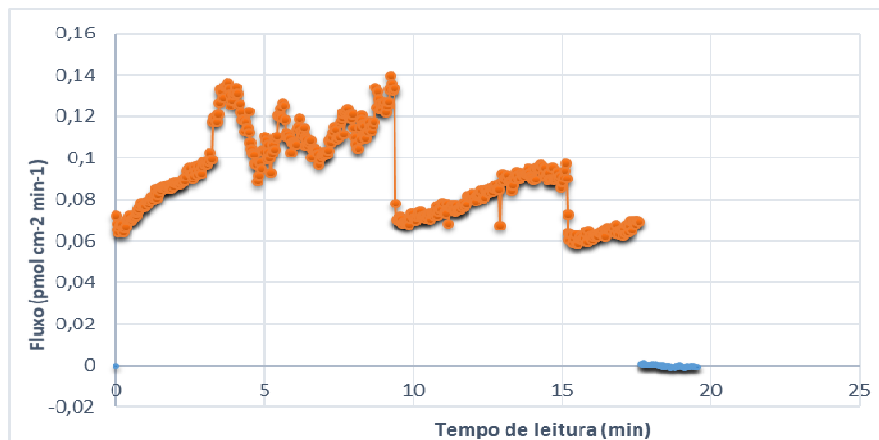


e')

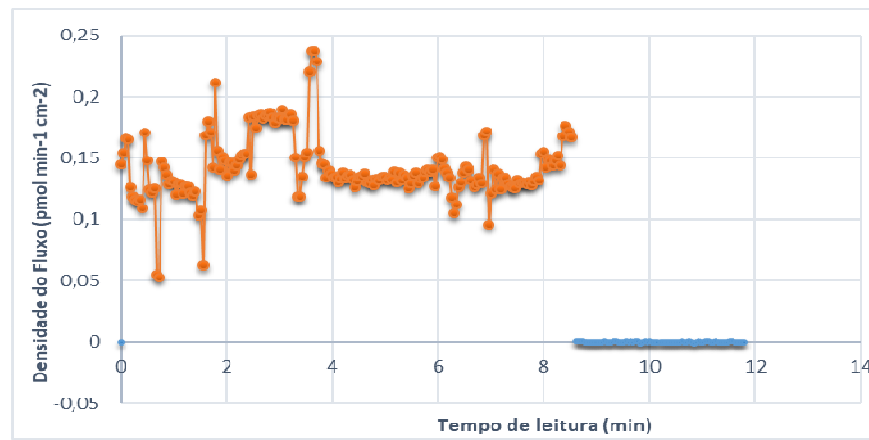


**Figura C7.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em espiral e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº5) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

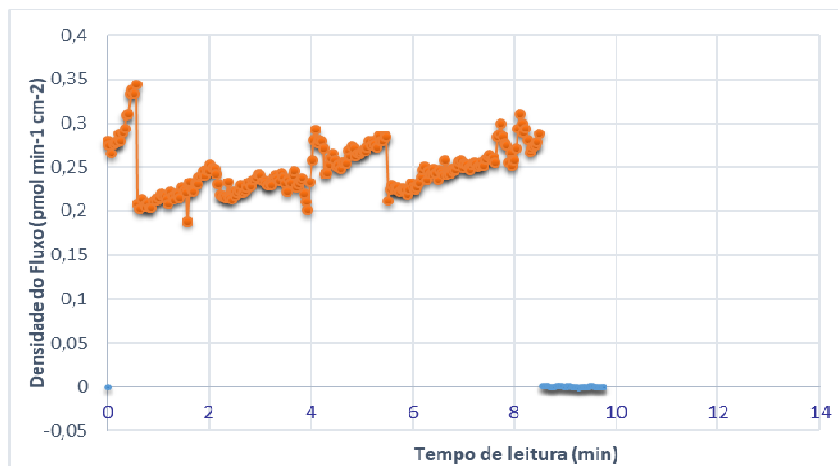
a)



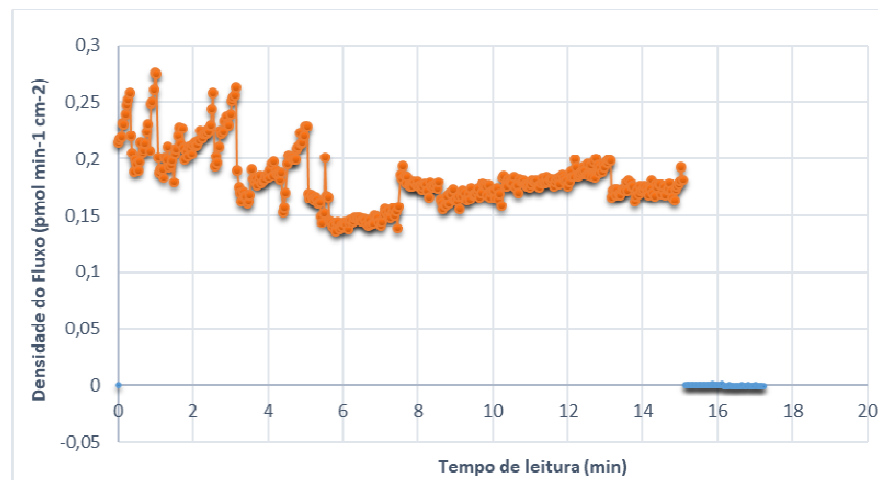
a')



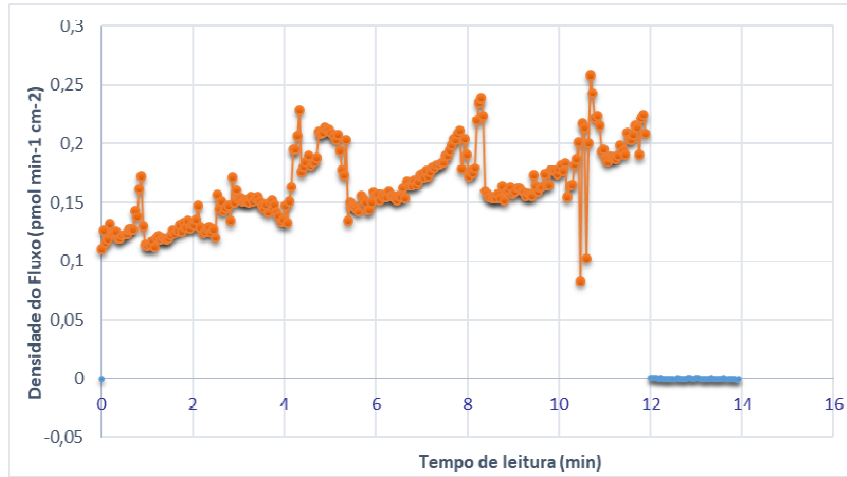
b)



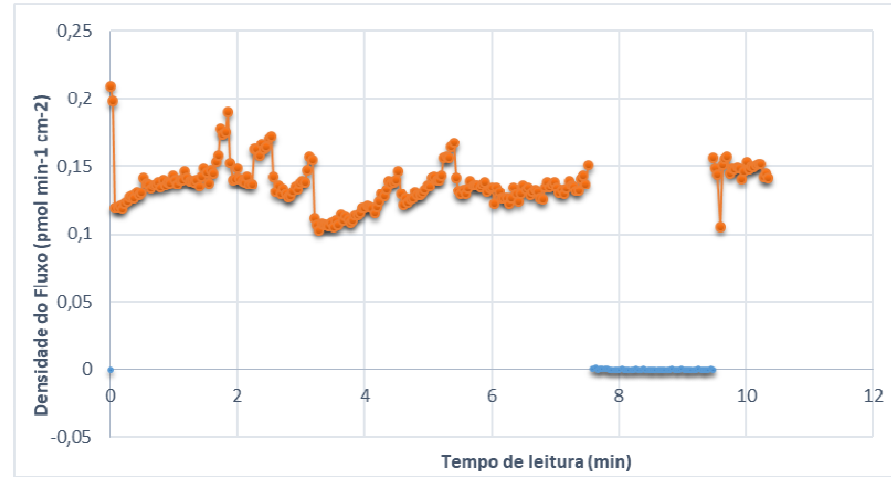
b')



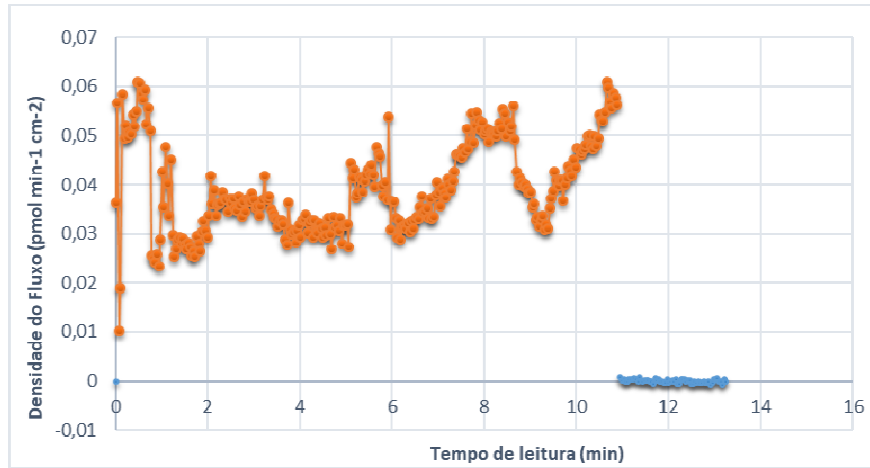
c)



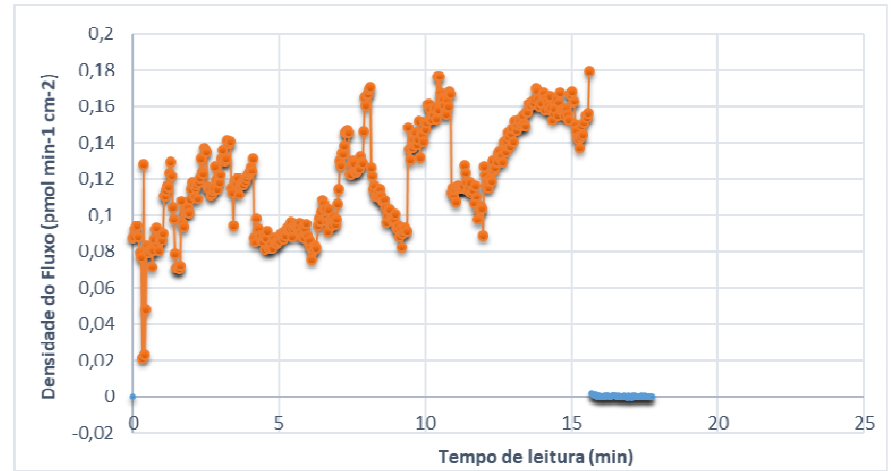
c')



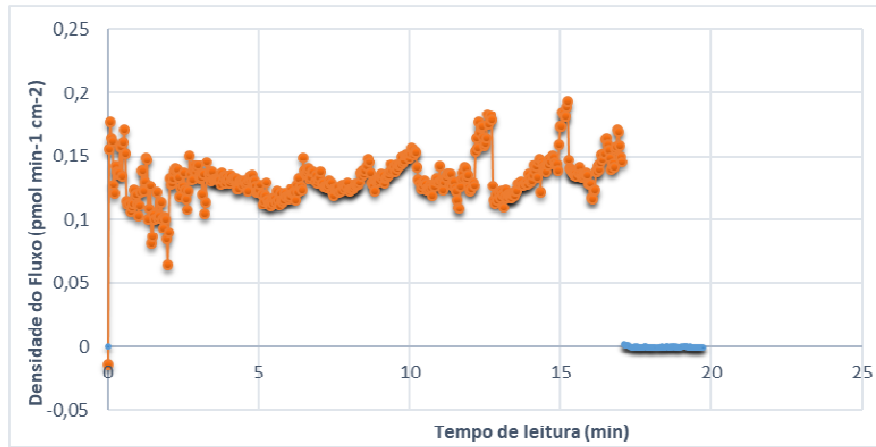
d)



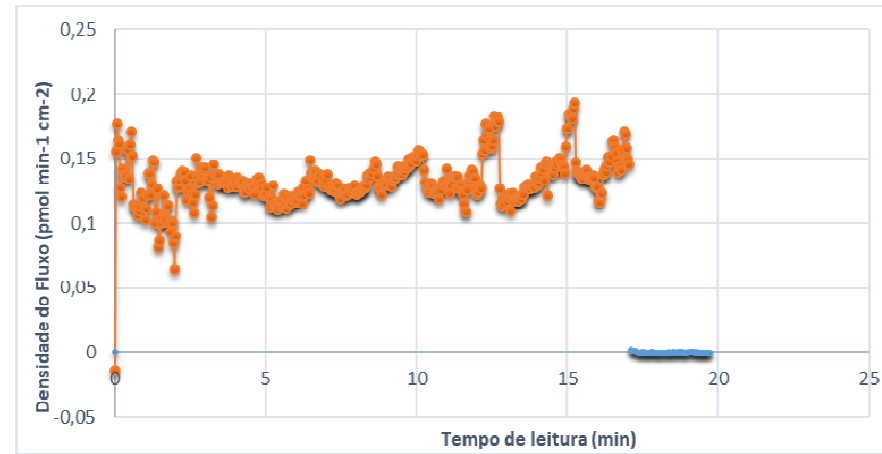
d')



e)

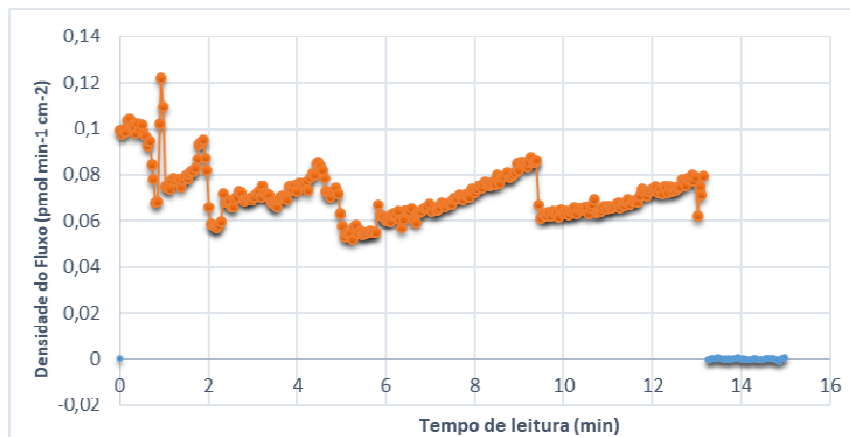


e')

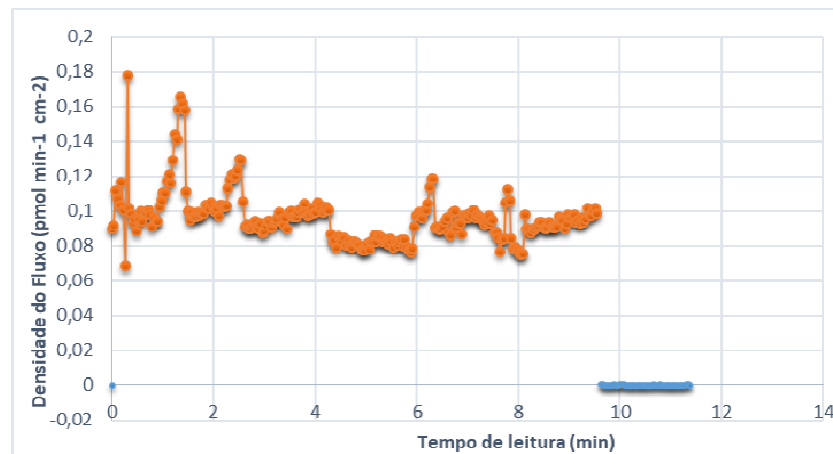


**Figura C8.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo em U e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº6) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

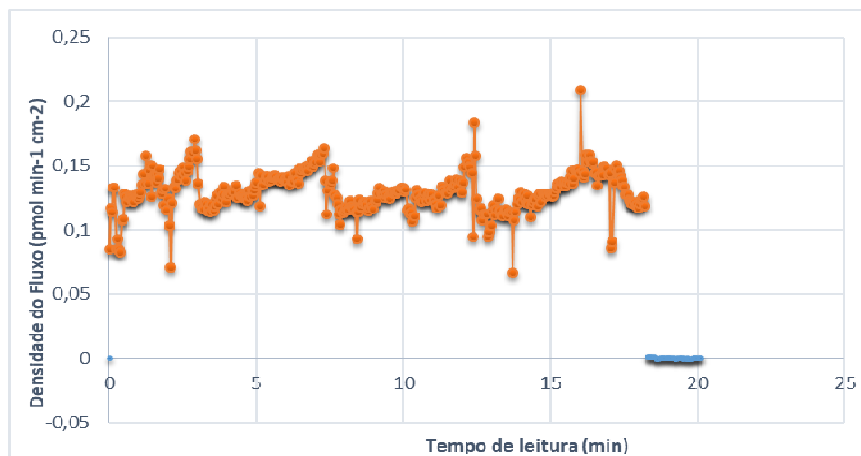
a)



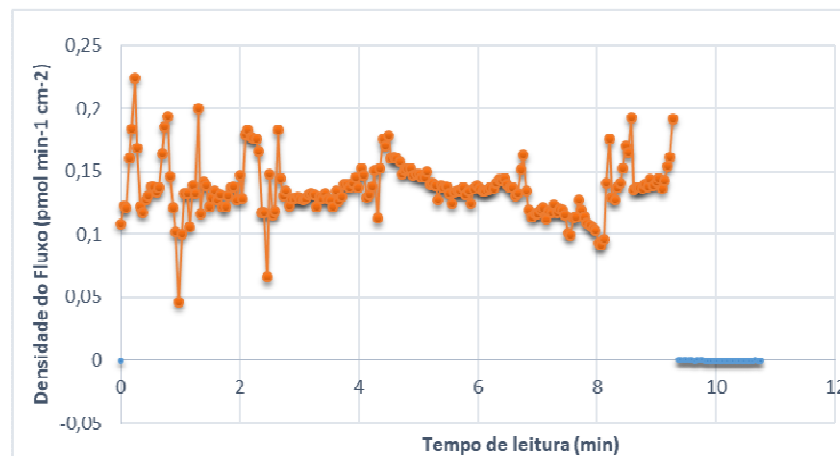
a')



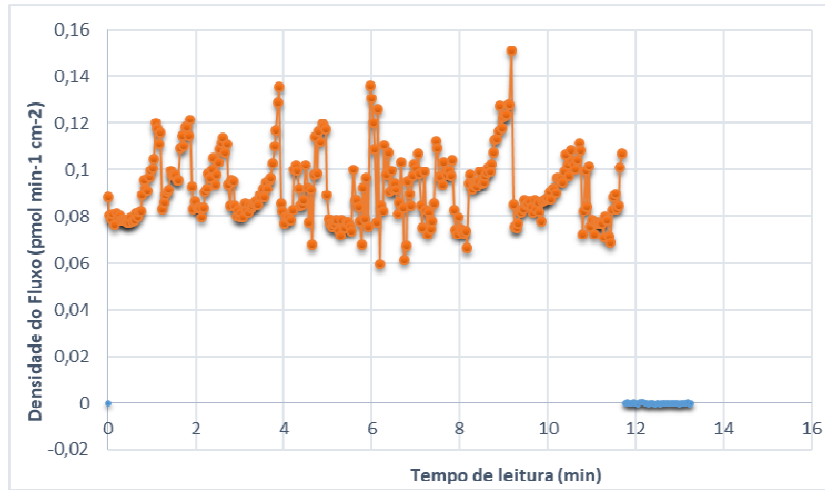
b)



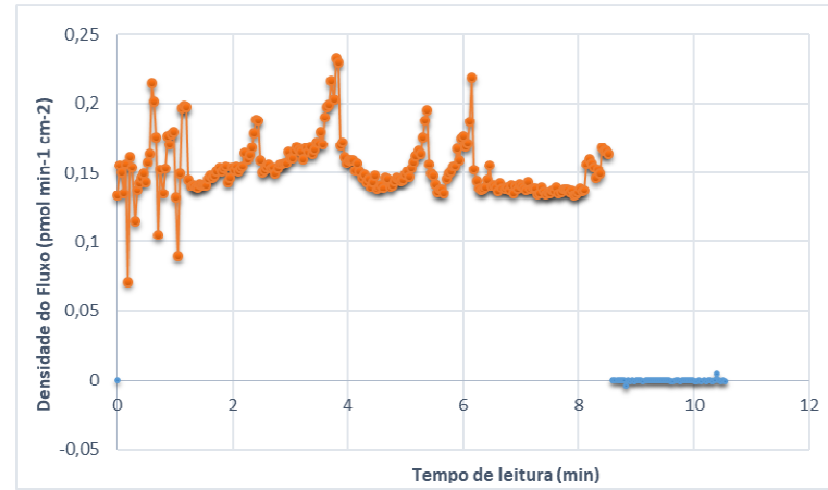
b')



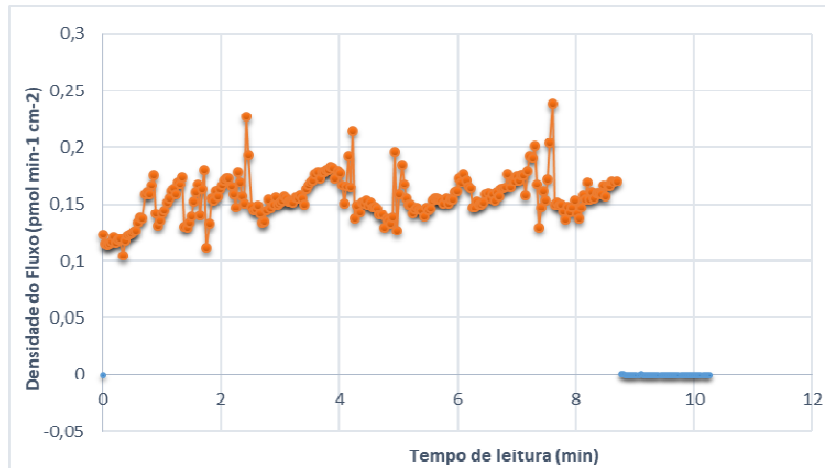
c)



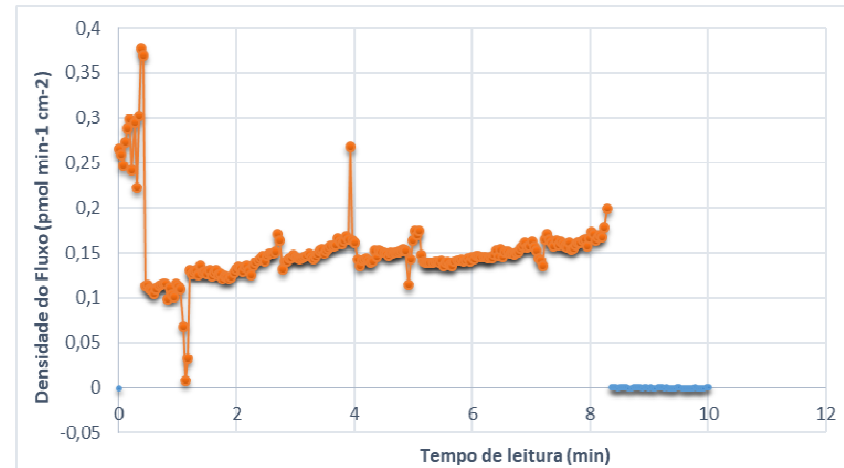
c')



d)

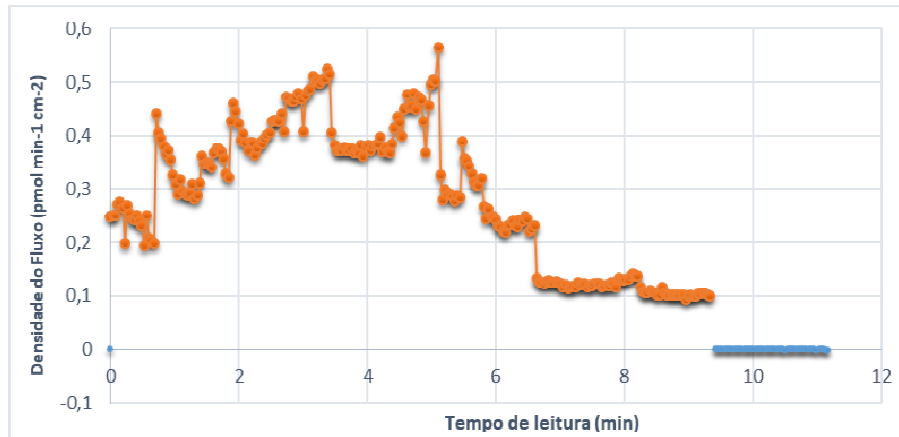


d')

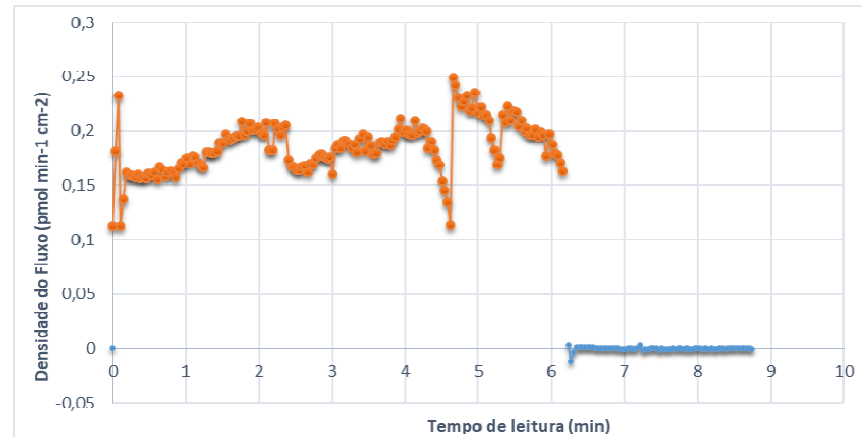




e)

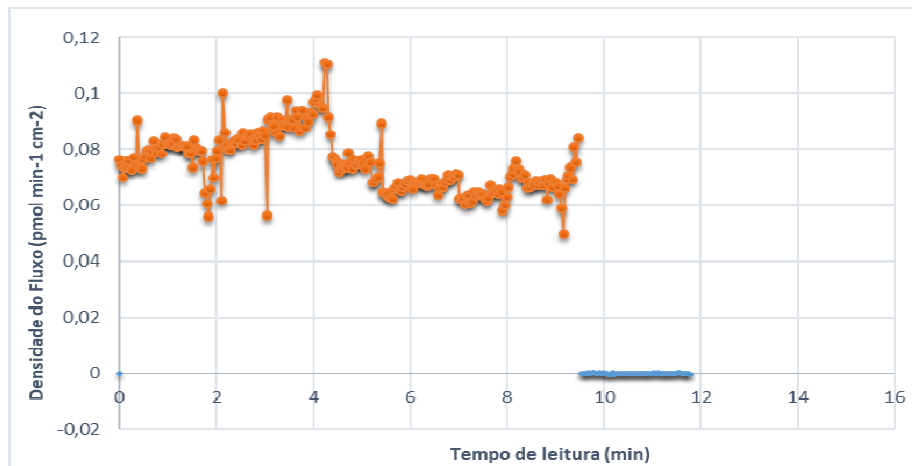


e')

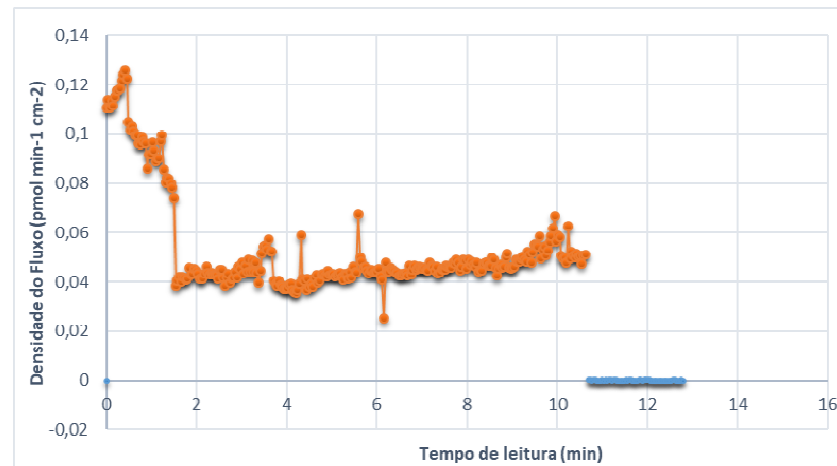


**Figura C9.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator no centro das bobinas e densidade de fluxo magnético de 5 mT (Experimento n<sup>o</sup>7) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e').

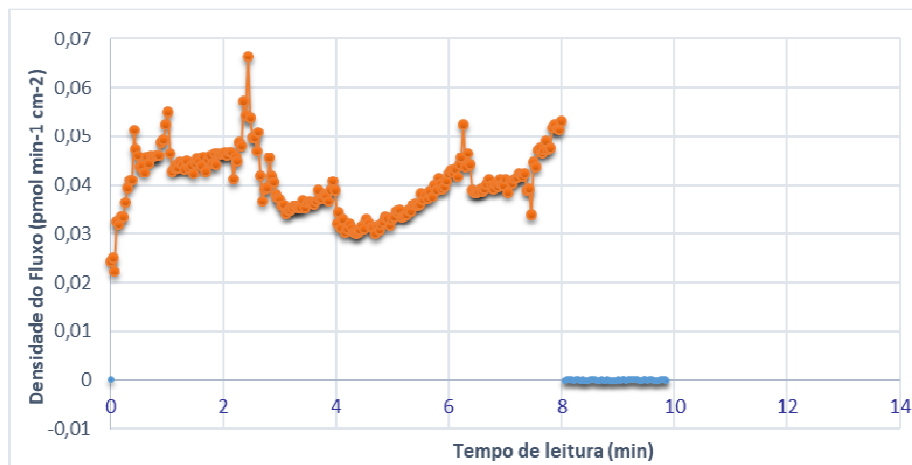
a)



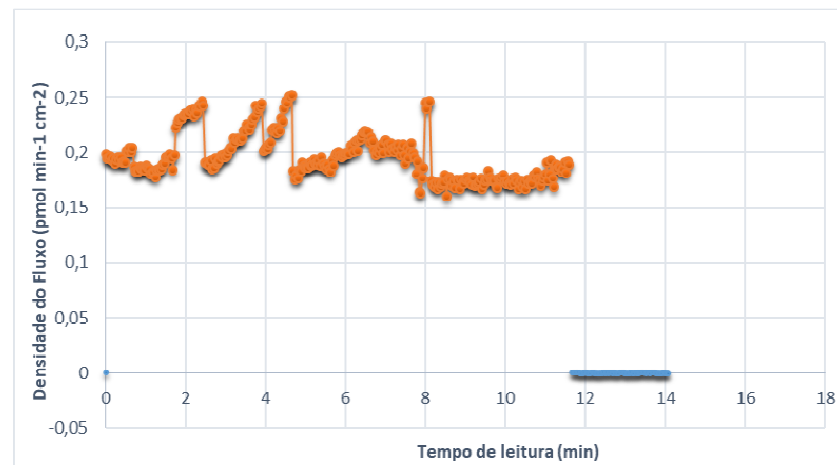
a')



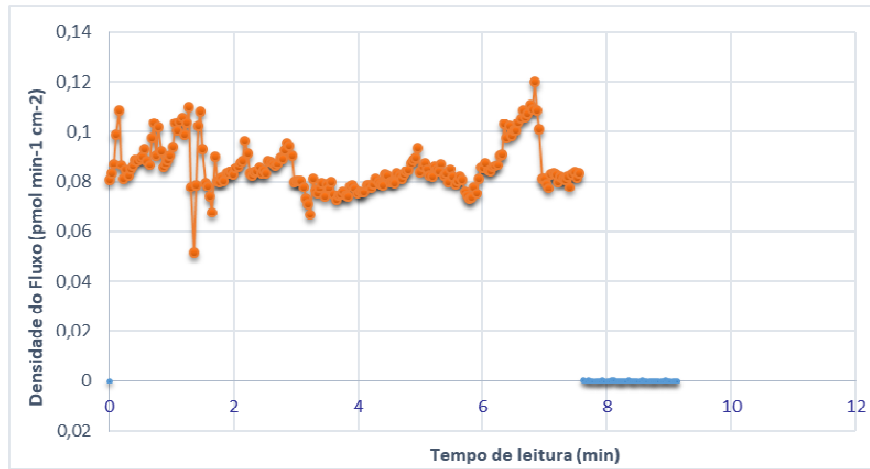
b)



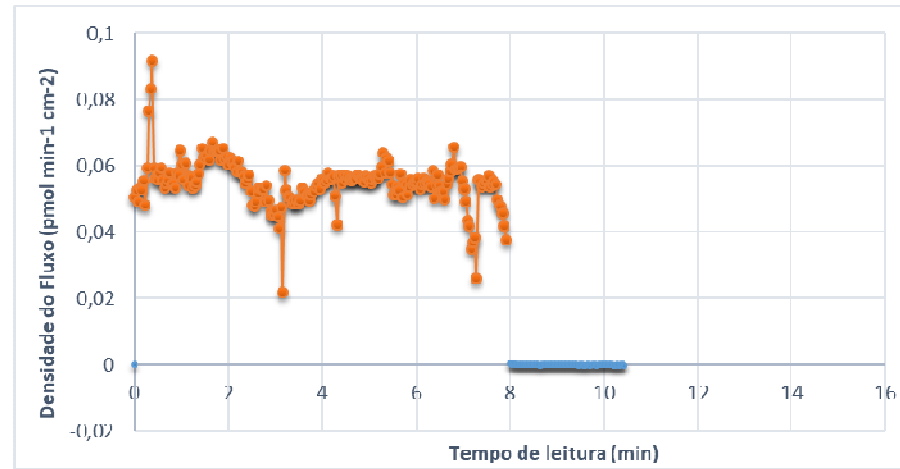
b')



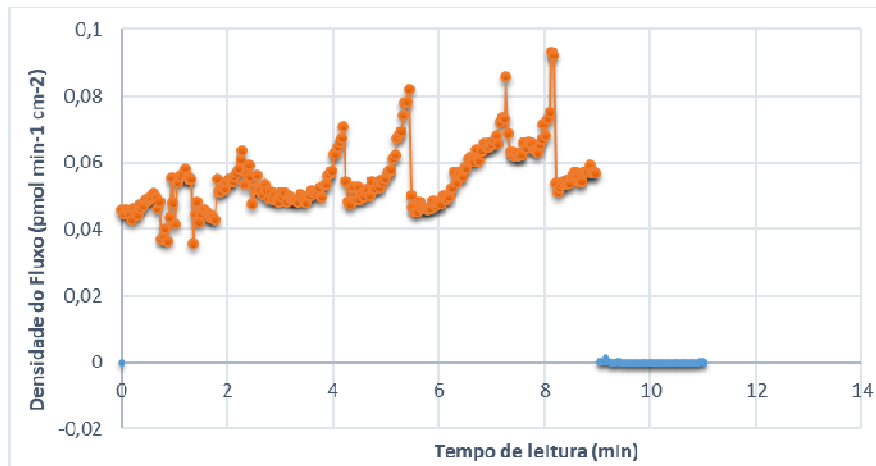
c)



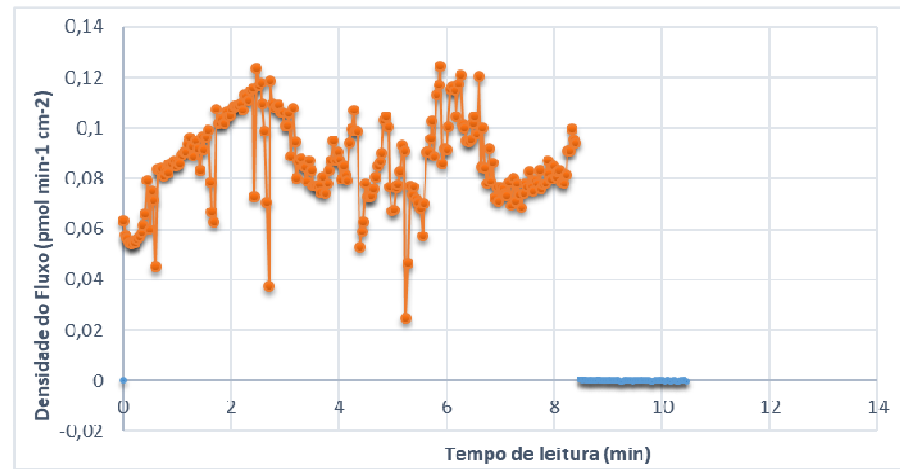
c')



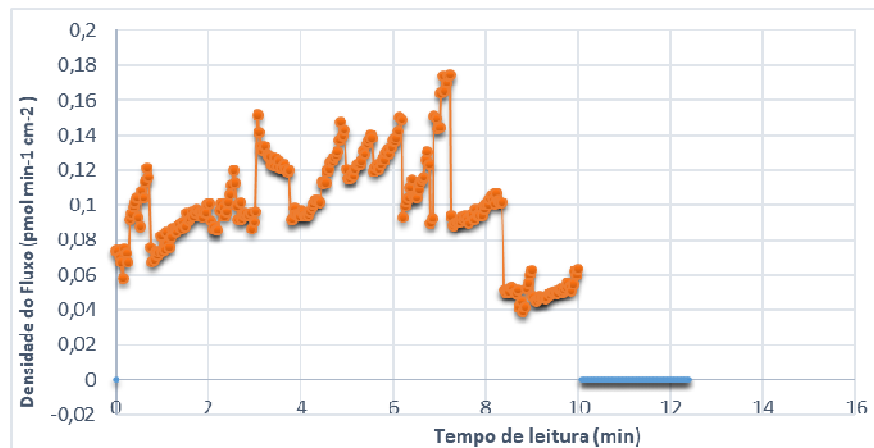
d)



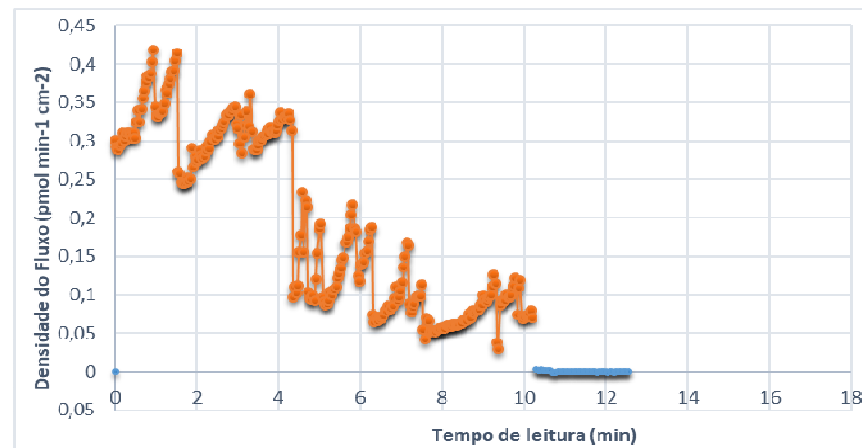
d')



e)

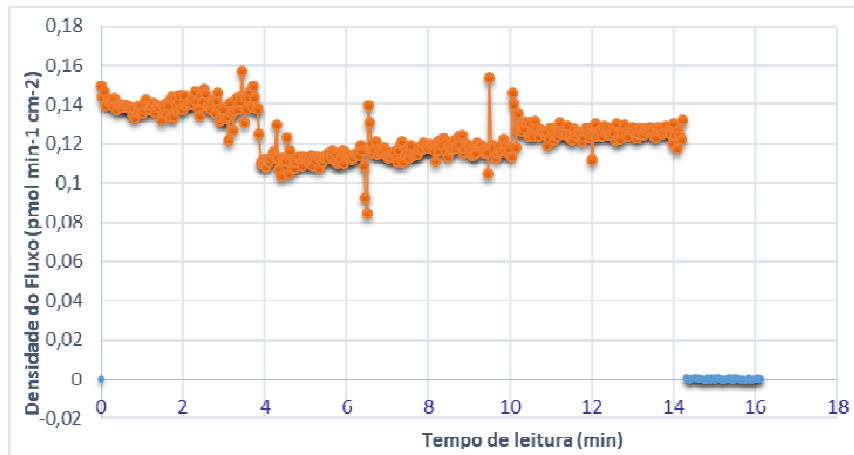


e')

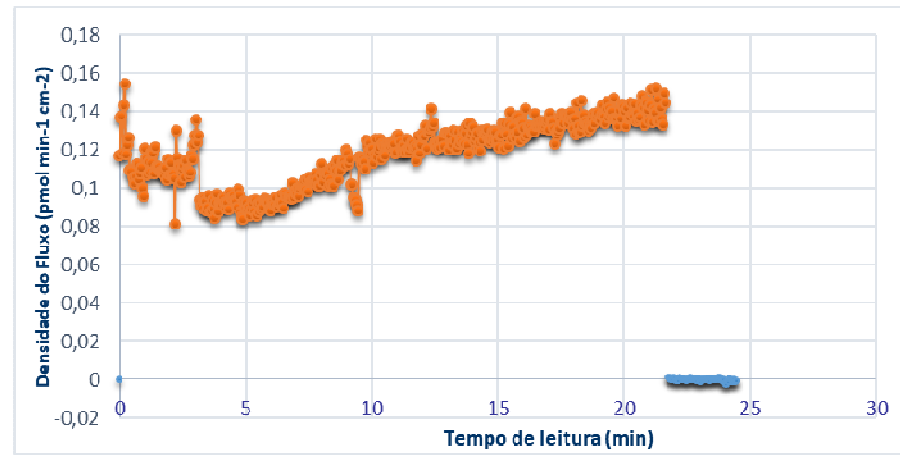


**Figura C10.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 15 mT (Experimento nº8) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

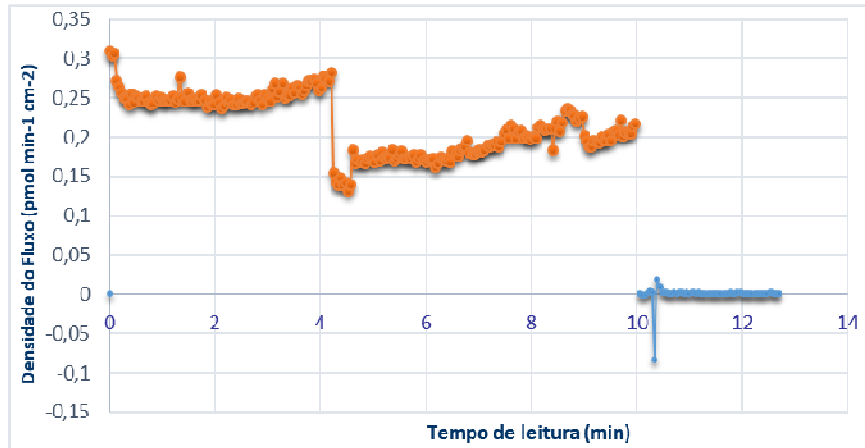
a)



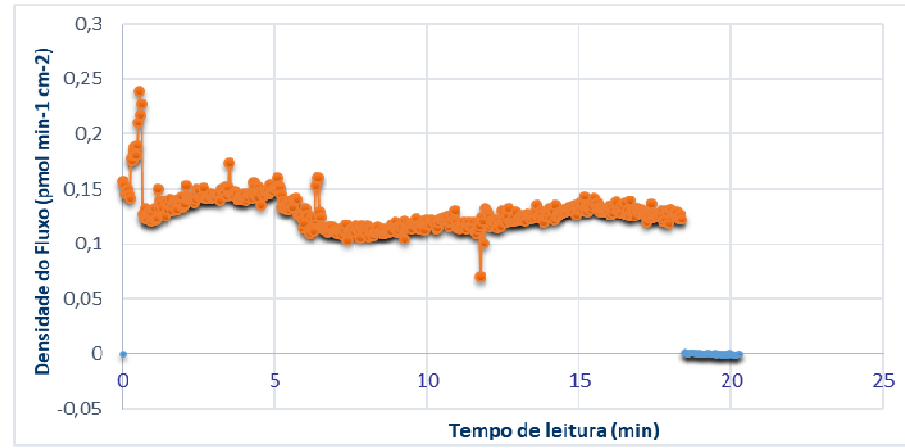
a')



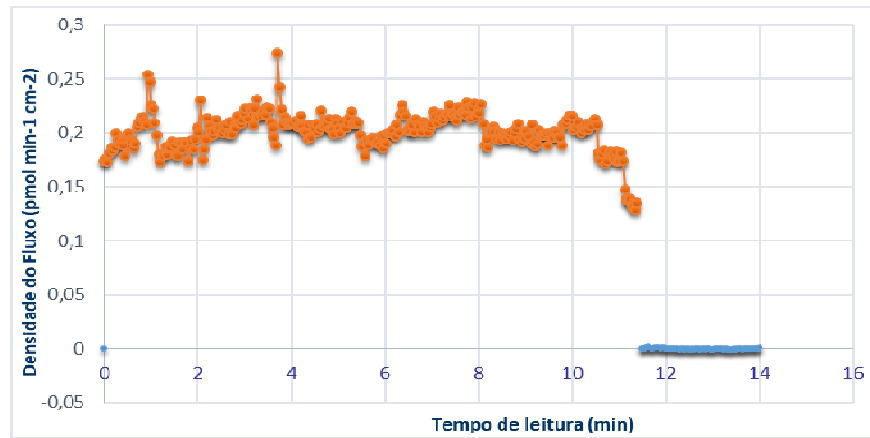
b)



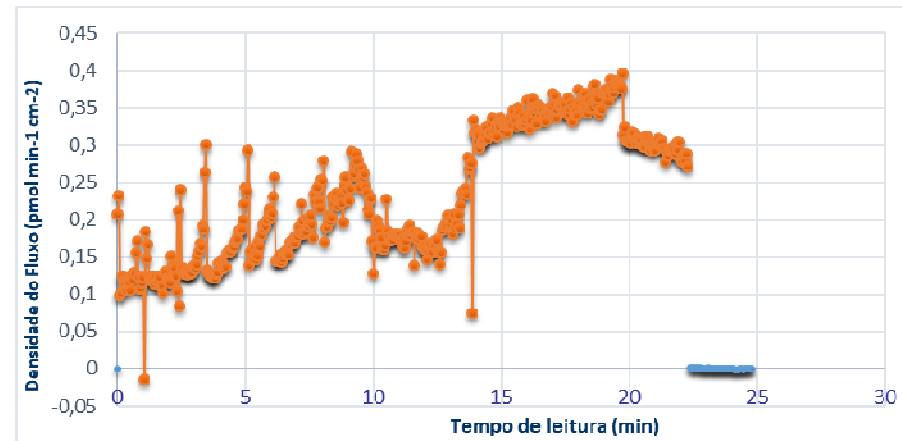
b')



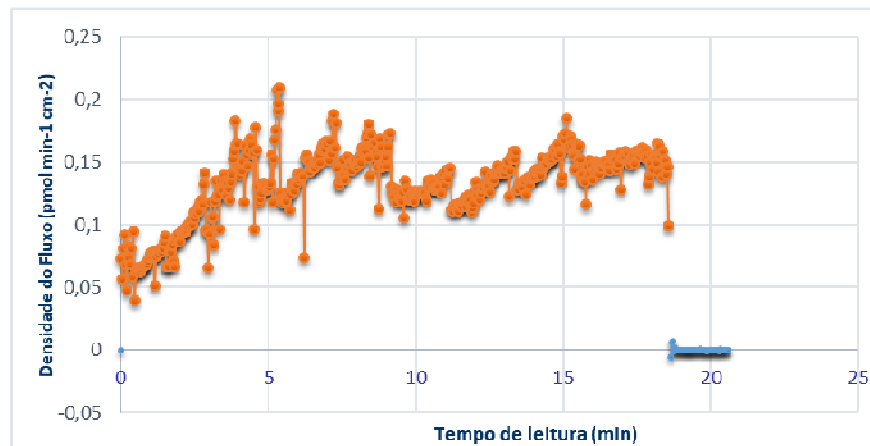
c)



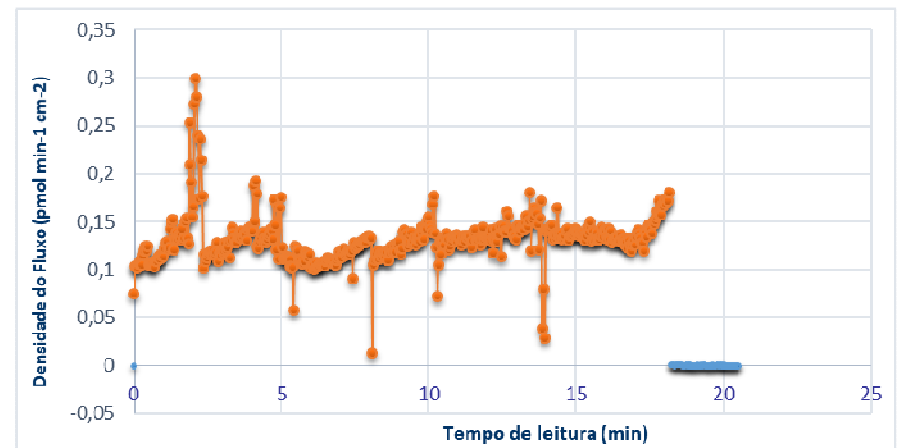
c')



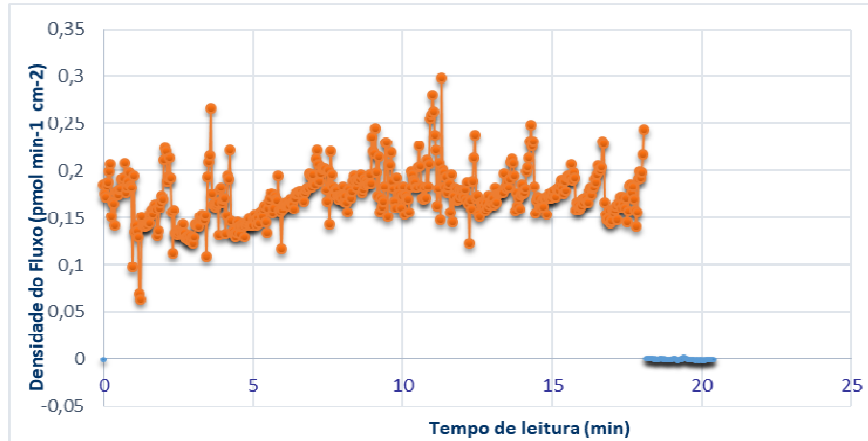
d)



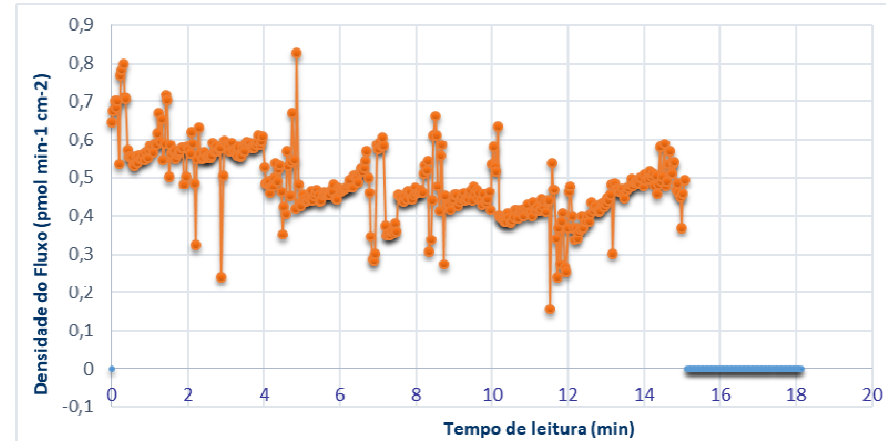
d')



e)

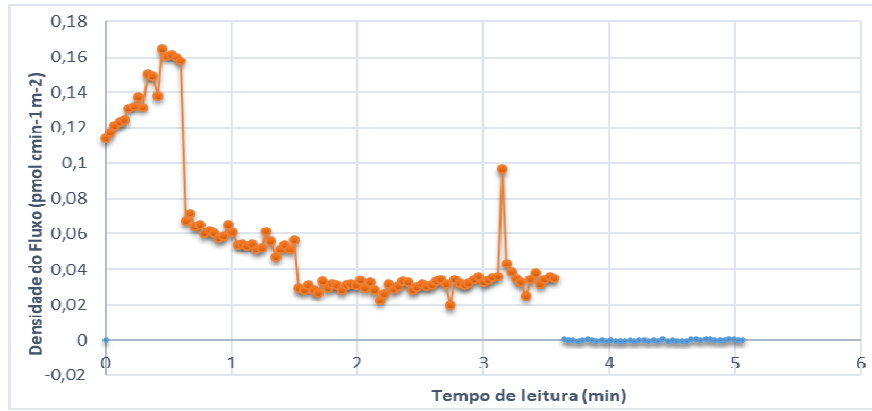


e')

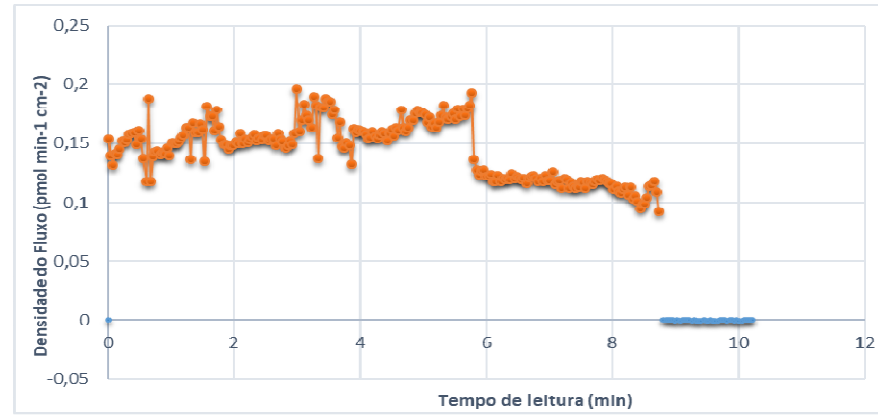


**Figura C11.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº9) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

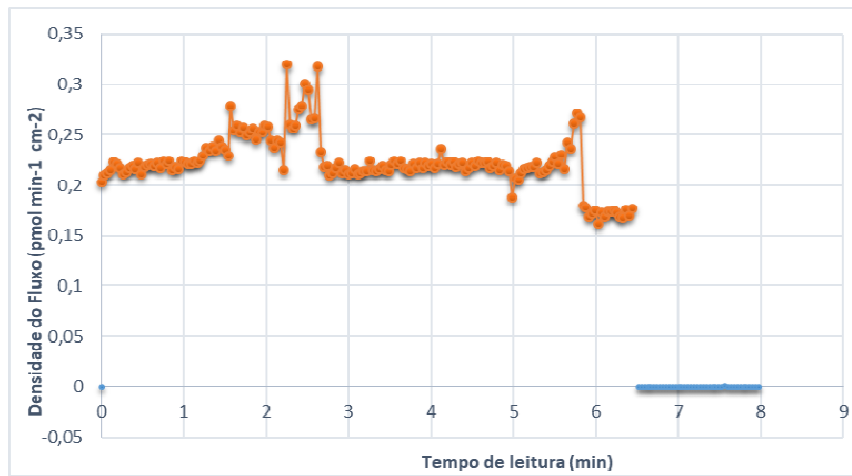
a)



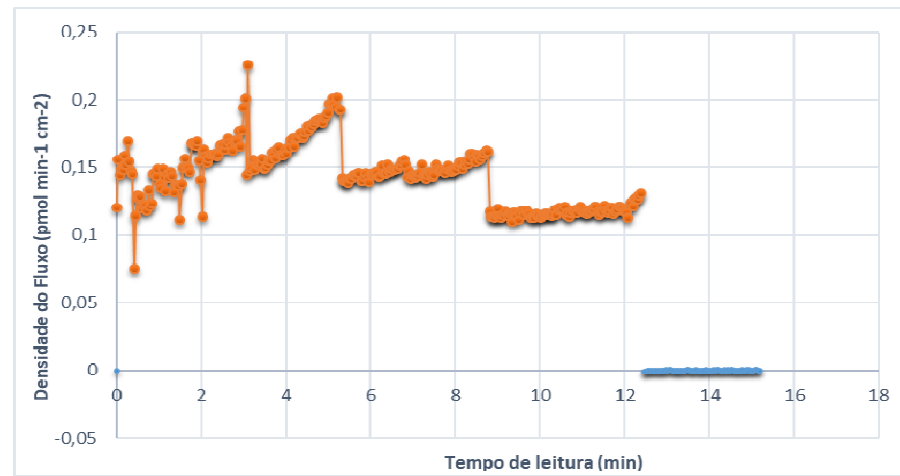
a')



b)

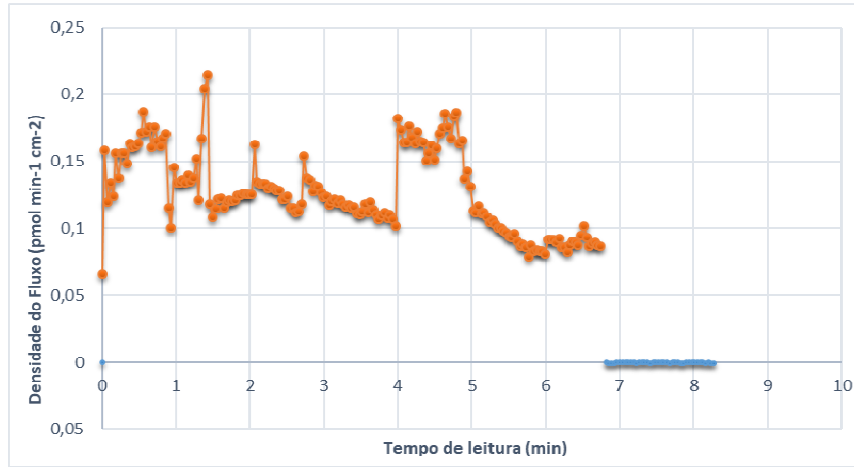


b')

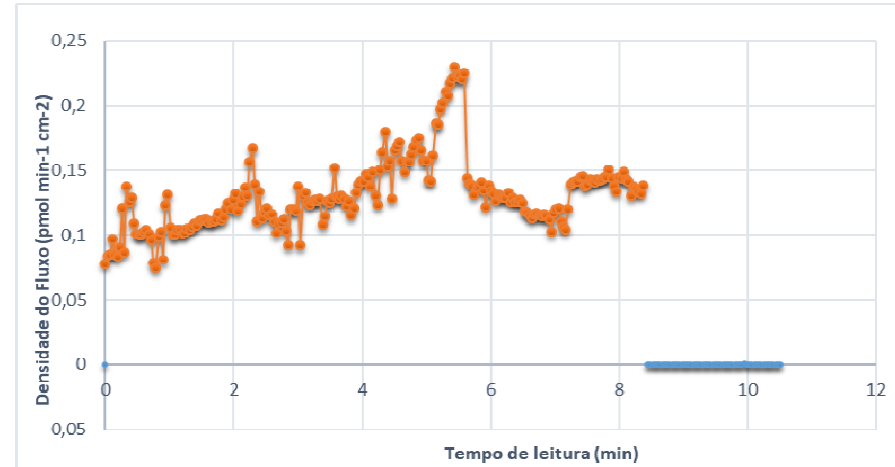




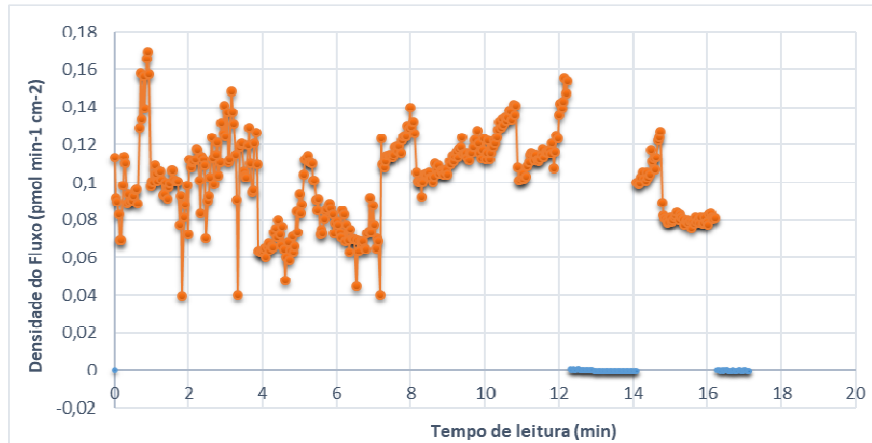
c)



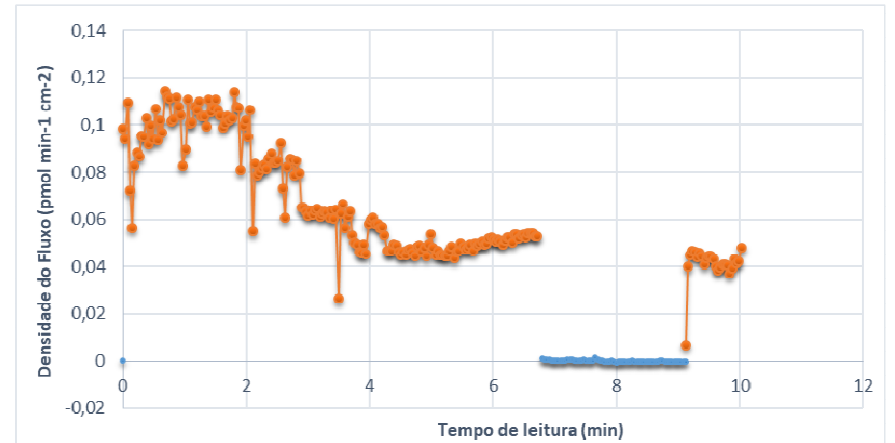
c')



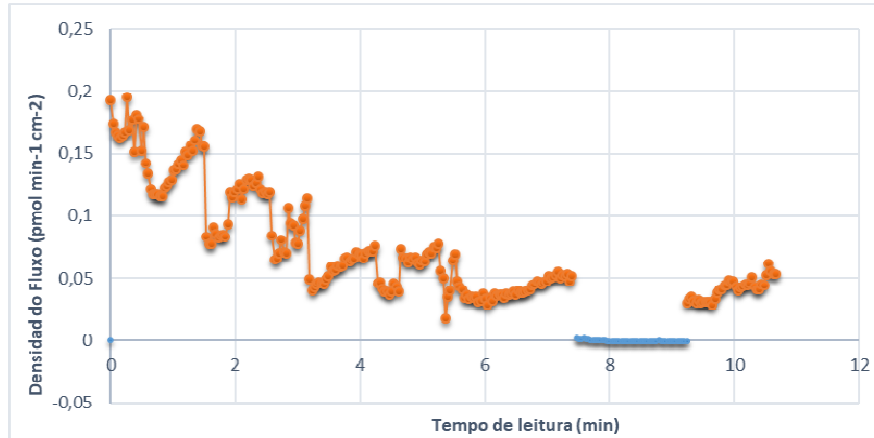
d)



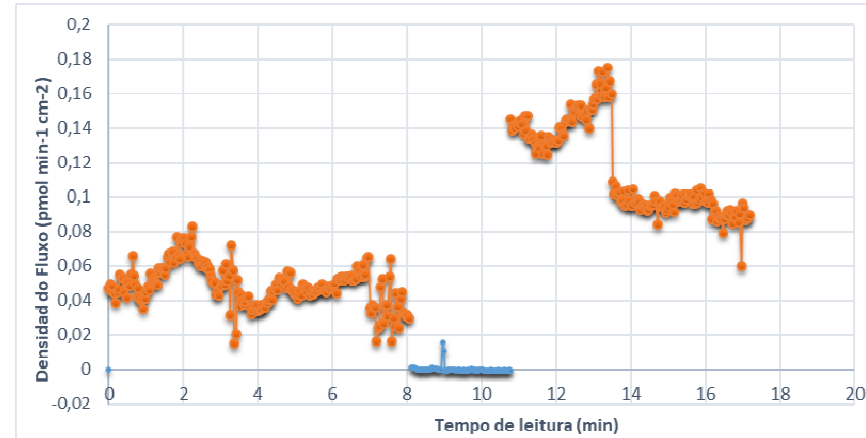
d')



e)

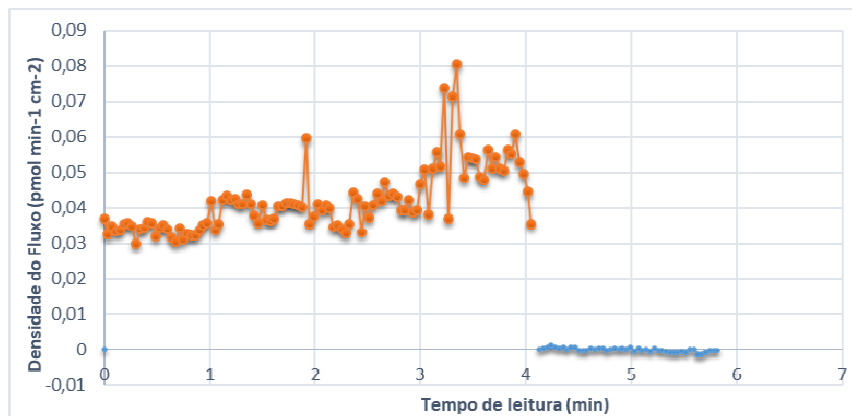


e')

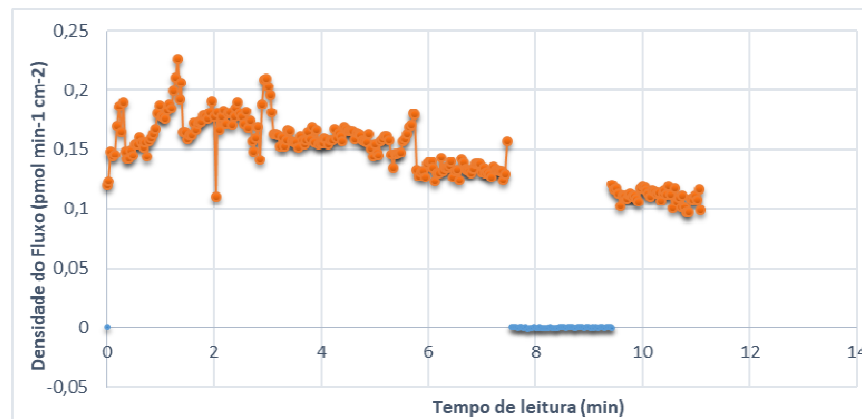


**Figura C12.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº10) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

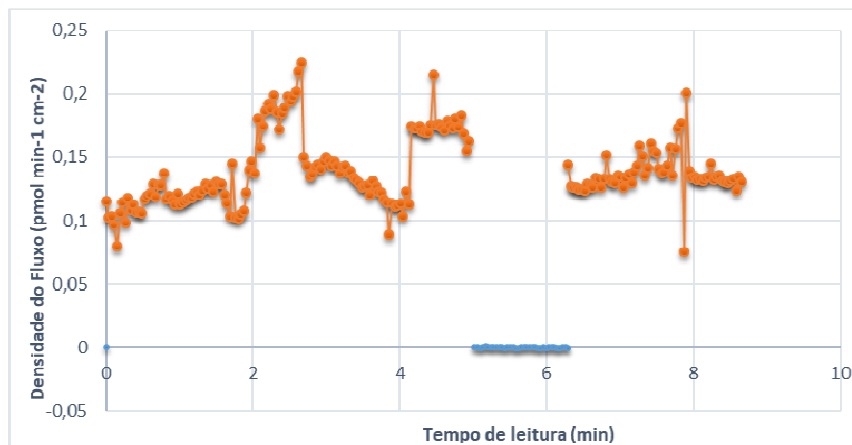
a)



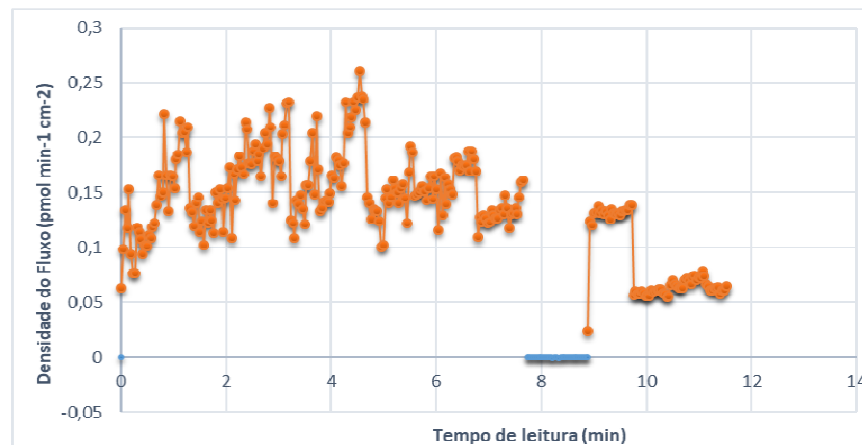
a')



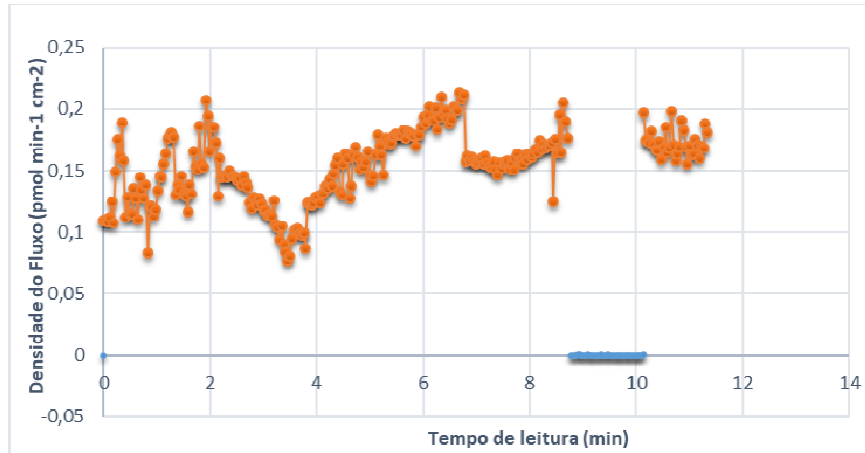
b)



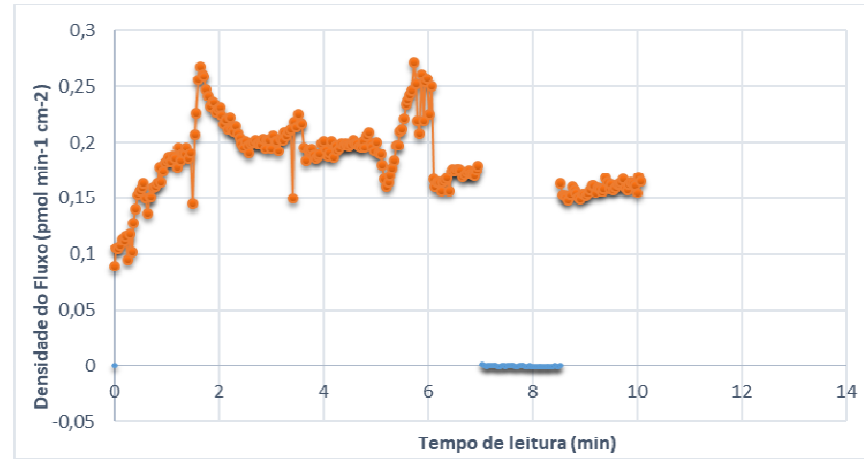
b')



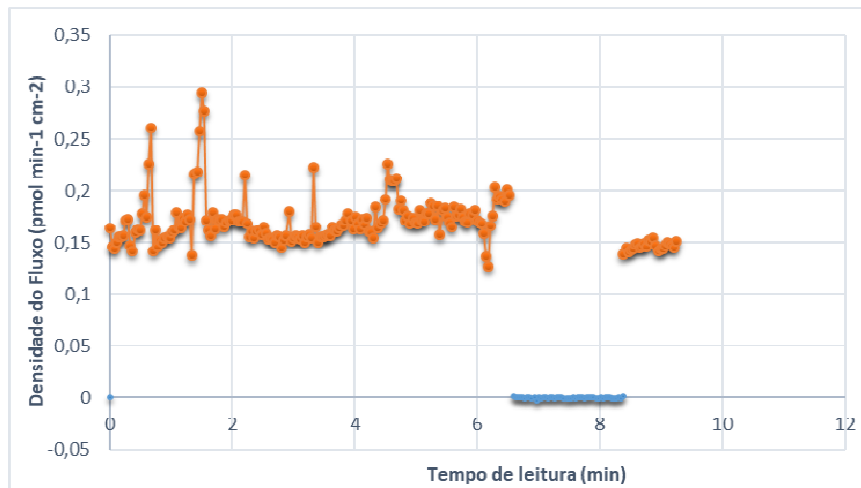
c)



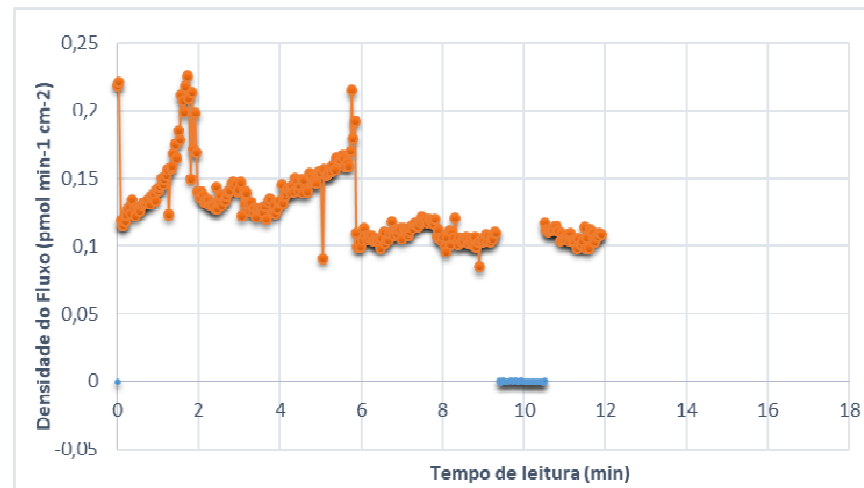
c')



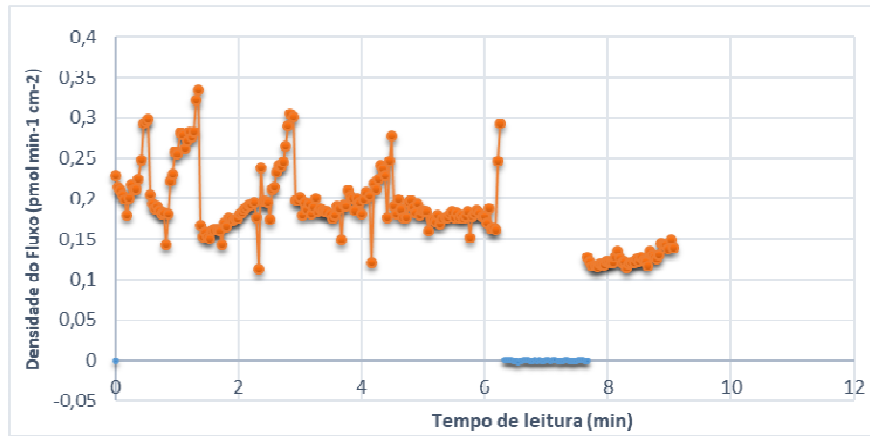
d)



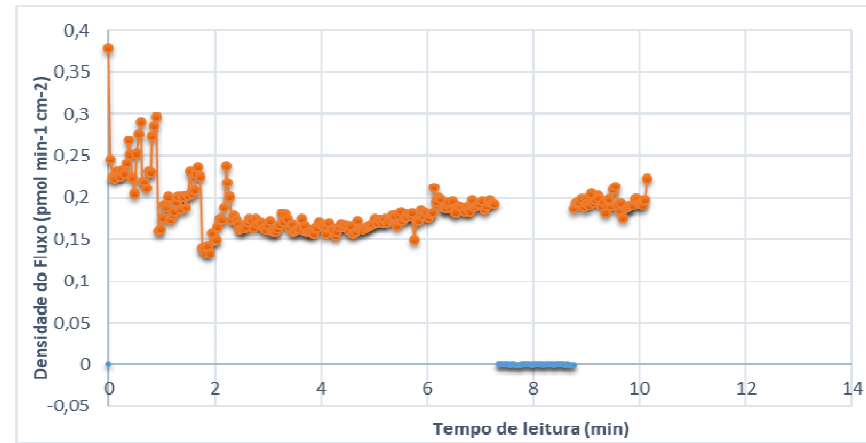
d')



e)



e')



**Figura C13.** Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator com reciclo externo e densidade de fluxo magnético de 10 mT (Experimento nº11) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').