

**EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE A LEVEDURA
Saccharomyces cerevisiae NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA:
ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS EM NÍVEL CELULAR**

CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2022**

EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE A LEVEDURA
Saccharomyces cerevisiae NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA:
ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS EM NÍVEL CELULAR

CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE

“Tese 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 Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Victor Haber Pérez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A553

Andrade, Cristilane Macharete de.

Efeito do campo magnético sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica: elucidação dos mecanismos em nível celular / Cristilane Macharete de Andrade. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

151 f. : il.

Bibliografia: 84 - 92.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientador: Victor Haber Perez.

1 . S. cerevisiae. 2. bioetanol. 3. biorreator não convencional assistido por campo magnético. 4. H⁺-ATPase tipo P. 5. razão de acoplamento. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

**EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE A LEVEDURA
Saccharomyces cerevisiae NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA:
ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS EM NÍVEL CELULAR**

CRISTILANE MACHARETE DE ANDRADE

"Tese 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 Doutora em Produção Vegetal."

Aprovada em 11 de abril de 2022.


Comissão Examinadora:



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



Prof. Everson Alves Miranda (PhD., Engenharia Química) - UNICAMP



Prof. Júlio César dos Santos (DSc., Biotecnologia Industrial) - USP



Prof. Victor Haber Pérez (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

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

Agradeço a UENF e a CAPES 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 Pérez, pela orientação, dedicação, confiança e conhecimentos transmitidos. Meu muito obrigada pela atenção e contribuição para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal!

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

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;

À Professora 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;

Aos amigos antigos e atuais que a UENF, o Setor de Engenharia de Processos e minhas repúblicas “Nossa Casa” e “Solar 202” me proporcionaram e que quero levar pra toda vida. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelas risadas, foram momentos incríveis e de grande aprendizado. Obrigada pela amizade não só no laboratório, mas principalmente fora dele!

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!

“Por isso não temas, pois eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento...”

(Isaias 41.10)

“...E você aprende que realmente pode suportar. Que realmente é forte e que pode ir muito mais longe, depois de pensar que não pode mais.”

(William Shakespeare)

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fermentação alcoólica.....	4
2.2 Aspectos gerais sobre magnetismo e sistemas de exposição ao campo magnético	7
2.3 Aplicações biotecnológicas de campos magnéticos.....	15
2.3.1 <i>Processos fermentativos e produção de metabólicos</i>	17
2.3.2 <i>Crescimento e inativação de micro-organismos</i>	22
2.4 Aspectos gerais sobre membrana plasmática	25
2.5 H ⁺ -ATPases tipo P: estrutura e funcionamento.....	27
2.6 Interação do campo magnético com enzimas ATPases	30
2.7 Considerações gerais sobre a pesquisa bibliográfica	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Materiais	34
3.2 Procedimentos experimentais.....	34
3.2.1 <i>Meio de manutenção</i>	34
3.2.2 <i>Preparo do inóculo e obtenção da biomassa</i>	34
3.2.3 <i>Fermentações assistidas por campo magnético</i>	35
3.3 Métodos analíticos	38
3.3.1 <i>Análise do crescimento celular</i>	40

3.3.2	<i>Monitoramento da cinética de fermentação</i>	40
3.3.3	<i>Estudo da fisiologia da levedura</i>	40
3.3.3.1	<i>Determinação da densidade do fluxo de H⁺ extracelular</i>	40
3.3.4	<i>Estudo da morfologia da levedura</i>	41
3.3.4.1	<i>Microscopia de fluorescência</i>	41
3.3.5	<i>Estudos bioquímicos</i>	42
3.3.5.1	<i>Isolamento de membranas totais</i>	42
3.3.5.2	<i>Determinação do teor de proteína pelo método de Bradford</i>	44
3.3.5.3	<i>Imunoblotting</i>	44
3.3.5.4	<i>Determinação do gradiente de H⁺ (ΔpH - transporte de H⁺)</i>	46
3.3.5.5	<i>Determinação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPase tipo P</i>	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Mecanismo de interação do campo com a levedura	50
4.1.1	<i>Cinética de fermentação alcoólica</i>	50
4.1.2	<i>Estudo fisiológico: determinação do fluxo de prótons extracelular</i>	55
4.2	Confirmação da presença e ação do campo sobre H ⁺ -ATPase tipo P	60
4.2.1	<i>Cinética de fermentação alcoólica</i>	60
4.2.2	<i>Estudo fisiológico: determinação do fluxo de prótons extracelular</i>	64
4.2.3	<i>Estudo morfológico por microscopia de fluorescência</i>	67
4.2.4	<i>Estudos bioquímicos</i>	69
4.2.4.1	<i>Cinética de hidrólise da parede celular</i>	69
4.2.4.2	<i>Determinação do teor de proteína</i>	70
4.2.4.3	<i>Immunoblotting</i>	71
4.2.4.4	<i>Determinação da atividade hidrolítica</i>	72
4.3	Validação da ação do campo sobre H ⁺ -ATPase tipo P	74
4.3.1	<i>Cinética de fermentação alcoólica</i>	74
4.3.2	<i>Estudos bioquímicos</i>	74
4.3.2.1	<i>Cinética de hidrólise da parede celular</i>	74
4.3.2.2	<i>Determinação do teor de proteína</i>	75
4.3.2.3	<i>Imunoblotting</i>	76
4.3.2.4	<i>Determinação da atividade de hidrolítica</i>	76
4.3.2.5	<i>Determinação da atividade de transporte H⁺</i>	79
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

APÊNDICES	93
APÊNDICE A – Curvas de calibração HPLC	94
APÊNDICE B – Curva de crescimento da levedura	95
APÊNDICE C – Calibração biorreator	96
APÊNDICE D – Dados da densidade de fluxo de H ⁺	97
APÊNDICE E – Cinética de hidrólise da parede celular	116
APÊNDICE F – Dados da dosagem de proteínas	117
APÊNDICE G – Curva padrão de fosfato inorgânico.....	119
APÊNDICE H – Dados da atividade hidrolítica.....	120
APÊNDICE I – Dados da atividade de transporte H ⁺	126
APÊNDICE J - Cinética de monitoramento da temperatura das bobinas	127
APÊNDICE K – Artigo publicado	131

RESUMO

ANDRADE, Cristilane Macharete de, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2022. EFEITO DO CAMPO MAGNÉTICO SOBRE A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS EM NÍVEL CELULAR. Orientador: Prof. Victor Haber Pérez.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar o efeito do campo magnético de baixa frequência e intensidade na fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae* X2180 em biorreator assistido por campo magnético, não apenas através das observações macroscópicas, mas principalmente monitorando possíveis alterações em nível celular da enzima H^+ -ATPase (tipo P) presente na membrana plasmática, bem como, na morfologia das leveduras. As fermentações foram realizadas sob linhas de campo na direção axial com densidade de fluxo magnético (B) de 10 mT, usando quatro diferentes arranjos de biorreator em relação à exposição da suspensão celular ao campo (biorreator com reciclo externo em tubo espiral, biorreator com reciclo externo em tubo em U, o biorreator com reciclo externo em tubo reto e biorreator sem reciclo). A cinética de fermentação foi monitorada pelo consumo de substrato, pH, formação de bioetanol e subprodutos. Além disso, medidas eletrofisiológicas do fluxo de H^+ , bioquímicas e microscópicas de fluorescência foram realizadas nas células da levedura em diferentes estágios da fermentação. Os resultados mostraram que o campo magnético favoreceu o consumo de substrato, a produtividade de bioetanol e conseqüente redução dos tempos de fermentação, o que pode ser atribuído às alterações na performance da enzima H^+ -ATPase tipo P, presente na membrana plasmática, cuja bomba de prótons se tornou mais eficiente sob efeito

do campo magnético, tendo menor gasto de energia para um maior transporte de H^+ e operando, portanto, em condições de hiperacoplamento para a manutenção do equilíbrio eletroquímico da célula. Esta razão de acoplamento chegou a ser 6 vezes maior em relação ao controle. Finalmente, os resultados deste estudo podem contribuir para o entendimento dos mecanismos biológicos de interação dos campos magnéticos com micro-organismos de importância industrial e ao mesmo tempo, contribuir com a cadeia produtiva de bioetanol em função do potencial desta tecnologia para a sua implantação em escala industrial.

Palavras-chave: *S. cerevisiae*, bioetanol, biorreator não convencional assistido por campo magnético, H^+ -ATPase tipo P, razão de acoplamento.

ABSTRACT

ANDRADE, Cristilane Macharete de, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2022. MAGNETIC FIELD EFFECT ON THE *S. cerevisiae* YEAST DURING ALCOHOLIC FERMENTATION: MECHANISMS ELUCIDATION AT CELLULAR LEVEL. Advisor: Prof. Victor Haber Pérez.

The aim of this work was to study the effect of low frequency and intensity magnetic field on alcoholic fermentation using *S. cerevisiae* X2180 in a bioreactor assisted by magnetic field, not only through macroscopic observations, but mainly by monitoring possible changes at the cellular level of the P type H⁺-ATPase present in the plasma membrane, as well as in yeast morphology. Fermentations were carried out under field lines in the axial direction with a magnetic flux density (B) of 10 mT, using four different bioreactor arrangements in relation to the cell suspension exposure to the field (bioreactor with spiral tube external recycle, U-tube external recycle bioreactor, bioreactor with external recycle straight tube and bioreactor without recycle). Fermentation kinetic was monitored by substrate consumption, pH, bioethanol formation and formed by-products. In addition, electrophysiological H⁺ efflux, biochemical and microscopic fluorescence measurements were performed in yeast cells at different stages of fermentation. The results showed that the magnetic field favored the consumption of substrate, the bioethanol productivity and consequent fermentation times reduction. This can be attributed to the changes in the performance of the P-type H⁺-ATPase enzyme, present in the plasma membrane, whose proton pump became more efficient under magnetic field effect, with lower energy expenditure for greater H⁺ transport

and thus operating, under hyper-coupling conditions to maintain the electrochemical balance of the cell. This coupling ratio was 6 times higher compared to the control. Finally, the results of this study can contribute to the understanding of the biological mechanisms of the magnetic fields interaction with microorganisms of industrial importance and, at the same time, with the bioethanol production chain due to the potential of this technology for its implementation on an industrial scale.

Keywords: *S. cerevisiae*, bioethanol, unconventional bioreactor assisted by magnetic field, P-type H⁺-ATPase, coupling ratio.

1 INTRODUÇÃO

Novas tecnologias têm sido estudadas a fim de melhorar a eficácia de processos biotecnológicos (Silva *et al.*, 2020; Veiga *et al.*, 2020). Neste sentido, há alguns anos bioprocessos assistidos por campos magnéticos têm despertado a atenção, tanto do ponto de vista científico como do industrial, em virtude das potencialidades dos efeitos biológicos reportados (Silva *et al.* 2020; Berlot *et al.*, 2013; Deutmeyer *et al.*, 2011; Dobsinský *et al.*, 2017; Galonja-Corghill *et al.*, 2009; Konopacka *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Justo *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004).

Ao mesmo tempo, muitos estudos que abordam a sua aplicação sob micro-organismos são controversos e não há um consenso quanto aos efeitos provocados na célula (Albuquerque *et al.*, 2016; Hristov e Perez, 2011). De maneira geral, os mecanismos biofísicos e bioquímicos que constituem a base da interação entre campos magnéticos e leveduras são muito complexos e pouco compreendidos (Dussán *et al.*, 2019; Albuquerque *et al.*, 2016). Entretanto, os recentes progressos na biologia celular e molecular têm aberto novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre processos ocorridos na célula, tornando possível a análise ampla de mudanças ocorridas na célula microbiana, em condições e/ou momentos distintos (Saini *et al.*, 2018).

Portanto, 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 tais alterações e repostas provocadas em bioprocessos. Assim, um primeiro desafio será compreender as bases biofísicas das interações do campo magnético com as células vivas. Uma vez estabelecido um mecanismo de ação claro e os principais alvos celulares e moleculares, uma gama mais ampla de tipos de células poderia ser analisada para revelar e avaliar o impacto ambiental do campo magnético e os equilíbrios técnico-econômicos necessários para discriminar o real potencial dessa tecnologia (Andrade *et al.*, 2021).

Diante de tal questionamento, há alguns anos, o grupo de pesquisa “Biomagnetismo aplicado à Indústria de Processos” tem se dedicado a estudar aplicações biotecnológicas de campos magnéticos na indústria de alimentos e neste contexto a elucidação dos mecanismos de interação destes campos com as células microbianas tem sido um desafio de grande complexidade. Inicialmente, as respostas foram apenas em nível macroscópico e embasadas em hipóteses sobre alterações na permeabilidade das membranas celulares e outros efeitos reportados na literatura. Porém, desde o ano de 2017, em parceria com o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB-UENF) foram iniciados estudos sobre a influência do campo magnético em nível celular, isto é, sobre a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados mais recentes do grupo (Andrade *et al.*, 2021) foram animadores porque, além de influenciar positivamente o processo fermentativo, com a redução do tempo de fermentação e consequente melhoria na produtividade de bioetanol, também apontaram como possível alteração em nível celular, respostas significativas no efluxo de prótons através da membrana plasmática responsável pelo equilíbrio eletroquímico das células. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do campo magnético de baixa frequência e intensidade na fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae* através de observações macroscópicas e em nível celular monitorando a

atividade da bomba H^+ -ATPase tipo P presente na membrana plasmática da levedura visando aplicações futuras destes sistemas em escala industrial.

Os resultados do estudo experimental foram divididos basicamente em três etapas, sendo a primeira delas focada na formulação de uma hipótese de um possível efeito biológico do campo magnético devido à sua interação com a levedura, com base em observações positivas da cinética das fermentações em biorreatores com diferentes configurações sob campos magnéticos de baixa frequência e intensidade e das respostas fisiológicas da levedura nos efluxos de H^+ por ATPases de membrana plasmática (tipo P) em relação aos controles. Mas, como os efluxos de H^+ são consequência de diferentes mecanismos de transporte, na segunda etapa o trabalho foi direcionado para correlacionar os resultados observados, na melhor configuração sob campo magnético, com a atividade específica da H^+ -ATPase tipo P, além de explorar possíveis alterações morfológicas das leveduras expostas a estes campos magnéticos. Finalmente, como as H^+ -ATPases do tipo P são complexos de proteínas embebidas em membranas plasmáticas que funcionam como bombas de prótons acionadas por hidrólise de ATP, em uma última etapa, a validação do mecanismo proposto foi confirmada através de estudos de acoplamento bioquímico desta enzima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica, também conhecida como etanólica é um processo anaeróbico para produção de energia, na qual ocorre uma série de complexas reações enzimáticas realizadas por micro-organismos, onde a glicose é convertida em etanol (Azhar *et al.*, 2017; Ko *et al.*, 2016). Os principais micro-organismos responsáveis por esta transformação são as leveduras do gênero *Saccharomyces* e também por bactérias como a *Zymomonas mobilis* (Crocomo e Gutierrez, 2001; Lima *et al.*, 2001).

Dentro do gênero *Saccharomyces*, especialmente a *S. cerevisiae*, é o micro-organismo mais comumente empregado na produção de etanol, devido à sua boa capacidade fermentativa, alta produtividade, alta tolerância ao etanol e outros inibidores formados durante a fermentação, baixa geração de coprodutos e capacidade de fermentar uma ampla gama de açúcares (Azhar *et al.*, 2017; Ko *et al.*, 2016; Mussato *et al.* 2012). Vale ressaltar que, além da produção de etanol biocombustível, a levedura *S. cerevisiae* possui ampla utilização industrial, principalmente na indústria alimentícia (panificação, produção de vinho, produção de cerveja), além do uso na indústria farmacêutica (Azhar *et al.*, 2017; Hristov e Perez, 2011).

As células dessa levedura possuem formato redondo a ovoide com diâmetro 5 a 10 μm que se reproduzem por brotamento. Dependendo do tipo de

cultivo podem utilizar diferentes açúcares (Hristov e Perez, 2011, Lima *et al.*, 2001). Esta levedura é basicamente um dos organismos eucarióticos mais intensivamente estudados na biologia celular, cujo metabolismo é o mais conhecido (Saini *et al.*, 2018; Hristov e Perez, 2011).

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 (Lima *et al.*, 2001). Em condições anaeróbicas, a principal via metabólica usada pelas leveduras é a glicólise, conforme Equação 1, para cada molécula de glicose são produzidas duas moléculas de piruvato, que então é reduzido a etanol com liberação de duas moléculas de gás carbônico por ação de duas enzimas, a piruvato descarboxilase e a desidrogenase alcoólica (Crocomo e Gutierrez, 2001; Lima *et al.*, 2001). A Figura 1 exemplifica resumidamente como ocorre o processo de fermentação alcoólica.

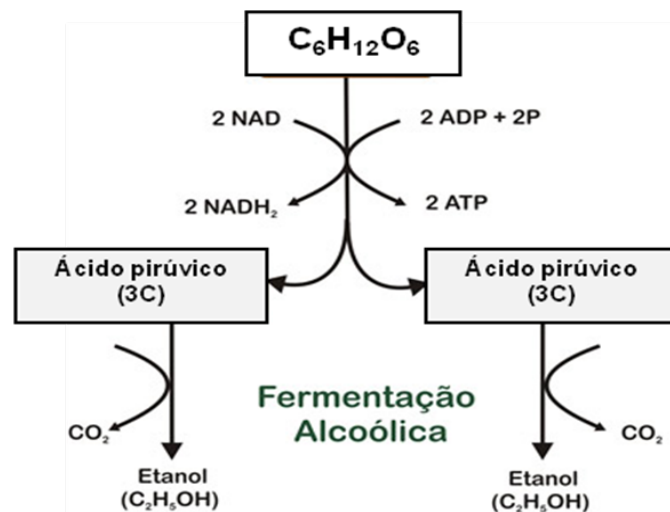
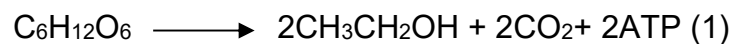


Figura 1. Esquema simplificado do metabolismo da glicose da fermentação alcoólica.

O rendimento teórico na produção de etanol é de 0,511 e 0,489 para CO₂ (Vásquez *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2008). Entretanto, juntamente com o etanol e o CO₂, o metabolismo anaeróbico permite a formação de vários subprodutos durante a fermentação, como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois 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 em um 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.

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado no mundo com uma produção global de 114 bilhões de litros em 2019 (Ren21, 2020) para o qual a produção por fermentação é uma tecnologia bem estabelecida. Porém, ainda há demanda para o desenvolvimento de processos não convencionais que resultem em melhorias na produção de etanol de primeira geração e que visem também alavancar a produção de biocombustíveis de segunda geração. Recentemente, a busca por alternativas tecnológicas que otimizem o processo fermentativo de forma eficiente e com alta produtividade de etanol tem despertado interesse tanto do setor industrial como científico (Azhar *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2016).

Neste sentido, muitas pesquisas e tecnologias têm sido desenvolvidas nos últimos anos, a fim de obter melhorias do processo como o uso da engenharia genética, utilização de matérias-primas alternativas, equipamentos, novas tecnologias, entre outros. 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 (Dussán *et al.*, 2019; Dobšinský e Jedlička 2017; Deutmeyer *et al.* 2011; Liu *et al.* 2009; Perez *et al.*, 2007; Nývák *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004; Ruíz-Gomes *et al.*, 2004).

As fermentações assistidas por campos magnéticos para produção de bioetanol têm atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica como uma técnica não convencional promissora, principalmente após os primeiros relatos sobre os efeitos positivos dos campos magnéticos na produção de bioetanol (Berlot *et al.*, 2013; Motta *et al.*, 2004; Deutmeyer *et al.*, 2011; Galonja-Corghill *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2021; Konopacka *et al.*, 2019; Dobšinský e Jedlička 2017; Liu *et al.*, 2009). 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 e sistemas de exposição ao campo magnético

Independente da sua forma, um ímã tem dois polos, o polo norte (N) e o polo sul (S), que exercem forças um sobre o outro de maneira análoga à das cargas elétricas, sendo assim, polos do mesmo nome se repelem e os polos 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. O campo magnético é gerado por cargas móveis através de ímãs permanentes ou por correntes elétricas ligadas a um solenoide ou a bobinas Helmholtz (Nussenzveig, 1997; Serway, 1996).

Segundo o Sistema Internacional de Unidade (SI), a unidade de campo magnético (B) é o Tesla (T), mas também pode ser representada em Gauss (G), que corresponde a 10^{-4} T, já a intensidade do campo magnético (H) a unidade é Amper por metro (A/m) (Tipler, 2000; Serway, 1996; Reitz, 1967).

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 em uma certa velocidade \vec{v} por um campo magnético constante e uniforme B em uma região do espaço, sofre a ação de uma força perpendicular a \vec{v} e \vec{B} . A força \vec{F} é dada pela Equação 2 e denominada Força de Lorentz do campo magnético (Tipler, 2000; Serway, 1996; Reitz, 1967).

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

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.

No caso dos processos fermentativos em que os meios de cultura e/ou suspensões celulares são ricos em sais e outros nutrientes, ou seja uma série de elementos químicos ionizáveis (com cargas) e estas soluções circulam a determinada velocidade \vec{v} dentro de um fermentador na presença de um campo \vec{B} , as forças de Lorentz provocam a aceleração centrípeta sobre as partículas carregadas no líquido determinando sua trajetória helicoidal (Figura 2) (Perez *et al.*, 2009; Reitz, 1967).

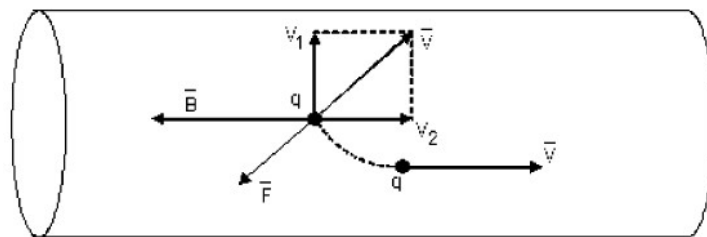


Figura 2. Movimento de uma partícula carregada em meio de fermentação atingindo o equilíbrio dinâmico sob campo eletromagnético. Fonte: Perez *et al.* (2009).

Esta trajetória helicoidal, cujo raio de curvatura é conhecido com Raio de Larmor (Figura 3), depende apenas da carga eletrostática da partícula e de sua massa. Desta forma, em um fermentador onde se aplica um campo há a separação das partículas com carga negativa e positiva, 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 (Perez *et al.*, 2009; Reitz, 1967).

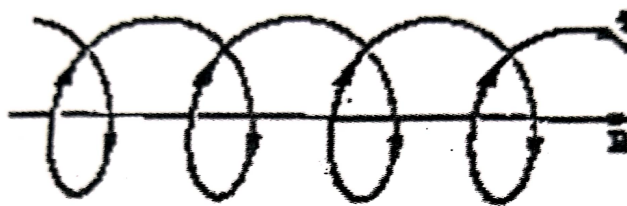


Figura 3. Raio de curvatura de uma partícula carregada em suspensão sob influência de um campo eletromagnético. Fonte: Perez *et al.* (2009).

Atualmente, o magnetismo aplicado em processos biotecnológicos tem apresentado resultados inovadores, entretanto, algumas variáveis importantes do campo magnético que influenciam na resposta e que devem ser consideradas como: a força do campo (densidade de fluxo magnético (B) e a intensidade do campo magnético (H)), tipo do campo (constante ou pulsante), o tempo de exposição, o tipo de corrente, a frequência e a orientação das linhas de campo (Albuquerque *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2009).

Biorreatores assistidos por campos eletromagnéticos estão sendo estudados em diferentes configurações (Dussán *et al.*, 2019; Perez *et al.*, 2009). Prova disso, que nas últimas décadas, uma variedade de dispositivos geradores de campos magnéticos e eletromagnéticos foi desenvolvida para tratar diversos materiais biológicos (David *et al.* 2016; Perez *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2009; Hristov, 2010; Justo *et al.*, 2006). Estes dispositivos 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).

A variedade de sistemas desenvolvidos muitas vezes aumenta os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade de pesquisas com esta tecnologia, pois 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. Porém, estudos básicos em escala laboratorial são necessários para avaliar as vantagens técnico-econômicas para implantação em escala industrial (Dussán *et al.*, 2019).

Para 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 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 apresenta 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) (Figura 4b), 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.

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 e produzem um campo magnético homogêneo na direção vertical na área central com densidade de fluxo magnético variando de 0,1 a 3,5 mT.

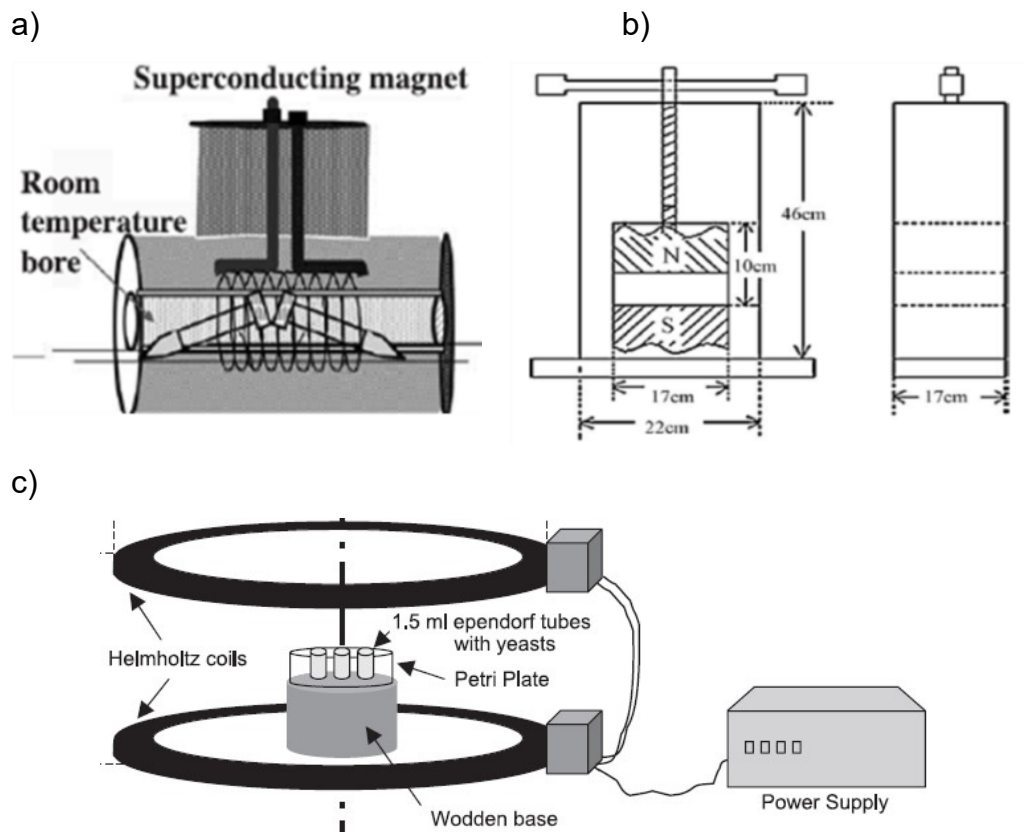


Figura 4. Sistemas de exposição a campos magnéticos de culturas microbianas estáticas gerados por: a) Ímã supercondutor (Iwasaka *et al.*, 2004), b) Ímãs permanentes Nd-Fe-B (Ji *et al.*, 2009) e c) Bobinas Helmholtz (Ruiz-Gómez *et al.*, 2004).

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 polos

opostos (Figura 5a) com distâncias reguladas de forma a obter densidade de fluxo magnético de 20, 12,5 e 5 mT, 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 polos opostos fornecendo densidade de fluxo magnético de 5-20 mT, com linhas de campo perpendiculares ao movimento do fluido com extremada baixa frequência (<300Hz). No segundo aparelho, utilizou-se um solenoide 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.

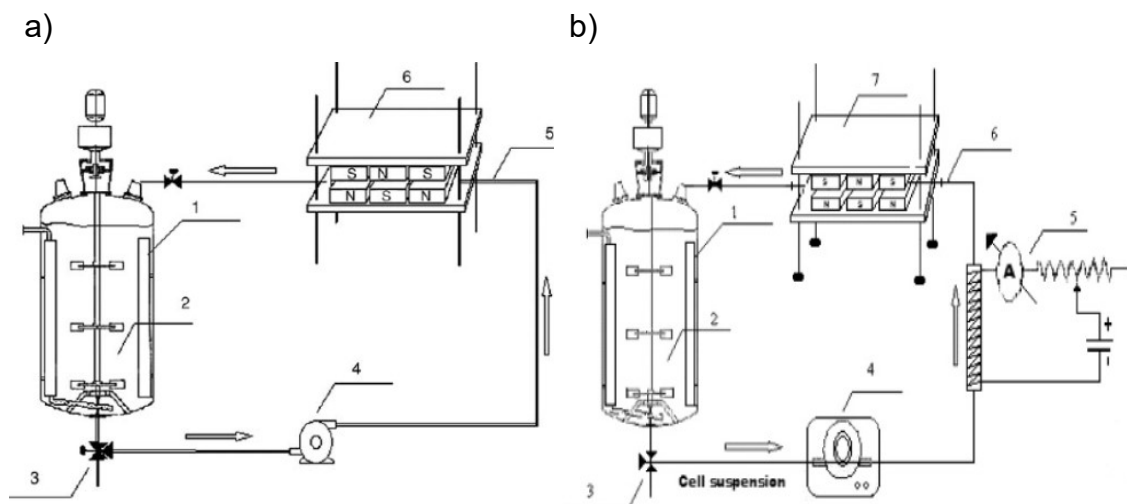


Figura 5. Esquemas experimentais de sistemas de exposição a campos magnéticos de suspensões celulares gerados por: a) Três pares de ímãs com polos opostos (Alvarez *et al.*, 2006), b) Seis ímãs, dispostos com polos opostos e um solenoide de dupla camada de 0,20 (Perez *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa “Biomagnetismo aplicado à Indústria de Processos” está implementado desde de 2008 no Setor de Engenharia de

Processos – Planta Piloto do Laboratório de Tecnologia de Alimentos junto ao Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuária presente na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Para tanto, segundo (Róman, 2015), foram desenvolvidos 3 sistemas geradores de campo magnético equipado com um sistema operacional para controle dos parâmetros do processo, sendo utilizados tanto para a obtenção de biocombustíveis como para produtos de interesse da indústria de alimentos.

Alguns estudos mais recentes do grupo descrevem melhor estes sistemas (Figura 6). Na Figura 6a 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 Greatz e controlado por um medidor digital.

De forma semelhante, Dussán *et al.* (2019) também utilizaram os sistemas variando a direção das linhas do campo gerado por dois conjuntos de bobinas que permitiam duas direções das linhas de campo em relação ao eixo vertical do fermentador, ou seja, transversal e axial (Figura 6b). Já Andrade *et al.* (2021) utilizaram apenas o sistema de gerador de campo com linhas na direção axial (Figura 6c) variando os sistemas de reciclo da suspensão celular.

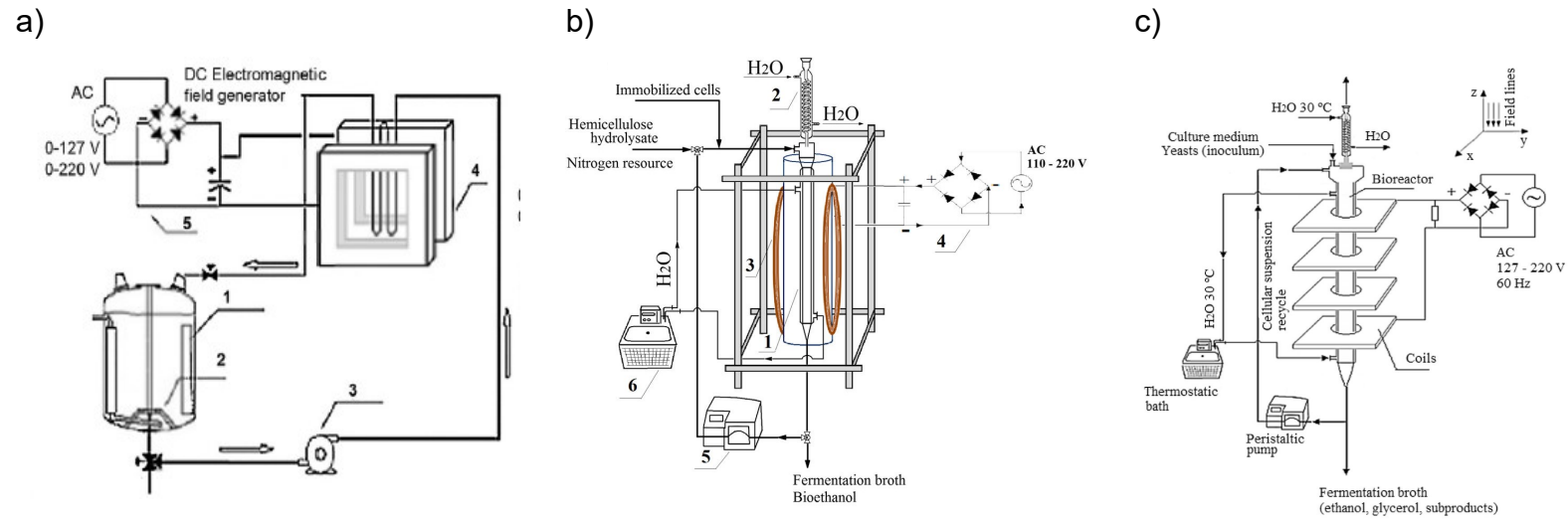


Figura 6. Esquemas experimentais de sistemas de exposição a campos magnéticos de suspensões celulares gerados por Bobinas Helmholtz desenvolvidos pelo grupo de pesquisa: a) Biorreator axial-transversal (David *et al.*, 2016); b) Biorreator transversal (Dussán *et al.*, 2019) e c) Biorreator axial (Andrade *et al.*, 2021).

2.3 Aplicações biotecnológicas de campos magnéticos

Nas últimas décadas, muitos pesquisadores investigaram a influência do campo magnético em sistemas biológicos e os efeitos provocados na célula. Diversas aplicações biotecnológicas sob campos magnéticos têm apresentado melhorias significativas do ponto de vista industrial e científico, entretanto os mecanismos biológicos dessa interação ainda não foram claramente elucidados (Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007 e 2009; Li *et al.*, 2007; Justo *et al.*, 2006).

Dessa forma, tanto a estimulação quanto a inibição de processos celulares representam 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. 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; David *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2007).

Os mecanismos envolvidos nessa interação ainda se encontram sob investigação. Na literatura algumas hipóteses de atuação do campo magnético sobre célula estão centradas principalmente nos componentes da membrana celular, acarretando respostas metabólicas que influenciam no crescimento, na composição celular e na síntese de metabólitos secundários (Silva *et al.*, 2020; Dobšinský e Jedlička, 2017; Perez *et al.*, 2007).

Segundo Perez *et al.* (2007), Fojt *et al.* (2004) e Strašák *et al.* (2002), campos magnéticos afetam a permeabilidade dos canais iônicos na membrana, afetando assim o transporte de íons para dentro das células. Para Hunt *et al.* (2009), além do aumento na permeabilidade da membrana, há um aumento da circulação do fluxo de íons e na taxa de reações bioquímicas bem como, 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 interna de carga elétrica de moléculas lipídicas da bicamada da membrana, na expressão de genes específicos e na atividade da enzima.

Para Albuquerque *et al.* (2016), a presença do campo altera a direção da migração de certos micro-organismos e o crescimento e a reprodução, aumenta a

síntese de DNA, atua na orientação de biomoléculas e reduz do número de células. Outro possível efeito é de que campos 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).

Na literatura são encontradas muitas pesquisas com aplicações biotecnológicas de campos magnéticos com diferentes sistemas, parâmetros experimentais e tipos de micro-organismos e fatores como: a intensidade do campo, tipo de campo, frequência, tempo de exposição, parâmetros operacionais dos dispositivos geradores de campo, direção das linhas de campo, geometria do sistema, configuração e tipo de campo, tipo de micro-organismo, composição do meio, a concentração microbiana, o estado biológico das células influenciam nos efeitos encontrados em resposta ao tratamento com campo magnético (Dussán *et al.*, 2019; David *et al.*, 2016; Albuquerque *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2009; Tenuzzo *et al.*, 2009).

A membrana celular é um importante alvo de estudo quando campos magnéticos são aplicados em micro-organismos, pois acredita-se que as respostas obtidas em processos biotecnológicos sob efeito destes campos estejam relacionadas inicialmente à interação do campo com a membrana plasmática da célula, e alterando as respostas metabólicas que influenciam na permeabilidade da membrana e na passagem de nutrientes para o interior da célula, no crescimento celular e na síntese de metabólitos secundários (Silva *et al.*, 2020; Dobšinský e Jedlička, 2017; Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007).

Portanto, a influência real dos campos magnéticos nas células torna-se mais complexa uma vez que, os experimentos envolvem uma gama de condições de exposição. Não há um consenso quanto aos efeitos provocados na célula, de maneira geral, os mecanismos biofísicos e bioquímicos que constituem a base da interação com campos magnéticos encontram-se sob investigação, (Dussán *et al.*, 2019, Albuquerque *et al.*, 2016). Entretanto, maiores esforços serão necessários para avaliar o comportamento complexo dos sistemas biológicos mediante a aplicação desta tecnologia.

2.3.1 Processos fermentativos e produção de metabólicos

Em bioprocessos, a aplicação de campos magnéticos tem apresentado respostas que vão desde alterações nas taxas de crescimento (inibição ou estimulação) até produção de metabólitos dependendo dos parâmetros estabelecidos (Hristov e Perez, 2011; Hunt *et al.*, 2009). Tratando da produção de bioprodutos, inúmeros benefícios foram obtidos nos últimos anos com a aplicação de campos magnéticos em processos fermentativos (Silva *et al.*, 2020; Dussán *et al.*, 2019; David *et al.*, 2016; Berlot *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007; Justo *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004), implicando em futuras melhorias no setor industrial de biocombustíveis, farmacêutico e alimentício.

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 magnético, o rendimento de nisina, no que diz respeito ao consumo de substrato e da biomassa formada foi, respectivamente, três e cinco vezes maior que os valores encontrados nos experimentos controle.

Santos *et al.* (2010) avaliaram a influência das variáveis tempo de exposição (8 - 16 h) e densidade de fluxo magnético (25,0 - 34,3 mT) na fermentação com *S. cerevisiae* ATCC 7754 para a produção de glutatona e verificaram o 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).

Muitos estudos também relatam o efeito positivo do campo magnético na produção de etanol por células de *S. cerevisiae* aumentando a taxa metabólica (Konapacka *et al.*, 2019; Dobšinský e Jedlička 2017; Motta *et al.*, 2004), a captação de glicose (Motta *et al.*, 2004; Ivanova *et al.*, 1996) e influência na redução do tempo de fermentação (Andrade *et al.*, 2021; Berlot *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007).

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 por *S. cerevisiae*. Ao aplicarem um campo magnético de 40 mT com frequência de 50 Hz durante 30 min de exposição por 10 dias no processo fermentativo do vinho. Dobšinský e Jedlička (2017) verificaram que o campo magnético acelerou o metabolismo da levedura e favoreceu a redução do tempo de fermentação. Berlot *et al.* (2013) verificaram uma redução no tempo de fermentação de mosto de uva quando células de *S. cerevisiae* foram previamente expostas ao campo magnético estático de 140 mT durante 72 h.

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, uma vez que a fermentação foi concluída em menos tempo quando comparada com o experimento controle (fermentação não exposta ao campo magnético), 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⁻¹ e densidade de fluxo magnético de 20 mT).

A produtividade de etanol aumentou 15% na fermentação do melaço de cana-de-açúcar por células de *S. cerevisiae* expostas a campo magnético de 150 mT (Galonja-Coghill *et al.*, 2009). Já Deutmeyer *et al.* (2011) observaram um aumento de 8% no rendimento de etanol na fermentação exposta a campos magnéticos estáticos não homogêneos de 200 mT gerados por ímãs NdFeB. Dussán *et al.* (2019) obtiveram um aumento de 12% no rendimento e de 34% na produtividade de etanol. Para Konapacka *et al.*, (2019), as culturas expostas ao campo magnético aumentaram até 33% e 50% a produção de etanol em comparação com o processo de controle.

Nas condições estudadas por Lopes *et al.* (2010) nenhum benefício foi verificado pela presença de campo magnético na produção de etanol em batelada. De modo semelhante, os resultados encontrados por Ruiz-Gomes *et al.* (2004) indicaram que a aplicação de campo magnético estático com densidade de fluxo magnético de 0,35 e 2,45 mT, durante 24 e 72 h não induziu alterações no crescimento da *S. cerevisiae* WS8105-1C.

Andrade *et al.* (2021) estudaram a produção de bioetanol em biorreator assistido por campo magnético axial na densidade de fluxo magnético de 10 mT usando três diferentes arranjos de reciclagem (tubo em espiral, tubo em U e biorreator). Em todas as condições estudadas, o campo magnético favoreceu a produção de bioetanol, reduzindo os tempos de fermentação em 2 h e atingindo um aumento na produtividade do etanol em relação ao controle. Além do aumento na produção de etanol, o campo magnético (B) também proporcionou um aumento no efluxo de H⁺ associado à atividade da enzima H⁺-ATPase tipo P.

De fato, pode observar resultados positivos disponíveis na literatura sobre a aplicação desta tecnologia em bioprocessos. Entretanto, entender os efeitos desta tecnologia sobre micro-organismos representa um passo de grande importância para a biotecnologia (Perez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006). Na Tabela 1 estão apresentados resumidamente alguns estudos relacionados aos efeitos do campo magnético sobre células de leveduras na produção de etanol.

Além do bioetanol, outros metabólitos de interesse industrial e científico podem ser obtidos e estimulados em bioprocessos através da aplicação de campos magnéticos, como carotenoides (Silva *et al.*, 2020) e outros pigmentos (Zhang *et al.*, 2015), proteínas (Veiga *et al.*, 2020; Justo *et al.*, 2006), ácido cítrico (Gao *et al.*, 2011), glutatona (Santos *et al.*, 2012), nisina (Alvarez *et al.*, 2006). Resumidamente, na Tabela 2 estão apresentados alguns produtos obtidos em processos biotecnológicos assistidos por campos magnéticos de estudos disponíveis na literatura.

Tabela 1. Leveduras expostas a campos magnéticos para produção de etanol

Micro-organismo	Parâmetros de campo magnético	Resultados e observações	Referência
<i>S. cerevisiae</i> X2189	Densidade de fluxo magnético de 10 mT (B).	Redução de 20% no tempo de fermentação e aumento de 33% na produtividade de etanol.	Andrade <i>et al.</i> (2021)
<i>Scheffersomyces shehatae</i> <i>UFMG HM52.2 imobilizadas</i>	Intensidade do campo magnético de 8 kA e 12 kA.	Aumento de 12% no rendimento e de 34% na produtividade de etanol.	Dussán <i>et al.</i> (2019)
<i>S. cerevisiae</i>	40 mT com frequência de 50 Hz durante de 30 minutos	Redução do tempo de fermentação.	Dobšinský e Jedlička (2017)
<i>S. cerevisiae</i>	Campo magnético estático de 140 mT durante 24, 48 e 72h de exposição.	Aumento do consumo de glicose e no rendimento de etanol.	Berlot <i>et al.</i> (2013)
<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>	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)

Tabela 2. Exemplos de processos biotecnológicos usando diferentes micro-organismos sob campos magnéticos

Micro-organismo	Parâmetros de campo magnético	Resultados e observações	Referência
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268	Densidade de fluxo magnético de 30 mT por 168h de exposição	Aumento de 12,8% na concentração celular do inóculo. A produção de carotenoides aumentou 59,4% e a produtividade de carotenoides 99,3%.	Silva <i>et al.</i> (2020)
<i>Monascus purpureus</i> SKY219	Densidade de fluxo magnético de 0,4 mT por 1, 4, 12, 24, 48, 72 e 96h de exposição.	Aumento de 65,4% no rendimento dos pigmentos amarelos e 59,2% nos pigmentos vermelhos.	Zhang <i>et al.</i> (2015)
<i>Saccharomyces 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>Yarrowia lipolytica</i> NRRL-1095	Intensidade eletromagnética de 1,5, 4,5 e 9,0 kA/m durante 24h.	Nas melhores condições houve Aumento de 6% na produção de biomassa e de 30% na produção de lipase.	David <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	Densidade de fluxo magnético de 60 mT por 24h	Aumento de 20,5% na concentração de biomassa e de 24,8% no teor de carboidratos.	Deamici <i>et al.</i> (2016).

2.3.2 Crescimento e inativação de micro-organismos

Muitas pesquisas também têm se dedicado a estudar os possíveis efeitos ocasionados pela exposição aos campos magnéticos na inativação de micro-organismos (Albuquerque *et al.*, 2016). Uma vez que o campo magnético provoca alterações no crescimento celular, proliferação e viabilidade celular por afetar as funções biológicas dos organismos, além de alterar características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos micro-organismos dependendo dos parâmetros utilizados (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 e membranas. Para Novák *et al.* (2007), bactérias são mais sensíveis à exposição a campos magnéticos do que as leveduras. Além disso, a diferença no efeito do campo entre as estirpes bacterianas pode ser causada pelo tipo de célula (eucariótico ou procariótico), morfologia (Fojt *et al.*, 2007; Strašák *et al.*, 2005), bem como a estirpe (Fojt *et al.*, 2004).

Ma *et al.* (2009) estudaram campo magnético de até 4,5T em *Escherichia coli* 8099 e verificaram que após o tratamento a taxa de sobrevivência do micro-organismo diminuiu significativamente e que a fase exponencial (Log) de crescimento de *E. coli* foi a fase de maior sensibilidade. Além da inibição no crescimento de *E. 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. A superfície das células crescidas sob o efeito do campo magnético apresentou deformações principalmente nas extremidades. Novák *et al.* (2007) verificaram a destruição de uma fração das células da levedura *S.cerevisiae* CCY 21-4-59 com um campo magnético de 10 mT durante 60 min de exposição.

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. Entretanto, em alguns estudos o crescimento celular não é afetado pelo campo. Harte *et al.* (2001) não observaram 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 μ s) em combinação com outras tecnologias não-térmicas (ultrassom, alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado e antimicrobianos como nisina e lisozima).

Lin *et al.* (2019) verificaram que após tratamento com campos magnéticos pulsados 0 a 8,0 T a 20 pulsos *E. coli* O157:H7 foram causados danos na membrana celular aumentando a permeabilidade da membrana celular, reduzindo o conteúdo de três macromoléculas intracelulares (proteína, ATP e DNA), além de exibir inibição da atividade ATPase.

Para a indústria de alimentos, essa técnica não convencional representa uma alternativa inovadora, uma vez que a aplicação de campos magnéticos na inativação de micro-organismos tem apresentado respostas promissoras no tratamento de contaminações microbianas. Resumidamente, na Tabela 3 estão apresentados alguns estudos envolvendo bactérias patogênicas sob aplicação de campos magnéticos, bem como os efeitos produzidos sobre as células expostas.

Tabela 3. 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>et al.</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 Aspectos gerais sobre membrana plasmática

As membranas celulares servem como barreira seletiva à passagem de substâncias do meio extracelular para o intracelular e vice-versa, transportando moléculas específicas e íons, nutrientes essenciais, excretar produtos, metabólitos e regular concentrações intracelulares de íons (Alberts *et al.*, 2010). Na Figura 7 está apresentado um desenho ilustrativo da membrana celular.

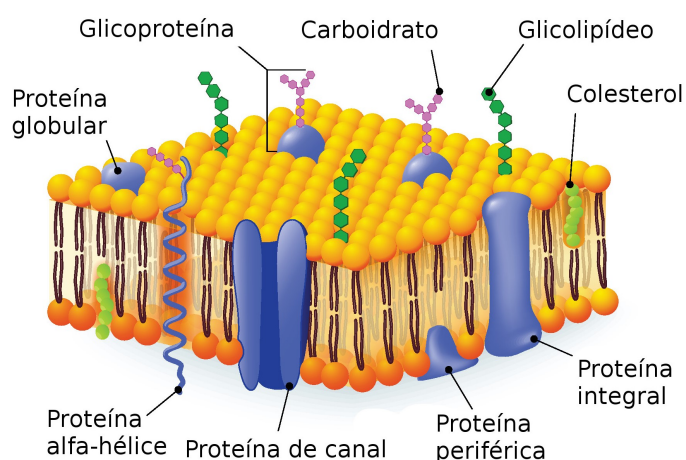


Figura 7. Ilustração da membrana plasmática que envolve as células. Fonte: Junqueira e Carneiro (2012).

As células de leveduras 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 (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 (Figura

8). 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).

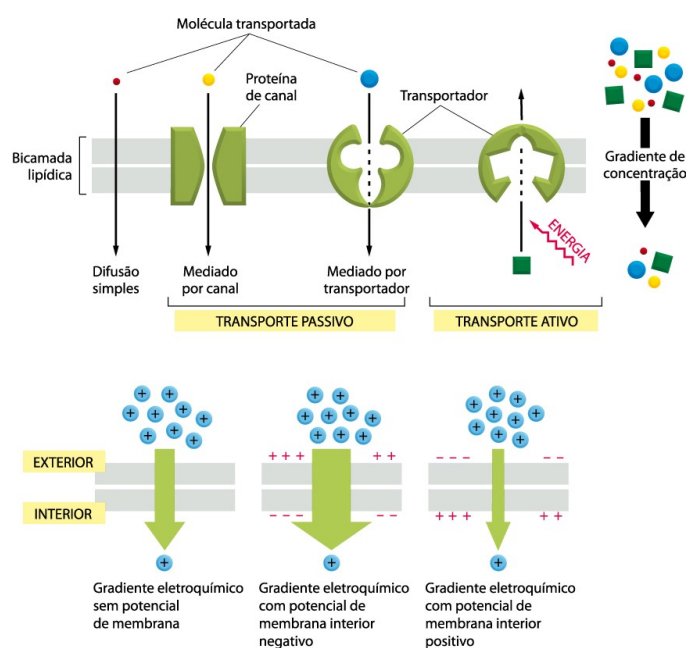


Figura 8. Esquema de transporte através da membrana plasmática. Fonte: Alberts *et al.* (2010).

Os gradientes de íons desempenham um papel importante nas células, uma vez que conduzem vários processos essenciais de transporte (Cyert e Philpott, 2013). 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).

Existem três principais classes de bombas acionadas por ATP (Figura 9): bombas do tipo P são estruturais e funcionalmente relacionadas a proteínas transmembranas de múltiplas passagens que se autofosforilam durante o ciclo de bombeamento; bombas do tipo F são proteínas semelhantes a turbinas

classificadas com ATP-sintases, pois atuam de forma reversa utilizando o gradiente de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato; e transportadores ABC que bombeiam predominantemente moléculas através das membranas celulares (Alberts *et al.*, 2010).

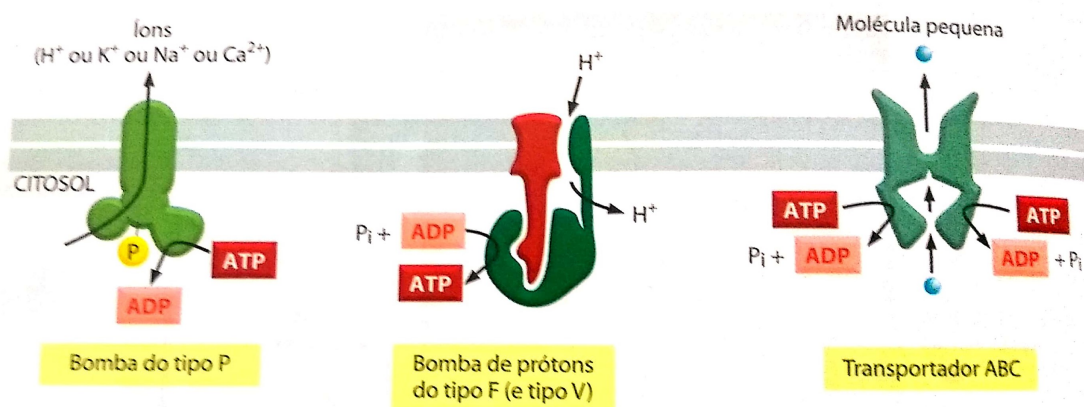


Figura 9. Tipos de bombas dirigidas por ATP. Fonte: (Alberts *et al.*, 2010).

Em todos os eucariotos, o potencial de membrana plasmática e os sistemas de transporte secundário são energizados pela atividade de proteínas de membrana H^+ -ATPase do tipo P. Essas bombas de H^+ são capazes de transportar H^+ através das membranas contra o gradiente eletroquímico de H^+ , usando a energia de hidrólise do ATP. Essas bombas são consideradas enzimas eletrogênicas, pois transportam cargas elétricas (positivas), criando uma diferença das cargas elétricas através da membrana, chamada potencial de membrana e simultaneamente, uma diferença dos potenciais químicos de H^+ ou gradiente de concentração de H^+ (ΔpH) (Pedersen *et al.*, 2007).

2.5 H^+ -ATPases tipo P: estrutura e funcionamento

As H^+ -ATPases representam uma grande família de enzimas eletrogênicas capazes de transportar carga elétrica (positiva) em forma de H^+ , através das membranas, utilizando a energia da hidrólise do ATP. Também são conhecidas como bombas protônicas translocase (EC 7.1.2.1) que regulam o pH

citoplasmático e geram a força necessária para transportar prótons através da membrana plasmática. Esta enzima mantém um potencial de membrana, o qual é essencial para todas as células eucarióticas. Esse potencial de membrana é baseado nas diferentes concentrações de íons na parte intra e extracelular da membrana (Cosse e Seidel, 2021; Cyert e Philpott, 2013).

O potencial de membrana e o gradiente de concentração de prótons (ΔpH) são importantes fatores na manutenção da atividade celular, uma vez que o gradiente eletroquímico criado por essas bombas estimula processos celulares centrais, tais como o transporte secundário de nutrientes (aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos) e produtos metabólicos para dentro e para fora da célula, respectivamente (Duby e Boudry, 2009; Pederson *et al.*, 2007).

A Figura 10 mostra a estrutura de uma H^+ -ATPase tipo P, um peptídeo de 100 KDa que contém dez hélices transmembranares (Pederson *et al.*, 2007). É uma das proteínas mais abundantes da membrana, constituindo de 15-20% de todas as proteínas encontradas na membrana de leveduras (Eraso *et al.*, 1987), com capacidade de transportar de 20-100 H^+ para fora da célula por segundo e consumo de pelo menos 20% de ATP celular (Cyert e Philpott, 2013; Serrano, 1988). Dessa forma, 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).

Além disso, esta enzima é regulada mais efetivamente pelo aumento do acoplamento entre o transporte de H^+ e a hidrólise de ATP, sugerindo que esta enzima pode responder mais rápido aos desafios impostos pelo ambiente (Gaxiola *et al.*, 2007).

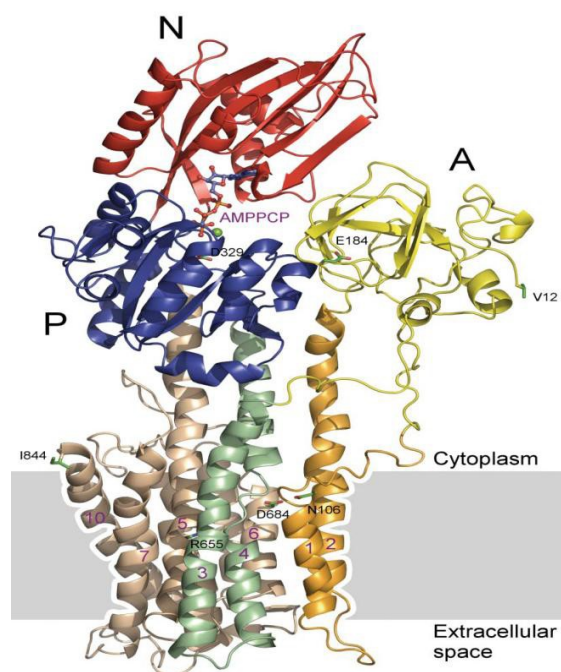


Figura 10. Estrutura representativa de uma forma ativa da H^+ -ATPase tipo P. São indicadas dez hélices transmembranas (laranja, verde e marrom); o domínio ligado ao nucleotídeo (N), vermelho; o domínio de fosforilação (P), azul; e o domínio ativo (A), amarelo. Fonte: Pedersen et al. (2007).

A H^+ -ATPase da membrana plasmática desempenha um papel essencial na fisiologia das células de fungos e leveduras, uma vez que a concentração de prótons (H^+) na célula influencia drasticamente todos os aspectos da bioquímica celular, regulado por esta enzima presente na membrana plasmática (Cyert e Philpott, 2013). O gradiente eletroquímico é utilizado pelos transportadores de proteínas para impulsionar a captação e o efluxo de íons e nutrientes através da membrana. Portanto, a absorção de nutrientes depende da manutenção do gradiente de prótons, uma vez que os principais nutrientes possuem afinidade com H^+ , como glicose, outros açúcares e aminoácidos (Cyert e Philpott, 2013; Lobão *et al.*, 2007).

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 H^+ -

ATPase tipo P um importante alvo de estudo quando leveduras são expostas a campos magnéticos externos.

2.6 Interação do campo magnético com enzimas ATPases

Para Hunt *et al.* (2009) e Pazur *et al.* (2007), os efeitos provocados por campos magnéticos em micro-organismos estão associados a alterações na membrana plasmática, com mudanças na conformação de proteínas, na expressão gênica, e na atividade de diversas enzimas. 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. 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).

Para Blank e Soo (2001), o campo magnético influencia na atividade enzimática, pois atua interagindo com cargas móveis e afetando elétrons dentro das bases do DNA. Moreli *et al.* (2005) verificaram uma redução maior que 50% na atividade de enzimas associadas à membrana expostas ao mesmo campo magnético. Por outro lado, Verma *et al.* (2017) constataram aumento da atividade enzimática da alfa amilase com campo magnético de 100 e 200mT.

O campo magnético pode influenciar na atividade enzimática, uma vez que um campo elétrico também é gerado. As H⁺-ATPases tipo P são enzimas eletrogênicas que transportam cargas elétricas (positivas) e criam um gradiente de concentração de H⁺ (Δ pH). De acordo com Minc e Chang (2010), o campo elétrico altera o potencial transmembranar em torno da célula, uma vez que afeta diretamente o fluxo de prótons provenientes de proteínas H⁺-ATPase da membrana plasmática. Oncul *et al.* (2015) verificaram que a exposição ao campo eletromagnético 1 e 50 mT durante 2 h em células de *S. aureus* e *E. coli* afetou o potencial transmembranar com alteração de fluxos iônicos, levando à hiperpolarização da membrana.

Andrade *et al.* (2021) verificaram que o campo magnético influenciou na atividade protônica da H⁺-ATPase tipo P presente na membrana plasmática de *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol. Houve um aumento significativo no efluxo de H⁺ associado à atividade da enzima H⁺-ATPase

tipo P. Sendo assim, o campo influenciou no efluxo de prótons e possivelmente favoreceu melhores condições durante o processo fermentativo.

Na literatura, poucos estudos abordam a influência de campos magnéticos na atividade de enzimas H⁺-ATPase tipo P. A atividade da Na, K-ATPase membrana, em condições basais, apresentou um aumento de 5-10% sob campos magnéticos de 0 a 70 Hz e 0 a 2 G. Além disso, o aumento na atividade da enzima teve pouca dependência da intensidade do campo, porém observa-se que o campo provavelmente influencia o fluxo de carga dentro da enzima durante a reação (Blank *et al.*, 1995).

Chen *et al.* (2009) estudaram a F₀F₁-ATPase exposta a campos magnéticos de 60 Hz e densidade de fluxo magnético de 0,1, 0,3 e 0,5 mT. Os autores verificaram um aumento na atividade de hidrólise da enzima quando exposta aos campos de 0,3 e 0,5 mT. Em contrapartida, a densidade de fluxo magnético de 0,1 mT não apresentou nenhum efeito na atividade, sugerindo que a atividade enzimática é dependente da densidade de fluxo magnético aplicado. Além disso, os resultados sugerem que o campo afeta principalmente a F₁, uma vez que o pH não foi alterado após a exposição; portanto a atividade de F₀ não foi afetada pelo campo, já que sua principal função é a transferência de H⁺.

Alguns estudos abordam os efeitos do campo magnético na ativação de outras ATPases do tipo P, como Na⁺/K⁺-ATPase (Blank, 2005; Moreli *et al.*, 2005) e Ca²⁺-ATPases de membranas celulares de mamíferos (Wei *et al.*, 2015; Moreli *et al.*, 2005) e mais recentemente a Na⁺-ATPase do fungo *M. purpureus* (Xiong *et al.*, 2020). Resumidamente, alguns estudos sob a aplicação de campos magnéticos na atividade e funcionamento de algumas ATPases estão apresentados na Tabela 4. Entretanto, um possível envolvimento de um efeito sobre os gradientes eletroquímicos transmembranares na modulação da captação de íons ainda não foi explorado.

Tabela 4. Estudos do efeito de campo magnético em sistemas celulares contendo bombas de íons de diferentes tipos

Enzima	Parâmetros de campo magnético	Resultados e observações	Referência
Na ⁺ -ATPase	B=1,6 mT.	Houve aumento do transporte de Na ⁺ do meio extracelular para o intracelular.	Xiong <i>et al.</i> (2020)
F ₀ F ₁ -ATPase	Campo magnético pulsado, 60 Hz e B (0,1, 0,3 e 0,5 mT).	A atividade de hidrólise da enzima quando exposta aos campos de 0,3 e 0,5 mT.	Chen <i>et al.</i> (2009)
Ca ²⁺ -ATPase	Campo magnético pulsado, B = 2 mT (frequências de 15, 50, 75 e 100 Hz).	Aumentou a atividade da enzima e os níveis de Ca ²⁺ .	Wei <i>et al.</i> (2015)
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	B = 10 µT e frequência de 10 a 2.500 Hz.	A atividade da enzima aumentou em função da frequência utilizada.	Blank e Soo, (2001)
Na ⁺ K ⁺ -TPase, Ca ⁺ -ATPase, Mg ⁺ -ATPase	Campo magnético pulsado (10, 20, 30, 40, 50, 60 pulsos) e B= 0-8T.	A atividade das enzimas diminuiu em 97,11%, 70,33% e 34,25%, respectivamente.	Lin <i>et al.</i> (2019)
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Campo magnético pulsado, frequência de 0-70 Hz e B= 0-2G.	Aumento de 5-10% na atividade da enzima.	Blank <i>et al.</i> (1995)
Ca ²⁺ -ATPase e Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Frequência 75 Hz e B= 2,5 mT em intervalos de 20 minutos.	A atividade das enzimas não foi afetada pelo campo magnético.	Moreli <i>et al.</i> (2005)

B-densidade de fluxo magnético.

2.7 Considerações gerais sobre a pesquisa bibliográfica

- Apesar da intensa atividade de pesquisa relacionada com aplicações de campos magnéticos em sistemas biológicos ainda existem lacunas importantes sobre a interação do campo com as células e, portanto, os mecanismos biológicos desta interação ainda não foram completamente esclarecidos;
- Diversos trabalhos demonstram os impactos biológicos de campos magnéticos em processos fermentativos indicando, por exemplo, melhorias na produção de metabólitos (Konapacka *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2004), incluindo estudos anteriores do grupo (Andrade *et al.*, 2021; Dussán *et al.*, 2019, David *et al.*, 2016, Perez *et al.* 2007);
- Se observa também que muitas vezes os sistemas experimentais explorados não são bem descritos e, havendo carência sobre a informação de parâmetros de campo magnético se impõem restrições na comparação dos resultados experimentais observados, resultando muitas vezes em contradições aparentes sobre o efeito biológico destes campos magnéticos;
- Entre os efeitos provocados por campos magnéticos associados a alterações na membrana plasmática das células microbianas, o estudo do campo em enzimas transmembranares associadas ao transporte de íons em diferentes subníveis celulares como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e Na^+/K^+ -ATPases é muito importante. Até onde se sabe não há relatos sobre o efeito do campo em bombas de prótons tipo H^+ -ATPase de membrana plasmática de microorganismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Meio de manutenção

A levedura 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 (Kavavi et al., 2012). O meio foi vertido em tubo de ensaio e esterilizado a 121°C por 20 min. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 30°C durante 72 h em agitador shaker modelo MA 832 (Marconi, SP-Brasil), e finalmente estocados a 4°C até a sua utilização.

3.2.2 Preparo do inóculo e obtenção da biomassa

A levedura mantida em meio sólido foi transferida para o meio líquido. O meio de cultura continha: 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 40 g/L de glicose (Andrade et al., 2021) autoclavado a 121°C por 20 minutos com pH ajustado antes da esterilização. Previamente foi construída a curva de crescimento (Apêndice B). O crescimento das culturas de células ocorreu a 30°C

em agitador shaker modelo MA 832 (Marconi, SP-Brasil) sob agitação constante de 200 rpm, acompanhado pela medida em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific), realizada com intervalos de 2 h, em comprimento de onda de 600 nm.

O pré-cultivo foi realizado em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 1/5 volume de meio (50 mL), por aproximadamente 12 h em incubadora tipo shaker modelo MA 832 (Marconi, SP-Brasil) com agitação a 200 rpm a 30°C. Para o preparo do inóculo, as células da pré-cultura (20%v/v) foram transferidas assepticamente para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura e em seguida, incubadas em agitador shaker a 30°C e 200 rpm até atingir 1×10^6 células/mL.

Após obtenção do inóculo, as células da suspensão celular foram recuperadas por centrifugação a 2540 x g por 5 min e lavadas em água destilada esterilizada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa obtida foi armazenada em tubos Falcon de 15 mL a 4°C até a sua utilização.

3.2.3 Fermentações assistidas por campo magnético

As fermentações para avaliar a produção de bioetanol foram realizadas em meio YPD contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 65 ou 100 g/L de glicose, esterilizado a 121°C por 20 min com pH ajustado antes da esterilização (Duarte *et al.*, 2013). O meio de cultura foi inoculado com biomassa úmida (75% de umidade) com concentração inicial de 20 g/L de células da levedura em relação ao volume do meio. A biomassa (item 4.2.2) foi pesada assepticamente em balança semianalítica e inoculada no meio de cultivo.

As fermentações (em duplicata) foram conduzidas em condições anaeróbicas a 30°C, em fermentador de coluna de vidro com capacidade de 240 mL acoplado a um condensador vertical de vidro para condensação dos vapores de etanol (20°C), em biorreator assistido por campo eletromagnético de frequência extremamente baixa (< 300 Hz) com linhas de campo magnético na direção axial e densidade de fluxo magnético de 10 mT, com 4 diferentes configurações de tratamento (Figura 11), como descrito a seguir: a) biorreator com reciclo externo em tubo reto (Figura 11a); b) biorreator com reciclo externo em tubo em U (Figura 11b), biorreator com reciclo externo em espiral (Figura 11c)

posicionados no centro das bobinas do campo magnético, e biorreator sob campo magnético sem reciclo da suspensão celular (Figura 11d) com mais detalhes no Apêndice C. Nos sistemas com reciclo da suspensão celular o fluxo adotado foi de 102 mL/min. Os experimentos controle foram realizados sem aplicação de campo magnético nas mesmas condições dos cultivos conduzidos sob a exposição ao campo. Amostras foram retiradas em tempos predeterminados para realização das análises descritas no item 4.3. Os experimentos foram conduzidos até consumo total do substrato para fins comparativos e com consumo parcial da glicose (6h) para isolamento e análise de acoplamento da H⁺-ATPase.

O efeito do campo na fermentação para produção de bioetanol foi avaliado sobre as respostas: rendimento de etanol, produtividade volumétrica de etanol, consumo volumétrico de glicose, densidade média de fluxo de prótons, conteúdo de proteínas, alterações morfológicas e atividades da enzima H⁺-ATPase tipo P (transporte, hidrólise).

Previamente, o sistema de geração de campo magnético foi calibrado (Andrade, 2018) determinando as faixas de densidade de fluxo magnético e os parâmetros de operação a serem utilizados no sistema, bem como a distribuição do campo no biorreator (Apêndice C). As medições de densidade de fluxo magnético em função da posição dentro da câmara de tratamento magnético foram realizadas utilizando gaussímetro digital modelo 5180 (F.W. BELL, USA).

As bobinas foram energizadas por corrente contínua (DC) e durante a fermentação foi adotado como estratégia operacional, um esquema tipo on/off, ou seja, exposição ao campo magnético com intervalos de tempo 1h ligado/desligado, devido ao aquecimento (60°C) da câmara de tratamento magnético (Andrade, 2018; David, 2012). O monitoramento do aquecimento das bobinas geradoras de campo magnético foi realizado utilizando uma câmara de termovisor modelo E40 FLIR (FLIR Systems, Inc., USA).

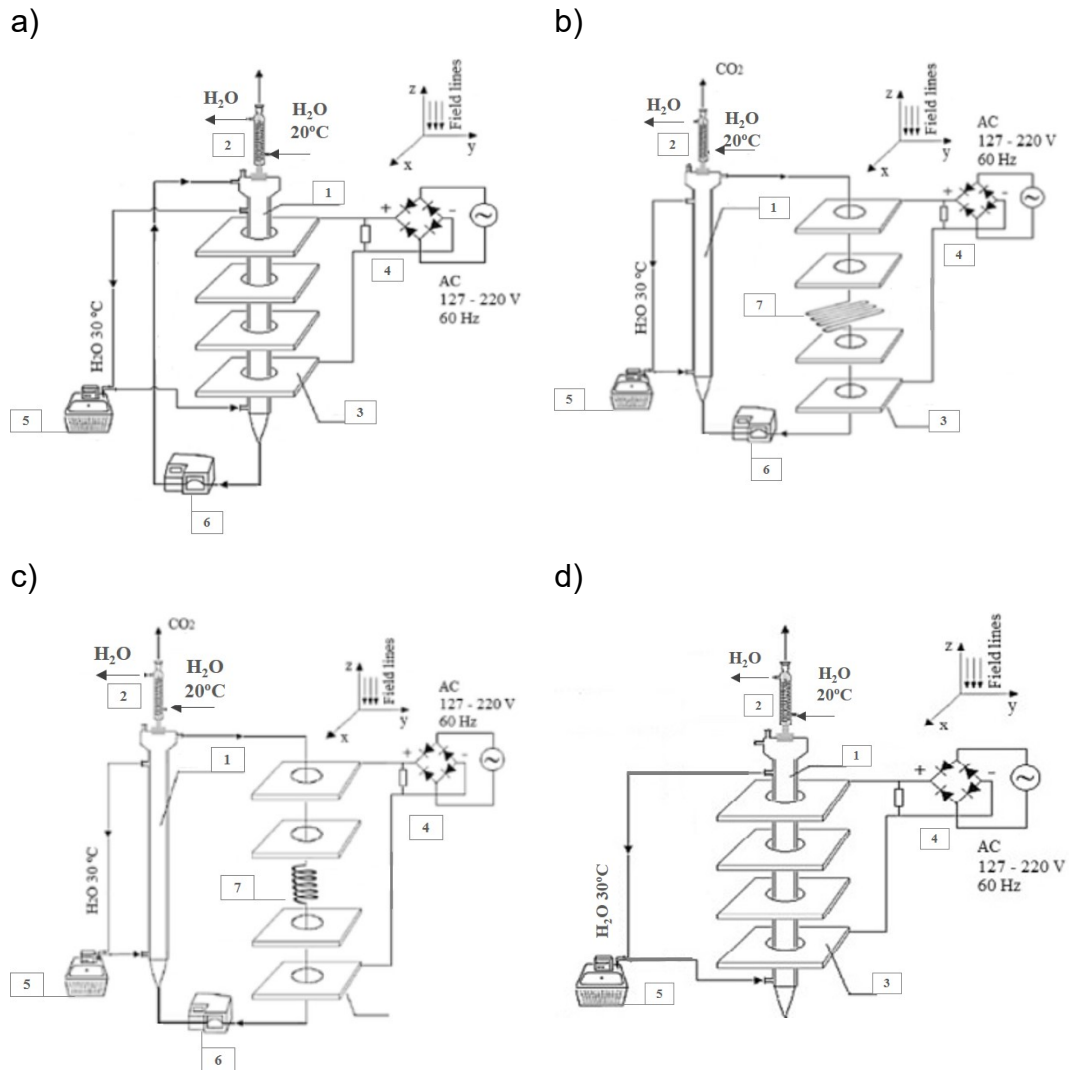


Figura 11. Sistema de fermentação no Biorreator Assistido por Campos eletromagnéticos – Sistema Axial do Laboratório de Engenharia de Processos - Planta Piloto (LTA/CCTA). Esquema das configurações de biorreator assistido por campo magnético axial: a) Biorreator com reciclo externo em tubo reto; b) Biorreator com reciclo externo em tubo em U; c) Biorreator com reciclo externo em tubo em espiral; d) Biorreator sem reciclo. Sendo: 1- biorreator de vidro; 2- Condensador; 3- bobinas geradoras de campo magnético; 4- variador de tensão; 5- banho termostático para controle de temperatura da fermentação; 6- Bomba peristáltica para reciclo do meio de fermentação; 7- Sistema de reciclo (em U ou espiral).

As variáveis de processo como temperatura do banho termostático, fluxos de substratos, densidade de fluxo magnético (pela variação da corrente elétrica previamente retificada) e aquecimento das bobinas (através do monitoramento da

temperatura na sua superfície) foram estabelecidas através de um sistema de automação e instrumentação operado por uma plataforma computacional desenvolvida pelo Laboratório de Engenharia de Processos - Planta Piloto (LTA/CCTA-UENF), que interage com o sistema de automação do biorreator.

3.3 Métodos analíticos

O experimental foi dividido em três tópicos. Na primeira etapa, as fermentações foram conduzidas em biorreatores com diferentes configurações de reciclo da suspensão celular avaliando respostas fisiológicas da levedura no efluxo de prótons da H^+ -ATPase tipo P sob campo magnético em relação ao controle (tópico 1- Mecanismo de interação do campo magnético com a levedura).

No segundo tópico (confirmação da presença e ação do campo sobre a H^+ -ATPase tipo P), as fermentações foram realizadas a partir da melhor configuração sob campo magnético estudada no primeiro tópico, biorreator em tubo reto, porém sem reciclo da suspensão celular, sendo avaliada a atividade específica da H^+ -ATPase tipo P (performance fisiológica e bioquímica), além de explorar possíveis alterações morfológicas das leveduras expostas ao campo magnético. E, por fim, no terceiro tópico, as fermentações foram conduzidas por 6h em biorreator sem reciclo da suspensão celular com a validação do mecanismo proposto através de estudos de acoplamento bioquímico da bomba de prótons acionada por hidrólise de ATP.

Durante e após a realização das fermentações expostas ou não ao campo magnético de baixa frequência e intensidade com linhas na direção axial e densidade de fluxo magnético de 10 mT foram realizadas análises dos parâmetros cinéticos e estudos da fisiologia, morfologia e bioquímica das células da levedura, resumidamente apresentadas na Figura 12.

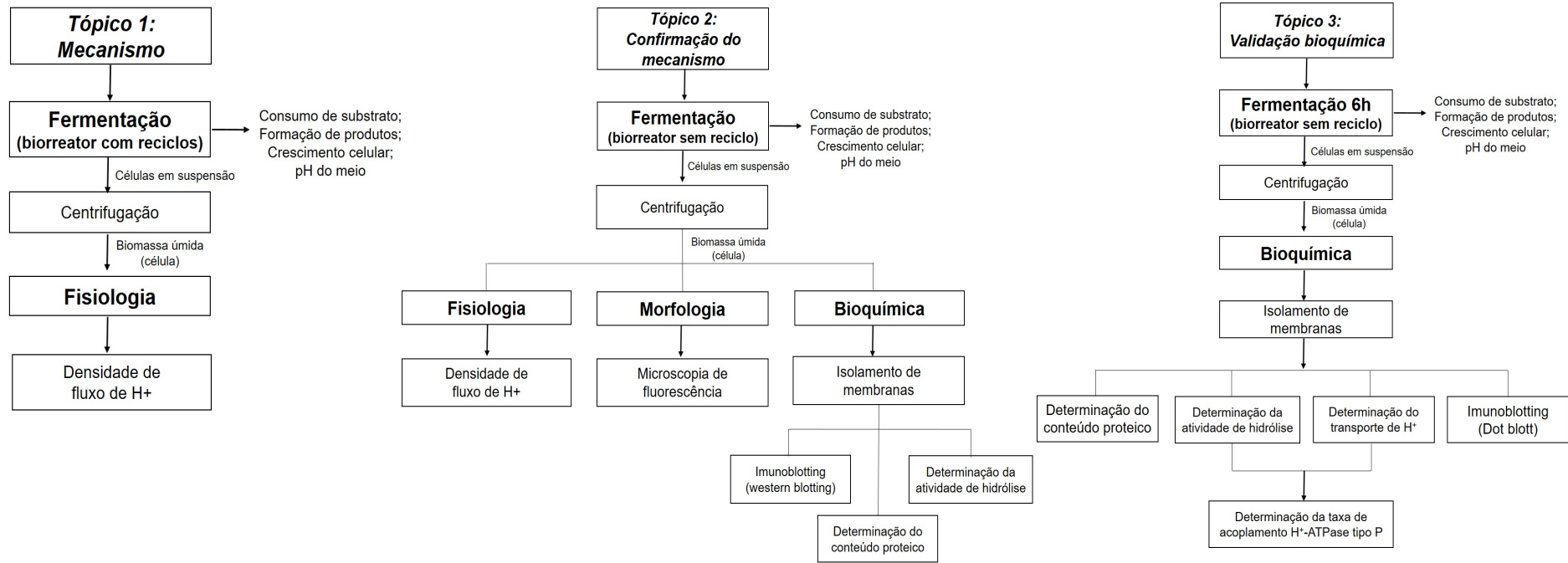


Figura 12. Organização das análises experimentais realizadas durante e após a fermentação em biorreator.

3.3.1 Análise do crescimento celular

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). E, durante a fermentação, 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).

3.3.2 Monitoramento da cinética de fermentação

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 Ca^{+2} (8%). Água ultrapura 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 (Apêndice A) com intervalo de linearidade dos compostos analisados. O pH do meio foi determinado com auxílio de pHmetro de bancada modelo W3B (BEL Engineering).

3.3.3 Estudo da fisiologia da levedura

3.3.3.1 Determinação da densidade do fluxo de H^+ extracelular

As amostras retiradas durante o processo de 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 H^+ foi mensurado por meio de microeletrodos 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 KH_2PO_4 e 40 mmol/L KCl, pH 6,0) e, em seguida, com uma coluna de 10-15 mm de coquetel íon-seletivo para 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 em tempos predeterminados durante as fermentações 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, 65 ou 100 g/L de glicose e 20 g/L de ágar). Após 5 a 10 min, os microeletrodos foram posicionados próximos às superfícies das células imobilizadas e adicionado cuidadosamente o meio líquido (10 g/L de extrato de levedura, 65 e 100 g/L de glicose) a fim de evitar o deslocamento das células.

O fluxo de H⁺ foi imediatamente aferido até atingir a estabilidade quando foi adicionado 1 mmol/L de ortovanadato de sódio (pH 7,2, Sigma-Aldrich). Toda a análise do fluxo de H⁺ foi aferida por um período médio de 10-15 min em uma distância de excursão de 15 mm, em um ciclo completo de 1-2 s. As medidas controle (sem vanadato) foram realizadas a 1-2 mm de distância das células e subtraídas das medidas próximas às superfícies celulares. Os gráficos obtidos estão apresentados no Apêndice D.

3.3.4 Estudo da morfologia da levedura

3.3.4.1 Microscopia de fluorescência

A investigação das possíveis alterações na morfologia do citoesqueleto e do núcleo das células da levedura foi realizada com auxílio de microscopia de fluorescência e microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC). As amostras para as análises foram retiradas com 4 e 8 h de fermentação.

As células retiradas da fermentação foram imediatamente centrifugadas 1500 x g por 5 min à temperatura ambiente e fixadas em formaldeído. No momento da análise as células foram fixadas em 0,5 mol/L de fosfato de potássio pH 6,5 e 20% formaldeído, seguida de centrifugação a 1500xg por 5 min. As células foram lavadas e ressuspensas em 1mL de tampão fosfato pH 6,5 por duas vezes. A amostra foi permeabilizada e ressuspensa em 1 mL Triton™ X-100 0,2% em tampão SHA (1 mol/L sorbitol, 0,1 mol/L HEPES - 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-ácido etanossulfônico e 5 mmol/L azida sódica), incubada por 15 min, seguida de mais três lavagens com tampão fosfato pH 6,5. Foram adicionados 0,3 µmol/L de rodamina faloidina para marcar o citoesqueleto, com incubação durante 90 min à temperatura ambiente. Após 60 min de reação, foram adicionados 3 mmol/L de 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), marcador do núcleo durante 30 min. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes e

ressuspensas em tampão fosfato pH 6,5 (adaptado de Baggett *et al.*, 2013 e Chowdhury *et al.*, 1992). As micrografias foram obtidas com auxílio de um microscópio óptico Zeiss Axio Imager A.2, equipado com Axiocam MRc5 e software AxioVision no aumento de 63x e processadas com auxílio do software Image J.

3.3.5 Estudos bioquímicos

3.3.5.1 Isolamento de membranas totais

A obtenção das membranas totais das células da levedura *S. cerevisiae* foi realizada após o período de fermentação, as células foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 5 min e a massa úmida determinada. O isolamento dos esfereoplastos e a obtenção de membranas celulares foram realizados de acordo com Okorokov e Lehle (1998) com modificações (Figura 13).

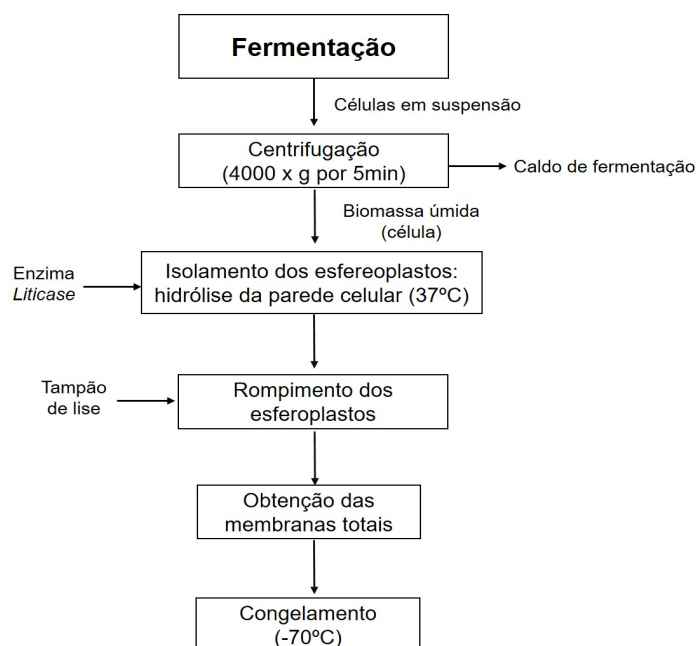


Figura 13. Resumo esquemático do isolamento de membranas (modificado de Okorokov & Lehle, 1998).

Após determinação da massa úmida, para cada 1 g de massa úmida de células, foram adicionados 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 mol/L sorbitol; 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,2), 4 mg de enzima *liticase* obtida de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich, ≥ 200 unidades mg^{-1}) e 12,5 μL de β -mercaptoetanol (concentração final de 30 mmol/L). A suspensão celular foi incubada a 37°C em banho-maria sob leve agitação com o monitoramento cinético da hidrólise da parede celular realizado a cada 10 min em espectrofotômetro ($\lambda=600$ nm) até o tempo máximo de 50 min ou até que a absorvância chegue a 20% do valor inicial, os dados estão apresentados no Apêndice E.

Posteriormente, os frascos contendo a suspensão celular foram transferidos para o gelo e a reação paralisada pela adição do tampão de parada (1,2 mol/L sorbitol; 200 mmol/L Tris-HCl; 20 mmol/L EDTA, pH 7,4, 0,2 mol/L de benzamidina e 0,2 mol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF). Em seguida, a solução foi cuidadosamente aplicada sobre a solução colchão (1,4 mol/L sorbitol; 50 mmol/L Tris, pH 7,4) e centrifugada a 3.500 x g por 6 min a 4 °C (Eppendorf - 5430R). Os esferoplastos foram centrifugados a 5.000 x g por 5 min a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 20 mL de tampão de lise (12,5% sacarose; 200 mmol/L MOPS-KOH, pH 7,6); 1 mmol/L de DTT (*1,4-ditiotreitol*), 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de coquetel de inibidores de proteases (quimiostatina, pepstatina, antipaína, leupeptina e aprotinina na concentração de 1 mg mL^{-1}), 1 mmol/L de benzamidina, 1 mmol/L de PMSF e 0,3% de albumina sérica bovina (BSA).

A ressuspensão foi homogeneizada em homogeneizador Dounce de vidro com pistilo de teflon e adicionado o glicerol (1,17 g de glicerol para cada 10 mL de solução), com 21 ciclos completos (pulsos). A solução foi centrifugada a 5.000 x g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante centrifugado a 100.000 x g por 45 min a 4 °C (Hitachi - Himac 80wx, rotor P50A2).

O sedimento da centrifugação foi ressuspensão em tampão de lise (12,5% sacarose, 200 de mmol/L MOPS-KOH, pH 7,6) contendo glicerol (1,17 g para 10 mL), coquetel de inibidores (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), benzamidina (0,5 mmol/L), fluoreto de fenil metil sulfonil (0,5 mmol/L) e *1,4-ditiotreitol* (0,2 mmol/L). A solução foi adicionada gradativamente ao sedimento de membranas totais e homogeneizada em pistilo de teflon (homogeneizador Dounce) e com 15 ciclos completos. O isolado de membranas foi ressuspensão e o volume total foi aliquoteado em

recipientes de 100 μ L, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C para análises posteriores.

3.3.5.2 *Determinação do teor de proteína pelo método de Bradford*

A determinação do conteúdo de proteína total foi realizada pelo método descrito por Bradford *et al.* (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O reagente de Bradford continha 67 mg de Comassie Brilliant Blue G 65%, 23,7 mL de etanol absoluto e 50 mL de ácido ortofosfórico (85%), para um volume final de 500 mL. O Comassie e o etanol em um béquer, devidamente envolvido em papel alumínio, a fim de evitar a entrada de luz, deixada sob agitação por 1 h à temperatura ambiente ($25-30^{\circ}\text{C}$). Em seguida, foi adicionado o ácido ortofosfórico e a solução homogeneizada por 5 min e o volume ajustado para 500 mL em balão volumétrico. A solução foi filtrada em papel filtro por três vezes e armazenada em vidro âmbar.

A curva padrão foi obtida a partir de BSA para concentrações de 0 - 40 $\mu\text{g/mL}$ (Apêndice F). Foram utilizados 100 μL das soluções de BSA nas concentrações preparadas e adicionados 1000 μL da solução de Bradford em intervalos regulares, em triplicata. Após 10 min de reação à temperatura ambiente, as medidas foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda = 595\text{ nm}$.

O conteúdo de proteína total foi determinado utilizando 10 μL de suspensão de membranas diluídas 100x com água destilada. Foram utilizados 100 μL da suspensão diluída e adicionados 1000 μL da solução de Bradford, seguido de 10 min de reação à temperatura ambiente e medida a absorvância em espectrofotômetro a 595 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado para curva padrão.

3.3.5.3 *Imunoblotting*

Na análise de Western Blotting, a imunorreatividade da enzima H^{+} -ATPase tipo P foi detectada utilizando 10 μL de vesículas de membranas totais isoladas das fermentações com células de *S. cerevisiae* e incubadas a 65°C por 20 min, posteriormente separadas em gel SDS-PAGE 10% (w/v) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amesham/GE Healthcare). A P-H^{+} -ATPase foi detectada usando anticorpo policlonal anti-PMA1/2 (1:1000) de *S. cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, EUA, Y-300). A imunodeteção foi

realizada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase (GE Healthcare Bio-Sciences, EUA) e com kit quimioluminescente de detecção (ECL Western blotting detection system, GE Healthcare) (Cogo, 2018).

Na realização do dot blot, a imunorreatividade da enzima H⁺-ATPase Tipo P foi detectada sob condições de baixo conteúdo proteico e para marcação com o anticorpo específico H⁺-ATPase de membrana plasmática foi realizado um dot blott. Em um pedaço de membrana de nitrocelulose foram marcados quadrantes de 1 cm². Essa membrana de nitrocelulose foi embebida em tampão PBS (10 mM de Na₂HPO₄, pH 7,6 contendo 0,9% NaCl) por 5 min até que estivesse completamente umedecida. A membrana de nitrocelulose ficou reservada sobre um papel filtro em local limpo e seco por algumas horas, até que a membrana de nitrocelulose estivesse completamente seca. Em cada quadrante de 1 cm² foram aplicadas 5 µL da fração de membranas totais. A aplicação das amostras ocorreu de forma que fossem gotejadas perpendicularmente sobre um dos quadrantes marcados na membrana de nitrocelulose e se espalhassem uniformemente. Aguardou-se o tempo suficiente pra que as amostras ficassem secas completamente (Venancio, 2014).

A membrana seca foi incubada sob agitação em solução contendo solução bloqueadora contendo PSB e 5% de leite comercial (Molico) por 1 h. Foram utilizados anticorpos primários diluídos 1:1000 em solução de leite comercial a 3% e incubados sob agitação por 30 min; após esse período a placa com a membrana foi deixada na geladeira durante a noite a 5°C. Na etapa seguinte de revelação, a membrana foi lavada com leite 5% por mais 1 h em agitação trocando a solução a cada 15 min. O segundo anticorpo conjugado à peroxidase foi diluído 1:1000 em solução de leite a 5% e incubado por 1 h em agitação. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com solução de leite 5% em PBS 3 vezes por 10 min sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS 3 vezes por 5 min sob agitação. Depois a membrana foi revelada com solução contendo H₂O, Tris HCl 1mol/L (pH 7,5) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB), imidazol e 30% de peróxido de hidrogênio. O sinal da ligação específica do anticorpo foi revelado e a imunorresposta detectada.

3.3.5.4 Determinação do gradiente de H^+ (ΔpH - transporte de H^+)

A determinação do gradiente de H^+ seguiu o método descrito por Okorokov e Lichko (1983). A detecção foi realizada em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm, excitação em 415 nm e emissão em 485 nm. A formação do ΔpH pela H^+ -ATPase tipo P foi observada em solução contendo: 100 μL de 50 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,5 mmol/L de concentração final); 50 μL de 2 mol/L KCl (50 mmol/L de concentração final); 80 μL de vesículas de membrana (volume dependente da atividade, de modo que a amplitude máxima (F_{max}) não ultrapassasse 50% do decaimento da fluorescência); tampão MOPS-KOH (12,5% sacarose, 200 mmol/L MOPS-KOH, pH 7,2) em quantidade necessária para completar 2 mL de volume final.

O gradiente de H^+ foi monitorado pelo decréscimo da fluorescência, acrescentando-se 3 μL de 1 mmol/L ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina), uma sonda fluorescente capaz de ligar-se aos H^+ e atravessar as membranas biológicas (Figura 14). Após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) iniciou-se a reação com a adição de 100 mmol/L de ATP-KOH pH 7,2 (concentração final de 1 mmol/L). A cinética de extinção da fluorescência (“*quenching*”) foi monitorada até atingir o equilíbrio entre o efluxo e o influxo de prótons “*steady-state*”, e o gradiente dissipado quando adicionou 2 mol/L de NH_4Cl (concentração final de 20 mmol/L) a fim de paralizar a reação, a fim de refazer a fluorescência inicial e desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

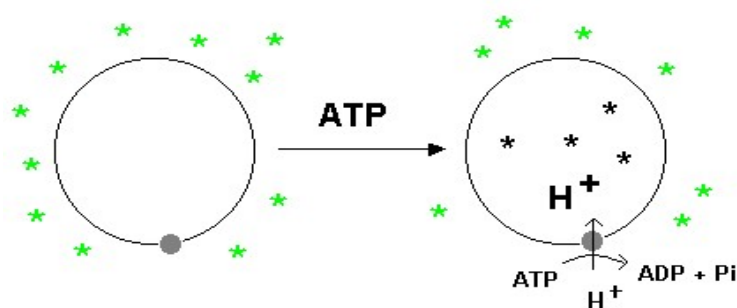


Figura 14. Representação esquemática explicando o decaimento da fluorescência. A protonação do ACMA (representado por asteriscos) no interior das vesículas impede sua saída. Assim, as concentrações de ACMA no exterior da célula se tornam menores, resultando no decaimento da fluorescência (Teixeira, 2016).

A atividade da H⁺-ATPase Tipo P foi determinada pela adição de 200 μmol/L de ortovanadato de sódio, um inibidor específico para esta enzima. A atividade de transporte da H⁺-ATPase Tipo P foi determinada pela diferença entre a atividade total e a atividade vanadato-insensível. A velocidade inicial da reação (V_0) e a amplitude máxima de fluorescência (F_{max}) na suspensão de vesículas de membranas totais foi determinada a partir dos gráficos obtidos durante as análises (Figura 15). Foram utilizadas as equações 3 e 4 para determinar a velocidade inicial e a amplitude máxima:

$$V_0 = \frac{\left(\frac{F_0}{F_{max} \times t}\right) \times 100}{vol. de membrana} \quad (3)$$

Em que:

V_0 : velocidade inicial de formação de ΔpH (U.R.F%/mim)/uL de extrato de membrana;

F_0 : fluorescência dependente de V_0 em um dado tempo (t), determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

F_{max} : fluorescência máxima (total);

t: tempo em minutos.

- Amplitude máxima: $\Delta F_{max} = \left(\frac{F_{eq}}{F_{max}}\right) \times 100 \quad (4)$

Em que:

F_{eq} : fluorescência de equilíbrio determinada como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H⁺ nas vesículas.

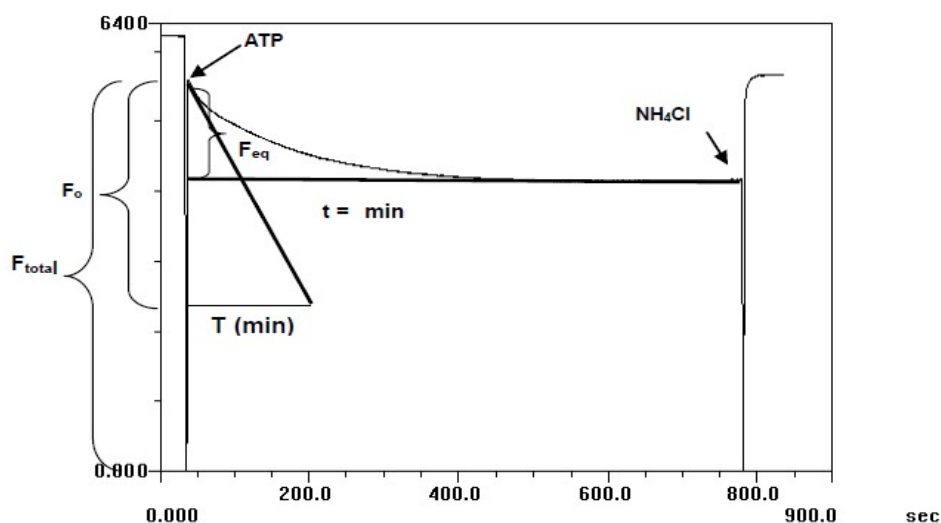


Figura 15. Representação esquemática da determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H⁺. Fonte: Teixeira (2016).

3.3.5.5 Determinação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPase tipo P

Previamente, foi preparada uma curva padrão de fosfato inorgânico (P_i) disponível no Apêndice G. A solução estoque de 0,5 μmol/mL KH₂SO₄ (desidratado 40-60°C por 2-3h) foi utilizada como padrão do conteúdo de P_i. A partir da solução estoque foram preparadas duas soluções (0,50 e 0,25 μmol/mL KH₂SO₄) que foram utilizadas para construir a curva. A solução de P_i foi incubada a 30 °C por 30 min. Após incubação, 2 mL da solução C foi adicionada. Cada amostra foi incubada por exatamente 10 min a 30°C, seguida imediatamente da medida da absorvância em espectrofotômetro a 750 nm. A solução C consiste em uma mistura de 100:1 da solução A (molibdato de amônio 0,5 %; SDS 0,5 %; H₂SO₄ 2 %) e a solução B (ácido ascórbico 10 %), respectivamente, preparada no momento próximo à sua adição. A solução C foi utilizada em iguais condições e proporções para a determinação de hidrólise do ATP.

A atividade hidrolítica de ATP foi determinada pelo aumento na quantidade de P_i formado resultante da hidrólise de ATP, conforme descrito por Fiske e Subbarow (1925). Os ensaios foram realizados sob refrigeração, em tubos contendo tampão de hidrólise (100 mmol/L de sorbitol; 30 mmol/L de MOPS-KOH; 9,5 mmol/L de MgSO₄.5H₂O; 262 μmol/L de molibdato de amônio, pH 6,5); 1

mol/L de KCl; 10 μ L de suspensão de vesículas de membranas e água destilada para completar 300 μ L. A reação foi iniciada pela adição de 100 mmol/L de ATP-KOH, pH 7,2 (concentração final de 5 mmol/L). Na detecção da atividade específica da H⁺-ATPase tipo P foi utilizado um inibidor específico (200 μ mol/L de ortovanadato de sódio). A reação transcorreu a 30°C nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 30 min para a construção da curva cinética da velocidade inicial de hidrólise (Apêndice H). A reação foi interrompida pela adição de água destilada gelada (até completar 1 mL de volume de reação) e, logo em seguida, adicionados 2 mL da solução de revelação (10% de ácido ascórbico e 0,5% de molibdato de amônio, relação 1:10 v/v). A solução foi incubada por 10 min a 30 °C, seguido pela medida da absorvância em espectrofotômetro a 750 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de Pi formado por minuto (μ mol de *Pi* /min) e por microlitro de extrato de isolado de membranas (U/ μ L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mecanismo de interação do campo com a levedura

4.1.1 *Cinética de fermentação alcoólica*

A fermentação sem exposição ao campo magnético (controle), apresentou um perfil típico de cinética de consumo de açúcar, variação de pH, formação de subprodutos (glicerol) e produção de bioetanol (Figura 16).

Assim, a solução de glicose com concentração inicial de 65 g/L foi praticamente esgotada ao longo de 10 h de fermentação resultando em 30,92 g de etanol/L de meio de cultura preparado, ou seja, atingindo um rendimento final de 47,6%, resultado este que pode ser considerado satisfatório para esta linhagem de levedura de laboratório. A *S. cerevisiae* X-2180 é uma cepa selvagem e não industrial selecionada para altas performances na produção de etanol, o qual é bem caracterizado em nível bioquímico e molecular e, portanto, útil para estudos enzimáticos e eletrofisiológicos em escala de bancada.

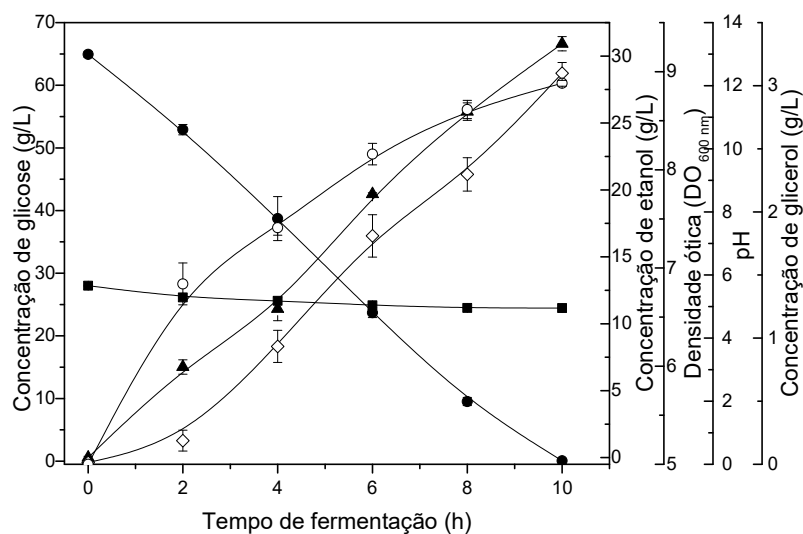


Figura 16. Cinética da fermentação de *S. cerevisiae* X2180 na produção de etanol sem aplicação de campo magnético (controle). Biorreator no centro das bobinas com reciclo externo (102 mL/min). Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica ($DO_{600\text{ nm}}$); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

A cinética das fermentações sob campos magnéticos com os três sistemas de reciclo expostos ao campo magnético: biorreator com reciclo externo em tubo em espiral, biorreator com reciclo externo em tubo em U e biorreator do reciclo externo em tubo reto, totalmente inserido no campo magnético está apresentada na Figura 17. Em todos os casos, o campo magnético parece ter induzido ou acelerado o consumo de glicose melhorando a produção de bioetanol. Os melhores resultados foram obtidos com o biorreator exposto ao campo magnético (Figura 17c), reduzindo o tempo de fermentação em 2h e alcançando aumento médio de cerca de 30% na produtividade do etanol em relação ao controle.

Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros cinéticos (crescimento celular, pH, consumo de substrato, formação de produto e subprodutos) das fermentações expostas ao campo magnético comparado ao controle. Pode observar que o campo magnético também acelerou o consumo de glicose.

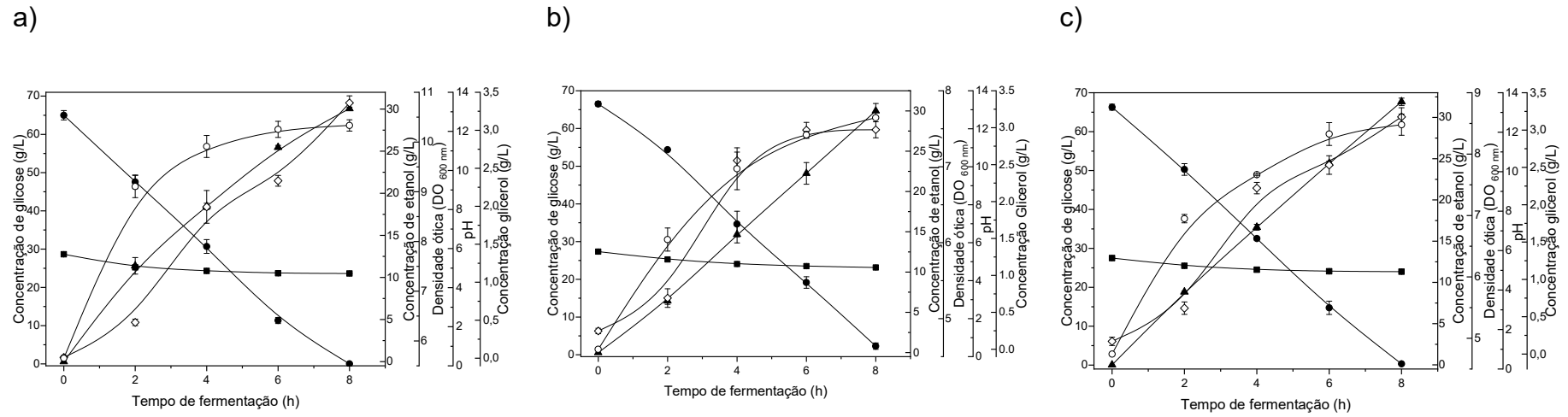


Figura 17. Cinética da fermentação de *S. cerevisiae* X2180 para produção de etanol em biorreator assistido por campo magnético com reciclo externo (102 mL/mim): a) em tubo espiral, b) em tubo em U, c) em tubo reto inserido totalmente dentro do sistema de exposição ao campo magnético com reciclo externo. Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ◇ Densidade óptica (DO_{600 nm}); ○ Concentração de glicerol (g/L); ■ pH.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da fermentação para produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* X2180

Experimento	Yp/s (g/g)	Qp (g/L.h)	Qs (g/L.h)	€ (%)
Controle	0,476	3,09	6,490	92,72
Reciclo em espiral sob campo	0,429	3,756	8,764	83,26
Reciclo em U sob campo	0,451	3,751	8,027	88,27
Biorreator inserido no campo	0,481	4,00	8,245	94,18

Onde: Yp/s= rendimento de etanol (g/g); Qp= produtividade volumétrica global de etanol (g/L.h); Qs= consumo volumétrico de glicose (g/L.h); €= Eficiência da bioconversão açúcar-etanol (%) calculada como a razão entre o valor experimental de Yp/s e o valor teórico de Yp/s (0,5111g g⁻¹).

Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores (Dussan *et al.*, 2019; Perez *et al.*, 2007) confirmando que campos magnéticos de baixa frequência e intensidade podem exercer efeitos positivos na produção de etanol por leveduras em condições anaeróbicas, confrontando os resultados controversos de estudos sobre o efeito de campos magnéticos em processos de fermentação (Anton-Leberre *et al.*, 2010; Otabe *et al.*, 2009).

O monitoramento da temperatura das bobinas do reator de campo magnético e do meio de fermentação foi realizado com auxílio de câmera de infravermelho. O melhor resultado cinético da fermentação foi obtido quando todo reator foi exposto ao campo magnético. Na Figura 18 estão apresentadas a título ilustrativo as termografias realizadas durante a fermentação para o monitoramento do comportamento temperatura das bobinas e do meio de fermentação (Apêndice J) ao longo do experimento. Pode observar que em todas as condições de exposição ao campo magnético, mesmo com aquecimento moderado das bobinas, a temperatura do meio de cultura nas fermentações não foi alterada, ou seja, não houve efeito da radiação térmica das bobinas sobre o sistema de fermentação. De fato, o monitoramento da temperatura das fermentações descarta e garante que qualquer alteração dos parâmetros avaliados, não esteja associada à transferência de calor proveniente do aquecimento gerado pela passagem da corrente elétrica pelos fios que compõem as bobinas geradoras do campo magnético.

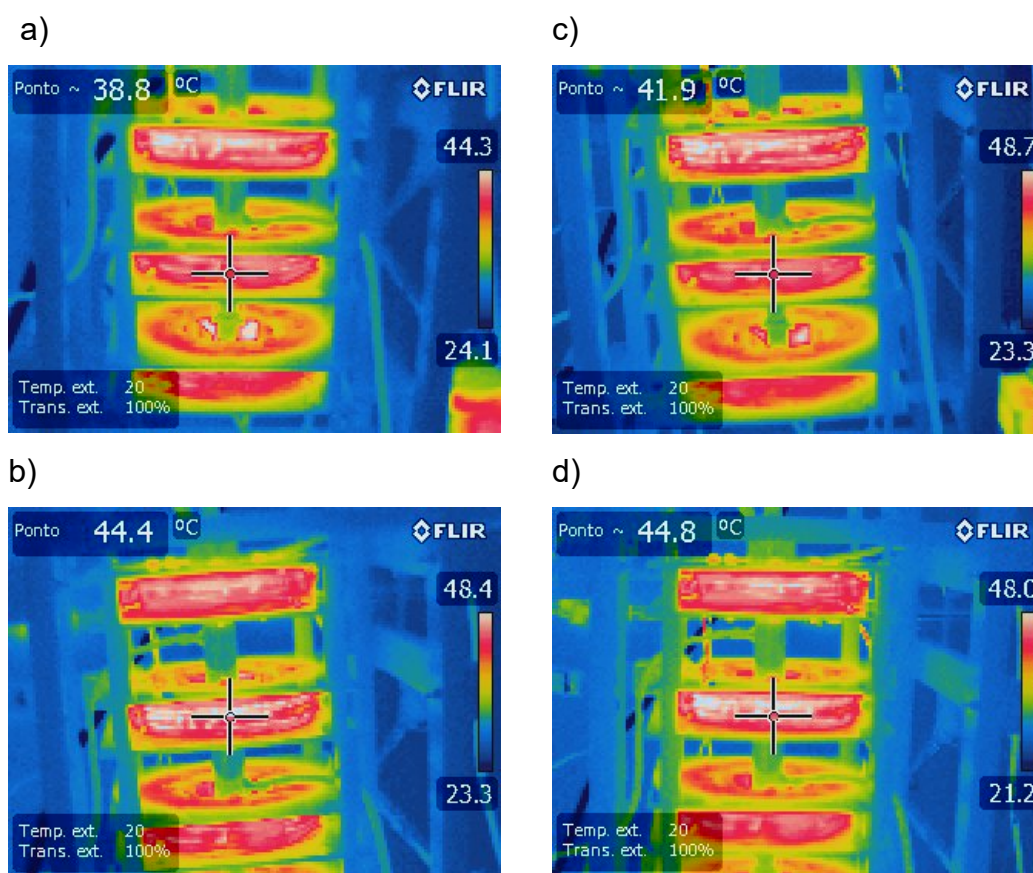


Figura 18. Monitoramento cinético da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR nas fermentações em biorreator assistido por campo magnético – axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT na produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 a 30°C, nos tempos de fermentação de: a) 2 h, b) 4 h, c) 6 h e d) 8 h.

Os efeitos biológicos relacionados aos campos magnéticos também foram relatados por muitos outros autores (Berlot *et al.*, 2013; Motta *et al.*, 2004; Deutmeyer *et al.*, 2011), cujos resultados foram essencialmente atribuídos a mudanças no crescimento celular, variações de pH do meio e aumentos no consumo de substrato e da produtividade de etanol. Na maioria dos casos, os fenômenos são discutidos principalmente com base apenas em alterações na permeabilidade da membrana celular e/ou modulações indeterminadas do metabolismo celular. No entanto, os elementos-chave bioquímicos e moleculares que integram os fenômenos no nível da membrana celular permanecem em

grande parte elusivos. Com base nas observações positivas das cinéticas de fermentação, também foram avaliadas as respostas fisiológicas da levedura.

4.1.2 Estudo fisiológico: determinação do fluxo de prótons extracelular

Em estudos anteriores do grupo, Perez *et al.* (2007) postularam que campos eletromagnéticos podem gerar uma diferença de potencial em meios de cultura em suspensão celular, induzindo fluxos de carga por efeito capacitivo, ou seja, pelo estabelecimento de campos elétricos e correntes de indução não uniformes no meio de fermentação. Como essas correntes parasitas podem alterar os potenciais de repouso nas células, pode-se acreditar também que em nosso estudo estas correntes afetem também os fluxos de H^+ avaliados eletrofisiologicamente nas células de levedura retiradas da fermentação durante a produção de etanol. Mas, entender a contribuição da H^+ -ATPase do tipo P, estimada por Na_3VO_4 (inibidor específico H^+ -ATPase do tipo P) é essencial, por ser esta uma bomba de prótons responsável pelo controle do gradiente eletroquímico de H^+ gerado através da membrana celular. Isto pode também impulsionar o transporte secundário de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos (Minc e Chang, 2014; Pedersen *et al.*, 2007).

As medidas da densidade de fluxos de prótons foram realizadas a cada 2 horas, e os gráficos obtidos das medidas feitas no SIET estão apresentados no Apêndice D (Figuras 1D a 5D). A densidade de fluxo de prótons total e na presença do inibidor foi utilizada para calcular a densidade de efluxo de prótons vanadato-sensível. Para fins comparativos, considerou-se a média do efluxo de prótons medido a cada 2h. Em todas as condições estudadas, a presença do inibidor (Na_3VO_4) a densidade de fluxo de prótons diminuiu, e esta redução foi atribuída majoritariamente à atividade da enzima H^+ -ATPase da membrana plasmática.

De acordo com os dados de transporte de H^+ apresentados na Figura 19, verificam-se evidências convincentes de um efluxo de H^+ aprimorado conduzido pela H^+ -ATPase do tipo P, como um componente principal superativado pelo campo magnético. Pode observar que a densidade média de efluxo de prótons vanadato sensível relacionada à atividade desta enzima sofreu um estímulo para todos os arranjos de reator com reciclo testados (Figura 19a); na qual a

densidade de efluxo de prótons vanadato sensível aumentou consideravelmente na presença do campo magnético.

Os efeitos mais significativos foram relacionados ao campo magnético imposto ao biorreator, exibindo cerca de 2,5 vezes mais efluxos de H⁺ sensíveis ao vanadato em relação ao experimento controle, nas mesmas condições que mais aumentaram a produtividade do bioetanol. De fato, as letras diferentes (Figura 19a) indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com ANOVA e teste de Tukey para nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Durante a fermentação, as leveduras precisam absorver e metabolizar quantidades crescentes de aminoácidos e outros nutrientes para produzir etanol (Barnett, 2008). Além disso, os perfis dos efluxos H⁺ ilustrados na Figura 19b e 19c confirmam o efeito do campo magnético sobre a atividade das bombas H⁺ do tipo P em leveduras, uma vez que os resultados estatísticos mostraram alta significância ao nível de $p \leq 0,001$ ao comparar o desempenho das leveduras na melhor condição de exposição ao campo magnético de 10 mT em relação ao sistema não exposto (Figura 19c).

As H⁺-ATPases do tipo P catalisam a hidrólise de ATP acoplada à translocação de íons H⁺ através da membrana celular de levedura, resultando no estabelecimento de um gradiente eletroquímico transmembranar de H⁺, que por sua vez impulsiona o transporte secundário ativo de nutrientes, incluindo aminoácidos, transportadores simportes/H⁺ e canais dependentes de voltagem que translocam íons metálicos essenciais para o crescimento ideal e potencial de rendimento de fermentação (Barnett, 2008; Serrano, 1988).

Vale ressaltar que a estimulação do efluxo H⁺ induzido pela exposição de células de levedura a um campo magnético de 10 mT é quase completamente antagonizada pela adição de vanadato, um inibidor de ATPases iônicas do tipo P. No entanto, o campo magnético não induz qualquer alteração na acidificação insensível ao vanadato, correlacionada ao CO₂ e ácidos orgânicos derivados do processo de fermentação (Pena *et al.*, 2015).

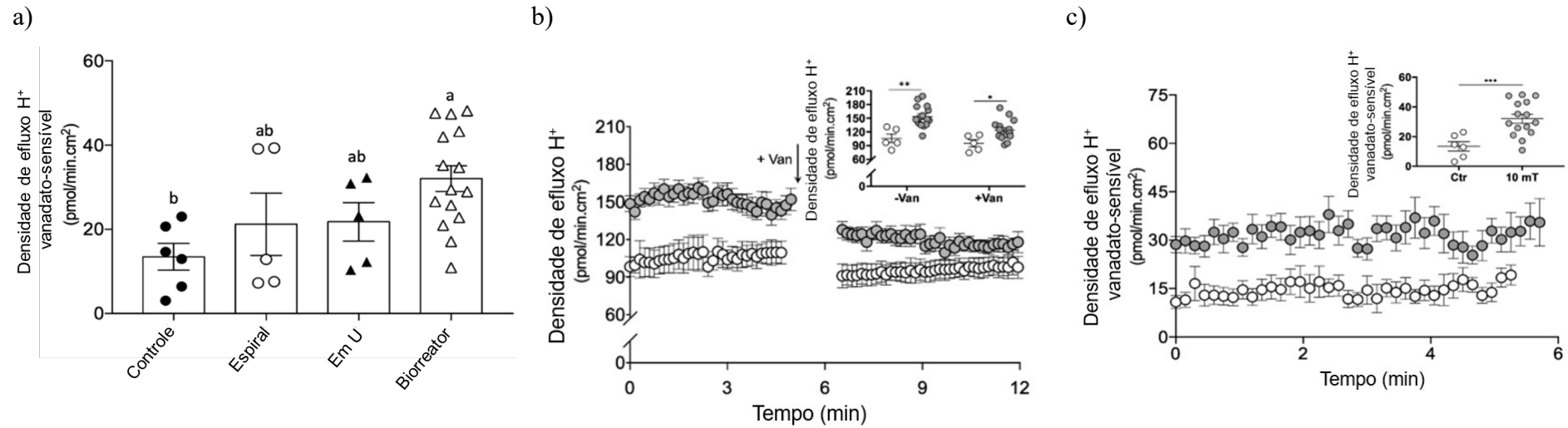


Figura 19. Efeitos do campo magnético no gradiente eletroquímico de H⁺ na membrana plasmática de *S. cerevisiae* X-2180: a) Densidade média de efluxo de H⁺ vanadato-sensível nos arranjos operacionais adotados para as fermentações com reciclos. b) Densidade de efluxo de H⁺ (total e vanadato-resistente) medida na fermentação do biorreator com reciclo externo; e c) Densidade de efluxos H⁺ sensíveis ao vanadato representando a atividade específica das bombas H⁺-ATPase tipo P da membrana plasmática de leveduras retiradas da fermentação no biorreator com reciclo externo. Símbolos: ○ Experimento controle (não exposto ao campo magnético); ● Leveduras expostas ao campo magnético (10 mT). Nota: Os dados da Fig. 5a foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) onde letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, enquanto, as Fig. 5b e 5c foram analisadas pelo teste *t* onde os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Os efeitos do campo magnético também foram associados à ativação de outras ATPases do tipo P, como Na⁺/K⁺-ATPase (Blank, 2005) e Ca²⁺-ATPases de membranas celulares de mamíferos (Wei *et al.*, 2015) e mais recentemente a Na⁺-ATPase do fungo *M. purpureus* (Xiong *et al.*, 2020). Da mesma forma, o efeito de campos magnéticos no aumento da concentração intracelular de íons Ca²⁺ em bactérias (Wu *et al.*, 2017) e Na⁺; K⁺; Zn²⁺ e Ca²⁺ em *S. cerevisiae* geneticamente modificada também foi relatado (Choe *et al.*, 2018). Entretanto, um possível envolvimento de um efeito sobre os gradientes eletroquímicos transmembrana na modulação da captação de íons ainda não foi explorado até agora. Nas plantas, a produtividade e o potencial de rendimento mostraram-se maiores em plantas expostas a baixo campo magnético, efeito que foi correlacionado com o aumento do teor de nutrientes, como N, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn (Esitken *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que as células vegetais, como as leveduras, também possuem seus sistemas secundários de transporte ativo de nutrientes e metabólitos energizados por gradientes eletroquímicos de H⁺ transmembrana, gerados por H⁺-ATPases do tipo P, que constituem o sistema primário de transporte de íons de suas membranas plasmáticas. Portanto, é tentador especular que o mesmo mecanismo de fluxos de H⁺ induzidos por campos magnéticos relacionados à ativação de H⁺-ATPases de levedura também poderia explicar os efeitos nutricionais estimulantes encontrados em plantas (Esitken *et al.*, 2004) envolvendo também um efeito magnetogênico na bomba H⁺ da planta.

Enquanto isso, os resultados até aqui sugerem que os campos magnéticos podem exercer seus efeitos especificamente na atividade da bomba de prótons da membrana plasmática, energizando os sistemas de transporte ativo secundário acoplados ao gradiente eletroquímico H⁺ impulsionado pela bomba, influenciando também toda a bioeletroquímica da membrana da célula de levedura (Figura 20).

A Figura 20 tem como propósito auxiliar a descrição do possível mecanismo de interação do campo com as leveduras. Assim, a figura ilustra uma célula da levedura durante o processo de fermentação sob campo magnético. No citosol ocorre a glicólise, onde a glicose é convertida em etanol e subprodutos como glicerol e acetatos são excretados para o meio extracelular. Na membrana

plasmática estão presentes algumas proteínas transportadoras Hxt de glicose, simportadores de dissacarídeos, glicose e aminoácidos, bombas de potássio, canais voltagem dependente e bombas de prótons (*Pma1* ou H⁺-ATPase tipo P). As bombas de prótons são as responsáveis pela manutenção do gradiente eletroquímico fundamental para energização de outros transportadores presentes na membrana, sendo estes importantes para entrada de nutrientes na célula, como o transporte secundário de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos (Minc e Chang, 2014; Pedersen *et al.*, 2007).

A captação de glicose por *S. cerevisiae* ocorre por difusão facilitada mediada por transportadores de açúcar Hxt e não requer energia metabólica, uma vez que a força motriz para a translocação de soluto é fornecida exclusivamente pelo alto gradiente de concentração de açúcar sobre a membrana (Bisson *et al.*, 2016). Por outro lado, o acúmulo intracelular de outras hexoses e dissacarídeos é realizado acoplando a captação de uma molécula de açúcar à captação de um ou mais íons H⁺ via simportadores também conduzidos pelo gradiente eletroquímico de prótons. Além da absorção de açúcares, o rendimento da produção de bioetanol depende do equilíbrio nutricional da célula de levedura durante o processo de fermentação, que por sua vez depende da manutenção de altos níveis de ativação dos sistemas de transporte de íons na membrana celular (Barnett, 2008).

De fato, além de sua relevância para a nutrição celular, esta bomba de prótons também desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do pH extracelular e intracelular, permitindo que as células de levedura lidem com o H⁺ excedente gerado pelo maior fluxo glicolítico e metabolismo de transbordamento. Isso é especialmente relevante para cepas de leveduras industriais selecionadas para metabolizar altas concentrações de glicose, uma vez que essas células sofrem rápido crescimento fermentativo, produzindo etanol, gás carbônico e ácidos orgânicos, acidificando rapidamente o meio, o que requer mecanismos robustos para manter o pH citosólico subjacente à bomba de prótons fortemente regulada para as atividades (Bisson *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 1991).

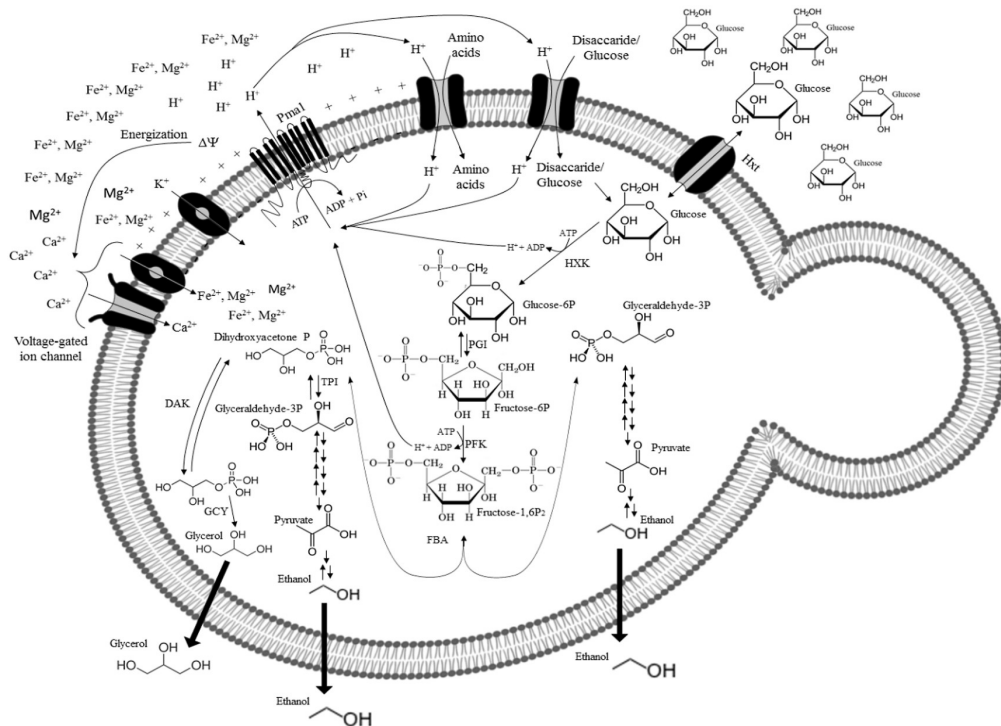


Figura 20. Mecanismo biofísico de ação do campo magnético de baixa frequência e intensidade sobre *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica e os alvos celulares. Hxt, transportadores de glicose de difusão facilitada pela membrana plasmática; Pma1, H⁺-ATPase tipo P representado como o sistema de transporte primário de H⁺ acoplado quimiosmoticamente a vários transportadores de íons secundários da membrana plasmática da levedura; A via glicolítica é representada dentro da célula. Fonte: Andrade *et al.* (2021).

Entretanto, como os efluxos de H⁺ são consequência de diferentes mecanismos de transporte, a segunda etapa do trabalho foi direcionada para correlacionar os resultados observados, na melhor configuração sob campo magnético, com a atividade específica da H⁺-ATPase tipo P, além de explorar possíveis alterações morfológicas das leveduras expostas a estes campos magnéticos.

4.2 Confirmação da presença e ação do campo sobre H⁺-ATPase tipo P

4.2.1 Cinética de fermentação alcoólica

Neste estudo, as fermentações foram conduzidas a partir da melhor condição estudada por Andrade *et al.* (2021), biorreator em tubo reto no centro das bobinas com reciclo externo da suspensão celular (Figura 11a). Os

experimentos foram conduzidos com uma concentração inicial de glicose de 100 g/L, as células em regime estático (sem reciclo da suspensão celular, Figura 11d) e o biorreator de vidro posicionado dentro da câmara de tratamento magnético entre as bobinas do reator com maior densidade de fluxo magnético.

As cinéticas das fermentações estão apresentadas na Figura 21. Pode observar que a fermentação obteve consumo total da glicose presente no meio com 12 h (Figura 21a), já a fermentação exposta ao campo magnético (Figura 22b) obteve o consumo total do substrato com 11 h de fermentação. Nota-se que nesta condição de fermentação (células estáticas e posicionamento do reator no centro das bobinas) a redução do tempo de fermentação foi de 1 h com a presença do campo magnético, diferentemente dos resultados obtidos por Andrade *et al.* (2021), que obtiveram uma redução de 2 h com a exposição ao campo magnético. Pode concluir que esta diferença está associada às diferenças das configurações entre as fermentações.

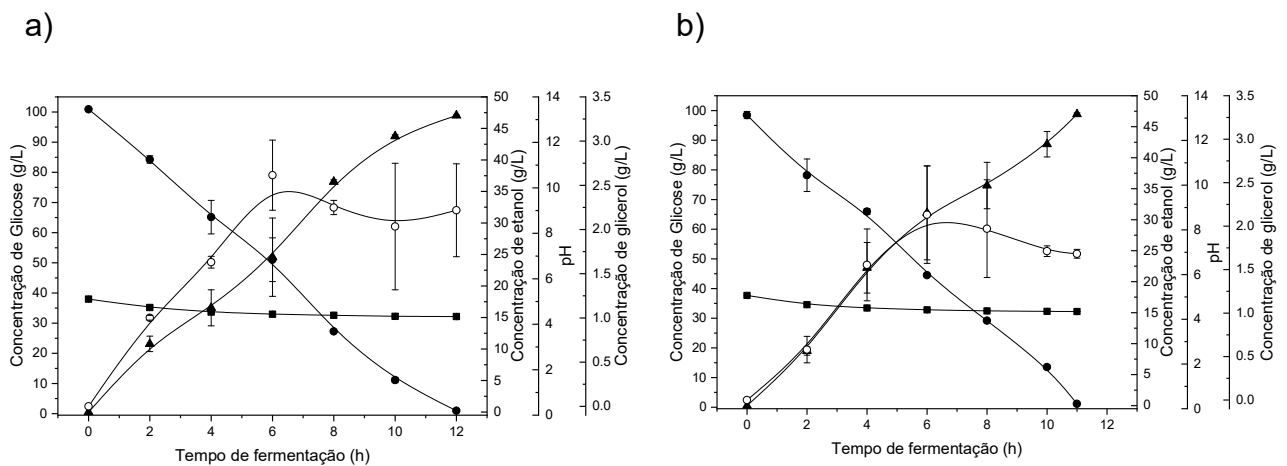


Figura 21. Cinética de fermentação de *S. cerevisiae* X2180 na produção de etanol em biorreator sem reciclo. a) Fermentação (controle). b) Fermentação assistida por campo magnético - axial. Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ▲ Concentração de etanol (g/L); ○ Concentração glicerol (g/L); ■ pH.

Ambas as fermentações (controle e fermentação exposta ao campo magnético) apresentaram alta eficiência de conversão do substrato em produto, valores acima de 91% (Tabela 6). Quando comparadas, a fermentação controle

atingiu um rendimento final de 46,6% em relação ao valor teórico, enquanto aquela exposta ao campo obteve um rendimento de 47,7%. Entretanto, o campo magnético proporcionou um aumento de 9% de produtividade volumétrica de etanol e de 6% no consumo do substrato em relação à fermentação controle.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da fermentação para produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* X2180

Experimento	Yp/s (g/g)	Qp (g/L.h)	Qs (g/L.h)	€ (%)
Biorreator controle	0,466	3,921	8,329	91,228
Biorreator com campo magnético	0,477	4,275	8,848	93,425

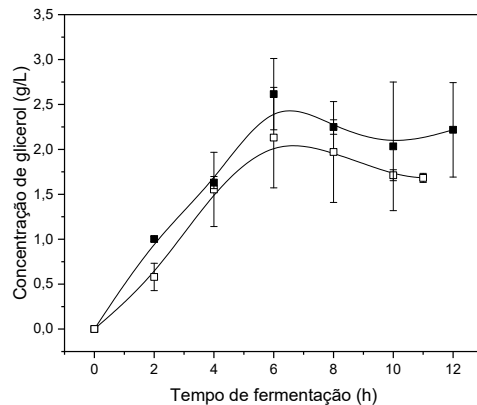
Onde: Yp/s= rendimento de etanol (g/g); Qp= produtividade volumétrica global de etanol (g/L.h); Qs= consumo volumétrico de glicose (g/L.h); €= Eficiência da bioconversão açúcar-etanol (%) calculada como a razão entre o valor experimental de Yp/s e o valor teórico de Yp/s (0,5111g g⁻¹).

Durante a fermentação também se observou que houve a formação de produtos secundários como glicerol e ácido acético tanto na fermentação controle quanto a exposta ao campo magnético (Figura 22). De acordo com Lima *et al.* (2001), esta é uma característica comum ao metabolismo anaeróbico, pois juntamente com a produção de etanol e gás carbônico, ocorre a formação e excreção de glicerol e outros produtos secundários durante a fermentação. Entretanto, o glicerol é um metabólito indesejável na fermentação, pois afeta negativamente o rendimento de etanol: em torno de 5 a 10% do rendimento pode ser comprometido com a formação de secundários.

A aplicação de campo magnético reduziu a formação de glicerol, nota-se que na fermentação controle a concentração final média de glicerol foi de 2,22 g/L, enquanto a fermentação cujo biorreator foi exposto ao campo magnético a concentração final de glicerol chegou a 1,68 g/L (Figura 22a). Nota-se também que o campo também alterou a formação de ácido acético conforme gráfico da Figura 22b. Observa-se que nas primeiras horas de fermentação não havia formação do ácido em ambas as fermentações. A presença do campo magnético retardou a produção do ácido acético na fermentação. Vale ressaltar que a queda do pH e a acidificação do meio ao longo da fermentação é um processo natural da

fermentação alcoólica, por conta da formação de ácidos orgânicos durante esse processo (Lima *et al.*, 2001).

a)



b)

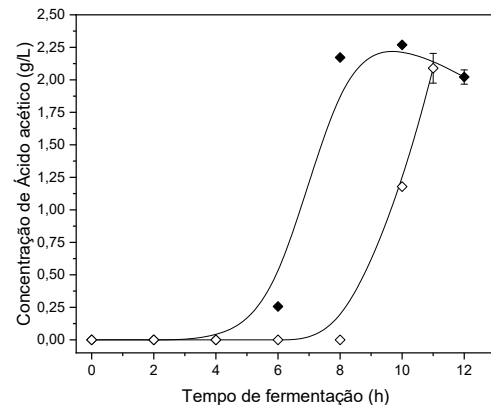


Figura 22. Cinética de formação de subprodutos durante a fermentação com *S. cerevisiae* X2180 em biorreator em tubo reto sem reciclo da suspensão celular. a) glicerol. b) ácido acético. Símbolos: ■ Concentração de glicerol (g/L) - controle; □ Concentração de glicerol (g/L) - campo magnético de 10 mT; ♦ Concentração de ácido acético (g/L) - controle; ◇ Concentração de ácido acético (g/L) - campo magnético de 10 mT.

Além da produção de ácidos orgânicos, a queda do pH também pode estar associada à atividade da H⁺-ATPase presente na membrana plasmática da levedura, uma vez que esta enzima também transporta prótons sendo a responsável pela manutenção do pH intra e extracelular (Lobão *et al.*, 2007). E, portanto, alvo de investigação da interação do campo com célula neste estudo.

De acordo com a Figura 23, pode observar que a temperatura da fermentação não foi alterada e conseqüentemente não influenciou os resultados obtidos. De fato, a temperatura é um dos principais fatores que interferem no metabolismo e na atividade de *S. cerevisiae*. Variações de temperatura afetam a viabilidade e o crescimento celular, além de influenciar na tolerância ao etanol e na formação de glicerol (Amillastre *et al.*, 2012). Portanto, o controle térmico da fermentação faz com que melhores rendimentos sejam alcançados em termos de

etanol. Além disso, a temperatura também pode influenciar na atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (Lobão *et al.*, 2007).

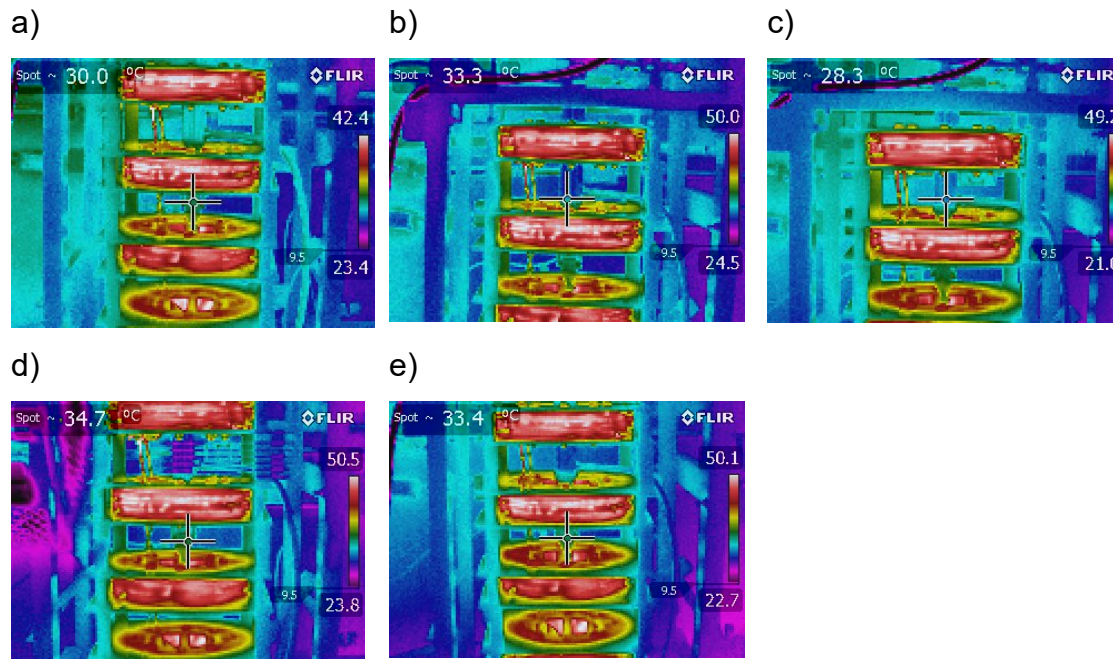


Figura 23. Monitoramento cinético da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR nas fermentações assistidas por campo magnético – axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT na produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 à 30°C. Nos tempos de fermentação de: a) 2 h, b) 4 h, c) 6 h, d) 8 h e e) 10h.

4.2.2 Estudo fisiológico: determinação do fluxo de prótons extracelular

Os fluxos de H^+ foram avaliados durante as fermentações e os gráficos obtidos das medidas feitas no SIET estão apresentados no Apêndice D (Figuras 6D a 9D). Na Tabela 7 encontram-se os resultados cinéticos médios da densidade de fluxos de prótons medida durante as fermentações. As medidas foram realizadas nos tempos de 4 e 8 h, e a média do efluxo de prótons foi considerada para fins comparativos. A densidade de efluxo de prótons vanadato-sensível foi obtida por diferença entre as medidas densidade de fluxo de prótons total e na presença do inibidor.

Tabela 7. Densidade média de fluxo de prótons durante a fermentação para produção de bioetanol pela levedura *S. cerevisiae* X2180

Experimento	Densidade média de efluxo de H ⁺ ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{cm}^2$)	
	Total	Vanadato- resistente
Biorreator controle	59,22 \pm 1,96	51,64 \pm 0,29
Biorreator com campo magnético	103,88 \pm 31,59	80,23 \pm 28,243

As fermentações foram conduzidas em duplicata (n=2).

De fato, fica comprovado que a presença do campo magnético aumenta o efluxo de H⁺ causado pela enzima H⁺-ATPase presente na membrana plasmática da levedura. Na Figura 24 encontra-se a densidade média de efluxo de prótons vanadato sensível relacionado à atividade desta enzima. Nota-se um efeito estimulador do campo magnético na densidade de efluxo de prótons vanadato sensível.

Portanto, além de aumentar a produtividade volumétrica, o campo magnético triplicou o efluxo de H⁺ vanadato-sensível em relação ao controle. Na Figura 24a, as letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com ANOVA e teste de Tukey para nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Confirmando assim, o efeito do campo magnético sobre a atividade das bombas H⁺ do tipo P em leveduras, uma vez que os resultados estatísticos mostraram alta significância em nível de $p \leq 0,001$ ao comparar o desempenho da levedura ao campo em relação ao sistema não exposto (Figura 24b e c).

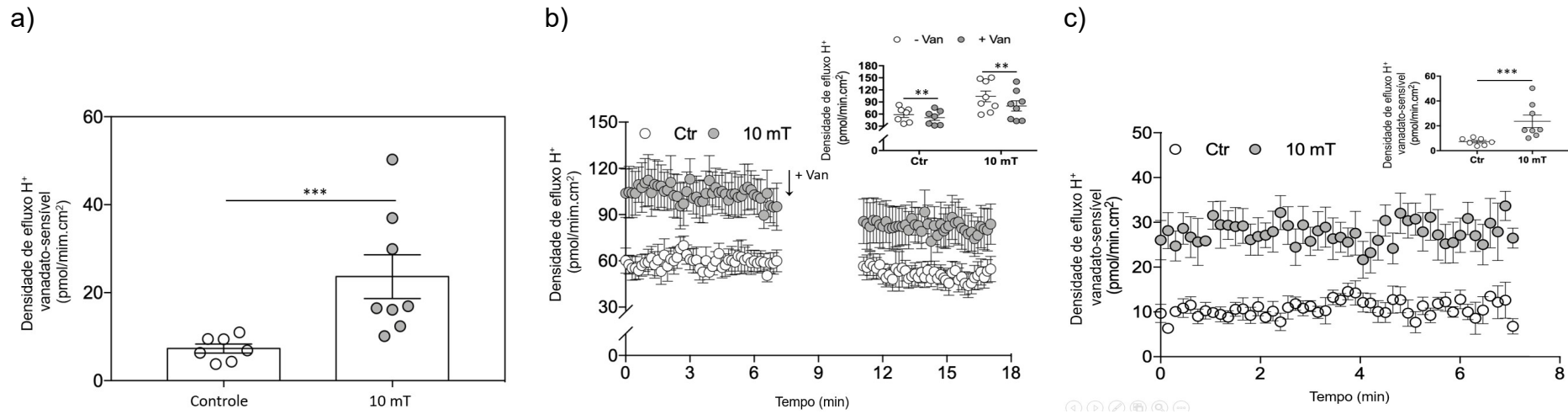


Figura 24. Efeitos do campo magnético no gradiente eletroquímico de H⁺ na membrana plasmática de *S. cerevisiae* X-2180: a) Densidade média de efluxo de H⁺ vanadato-sensível na fermentação sem reciclo da suspensão celular; b) Densidade de efluxos de H⁺ total e vanadato-resistente medida entre as fermentações (controle e campo magnético sem reciclo); c) Densidade de efluxos H⁺ sensíveis ao vanadato representando a atividade específica das bombas H⁺-ATPase tipo P da membrana plasmática de leveduras retiradas da fermentação sem reciclo. Símbolos: ○ Experimento controle (não exposto ao campo magnético); ● Leveduras expostas ao campo magnético (10 mT). Obs: Os dados foram analisados por ANOVA e teste t ($p \leq 0,001$) onde os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (** $p \leq 0,002$; *** $p \leq 0,001$).

4.2.3 Estudo morfológico por microscopia de fluorescência

Para estudo de alterações morfológicas provocadas pelo campo magnético, as amostras de células foram coletadas a cada 4 h durante a fermentação e as micrografias estão apresentadas na Figura 25.

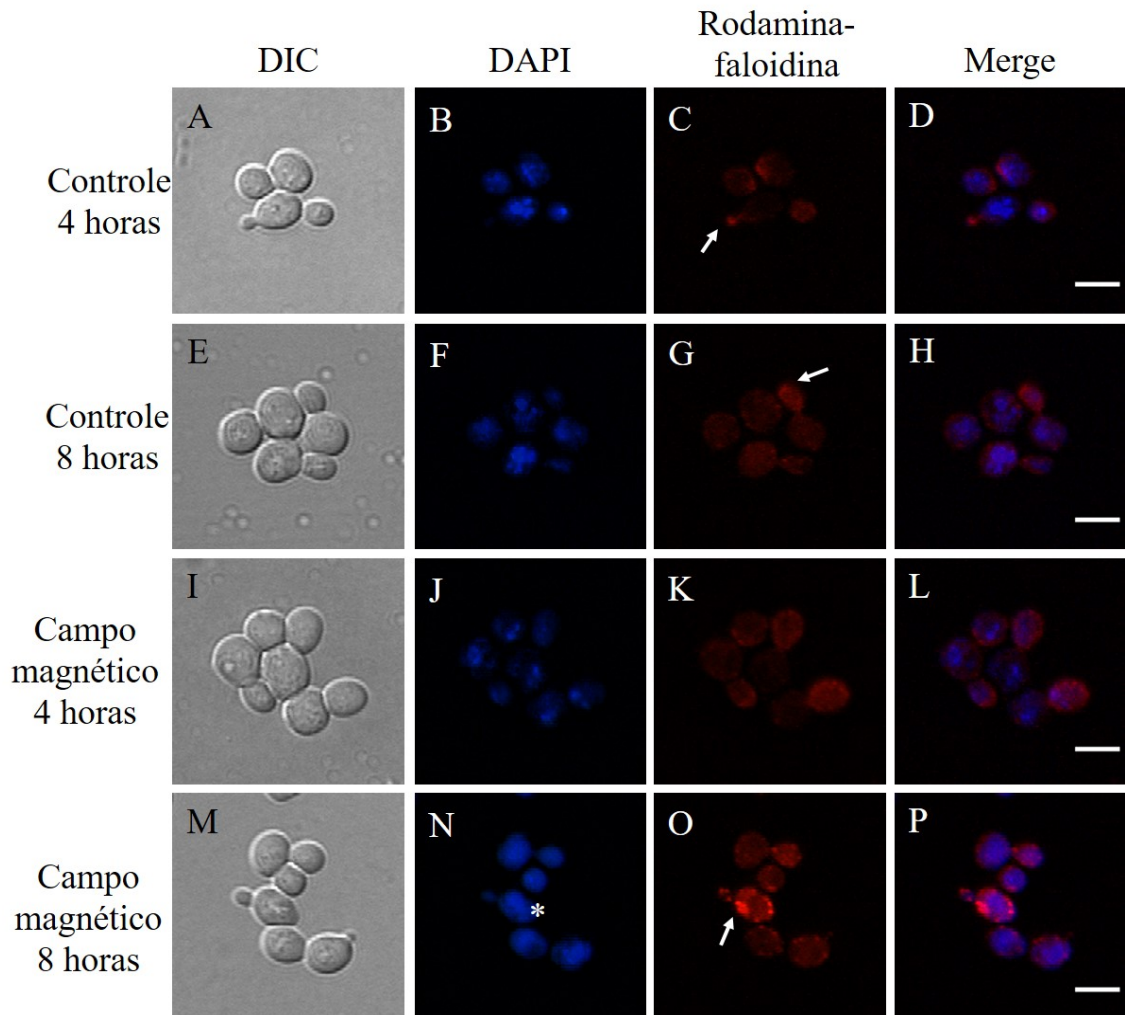


Figura 25. Características morfológicas das células de *S. cerevisiae* durante a fermentação. Letras: (A-D) Células controle após 4 h de fermentação. (E-H) Células controle após 8 h de fermentação. (I-L) Células expostas ao campo magnético durante 4 h de fermentação. (M-P) Células expostas ao campo magnético durante 8 h de fermentação. (A, E, I, M) Contraste de interferência diferencial. (B, F, J, N) Coloração da cromatina por DAPI. (C, G, K, O) Coloração do citoesqueleto de F-actina por Rodamina-faloidina. (D, H, L, P) Coloração de actina e cromatina por rodamina-faloidina e DAPI, respectivamente. Barra de escala: 5 μm .

As células intactas e viáveis de *S. cerevisiae* obtidas da condição controle apresentaram núcleos definidos e cromatina mais descompactada após 4 e 8 horas de fermentação, conforme demonstrado pela marcação com DAPI (Figuras 25 B e F, respectivamente). Além da cromatina nuclear, o DAPI também marca a cromatina mitocondrial em células de leveduras (Inapurapu *et al.*, 2017), o que pode explicar a presença das várias pontuações distribuídas no interior da célula. Essa marcação é distinta da observada em células de leveduras apoptóticas, as quais são caracterizadas pelo encolhimento celular e condensação ou fragmentação nuclear nos estágios iniciais e tardios da morte celular por apoptose, respectivamente (Madeo *et al.*, 1999).

Células expostas ao campo magnético por um período de 4 h também apresentaram a marcação da cromatina em estruturas definidas no interior da célula (Figura 25J), enquanto células expostas a essa condição por 8 h apresentaram uma marcação mais difusa, sem haver uma delimitação clara do núcleo (Figura 25N, asteriscos). Uma possível explicação para esse resultado pode ser alterações na estrutura da cromatina que resulta em um acúmulo mais impreciso do marcador. Outra possibilidade seria o excesso de DAPI internalizado como resposta a uma maior permeabilidade de membrana causada pela exposição mais longa ao campo magnético, uma vez que foi a condição que também apresentou superexposição na fluorescência do marcador.

O citoesqueleto de actina é um importante componente celular, capaz de formar cabos de actina que servem como trilhos para o movimento de organelas, incluindo mitocôndrias e vacúolos. Os microfilamentos de actina são estruturas altamente dinâmicas e sensíveis a várias drogas ou compostos químicos (Pruyne *et al.*, 2004). As células obtidas da condição controle continham a marcação da F-actina na periferia celular, com as marchas de actina corticais concentradas nas regiões de brotamento (Figura 25C e G, indicada por setas), possivelmente como resultado do recrutamento para a formação de estruturas envolvidas no transporte de organelas da célula-mãe para a célula-filha. Assim como na condição controle, as células expostas ao campo magnético durante 4 h de fermentação também apresentaram os pontos de actina na periferia celular (Figura 25K), enquanto muitas células expostas ao campo magnético durante 8 h apresentaram a formação de grandes aglomerados de actina (Figura 25O, seta), sugerindo alterações na formação e dinâmica do citoesqueleto. Os filamentos de actina em

ambas as células das fermentações, controle e exposta ao campo magnético, não foram observados possivelmente devido à fixação prévia com formaldeído, o qual resulta em um padrão de distribuição de F-actina despolarizado quando as células são marcadas com rodamina-faloidina (Uesono *et al.*, 2004; Vasicova *et al.*, 2016), mas o campo induz claramente aglutinação e clusterização da actina.

4.2.4 Estudos bioquímicos

Foi avaliado aqui o papel do gradiente de H^+ através da membrana plasmática na regulação das H^+ -ATPases tipo P, de forma a contribuir no entendimento sobre a sinalização envolvida em disfunções da regulação dessas bombas na presença do campo magnético durante a fermentação para produção de etanol. Para os estudos bioquímicos, as células retiradas no final da fermentação foram isoladas para obtenção das membranas totais e feita a análise bioquímica (conteúdo de proteínas e atividade de hidrólise da enzima).

4.2.4.1 Cinética de hidrólise da parede celular

Os dados da cinética de hidrólise da parede celular para isolamento das membranas totais das células das fermentações estão apresentados no Apêndice E e a cinética no gráfico da Figura 26. Normalmente, espera-se um decaimento da absorvância de 80% durante a hidrólise da parede celular, entretanto foi obtido um decaimento médio de 52,3% de membranas isoladas no fim da fermentação. No final da fermentação a parede celular encontra-se “mais rígida”, além disso, as células estão expostas a altas concentrações de etanol e a escassez de substrato característico da fermentação alcoólica, dificultando assim hidrólise da parede celular.

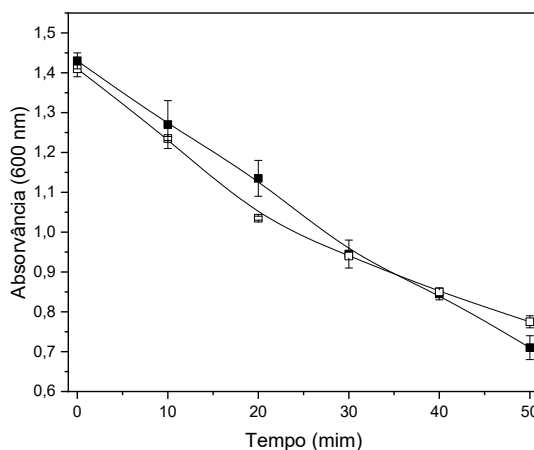


Figura 26. Gráfico cinético da hidrólise da parede celular da levedura *S. cerevisiae* X2180 nas fermentações para produção de etanol. Símbolos: ■ Biorreator sem aplicação de campo (controle); □ Biorreator assistido por campo magnético de 10 mT. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras de erro representam o desvio padrão respeito à média.

4.2.4.2 Determinação do teor de proteína

Após o isolamento das membranas das células da levedura utilizada nos experimentos de fermentação foi realizada a dosagem de proteína (Tabela 8). Pode observar que o campo magnético afetou significativamente a quantidade de proteínas totais. Houve aumento de 47,3% na quantidade de proteínas na fermentação exposta ao campo magnético quando comparada ao controle.

Tabela 8. Dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976) das membranas isoladas das fermentações em biorreator sem reciclo da suspensão celular.

Experimento	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Biorreator controle	$1,050 \pm 0,09$
Biorreator sob campo magnético	$1,547 \pm 0,29$

As fermentações foram conduzidas em duplicata (n=2).

4.2.4.3 Immunoblotting

O western blotting é um técnica qualitativa para validação da presença da bomba de prótons acionada pela hidrólise de ATP. De acordo com os resultados obtidos a partir do Western blotting (Figura 27) pode confirmar a presença da bomba H^+ -ATPase presente na membrana da levedura *S. cerevisiae* X2180 em ambos os tratamentos, bem como associar o efeito provocado pelo campo sobre as atividades realizadas por ela. Esta enzima presente na membrana plasmática de leveduras, fungos e plantas apresenta massa molecular em torno de 100 KDa (Pederson *et al.*, 2007). Entretanto, foi observado que além da banda relacionada a H^+ -ATPase tipo P (3ª banda do padrão, na cor verde), outras bandas foram formadas indicando a degradação da proteína, constituindo fragmentos da mesma, uma vez que, o anticorpo policlonal utilizado é específico para esta enzima.

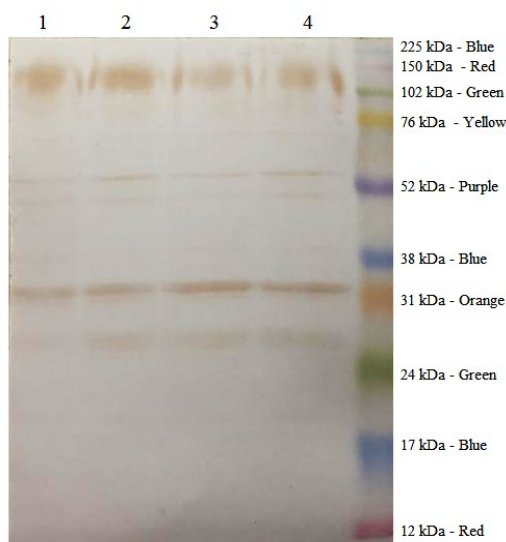


Figura 27. Efeito do campo magnético sobre a imunoresposta da H^+ -ATPase tipo P de membranas totais obtidas de células da fermentação sem reciclo e consumo total do substrato. Após obtenção do gel SDS-PAGE 10%, imunotransferência com o anticorpo policlonal de H^+ -ATPase tipo P de levedura (100 KDa) e detecção com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Identificação: Fermentação exposta ao campo magnético (1 e 2); Fermentação controle (3 e 4); Marcador padrão de peso molecular com faixa de cores variando de 12 a 225 KDa (Padrão - GE Healthcare).

Aparentemente parece haver maior intensidade das bandas dos poços 1 e 2 que correspondem à fermentação com exposição ao campo magnético, mas as bandas subsequentes inferiores que podem representar degradação por proteases são menos intensas quando comparadas com os experimentos controle. Já na fermentação controle (3 e 4) as bandas das enzimas estão menos intensas, porém as bandas de degradação são mais intensas.

4.2.4.4 Determinação da atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica do isolado de membranas de células de *S. cerevisiae* X2180 das fermentações foi determinada pela quantidade de *Pi* formado. A hidrólise foi quantificada na ausência (total) e na presença do inibidor específico da H⁺-ATPase tipo P vanadato (vanadato-resistente) e por diferença calculou-se a hidrólise de ATP vanadato-sensível. Os dados de hidrólise de ATP estão apresentados no Apêndice G. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de *Pi* formado por minuto (μmol de *Pi* /min) e por microlitro de extrato de isolado de membranas (U/ μL). A atividade foi determinada em função da proteína total determinada pelo método de Bradford e expressa como atividade específica (U/ μg).

A Figura 28 mostra os resultados da atividade hidrolítica dos extratos isolados de células controle e expostas ao campo magnético de 10 mT. Assim, é possível verificar que houve diferença entre estes sistemas, posto que a atividade hidrolítica específica vanadato-sensível correspondente a H⁺-ATPase tipo P da fermentação controle foi superior àquela determinada para a fermentação exposta ao campo magnético.

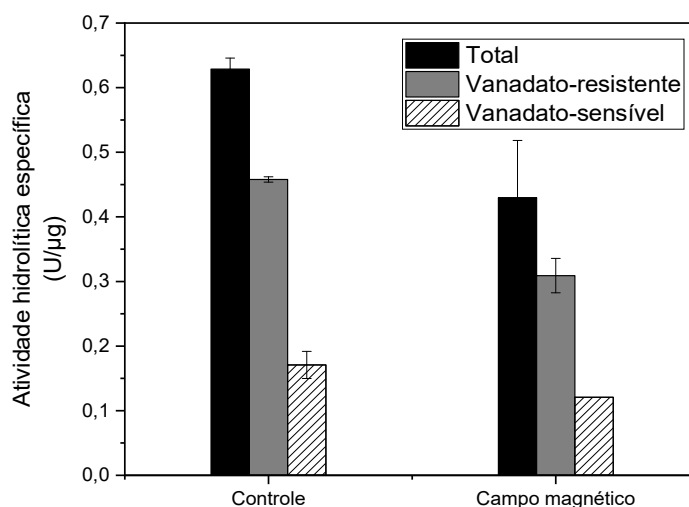


Figura 28. Determinação da atividade hidrolítica específica de membranas totais isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol: atividade hidrolítica total, vanadato-resistente e vanadato-sensível. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras de erro representam o desvio padrão respeito à média.

Portanto, aparentemente até este ponto da pesquisa houve controvérsias que precisavam ser resolvidas, pois como entender que havendo maior teor de proteína total e maior efluxo de H^+ vanadato-sensível sob campo magnético, houvesse menor atividade de hidrólise de ATP em relação ao experimento controle.

De acordo com a Tabela 4, campo magnético de baixa frequência e intensidade tem sido reportado por afetar de forma diferente, isto é, alterando positiva ou negativamente a performance de diferentes bombas de íons, as quais são também ATPase do tipo P. Inclusive, Lin e colaboradores (2019) relataram redução de atividade de transporte em torno de 97%, 70% e 34% para Na^+/K^+ -TPase, Ca^+ -ATPase, Mg^+ -ATPase, respectivamente. Embora, estes resultados sejam bem interessantes não é possível compará-los facilmente com aqueles obtidos para H^+ -ATPase tipo P exposta ao campo magnético por terem funcionalidades diferentes e por outro lado, até onde sabe não há estudos reportados na literatura para condições semelhantes em sistemas contendo H^+ -ATPase tipo P de leveduras.

Neste contexto, novos experimentos foram delineados visando avaliar simultaneamente, não apenas as atividades de hidrólise e de transporte, mas também a razão de acoplamento, por ser esta enzima H^+ -ATPases do tipo P uma proteína embebida na membrana plasmática que funciona como bomba de prótons acionada pela hidrólise de ATP (translocase), conforme já explicado no início do trabalho.

4.3 Validação da ação do campo sobre H^+ -ATPase tipo P

4.3.1 *Cinética de fermentação alcoólica*

Nesta última etapa, o estudo foi direcionado à confirmação do mecanismo proposto por Andrade *et al.* (2021) através de estudos do acoplamento bioquímico da enzima H^+ -ATPase presente na membrana da levedura. Portanto, as fermentações foram conduzidas até o consumo parcial do substrato (6 h), nas mesmas condições estudadas no item anterior (5.2) e o monitoramento da cinética de fermentação está apresentada na Figura 4J (Apêndice J). Como o controle térmico da fermentação pode influenciar a atividade da H^+ -ATPase, também foi realizado o monitoramento da temperatura das bobinas e do meio de fermentação. As termografias estão apresentadas no Apêndice J (Figura 3J). Pode-se afirmar que não houve alteração da temperatura da fermentação, pois as cores indicam que o meio de fermentação não foi afetado pelo aquecimento das bobinas do reator de campo magnético.

4.3.2 *Estudos bioquímicos*

4.3.2.1 *Cinética de hidrólise da parede celular*

Após 6 h de fermentação, as membranas totais das células da levedura *S. cerevisiae* X2180 da fermentação para produção de etanol foram isoladas e a cinética de hidrólise da parede celular monitorada. Os dados detalhados estão apresentados no Apêndice E e a cinética da hidrólise da parede celular no gráfico da Figura 29. Observa-se um decaimento médio na absorvância de 54,7%, sendo suficientes para realização das análises bioquímicas.

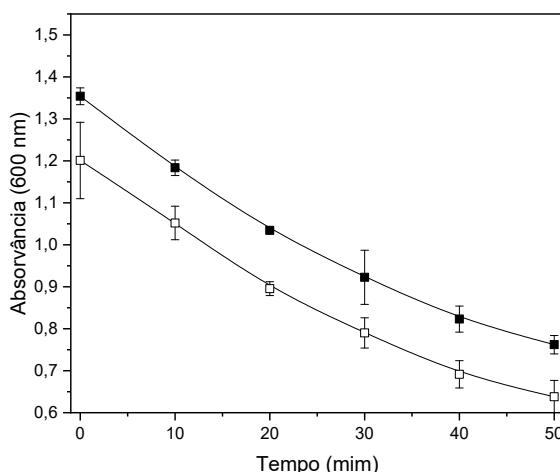


Figura 29. Gráfico cinético da hidrólise da parede celular da levedura *S. cerevisiae* X2180 na fermentação para produção de etanol conduzida por 6 h. Símbolos: ■ Biorreator controle; □ Biorreator assistido por campo magnético de 10 mT. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras de erro representam o desvio padrão respeito à média.

4.3.2.2 Determinação do teor de proteína

Após o isolamento das membranas das células da levedura utilizada nos experimentos de fermentação foi realizada a dosagem de proteína (Tabela 9). Pode observar que o campo magnético afetou significativamente a quantidade de proteínas totais. Houve um aumento de 72,3% na quantidade de proteína quando a fermentação foi exposta ao campo magnético. Além disso, o isolamento das membranas totais das fermentações com consumo parcial do substrato foi mais eficiente quando comparado ao isolamento da realização no fim da fermentação em termos de quantidade de proteína (item 4.2.2.2).

Tabela 9. Dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976) das membranas isoladas das fermentações em biorreator sem reciclo da suspensão celular

Experimento	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Biorreator controle	$1,521 \pm 0,41$
Biorreator sob campo magnético	$2,621 \pm 0,003$

As fermentações foram conduzidas em duplicata (n=2).

4.3.2.3 *Imunoblotting*

Para imunodeteccção de enzima H⁺-ATPase tipo P e validar de forma qualitativa sua presença na célula da levedura durante a fermentação foi realizado um dot blot, apresentado na Figura 30. Confirma-se nesta análise que a enzima está presente na membrana das leveduras de ambas as fermentações (controle e exposta ao campo magnético). Porém, nota-se uma diferença na expressão entre as fermentações. Entretanto, apesar da maior quantidade de proteína total (Tabela 9) presente na fermentação exposta ao campo magnético, não há maior expressão da enzima H⁺-ATPase tipo P em relação à fermentação controle. Com auxílio do Image J, a intensidade da resposta do dot blot foi quantificada, e, portanto, foi verificado que a expressão da enzima foi menor na fermentação exposta ao campo magnético, pois houve um redução média de 16,5% na expressão da H⁺-ATPase tipo P na fermentação tratada quando comparada ao controle.

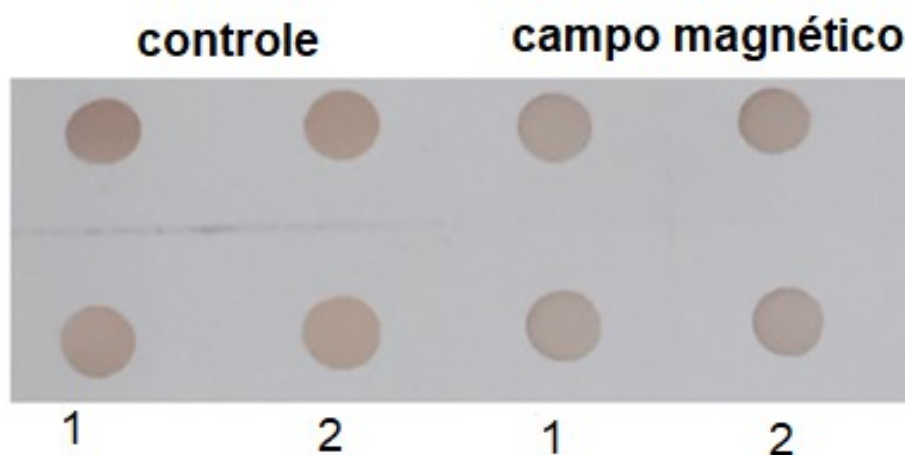


Figura 30. Imunoresposta (Dot blott) da H⁺-ATPase tipo P presente na membrana de células de *S. cerevisiae* X2180 após 6 h de fermentação sem reciclo. Os experimentos e as análises foram realizados em duplicata.

4.3.2.4 *Determinação da atividade de hidrolítica*

A atividade hidrolítica do isolado de membranas de células de *S. cerevisiae* X2180 das fermentações foi determinada pela quantidade de Pi formado. Primeiramente, foi realizada a cinética de hidrólise de ATP para determinar a velocidade inicial de hidrólise (V_0). A quantificação do ATP

hidrolisado foi obtida pela quantidade de P_i formado na ausência (total) e na presença do inibidor específico da H^+ -ATPase tipo P (vanadato-resistente) e, por diferença, calculada a hidrólise de ATP vanadato-sensível. Os dados de hidrólise de ATP estão apresentados no Apêndice H (Figuras 3H e 4H). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de P_i formado por minuto ($\mu\text{mol de } P_i / \text{min}$) e por microlitro de extrato de isolado de membranas ($U/\mu\text{L}$). A atividade foi determinada em função da proteína total determinada pelo método de Bradford e expressa como atividade específica ($U/\mu\text{g}$).

Na Figura 31 estão apresentadas as cinéticas de hidrólise de ATP nas fermentações controle e expostas ao campo magnético. Estas cinéticas foram obtidas a fim de estabelecer a velocidade inicial (V_0) e com 5 min de reação foi obtida máxima velocidade de hidrólise de ATP e, portanto, utilizada para determinação da taxa de acoplamento. Os dados obtidos na determinação da atividade hidrolítica revelaram que houve diferença entre as fermentações. Verifica-se que a taxa de atividade de hidrólise específica de ATP da fermentação controle foi superior à fermentação exposta ao campo magnético, praticamente dobrou.

Embora presente em ambos os tratamentos, conforme visto na análise de dot blott, a atividade hidrolítica específica vanadato-sensível correspondente a H^+ -ATPase tipo P na fermentação sob campo magnético foi menor quando comparada ao controle (Figura 32). Portanto, pode concluir que a enzima tem menor gasto de energia (ATP) quando as células da levedura são expostas ao campo magnético.

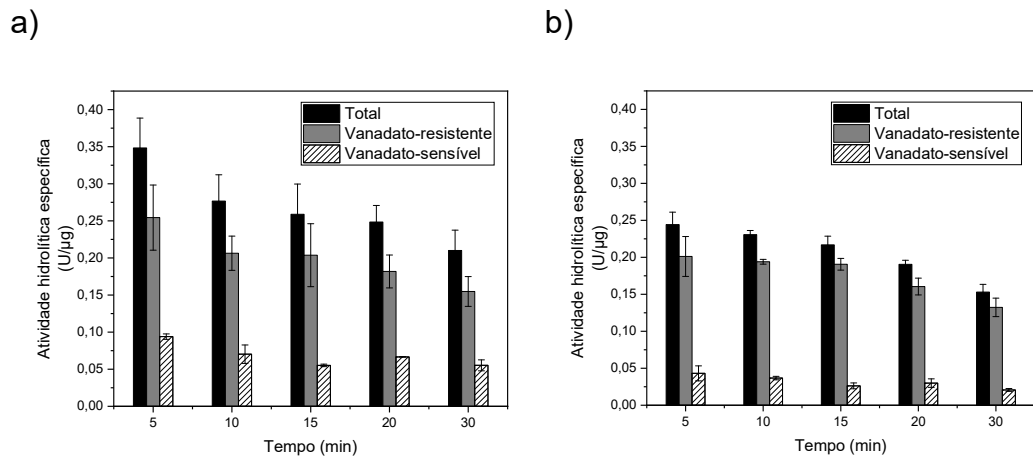


Figura 31. Cinética de atividade hidrolítica específica de membranas isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol. a) Biorreator controle; b) Biorreator exposto ao campo magnético de 10mT. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras de erro representam o desvio padrão respeito à média.

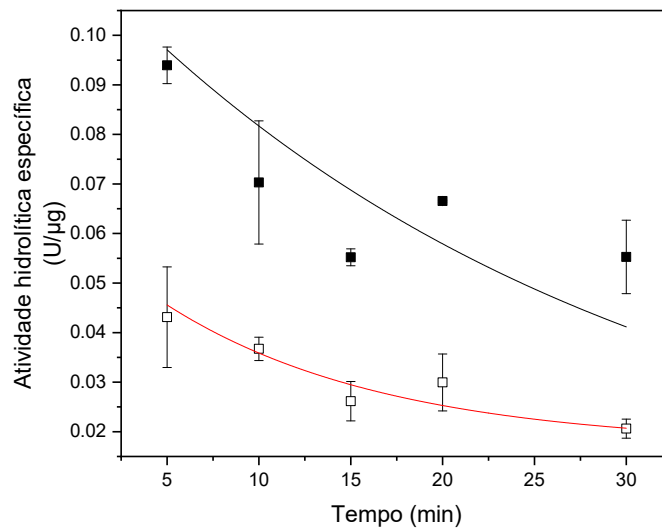


Figura 32. Cinética de atividade hidrolítica específica (vanadato-sensível) de membranas isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol. Símbolos: ■ Fermentação controle; □ Fermentação exposta ao campo magnético. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras de erro representam o desvio padrão respeito à média.

4.3.2.5 Determinação da atividade de transporte H^+

O transporte de H^+ dependente de ATP foi estimado pelo decréscimo da fluorescência conforme gráficos apresentados na Figura 33. Calculou-se a velocidade inicial de formação do ΔpH (V_0) e a fluorescência máxima total ($\Delta F_{\text{máx}}$) das células durante as fermentações. Definiu-se como uma unidade de atividade de transporte (U) unidade relativa de fluorescência (U.R.F%/mim) pelo volume de amostra. Para cálculo da atividade transporte específica foi considerada a massa de proteína (μg), os dados estão disponíveis na Tabela 11 (Apêndice I).

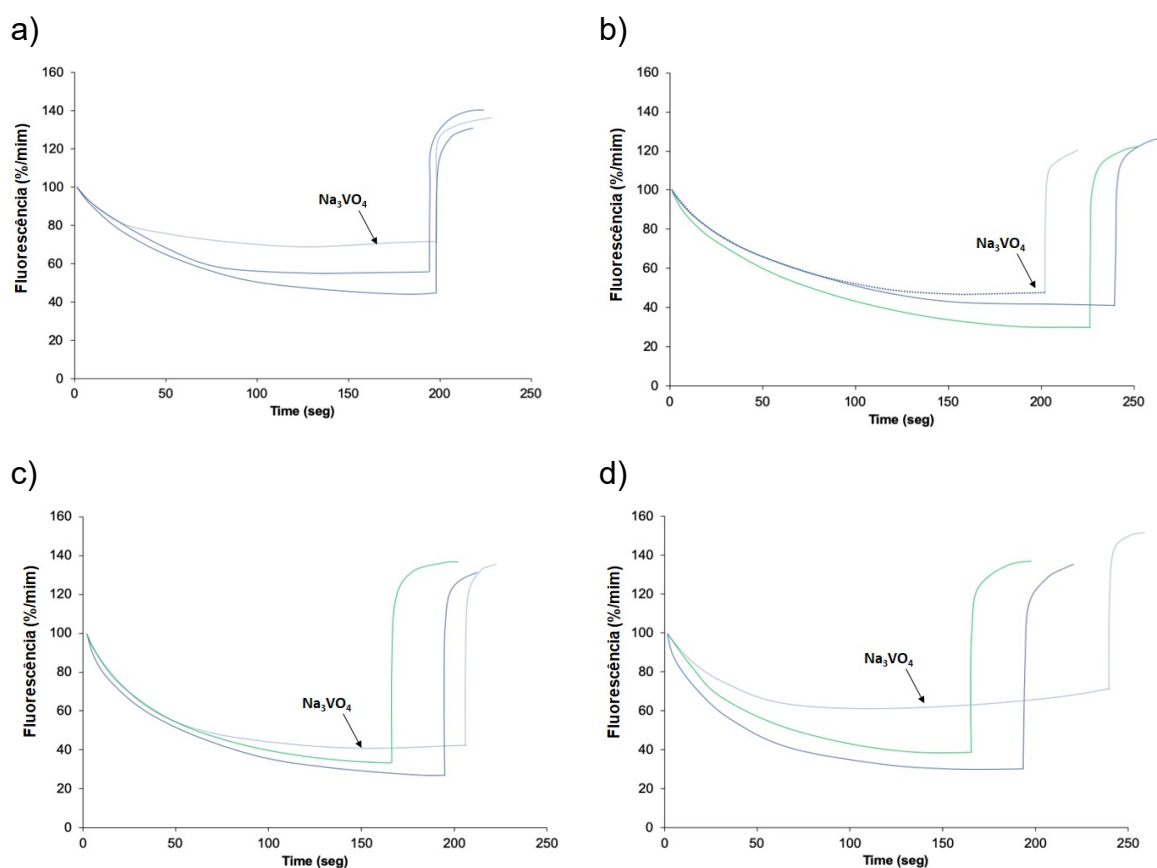


Figura 33. Atividade de bombeamento de prótons da H^+ -ATPase tipo P de membranas isoladas de fermentações por *S. cerevisiae* X2180 para produção de etanol. A translocação de prótons através de vesículas de membrana foi monitorada pela extinção de fluorescência de ACMA na presença de 80 μL de isolados de membrana; a reação foi iniciada pela adição de 1 mmol/L de ATP. Os dados são representativos de duas fermentações controle (a e b) e fermentações expostas ao campo magnético de 10 mT (c e d).

Na Figura 34 estão graficamente apresentadas as atividades de transporte de H⁺ específica. De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a velocidade inicial do transporte de H⁺ vanadato-sensível relacionado à atividade da enzima H⁺-ATPase tipo P na fermentação exposta ao campo magnético teve um aumento de quase três vezes em relação à fermentação controle.

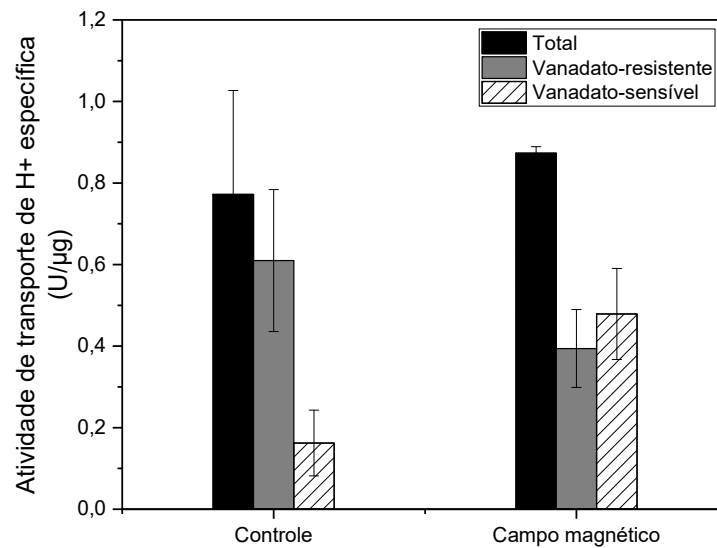


Figura 34. Atividade de transporte de H⁺ específica medida de membranas isoladas da fermentação em biorreator para produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e as barras representam o desvio padrão a respeito à média.

Portanto o campo magnético aumentou a velocidade de transporte H⁺ corroborando com o aumento do efluxo de prótons. Porém, a atividade de hidrólise de ATP foi reduzida. Estes resultados sugerem uma diferença no acoplamento funcional (acoplamento entre as duas atividades desempenhadas pela bomba: hidrólise de ATP e transporte de H⁺) entre os dois estados da enzima, revelando um estímulo da eficiência de transporte da bomba associada a um acoplamento menor de energia liberada pela hidrólise de ATP na promoção das mudanças conformacionais importantes para o transporte ativo de H⁺ pela enzima.

Dessa forma, a razão de acoplamento da bomba de prótons foi calculada pela razão entre a velocidade inicial de atividade de transporte de H⁺ e a velocidade inicial de hidrólise de ATP conforme descrito na Equação (5).

$$\text{Razão de acoplamento} = \frac{\text{Velocidade de transporte de H}^+}{\text{Velocidade de hidrólise de ATP}} \quad (5)$$

Como pode observar na Tabela 10, o campo magnético alterou a capacidade de acoplamento da bomba H⁺-ATPase, uma vez que as atividades de transporte e hidrólise da bomba também foram alteradas. Enquanto a atividade específica de hidrólise diminuiu a atividade de transporte aumentou com a presença do campo, fazendo com que a razão de acoplamento de 1,7282 ± 0,8 para a fermentação controle aumentasse para 11,1065 ± 2,59 sob o efeito do campo magnético, isto é, um aumento de 6,4 vezes maior em relação ao controle. Assim, pode concluir que enquanto na condição controle a bomba estava funcionando de forma acoplada, sob o efeito do campo magnético houve uma evidente alteração da bomba para uma condição de hiperacoplamento. Desta forma, estes resultados podem suportar o efeito do campo magnético na produtividade de produção de bioetanol pela *S. cerevisiae* X2180.

Tabela 10. Efeito do campo na capacidade de acoplamento de H⁺-ATPase entre atividade de transporte de H⁺ e atividade de hidrólise de ATP de células isoladas após a fermentação em biorreator sem reciclo da suspensão celular conduzida até o consumo parcial de substrato

Experimento	Atividade de transporte específica (U/μg)	Atividade de hidrólise específica (U/μg)	Razão de acoplamento
Biorreator controle	0,16236 ± 0,08	0,09395 ± 0,004	1,7282 ± 0,8
Biorreator sob campo magnético	0,47889 ± 0,11	0,04312 ± 0,001	11,1065 ± 2,59

Os valores representam as médias de experimentos conduzidos em duplicata.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- Baseado nos dados obtidos neste estudo, propomos e validamos o mecanismo de ação pelo qual campos magnéticos de baixa frequência e intensidade podem interagir com as células da levedura e impactar positivamente o processo de fermentação. De fato, o campo favorece o consumo de substrato, reduzindo os tempos de fermentação, com consequente aumento da produtividade;
- Este efeito positivo sobre a levedura pode ser sustentado do ponto de vista celular ao verificar que houve um efeito biológico do campo magnético na performance da enzima H^+ -ATPase tipo P, presente na membrana plasmática, uma vez que esta bomba de prótons se torna mais eficiente tendo menor gasto de energia para um maior transporte de H^+ operando em condições de hiperacoplamento na manutenção do equilíbrio eletroquímico da célula, seis vezes maior em relação ao controle;
- Parece haver uma relação entre a redução da produção de metabólitos intermediários como acetato e glicerol com a performance da enzima H^+ -ATPase tipo P sob campo magnético. Porém, esse tipo de observação precisa de mais estudos do ponto de vista bioquímico que permitam validar esta correlação;
- De forma semelhante, as alterações morfológicas observadas em nível celular sob campo magnético em relação ao núcleo e citoesqueleto são muito

importantes e precisam também de estudos mais aprofundados que podem ser complementados com microscopia eletrônica;

- Estudos futuros poderão ser direcionados para explorar se os campos magnéticos induzem mudanças transcricionais e/ou pós-transcricionais em bombas de íons, canais e outros transportadores de substrato, incluindo os sistemas voltagem-dependentes, visando complementar os resultados e ampliar o universo de potenciais aplicações em biotecnologia industrial e em processos químicos e de alimentos;
- Para abordar aplicações industriais, estudos futuros devem ser realizados utilizando substratos da prática industrial, como caldo de cana e melaço ou mesmo amido de milho hidrolisado, que fornece essencialmente sacarose e outros dissacarídeos fermentáveis, os quais são transportados via simporte de prótons nas leveduras e considerando o mecanismo revelado, resultados ainda melhores podem ser esperados;
- Finalmente, os resultados deste estudo podem ser de grande relevância pois, além de contribuir para o entendimento do efeito biológico dos campos magnéticos, também podem contribuir com a cadeia produtiva de bioetanol, uma vez que estudos de scale-up, de impacto ambiental e técnico-econômicos avaliem os benefícios desta tecnologia não convencional.

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.
- Amillastre, E., Aceves-Lara, C. A., Uribelarrea, J. L., Alfenore, S., Guillouet, S. E. (2012). Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 117: 242-250.
- Andrade, C. M. (2018). 132f. Efeitos biológicos do campo magnético sobre *Saccharomyces cerevisiae*: produção de bioetanol em biorreator assistido por campo magnético. Dissertação (Mestrado) – Produção vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Anton-Leberre, V., Haanappel, E., Marsaud, N., Trouilh, L., Benbadis, L., Boucherie, H., Massou, S., François, J. M. (2010) Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics*, 31 (1):28-38.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10: 52-61.
- Baggett, J. J., Shaw, J. D., Sciambi, C. J., Watson, H. A., Wendland, B. (2003). Fluorescent Labeling of Yeast. *Current Protocols in Cell Biology*, 4.13.1-4.13.28
- Bai, F. W., Anderson, W. A., Moo-Young. M. (2008). Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv* 26: 89-105.
- Barnett, J. (2008) A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites 1, *YeasT*, 25:689-731.

- Berlot, M., Rehar, T., Fefer, D., Berovic, M. (2013) The influence of treatment of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum with a magnetic field on subsequent grape must fermentation. *Chemical and Biochemical Engineering. Q.* 27:423-429.
- Bisson, L. F., Fan, Q., Walker, G. A. (2016) Sugar and glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*, in: J. Ramos, H. Sychrov_a, M. Kschischo (Eds.), *Yeast Membrane Transport, Springer International Publishing, Cham*, 125-168.
- Blank, M. (2005). Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na,K-ATPase? *Bioelectromagnetics*, 26 (8):677-683.
- Blank, M., Soo, L. (1997). Frequency dependence of Na, K-ATPase function in magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42: 231-234.
- Blank, M., Soo, L. (2001). Optimal frequencies for magnetic acceleration of cytochrome oxidase and Na,K-ATPase reactions. *Bioelectrochemistry* 53: 171–174.
- Blank, M., Soo, L., Papetein, V. (1995). Effects of low frequency magnetic fields on Na,K-ATPase activity, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*,38: 267-273.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- 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, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 133: 857-865.
- Chang, F., Minc, N. (2014). Electrochemical Control of Cell and Tissue Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:317–336.
- Chen, C., Cui, Y., Yue, J., Huo, X., Song, T. (2009). Enhancement of the hydrolysis activity of F₀F₁-ATPases using 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 30:663-668.
- Choe, M., Choe, W., Cha, S., Lee, I. (2018) Changes of cationic transport in AtCAX5 transformant yeast by electromagnetic field environments. *J. Biol. Phys.* 44 (3):433-448.
- Chowdhury, S., Smith, K. W., Gustin, M. C. (1992). Osmotic Stress and the Yeast Cytoskeleton: Phenotype-specific Suppression of an Actin Mutation *The Journal of Cell Biology*, 118 (3): 561-571.
- Cogo, A. J. D., Ferreira, K. R. D., Okorokov, L. A., Ramos, A. C., Façanha, A. R., Okorokova-Façanha, A. L. (2018). Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. *Biology open*, 7 (2).
- Cosse, M., Seidel, T. (2021). Plant Proton Pumps and Cytosolic pH-Homeostasis. *Front. Plant Sci.*, 12: 67287.

- Crocomó, O. J., Gutierrez, L. E. (2001). Caminhos metabólicos. In: Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E. *Biocologia Industrial*, vol. 1: Fundamentos, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.
- Cyert, M. S., Philpott, C. C. (2013). Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193: 677–713.
- 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 unconventional magnetically assisted bioreactor seeking whole cell biocatalyst (intracellular lipase) production. *Chemical Engineering Research and Design*, 3: 243–252.
- Deamici, K. M., Cardias, B. B., Costa, J. A. V., Santos, L. O. (2016). Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochemistry*, 51 (7): 912-916.
- 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. *Microbial Cell*, 5 (3):119-136.
- Deutmeyer, A., Raman, R., Murphy, P., Pandey, S. (2011) Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2 (4): 207-213.
- Dobsinský, J., Jedlicka, J. (2017) Biological effect of magnetic field on the fermentation of wine. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11 (1):575-579.
- Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J. S., Valença, G. P., Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation, *AMB Express*, 2013, 3:31.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Arch.* 457(3): 645-655.
- Dussán, K. J., Justo, O. R., Perez, V. H., David, G. F., Junior, E. G. S., da Silva, S. S. (2019) Bioethanol production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by immobilized *S. Shehatae* in a fluidized bed fermenter under magnetic field. *BioEnergy Research*, 12 (2):338-346.
- 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.
- Esitken, A., Turan, M. (2004) Alternating magnetic field effects on yield and plant nutrient element composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. camarosa). *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 54 (3):135-139.

- Fiske, C. H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375-400.
- 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.
- Galonja-Corghill, T., Kostadinovi_c, L. (2009) Magnetically altered ethanol fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *B. C, Proc. Nat. Sci.* 117:119-123.
- Gao, M., Zhang, J., Feng, H. (2011). Extremely Low Frequency Magnetic Field Effects on Metabolite of *Aspergillus Niger*. *Bioelectromagnetics*, 32:73-78.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214.
- 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. (2010). Magnetic field assisted fluidization – a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses. *Rev. Chem. Eng.*, 26 (3-4): 55-128.
- 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.
- Ida, Y., Furusawa, C., Hirasawa, T., Shimizu, H. (2012). Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2): 192–195.
- 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.
- Inapurapu, S., Kudle, K. R., Bodiga, S., Bodig, V. L. (2017). Cisplatin cytotoxicity is dependent on mitochondrial respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Iran J Basic Med Sci*, 20:83-89.

- Ivanova, V., Hristov, J., Dobрева, E., Al-Hassan, Z., Penchev, I. (1996) Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59 (2):187-198.
- 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.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2012). *Biologia Celular e Molecular*. 9ª Edição. Editora Guanabara Koogan. 338 p.
- 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.
- Konopacka, A., Rakoczy, R., Konopacki, M. (2019). The effect of rotating magnetic field on bioethanol production by yeast strain modified by ferrimagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn Mater.* 473:176-183.
- Konopacki, M., Rakoczy, R. (2019). The analysis of rotating magnetic field as a trigger of Gram-positive and Gram-negative bacteria growth. *Biochem. Eng. J.* 141:259-267.
- Lei, C., Berg, H. (1998). Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45 (2): 261-265.
- 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.
- Lima, U. A., Basso, L. C., Amorim, H. V. (2001). In: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzanil, W., Schmidell, W. *Biotechnologia Industrial*, Volume 3, Fundamentos, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 593 p. il.
- Lin, L., Wang, X., He, R., Cui, H. (2019). Action mechanism of pulsed magnetic field against *E. coli* O157:H7 and its application in vegetable juice. *Food Control*, 95: 150–156.
- Liu, C. Z., Wang, F., Ou-Yang, F. (2009) Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresour. Technol.* 100 (2):878-882.
- Lobão, F. A., Façanha, A. R., Okorokov, L. A., Dutra, K. R., Okorokova-Façanha, A. L. (2007). Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ Transport mediated by the plasmamembrane ATPase of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 274:17–23.

- Lopes, D. H. J., Sola-Penna, M. (2001). Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: the other side of urea interaction with proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394 (1): 61-66.
- Lopes, M. L., Paulillo, S. C. L., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., Bernardino, C. D., Amorim Neto, H. B., Amorim, H. V. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 475: 64–76.
- Lopes, P., Borzani, W., Rodrigues, J. A. D., Ratznei, 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. Acessado em: 11 de julho de 2016.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., Frohlich, K. U. 1999. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 145(4): 757-767.
- Mendoza-Turizo, M. G., Justo, O. R., Perez, V. H., Paz-Astudillo, I. C., Cardona, C. A., Mueses, M. A., Cabrera-Sanmartin, C. M. (2017) Modeling of bioethanol production in unconventional bioreactor assisted by electromagnetic field. *Int. J. Energy Res.* 41 (1):103-112.
- 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.
- Morelli, A., Ravera, S., Panfoli, I., Pepe, I. M. (2005). Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on membrane-associated enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441 (2): 191-198.
- 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.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M., Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy* 92: 763–768.
- Novák, J., Strašák, L., Fojt, L., Slaninová, I., Vetterl, V. (2007). Effects of lowfrequency 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.
- Okorokov, L. A., Lehle, L. (1998). Ca²⁺-ATPases of *S. cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiology Letters*, 162: 83-91.
- Okorokov, L. A., Lichko, L. P. (1983). The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*: ATPase is electrogenic H⁺ -translocase. *FEBS Letters*, 155: 102-106.

- Pazur, A., Schimek, C., Galland, P. (2007). Magnetoreception in microorganisms and fungi. *Central European Journal of Biology*, 2 (4): 597-659.
- Pedersen, B. P.; Buch-Pedersen, M. J.; Morth, J. P.; Palmgreen, M. G.; Nisse, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450: 1111-1114.
- Pena, A., Sanchez, N. S., Alvarez, H., Calahorra, M., Ramírez, J. (2015) Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 15 (2):1-13.
- 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).
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L. N., Dong, Y. Q., Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 559-591.
- Ramos, A. C., Façanha, A. R., Feijó, J. A. (2008) Proton (H^p) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 178 (1):177-188.
- Reitz, J. R. (1967). *Foundations of electromagnetic theory*. 2 ed. Addison Wesley Publishing Company.
- Ren21 (2010) Renewables 2020 Global Status Report, REN21 Secretariat), Paris, ISBN 9783948393007.
- Roman, D. C. C. (2015). Produção de biodiesel por método não convencional em biorreator assistido por campo eletromagnético. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 136p.
- Rosa, M. F. Sa-Correia, I. (1991) In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (3):830-835.
- 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.

- Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., Vij, S. (2018). Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochemistry* 72, 1–12.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, (36):19480– 19487.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 947 (1):1-28.
- Serway, R. A (1992). *Física 3 – Eletricidade, magnetismo e ótica*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, cap 29: 152-170.
- Silva, P. G. P., Prescendo Júnior, D., Sala, L., Burkertb, J. F. M., Santos, L. O. (2020). Magnetic field as a trigger of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. *Process Biochemistry*, 98: 131–138.
- Strašák, L., Vetterl, V., Šmarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 55 (1): 161-164.
- Teixeira, L. R. S. (2016). Influência da calcineurina sobre a ativação de P e V H⁺-ATPases por pH e glicose em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 122p.
- 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.
- Tipler, P. A. (2000). *Eletricidade & Magnetismo e Ótica*. 4ª Ed. Rio de Janeiro. LTC, Editora. 179 - 198.
- 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.
- Uesono, Y., Ashe, M.P., Toh, E. A. (2004). Simultaneous yet independent regulation of actin cytoskeletal organization and translation initiation by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15(4): 1544-1556.
- Vasicova, P., Rinnerthaler, M., Haskova, D., Novakova, L., Malcova, I., Breitenbach, M., Hasek, J. (2016). Formaldehyde fixation is detrimental to actin cables in glucose-depleted *S. cerevisiae* cells. *Microbial Cell*, 3 (5): 206-214.

- 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.
- Veiga, M. C., Fontoura, M. M., Oliveira, M. G., Costa, J. A. V., Santos, L. O. (2020). Magnetic fields: biomass potential of *Spirulina* sp. for food supplement. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43:1231–1240.
- Venâncio, J. B. (2013). Modulação das Bombas de H⁺ no Desenvolvimento Vegetal: Papel no Metabolismo de Açúcares e nas Respostas Adaptativas das Plantas ao Estresse Hídrico. Tese (Doutor em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 124p.
- Venancio, J. B., Catunda, M. G., Ogliari, J., Rima, J. A. H., Okorokova-Facanha, A. L., Okorokov, L. A., Façanha, A. R. (2014). A vacuolar H⁺-pyrophosphatase differential activation and energy coupling integrate the responses of weeds and crops to drought stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840: 1987–1992.
- Verma, O., Joshi, N., Pandey, S. T., Srivastava, R. C., Guru, S. K. (2017). Comparative Study of Hydropriming to Static Magnetic Field on Seedling Vigour and Enzyme Activity in Wheat Seed. *Agric Res*, 6(3):235–240.
- Volkov, V. (2015). Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. *Frontiers in Plant Science*, 6:425.
- Wei, J., Sun, J., Xu, H., Shi, L., Sun, L., Zhang, J. (2015) Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on intracellular calcium transients in cardiomyocytes. *Electromagn. Biol. Med.* 34 (1):77-84.
- Wu, P., Qu, W., Abdualrahman, M., Guo, Y., Xu, K., Ma, H. (2017) Study on inactivation mechanisms of *Listeria grayi* affected by pulse magnetic field via morphological structure, Ca²⁺ transmembrane transport and proteomic analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52 (9): 2049-2057.
- Xiong, X., Zhen, Z., Liu, Y., Gao, M., Wang, S., Li, L., Zhang, J. (2020) Low-frequency magnetic field of appropriate strengths changed secondary metabolite production and Na^(p) concentration of intracellular and extracellular *Monascus purpureus*. *Bioelectromagnetics*, 41 (4):289-297.
- Zablotskii, V., Polyakova, T., Lunov, O., Dejneka, A. (2016). How a high-gradient magnetic field could affect cell life. *Scientific Reports*, 6:37407.
- Zhang, J., Zeng, D., Xu, C., Gao, M. (2015). Effect of low-frequency magnetic field on formation of pigments of *Monascus purpureus*. *European Food Research and Technology*, 240: 577–582.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curvas de calibração HPLC

Curva de calibração para a determinação do consumo de substrato e formação de produto e subprodutos durante a fermentação para produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 em reator assistido por campo magnético.

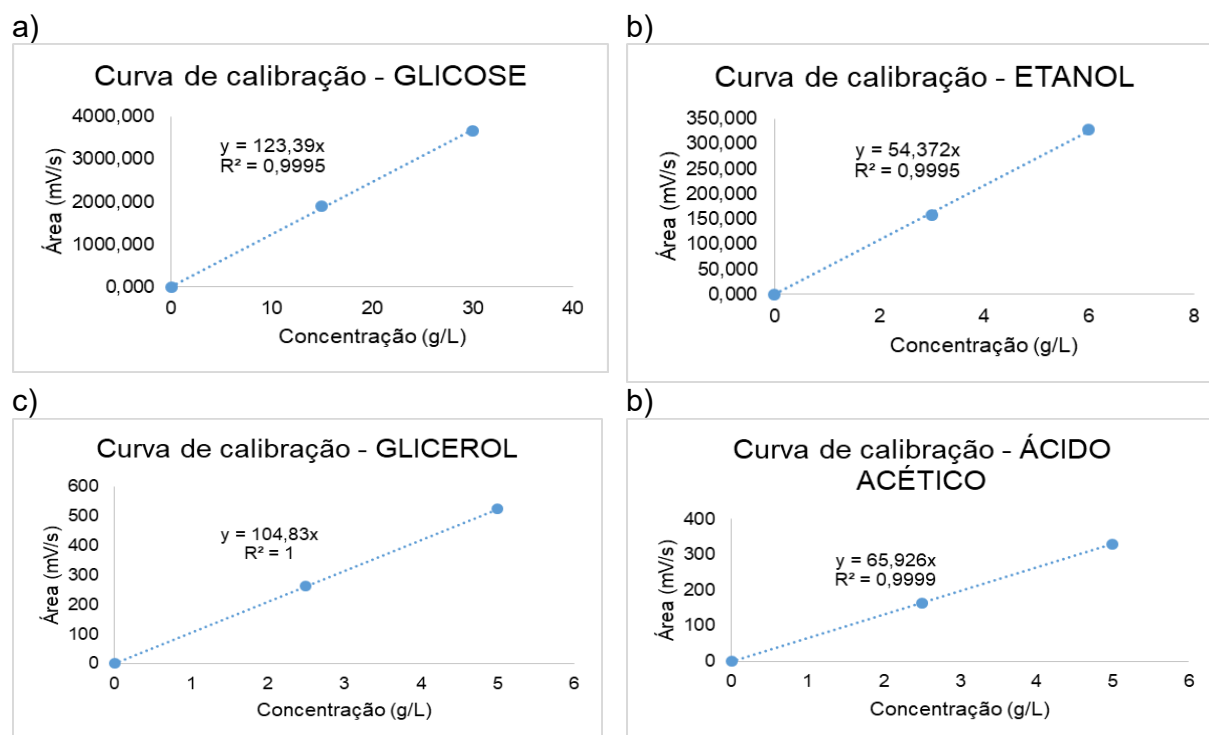


Figura 1A. Curvas de calibração usadas para determinar a concentração (g/L) da glicose consumida, etanol formado e glicerol produzido durante a fermentação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). a) Glicose, b) Etanol e c) Glicerol e d) Ácido acético.

APÊNDICE B – Curva de crescimento da levedura

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

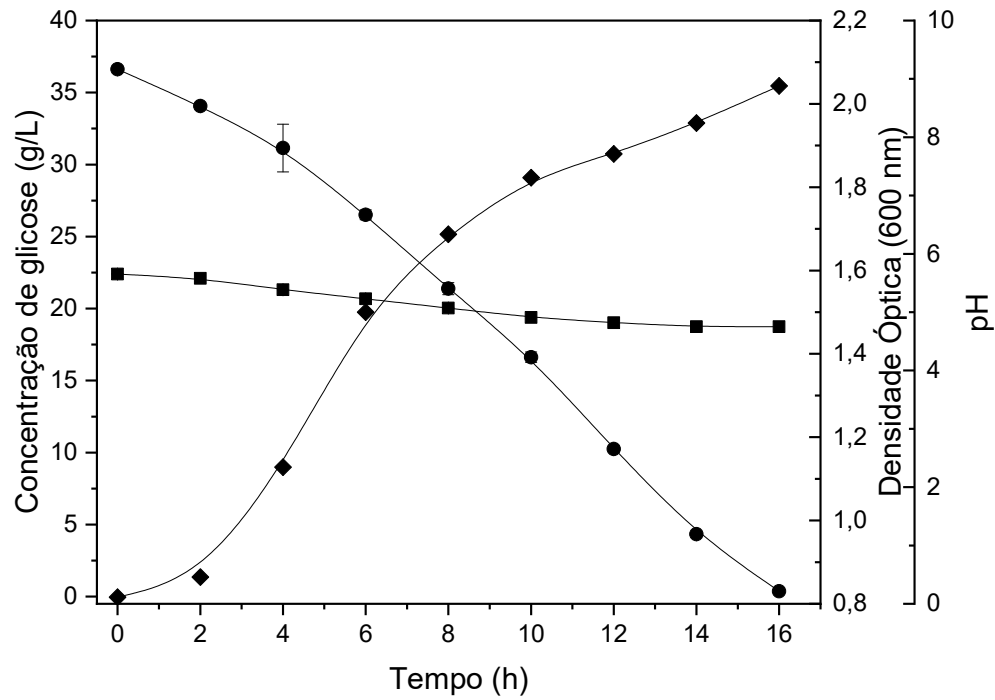


Figura 1B. Curva de crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* X2180 incubada em shaker a 30°C e agitação orbital de 200 rpm utilizando 20%(v/v) do pré-cultivo. Símbolos: ● Concentração de glicose (g/L); ◆ Densidade óptica (DO 600 nm); ■ pH .

APÊNDICE C – Calibração biorreator

Resultado da calibração do sistema gerador de campo magnético.

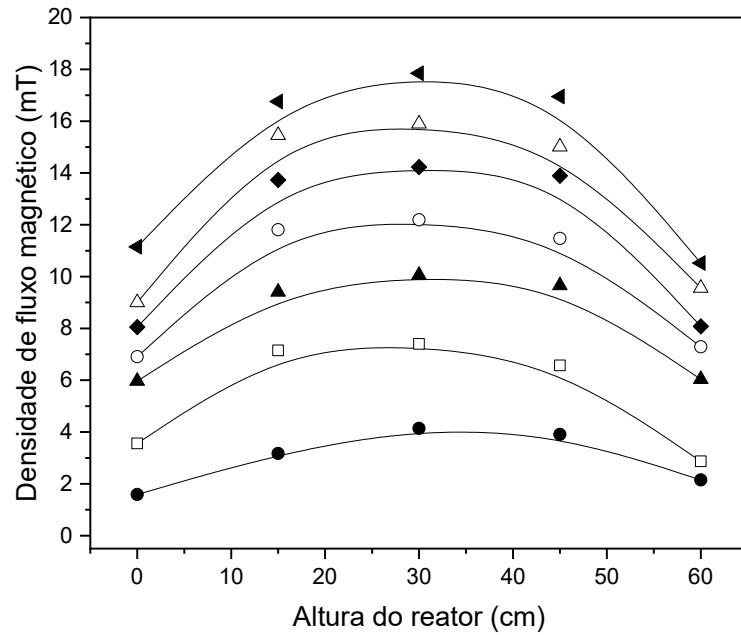
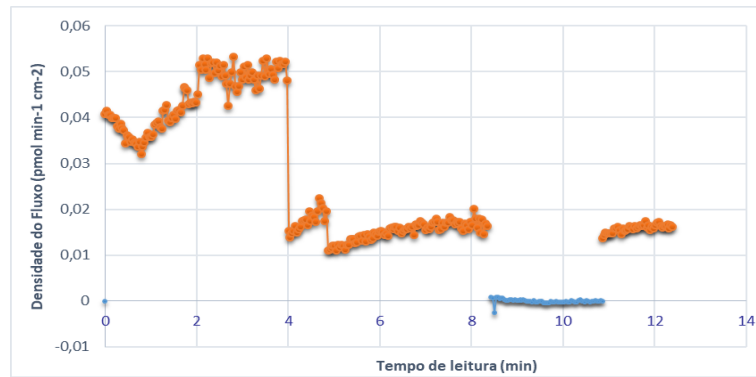


Figura 1C. Representação gráfica do perfil da densidade de fluxo magnético no centro das bobinas do biorreator assistido por campos eletromagnéticos – sistema axial. Símbolos: ● 1 A; □ 2 A; ▲ 3 A; ○ 4 A; ◆ 5 A; △ 6 A; ▶ 7 A.

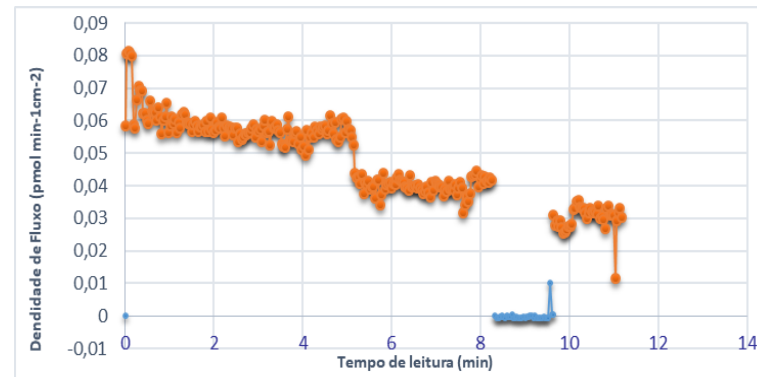
APÊNDICE D – Dados da densidade de fluxo de H^+

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

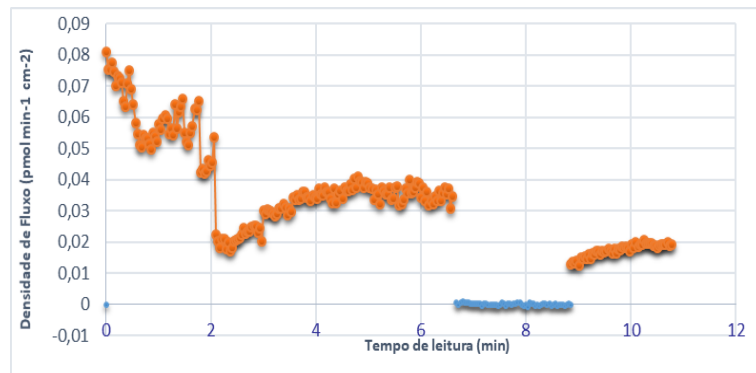
a)



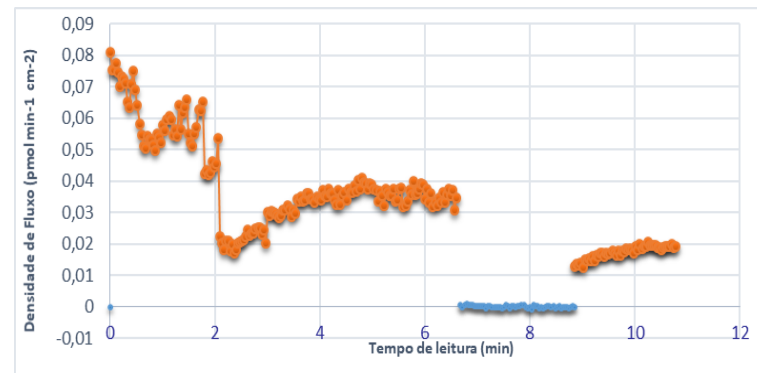
a')



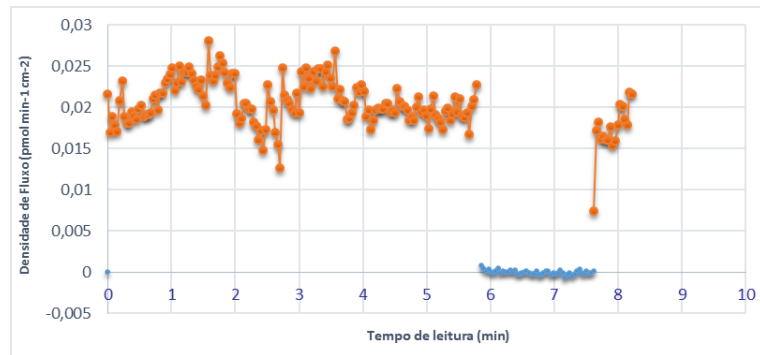
b)



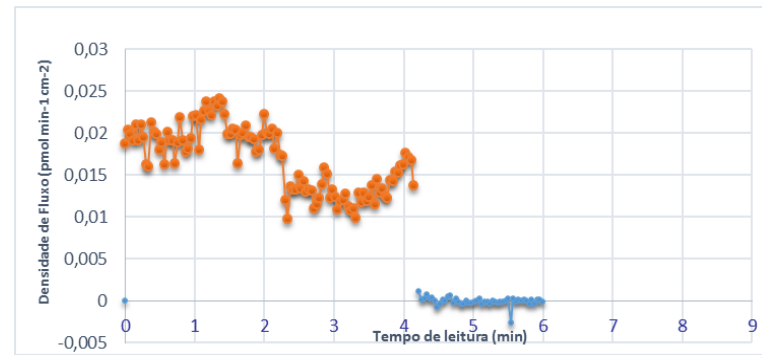
b')



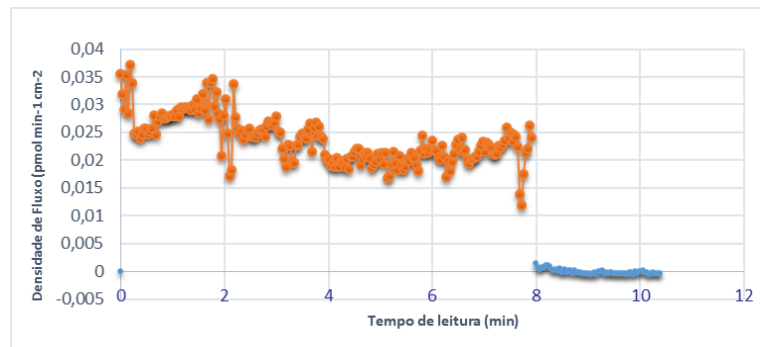
c)



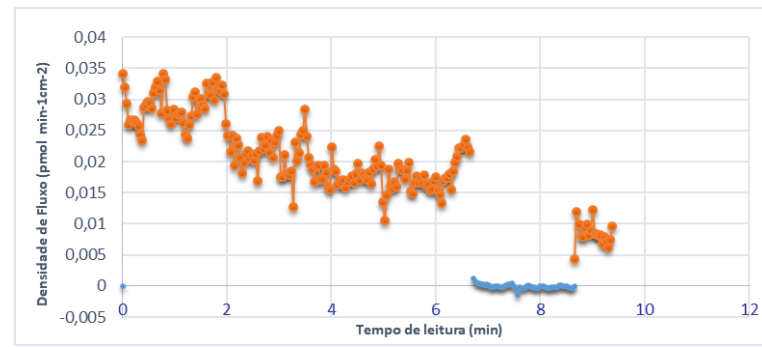
c')



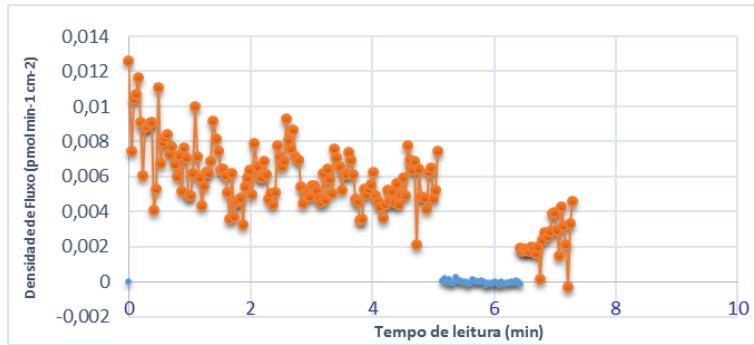
d)



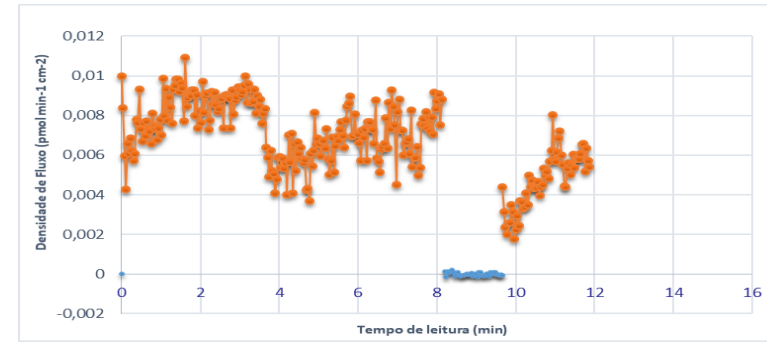
d')



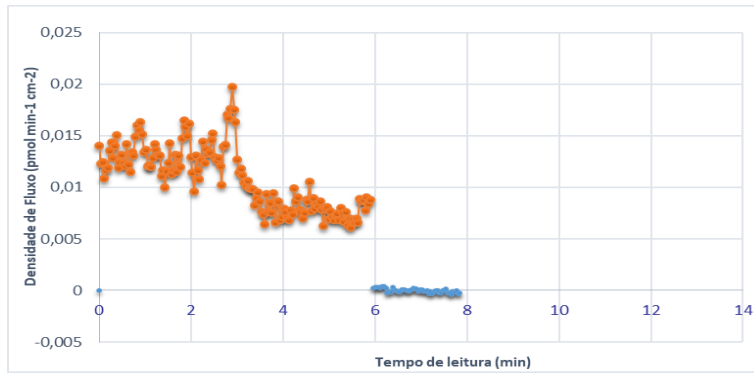
e)



e')



f)



f')

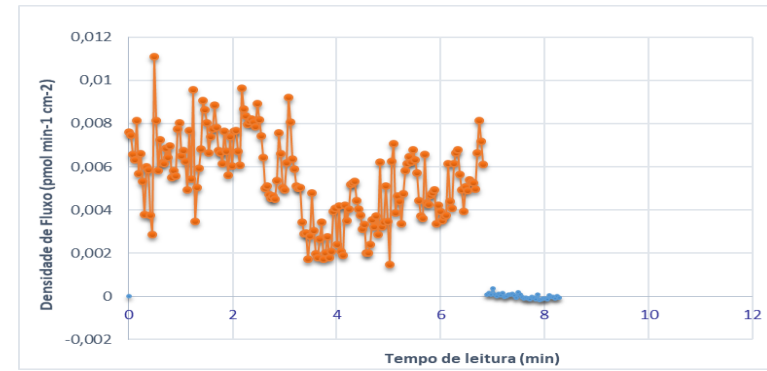
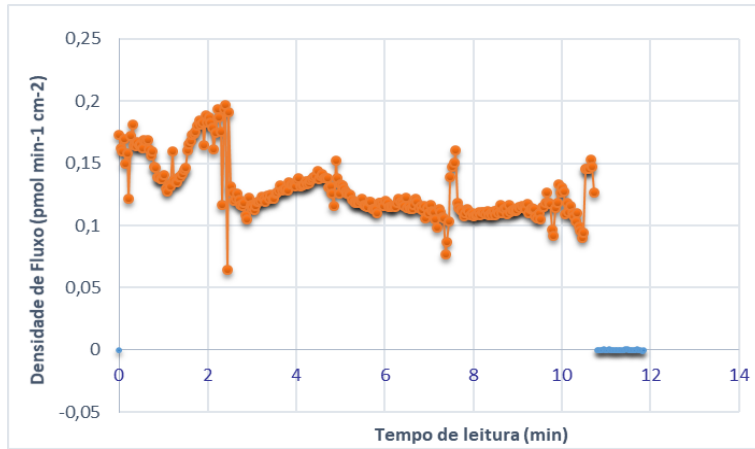
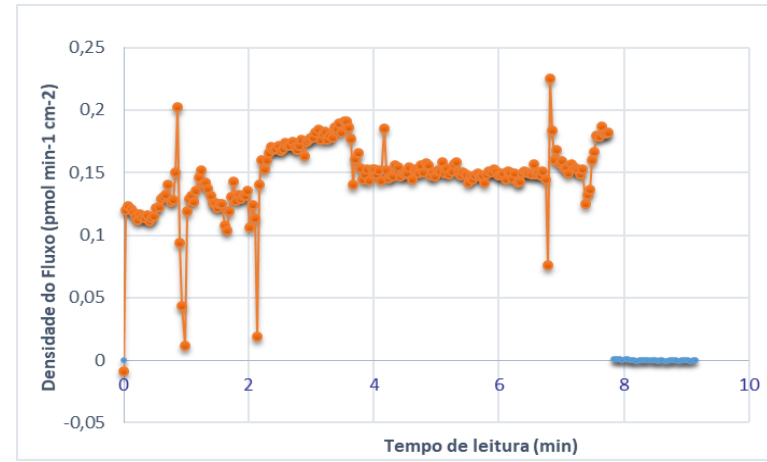


Figura 1D. Gráficos de densidade de fluxo de prótons durante a fermentação em biorreator com reciclo externo sem campo (CONTROLE – rep. 1) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e'); 10 h (f e f').

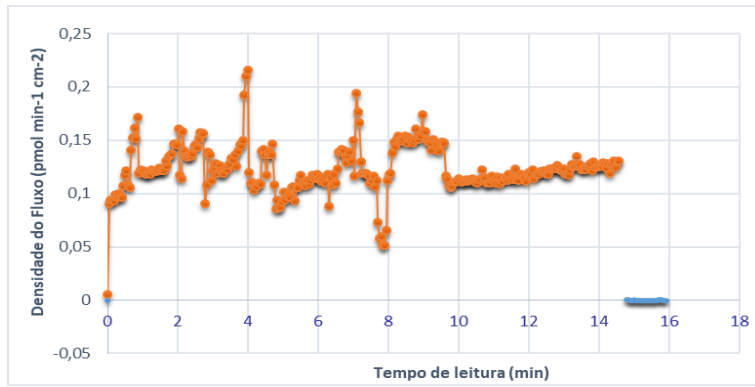
a)



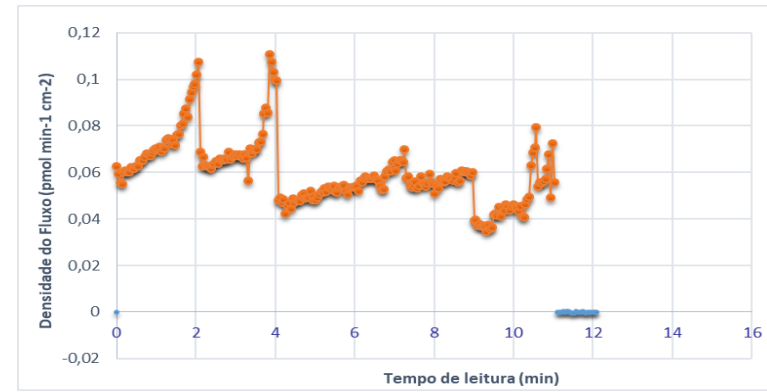
a')



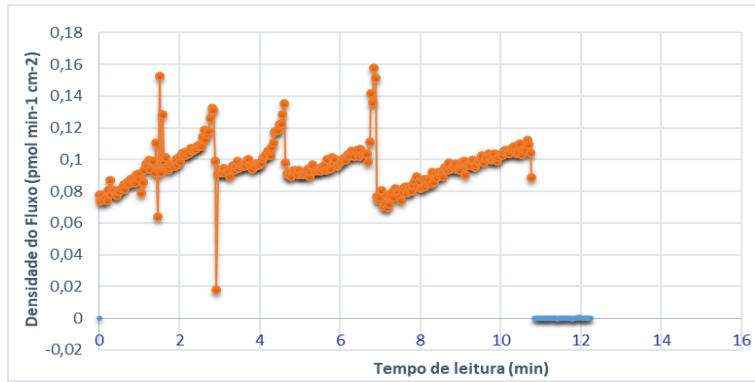
b)



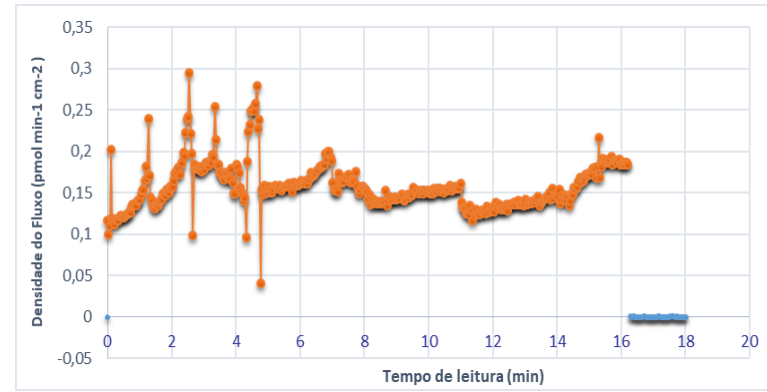
b')



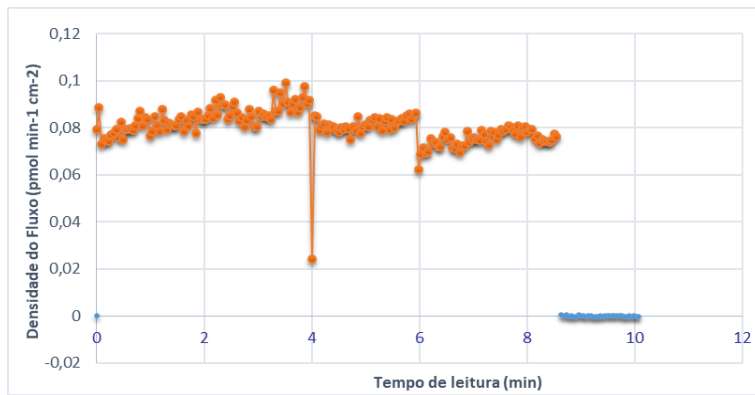
c)



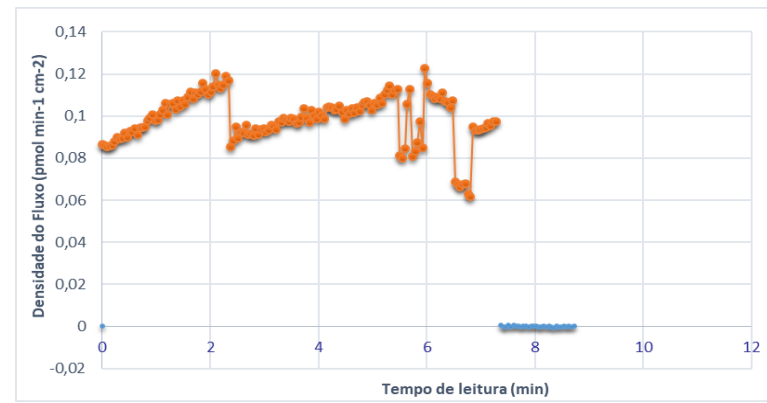
c')



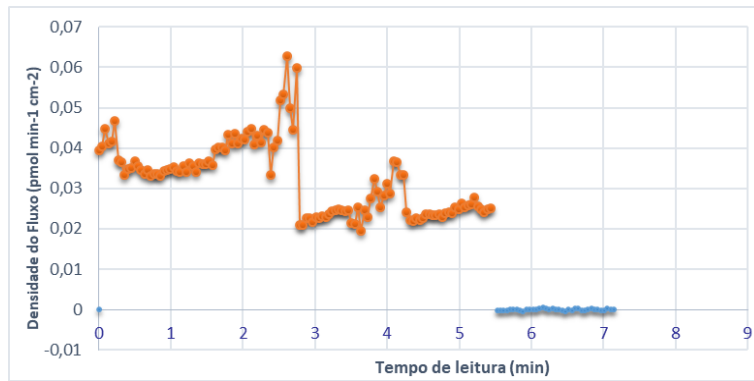
d)



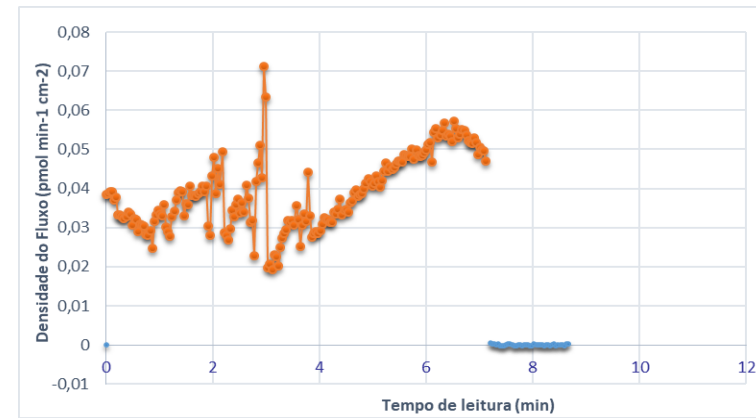
d')



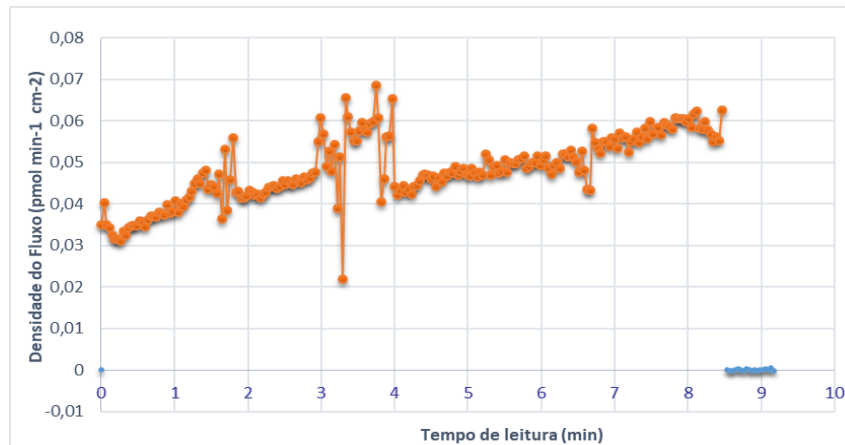
e)



e')



f)



f')

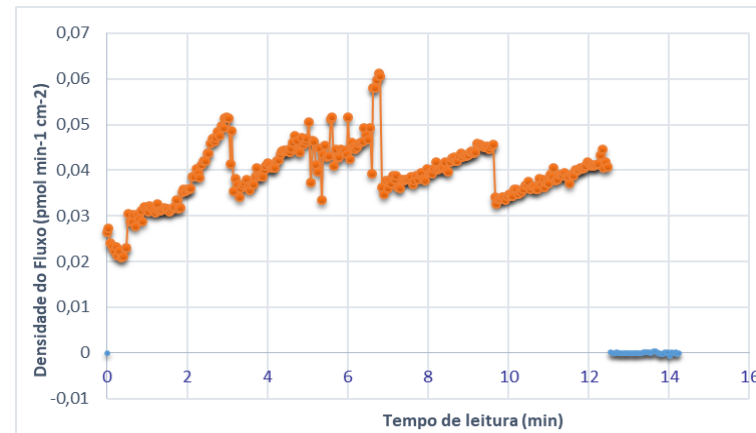
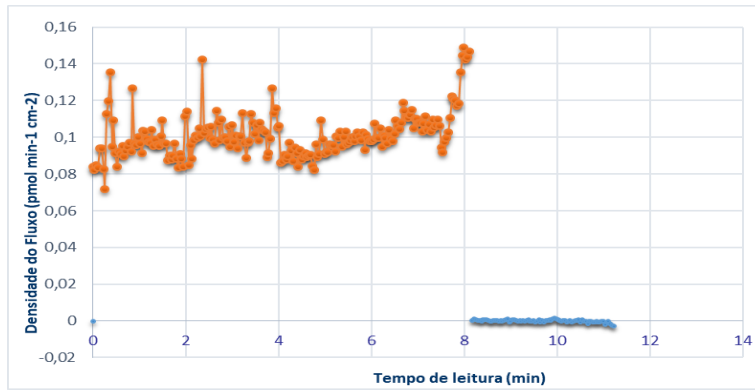
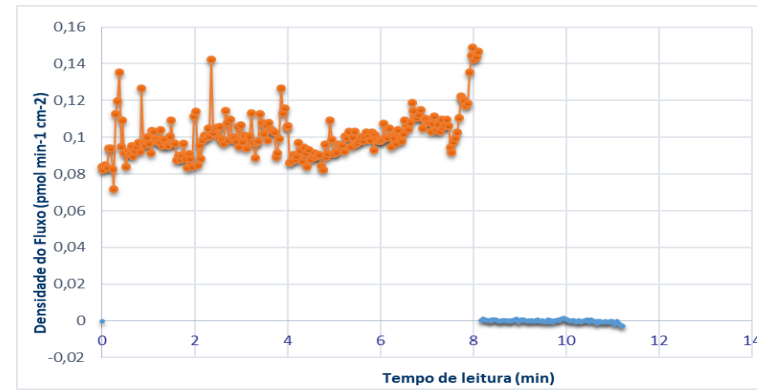


Figura 2D. Gráficos de densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator c/ reciclo externo sem aplicação de campo (CONTROLE –rep. 2) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2h (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e'); 10 h (f e f').

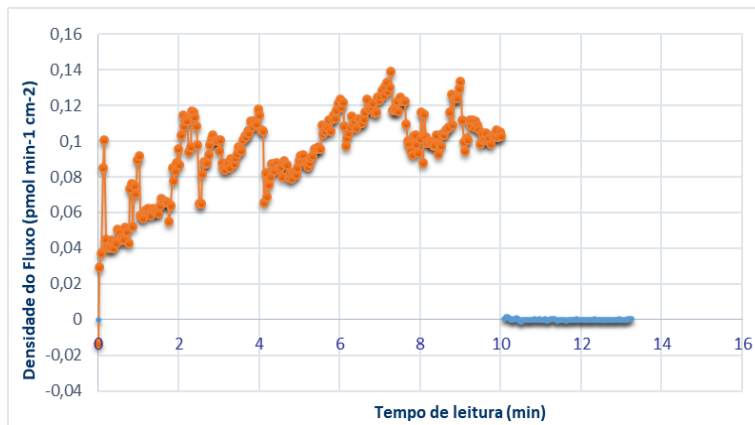
a)



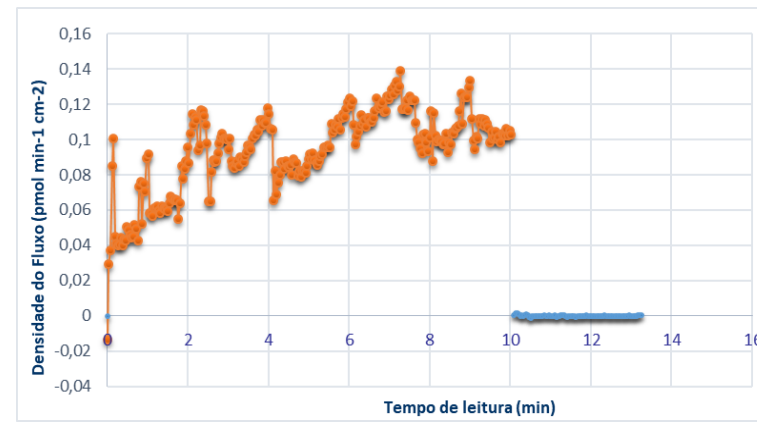
a')



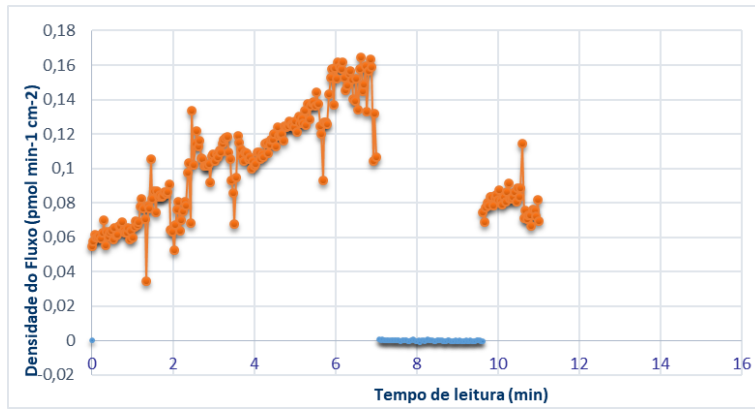
b)



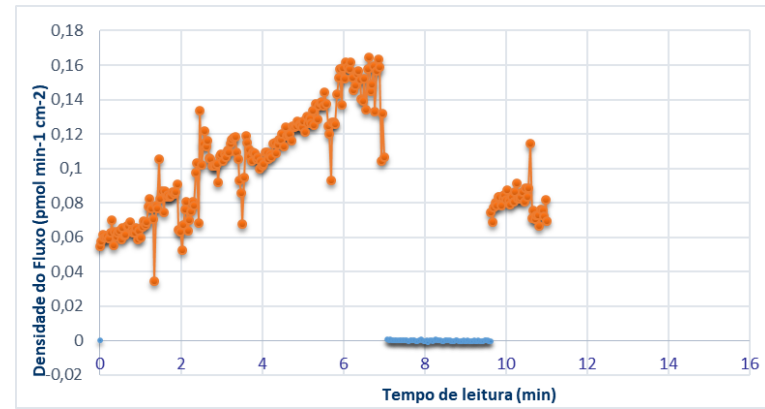
b')



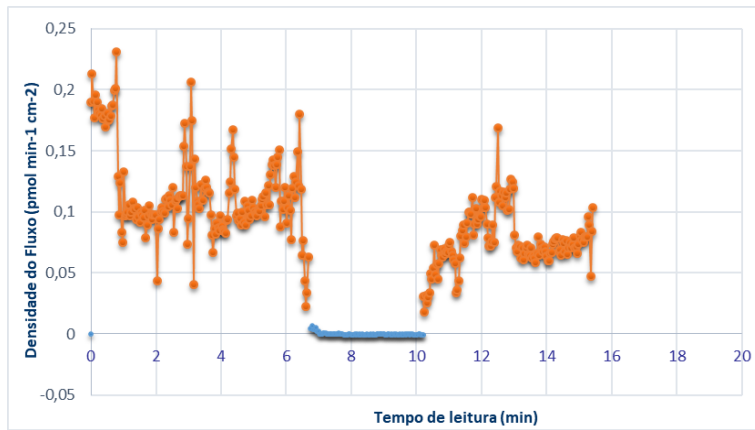
c)



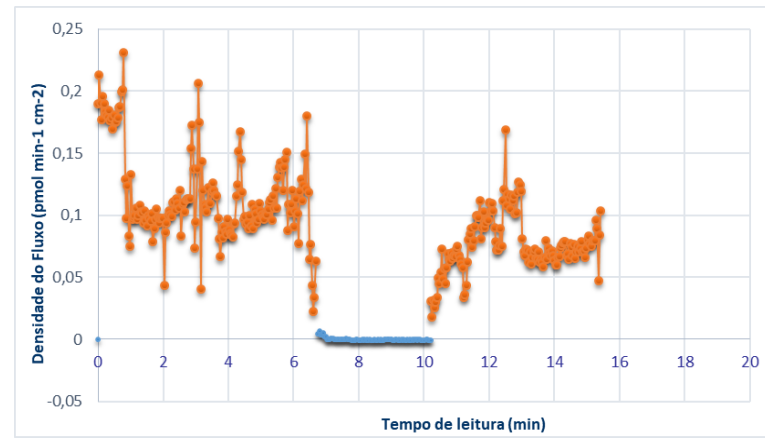
c')



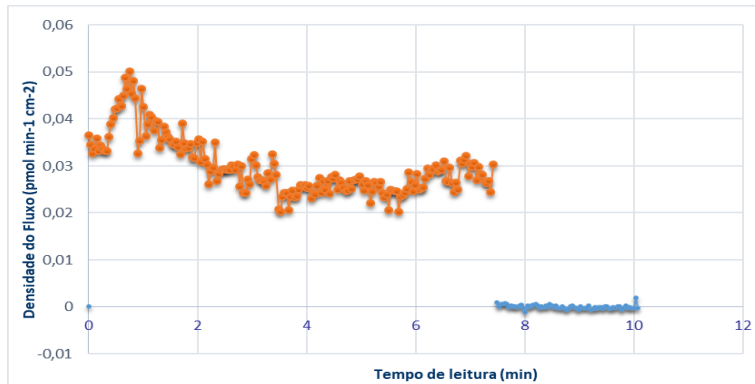
d)



d')



e)



e')

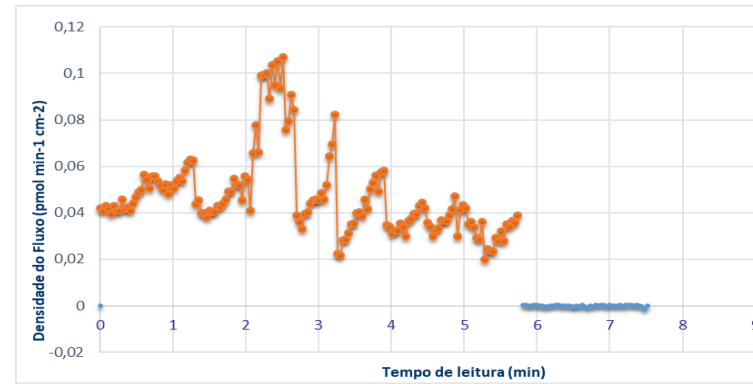
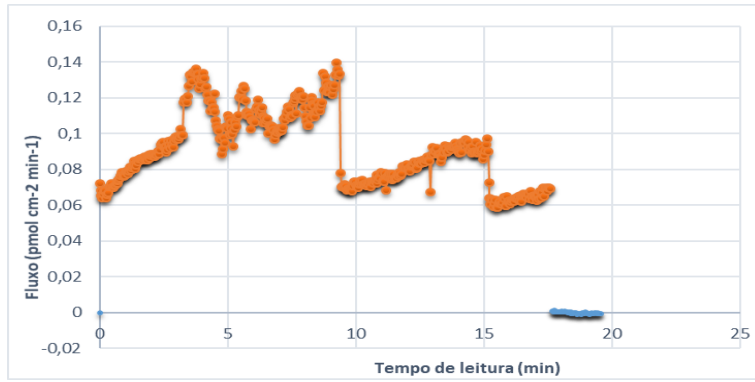
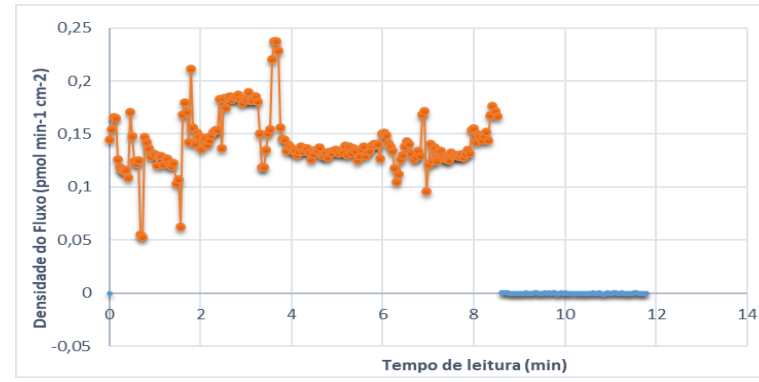


Figura 3D. Gráficos de densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator assistido por campo magnético - axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT e reciclo em espiral (102 mL/mim) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

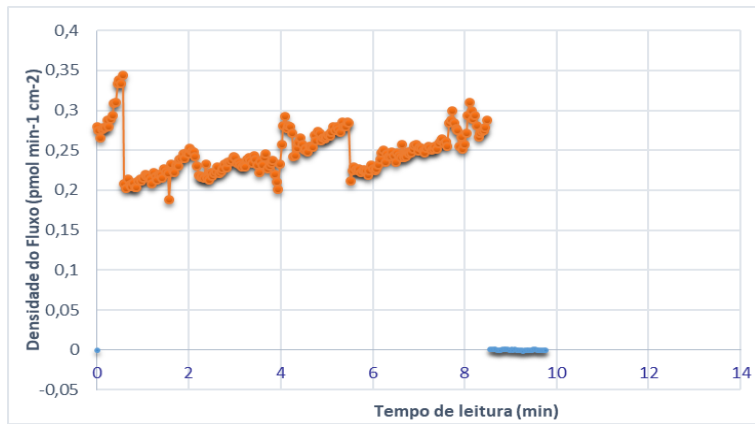
a)



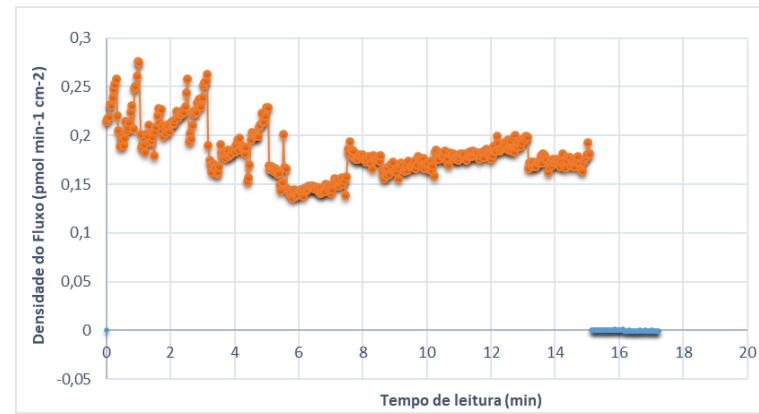
a')



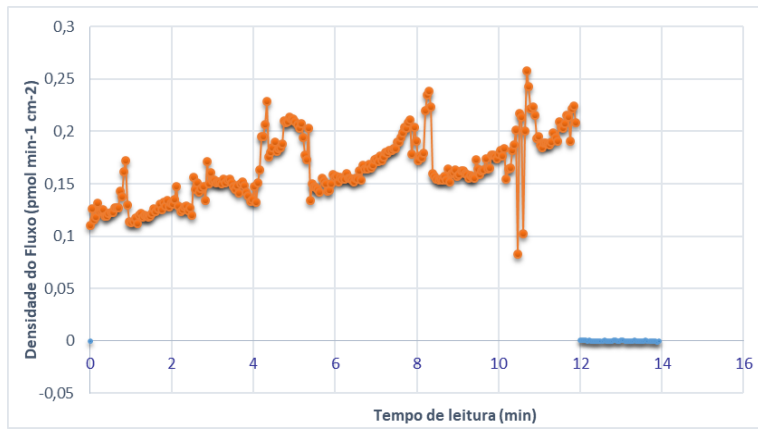
b)



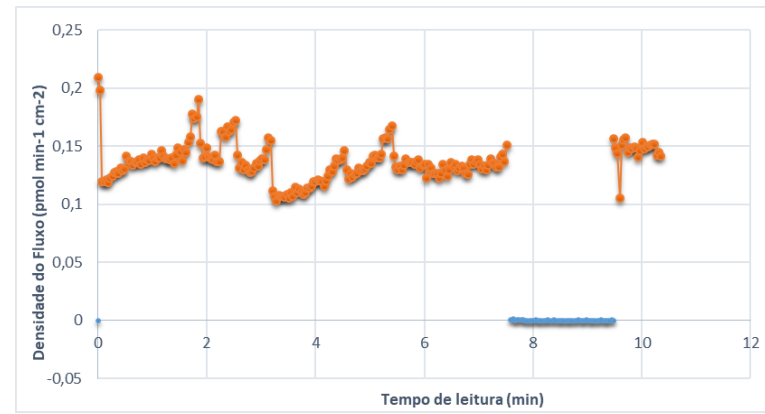
b')



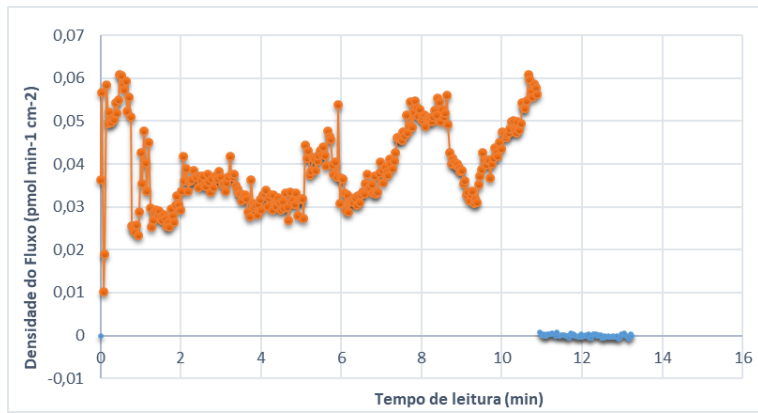
c)



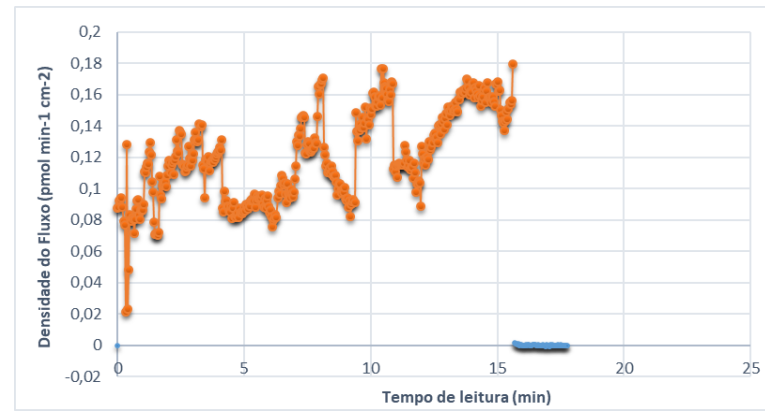
c')



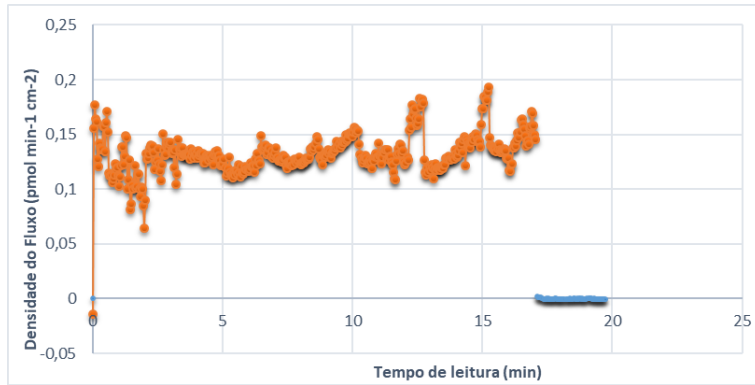
d)



d')



e)



e')

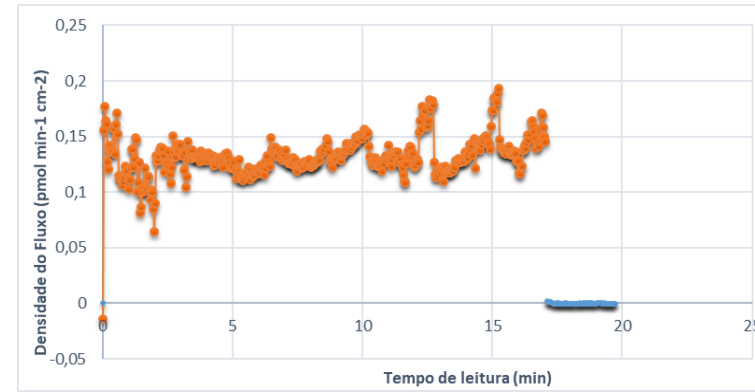
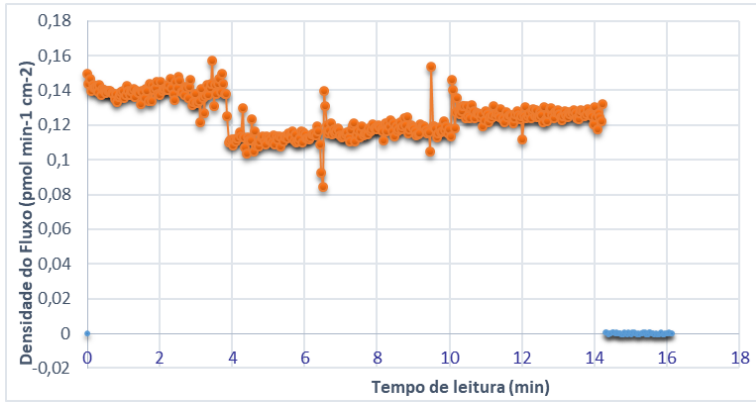
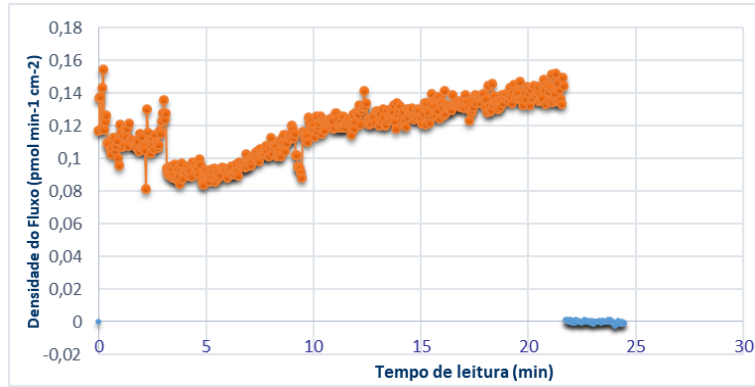


Figura 4D. Gráficos de densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator assistido por campo magnético - axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT e reciclo em U (102 mL/mim) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

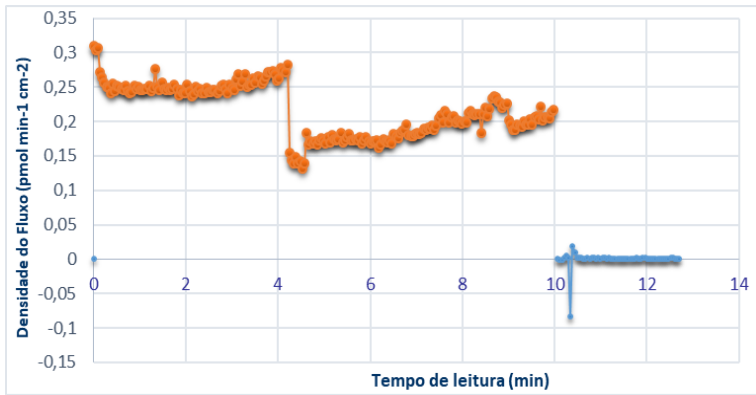
a)



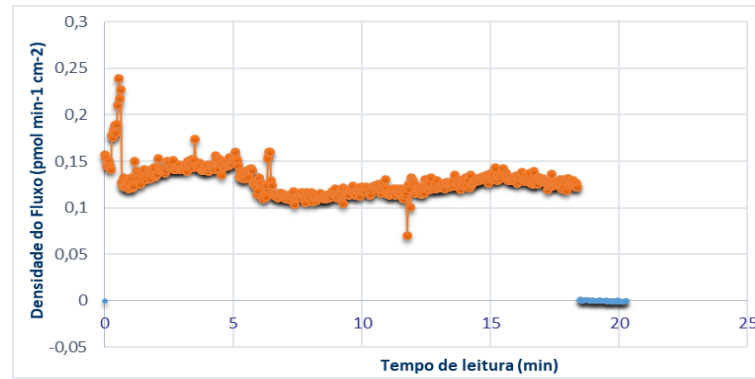
a')



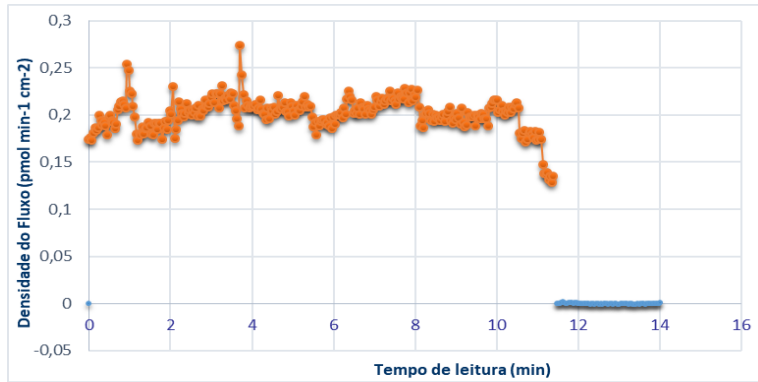
b)



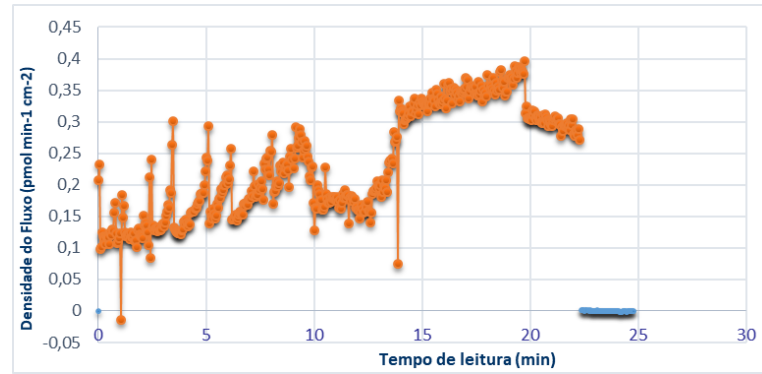
b')



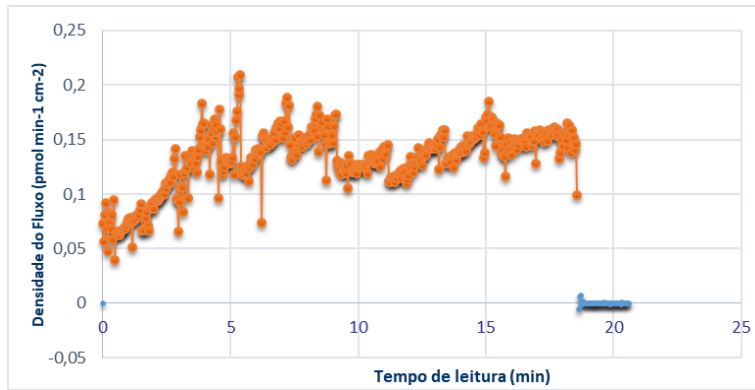
c)



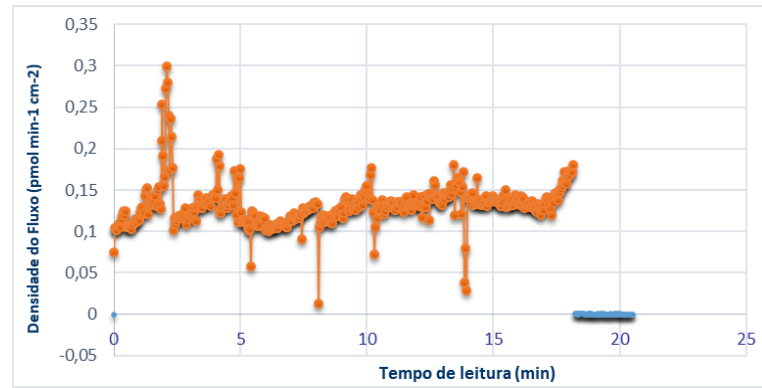
c')



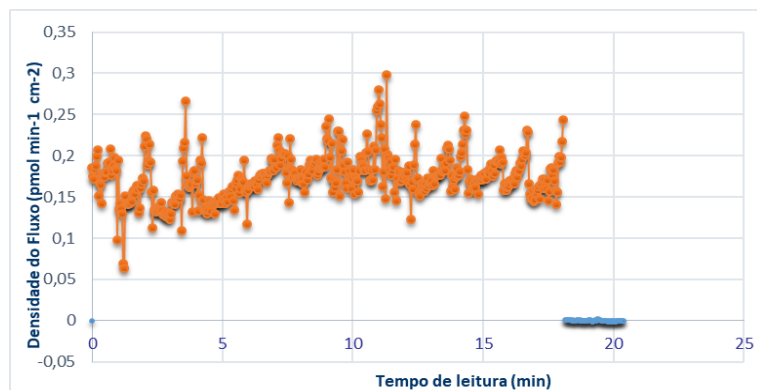
d)



d')



e)



e')

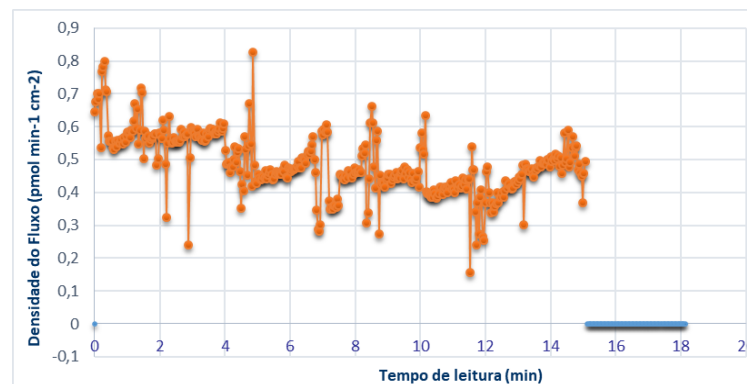


Figura 5D. Gráficos de densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator assistido por campo magnético - axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT e reciclo externo (102 mL/mim) nos tempos de fermentação de: 0h (a e a'); 2 (b e b'); 4 h (c e c'); 6 h (d e d'); 8 h (e e e').

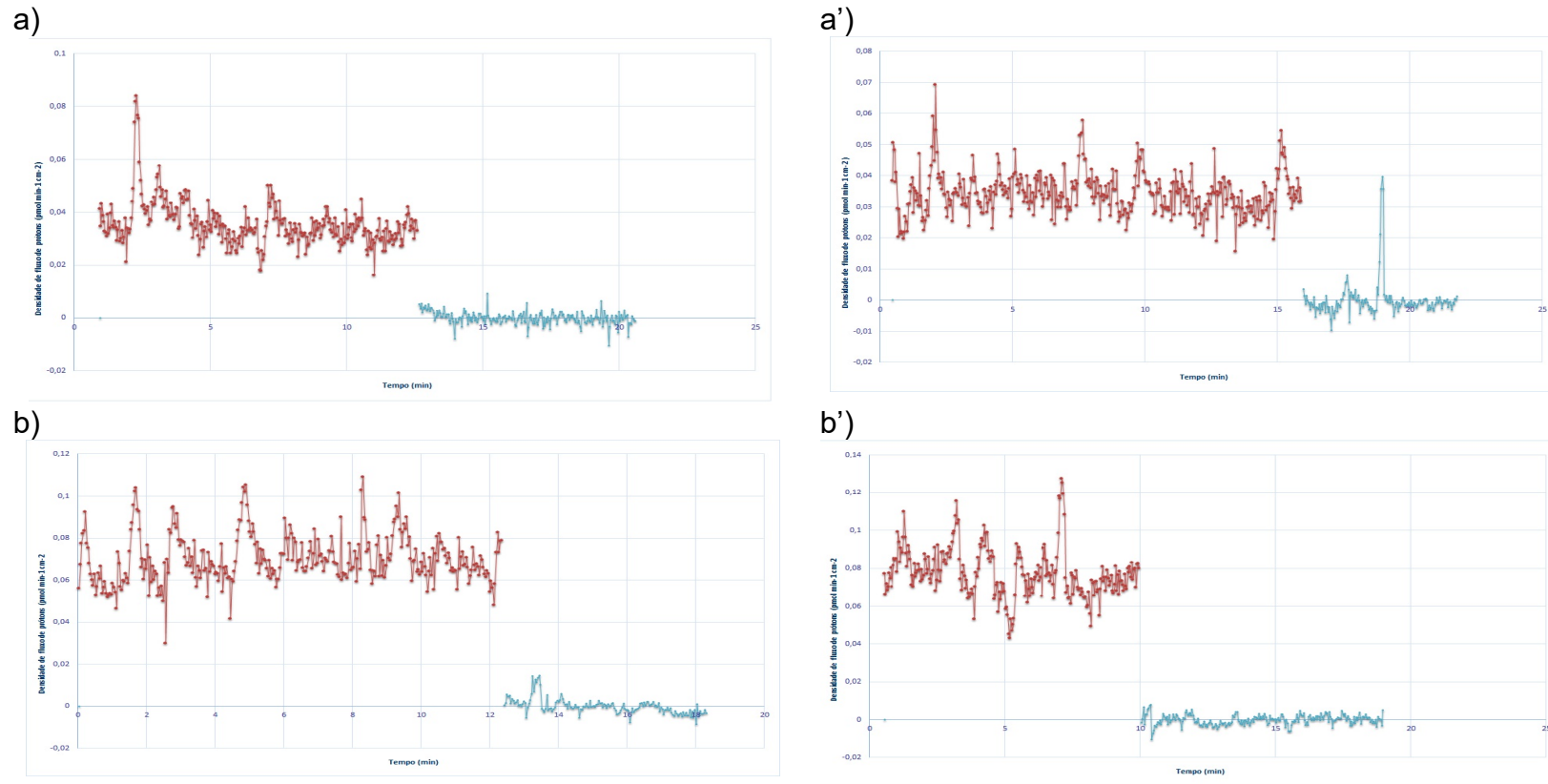


Figura 6D. Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator sem aplicação de campo magnético – Controle e sem reciclo da suspensão, nos tempos de fermentação de: 4h (a e a') e 8h (b e b').

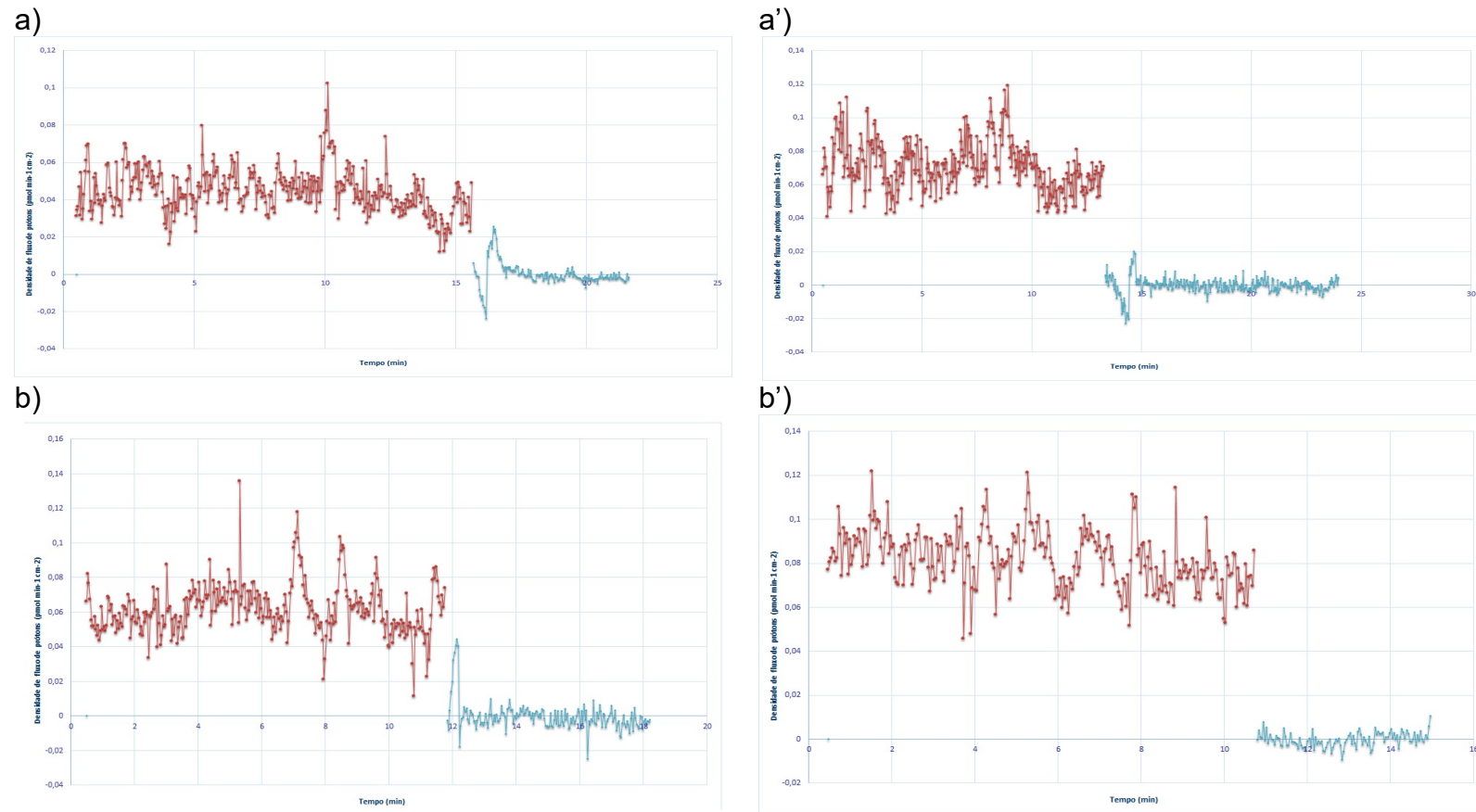


Figura 7D. Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator sem aplicação de campo magnético – Controle (repetição 1) e sem reciclo da suspensão, nos tempos de fermentação de: 4h (a e a') e 8h (b e b').

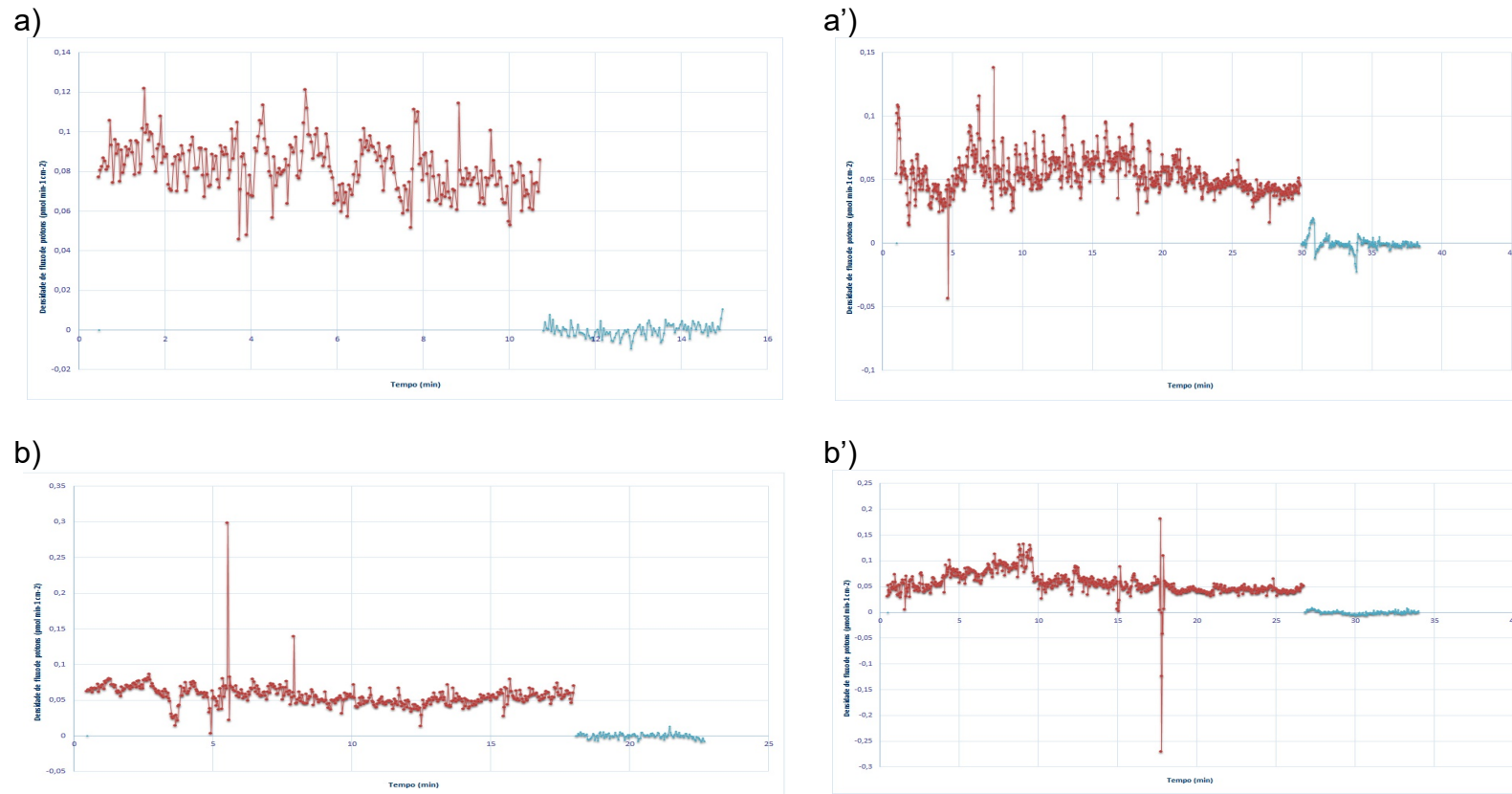


Figura 8D. Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator assistido por campo magnético – axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT e sem reciclo da suspensão nos tempos de fermentação de: 4h (a e a') e 8h (b e b').

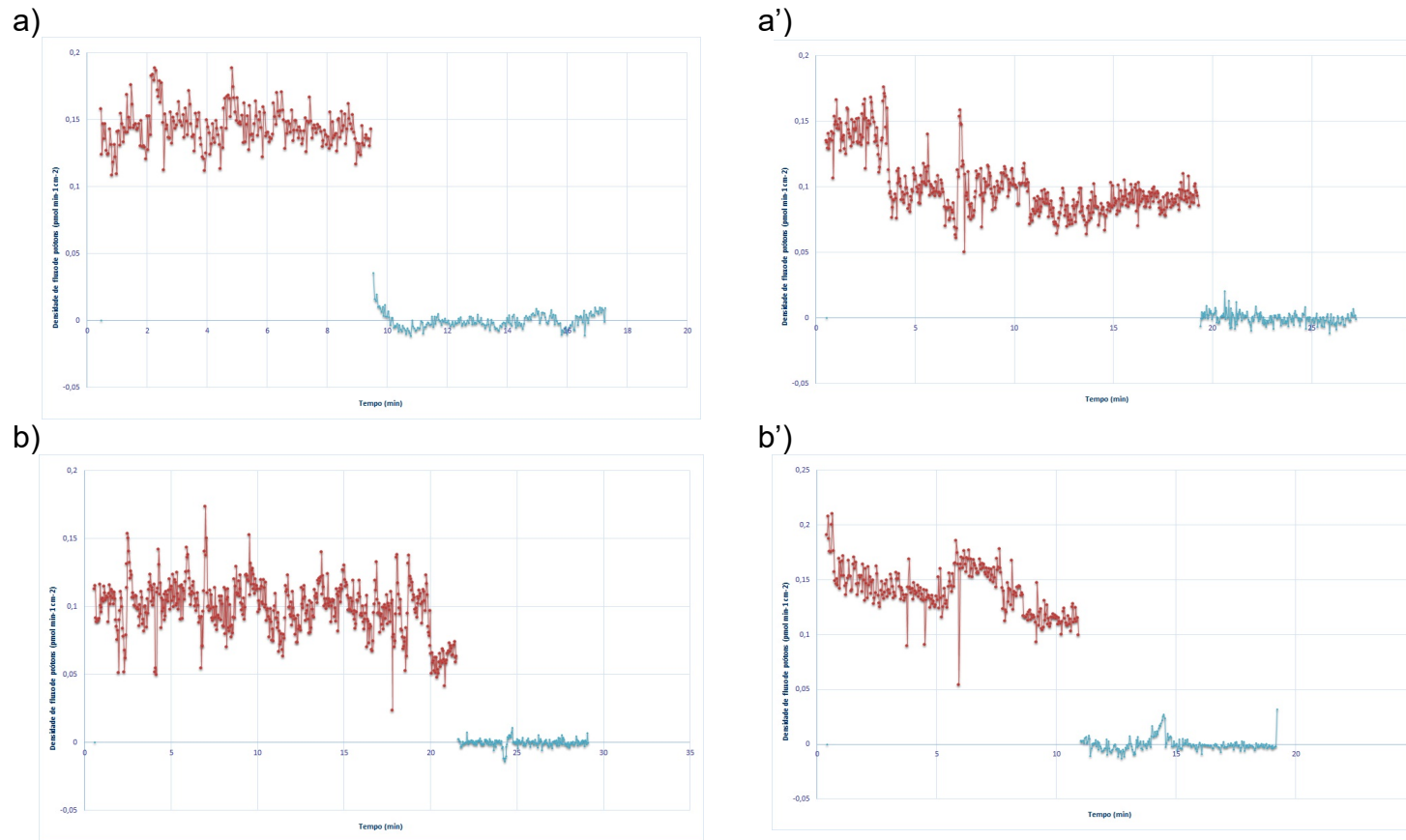


Figura 9D. Gráficos da densidade de fluxo de prótons durante a fermentação no biorreator assistido por campo magnético – axial com densidade de fluxo magnético de 10 mT (repetição 1) e sem reciclo da suspensão nos tempos de fermentação de: 4h (a e a') e 8h (b e b').

APÊNDICE E – Cinética de hidrólise da parede celular

Isolamento de membranas das células da levedura *S. cerevisiae* X2180.

Tabela 1E. Tabela de monitoramento da cinética durante a reação de hidrólise da parede celular de células de *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol. a) Membranas isoladas no fim da fermentação. b) Membranas isoladas na fermentação conduzida por 6h.

a)

Hidrólise da parede celular								
Tempo (min)	Absorvância (600nm)							
	Controle				Campo magnético 10 mT			
	Rep 1	Rep 2	Média	Desvio	Rep 1	Rep 2	Média	Desvio
0	1,45	1,41	1,43	0,02	1,39	1,43	1,41	0,02
10	1,33	1,21	1,27	0,06	1,23	1,24	1,235	0,005
20	1,18	1,09	1,135	0,045	1,03	1,04	1,035	0,005
30	0,98	0,91	0,945	0,035	0,94	0,94	0,94	0
40	0,86	0,83	0,845	0,015	0,85	0,85	0,85	0
50	0,74	0,68	0,71	0,03	0,76	0,79	0,775	0,015

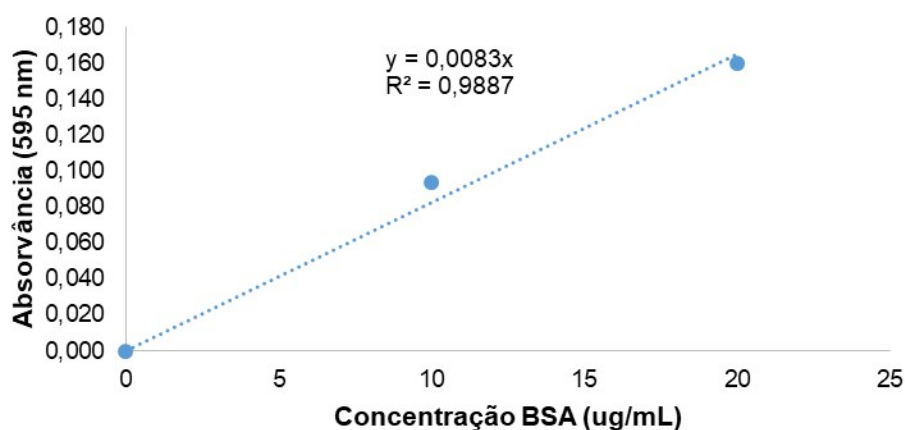
b)

Hidrólise da parede celular (6h de fermentação)								
Tempo (min)	Absorvância (600nm)							
	Controle				Campo magnético 10 mT			
	Rep 1	Rep 2	Média	Desvio	Rep 1	Rep 2	Média	Desvio
0	1,374	1,334	1,354	0,02	1,110	1,292	1,201	0,091
10	1,202	1,165	1,1835	0,0185	1,012	1,092	1,052	0,04
20	1,038	1,031	1,0345	0,0035	0,879	0,912	0,896	0,0165
30	0,987	0,858	0,9225	0,0645	0,754	0,826	0,790	0,036
40	0,854	0,792	0,823	0,031	0,659	0,724	0,692	0,0325
50	0,784	0,74	0,762	0,022	0,599	0,677	0,638	0,039

APÊNDICE F – Dados da dosagem de proteínas

Curva de padrão para dosagem de proteína das membranas isoladas da levedura *S. cerevisiae* X2180 na fermentação para produção de etanol.

a)

**Curva Padrão de Proteína
(Método de Bradford)**

b)

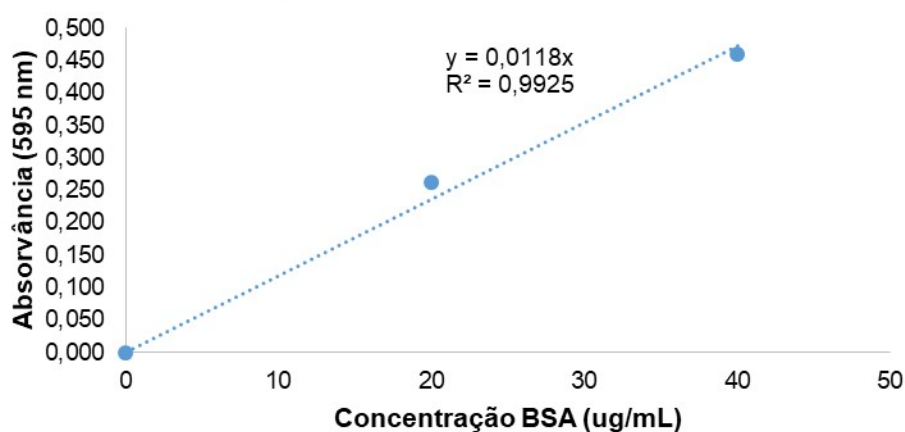
**Curva Padrão de Proteína
(Método de Bradford)**

Figura 1F. Curva de albumina sérica (BSA) pelo método de Bradford (1976). a) Curva utilizada da dosagem de proteína de membranas isoladas no fim da fermentação. b) Curva utilizada na dosagem de proteína de membranas isoladas na fermentação conduzida por 6h.

Tabela 1F. Dosagem de proteína das membranas isoladas das fermentações por *S. cerevisiae* X2180 em biorreator para produção de etanol determinadas pelo método de Bradford (1976). a) Dosagem das fermentações com consumo total do substrato; b) Dosagem das fermentações com consumo parcial do substrato – 6h.

a)

<i>Tratamento</i>	<i>Absorvância (595 nm)</i>			<i>Proteína (µg/mL)</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Média</i>	
Controle 1	0,085	0,097	0,0910	1137,50
Controle 2	0,075	0,079	0,0770	962,50
Campo 1	0,095	0,106	0,1005	1256,25
Campo 2	0,146	0,148	0,1470	1837,50

b)

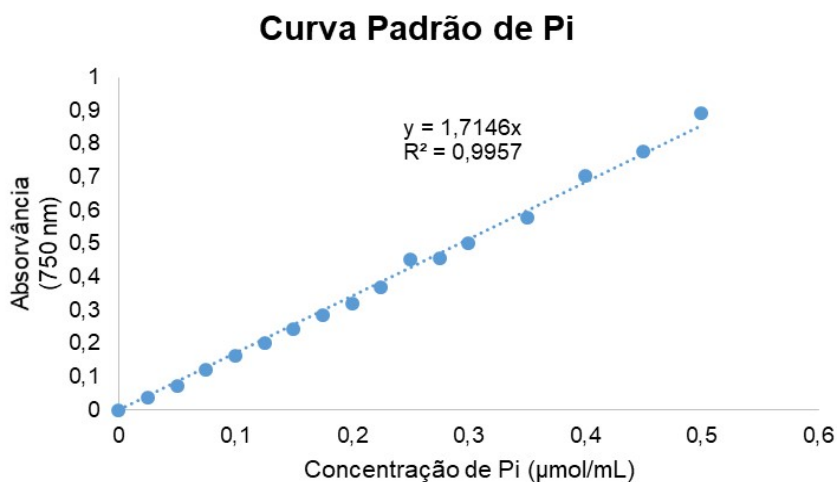
<i>Tratamento</i>	<i>Absorvância (595 nm)</i>			<i>Média</i>	<i>Proteína (µg/mL)</i>
	<i>Rep. 1</i>	<i>Rep. 2</i>	<i>Rep.3</i>		
Controle 1	0,222	0,217	0,244	0,2277	1929,38
Controle 2	0,109	0,149	0,136	0,1313	1112,99
Campo 1	0,308	0,307	0,312	0,309	2618,64
Campo 2	0,306	0,309	0,314	0,3097	2624,29

Obs: a quantidade de proteína foi determinada através das equações da curva padrão no Apêndice F (Figura 1F), onde Y é absorvância média e X a concentração de proteína (µg/mL), vale ressaltar que as amostras foram diluídas 100x.

APÊNDICE G – Curva padrão de fosfato inorgânico

Construção da curva padrão de fosfato inorgânico (Pi) para cálculo da atividade hidrolítica.

a)



b)

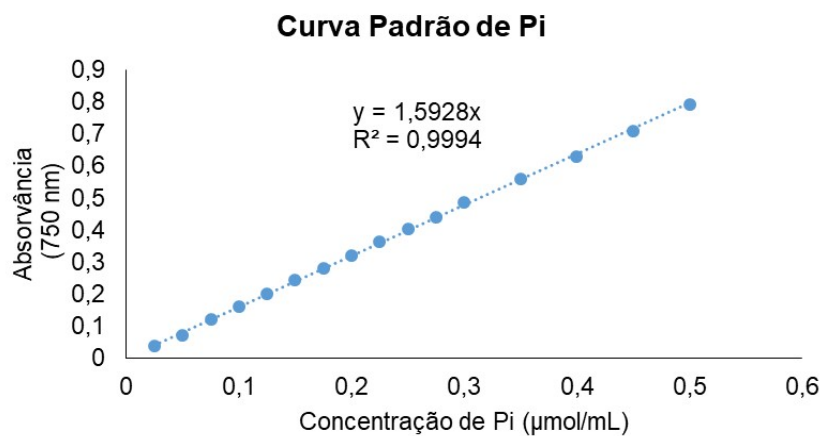


Figura 1G. Curva Padrão de fosfato inorgânico (Pi) para determinação da atividade hidrolítica: a) Fermentações conduzidas até o consumo total do substrato (Tópico 2). b) Curva utilizada na dosagem de proteína de membranas isoladas na fermentação conduzida por 6h (Tópico 3).

APÊNDICE H – Dados da atividade hidrolítica

Dados para determinação da atividade de hidrólise de ATP.

Tabela 1H. Determinação da concentração de Pi das membranas isoladas de leveduras *S. cerevisiae* X2180 após fermentação para produção de etanol.

Tratamento		Abs (750nm)	Pi ($\mu\text{mol/mL}$)	Pi ($\mu\text{mol/L}$)
Controle	Total	0,322	0,188	187,8
		0,394	0,230	229,8
	Vanadato	0,294	0,171	171,5
		0,269	0,157	156,9
		0,248	0,145	144,6
Controle (repetição 1)	Total	0,318	0,185	185,5
		0,303	0,177	176,7
	Vanadato	0,338	0,197	197,1
		0,267	0,156	155,7
		0,200	0,117	116,6
		0,207	0,121	120,7
Fermentação com campo magnético	Total	0,344	0,201	200,6
		0,320	0,187	186,6
	Vanadato	0,341	0,199	198,9
		0,196	0,114	114,3
		0,238	0,139	138,8
Fermentação com campo magnético (repetição 1)	Total	0,285	0,166	166,2
		0,347	0,202	202,4
	Vanadato	0,336	0,196	196,0
		0,254	0,148	148,1
		0,280	0,163	163,3

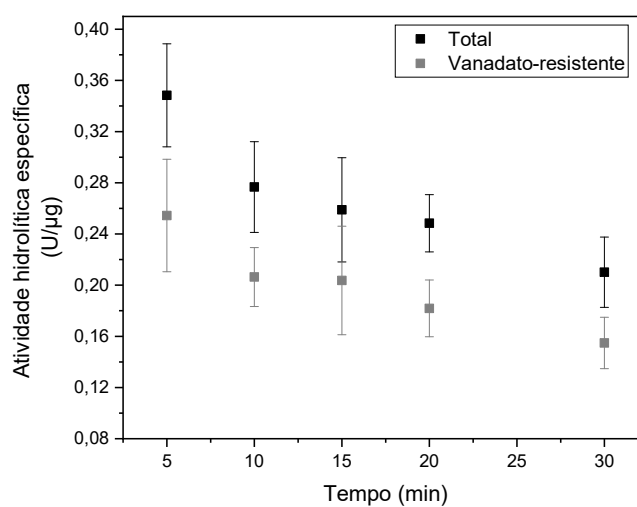
Tabela 2H. Determinação da concentração de P_i das membranas isoladas de leveduras *S. cerevisiae* X2180 após 6h de fermentação para produção de etanol (controle).

Tempo (min)	Medida	(Repetição 1)			(Repetição 2)		
		Abs (750nm)	P_i ($\mu\text{mol/mL}$)	P_i ($\mu\text{mol/L}$)	Abs (750nm)	P_i ($\mu\text{mol/mL}$)	P_i ($\mu\text{mol/L}$)
5 min	Total	0,132	0,083	82,9	0,106	0,067	66,55
		0,155	0,097	97,3	0,103	0,065	64,67
		0,139	0,087	87,3	0,101	0,063	63,41
	Vanadato	0,100	0,063	62,8	0,082	0,051	51,48
		0,096	0,060	60,3	0,075	0,047	47,09
		0,095	0,060	59,6	0,081	0,051	50,85
10 min	Total	0,216	0,136	135,6	0,155	0,097	97,31
		0,216	0,136	135,6	0,168	0,105	105,47
		0,235	0,148	147,5	0,175	0,110	109,87
	Vanadato	0,180	0,113	113,0	0,119	0,075	74,71
		0,167	0,105	104,8	0,122	0,077	76,59
		0,160	0,100	100,5	0,125	0,078	78,48
15 min	Total	0,295	0,185	185,2	0,232	0,146	145,66
		0,314	0,197	197,1	0,233	0,146	146,28
		0,296	0,186	185,8	0,252	0,158	158,21
	Vanadato	0,235	0,148	147,5	0,181	0,114	113,64
		0,218	0,137	136,9	0,206	0,129	129,33
		0,216	0,136	135,6	0,202	0,127	126,82
20 min	Total	0,414	0,260	259,9	0,29	0,182	182,07
		0,406	0,255	254,9	0,283	0,178	177,67
		0,430	0,270	270,0	0,291	0,183	182,70
	Vanadato	0,293	0,184	184,0	0,224	0,141	140,63
		0,302	0,190	189,6	0,209	0,131	131,22
		0,288	0,181	180,8	0,218	0,137	136,87
30 min	Total	0,490	0,308	307,6	0,373	0,234	234,18
		0,507	0,318	318,3	0,374	0,235	234,81
		0,518	0,325	325,2	0,39	0,245	244,85
	Vanadato	0,385	0,242	241,7	0,262	0,164	164,49
		0,364	0,229	228,5	0,297	0,186	186,46
		0,369	0,232	231,7	0,278	0,175	174,54

Tabela 3H. Determinação da concentração de Pi das membranas isoladas de leveduras *S. cerevisiae* X2180 após 6h de fermentação em biorreator assistido por campo magnético de 10 mT para produção de etanol.

Tempo (min)	Medida	(Repetição 1)			(Repetição 2)		
		Abs (750nm)	Pi (umol/mL)	Pi (umol/L)	Abs (750nm)	Pi (umol/mL)	Pi (umol/L)
5 min	Total	0,147	0,092	92,29	0,154	0,097	96,685
		0,138	0,087	86,64	0,167	0,105	104,847
		0,142	0,089	89,15	0,17	0,107	106,730
	Vanadato	0,111	0,070	69,69	0,138	0,087	86,640
		0,109	0,068	68,43	0,141	0,089	88,523
		0,107	0,067	67,18	0,15	0,094	94,174
10 min	Total	0,288	0,181	180,81	0,29	0,182	182,069
		0,276	0,173	173,28	0,291	0,183	182,697
		0,281	0,176	176,42	0,308	0,193	193,370
	Vanadato	0,235	0,148	147,54	0,258	0,162	161,979
		0,239	0,150	150,05	0,243	0,153	152,562
		0,242	0,152	151,93	0,241	0,151	151,306
15 min	Total	0,375	0,235	235,43	0,424	0,266	266,198
		0,389	0,244	244,22	0,436	0,274	273,732
		0,39	0,245	244,85			
	Vanadato	0,346	0,217	217,23	0,374	0,235	234,807
		0,329	0,207	206,55	0,36	0,226	226,017
		0,354	0,222	222,25	0,386	0,242	242,341
20 min	Total	0,447	0,281	280,64	0,488	0,306	306,379
		0,479	0,301	300,73	0,49	0,308	307,634
		0,462	0,290	290,06	0,497	0,312	312,029
	Vanadato	0,385	0,242	241,71	0,436	0,274	273,732
		0,349	0,219	219,11	0,423	0,266	265,570
		0,386	0,242	242,34	0,434	0,272	272,476
30 min	Total	0,521	0,327	327,10	0,619	0,389	388,624
		0,573	0,360	359,74	0,619	0,389	388,624
		0,51	0,320	320,19	0,607	0,381	381,090
	Vanadato	0,441	0,277	276,87	0,547	0,343	343,420
		0,442	0,277	277,50	0,538	0,338	337,770
		0,467	0,293	293,19	0,549	0,345	344,676

a)



b)

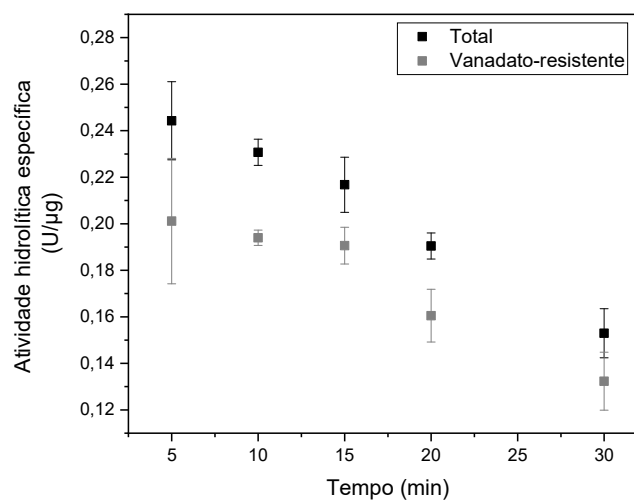


Figura 1H. Cinética de atividade hidrolítica específica (total e vanadato-resistente) de membranas isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 durante a fermentação para produção de etanol: a) sem exposição ao campo - controle; b) exposta ao campo magnético.

Tabela 4H. Atividade hidrolítica específica de membranas isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 após a fermentação para produção de etanol.

Experimento	Atividade hidrolítica específica ($\mu\text{mol Pi/min}$)/ μg Proteína)				
	Total	desvio	vanadato- resistente	desvio	vanadato- sensível
Fermentação controle	0,61	0,28	0,46	0,04	0,14983
Fermentação controle (repetição 1)	0,65	0,02	0,45	0,06	0,19188
Fermentação com campo magnético	0,52	0,00	0,34	0,00	0,18257
Fermentação com campo magnético (repetição 2)	0,34	0,03	0,28	0,00	0,05890

Tabela 5H. Cinética de atividade hidrolítica específica de membranas isoladas de células *S. cerevisiae* X2180 da fermentação para produção de etanol conduzida por 6h. Para o cálculo da velocidade inicial de transporte de H⁺ foram utilizados os dados da cinética de hidrólise no tempo de 5 minutos de reação (*).

Atividade hidrolítica específica ($\mu\text{mol Pi/min}$)/ $\mu\text{g ptn}$)					
FERMENTAÇÃO CONTROLE					
Tempo	Total	desvio	vanadato-resistente	desvio	vanadato-sensível
5	0,31	0,08	0,21	0,02	0,09764*
10	0,24	0,04	0,18	0,03	0,05786
15	0,22	0,02	0,16	0,02	0,05690
20	0,23	0,02	0,16	0,01	0,06636
30	0,18	0,02	0,13	0,01	0,04786
FERMENTAÇÃO CONTROLE (repetição 1)					
5	0,39	0,03	0,30	0,04	0,09025*
10	0,31	0,06	0,23	0,02	0,08273
15	0,30	0,04	0,25	0,05	0,05348
20	0,27	0,01	0,20	0,02	0,06675
30	0,24	0,02	0,17	0,03	0,06268
FERMENTAÇÃO SOB COM CAMPO MAGNÉTICO					
5	0,23	0,02	0,17	0,01	0,05327*
10	0,23	0,01	0,19	0,01	0,03436
15	0,20	0,01	0,18	0,02	0,02220
20	0,18	0,02	0,15	0,03	0,03569
30	0,14	0,03	0,12	0,01	0,02255
FERMENTAÇÃO SOB COM CAMPO MAGNÉTICO (repetição 1)					
5	0,26	0,04	0,23	0,03	0,03297 *
10	0,24	0,02	0,20	0,02	0,03908
15	0,23	0,01	0,20	0,02	0,03013
20	0,20	0,01	0,17	0,01	0,02419
30	0,16	0,01	0,14	0,00	0,01870

APÊNDICE I – Dados da atividade de transporte H⁺Tabela 1I. Determinação da atividade de transporte de H⁺ (total, vanadato-resistente e vanadato-sensível) de células de *S. cerevisiae* X2180 na fermentação para produção de etanol em biorreator.

		<i>V₀</i> – Variação da fluorescência	Atividade de transporte	Atividade de transporte específica	Atividade de transporte específica (vanadato- sensível)
		U= (U.R.F %/mim)	(U)/uL amostra	U/μg	U/μg
Fermentação controle (repetição 1)	Total	79,845	0,99806	0,51740	
	Vanadato- resistente	67,23	0,84038	0,43565	0,08175
Fermentação controle (repetição 2)	Total	91,445	1,14306	1,02701	
	Vanadato- resistente	69,81	0,87263	0,78403	0,24298
Fermentação c/ campo magnético (repetição 1)	Total	179,54	2,24425	0,85691	
	Vanadato- resistente	102,6	1,28250	0,48969	0,36722
Fermentação c/ campo magnético (repetição 2)	Total	186,66	2,33325	0,88920	
	Vanadato- resistente	62,69	0,78363	0,29864	0,59056

APÊNDICE J - Cinética de monitoramento da temperatura das bobinas

Monitoramento cinético da temperatura das bobinas das fermentações assistidas por campo magnético.

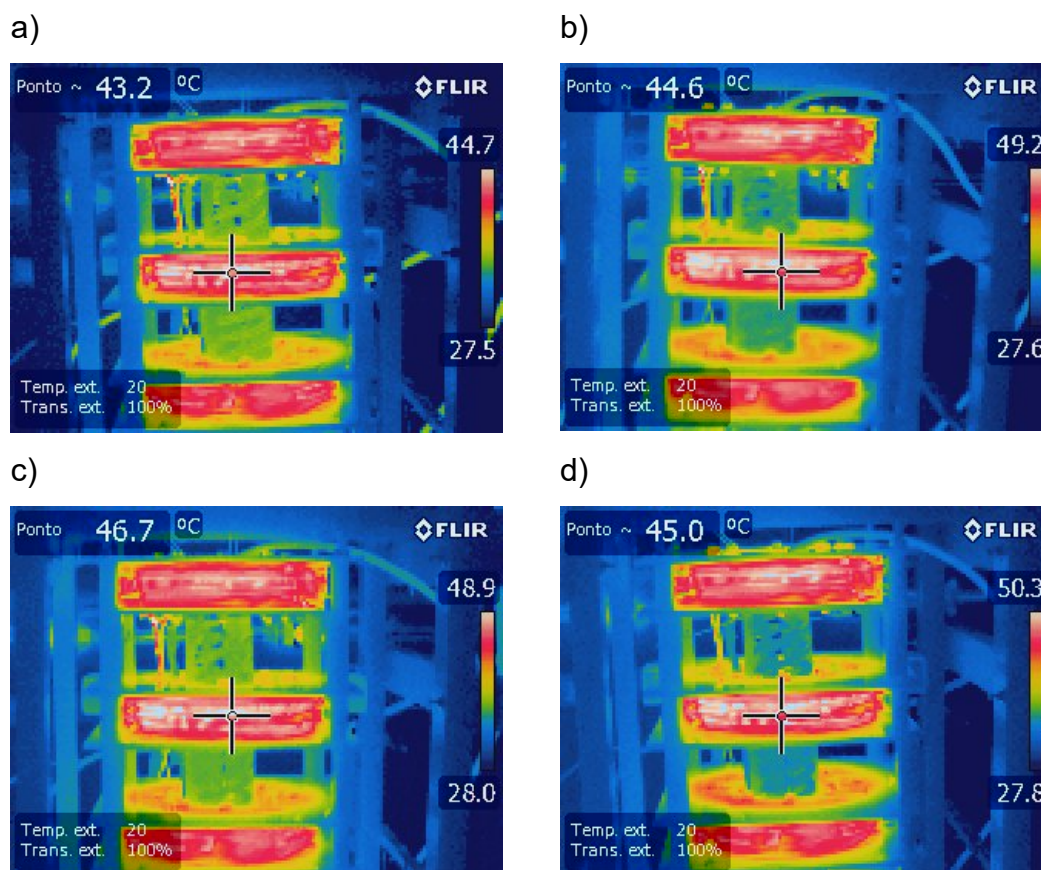


Figura 1J. Monitoramento cinético da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR nas fermentações assistidas por campo magnético – axial utilizando sistema de reciclo em espiral (102 mL/mim) e densidade de fluxo magnético de 10 mT na produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 a 30°C, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

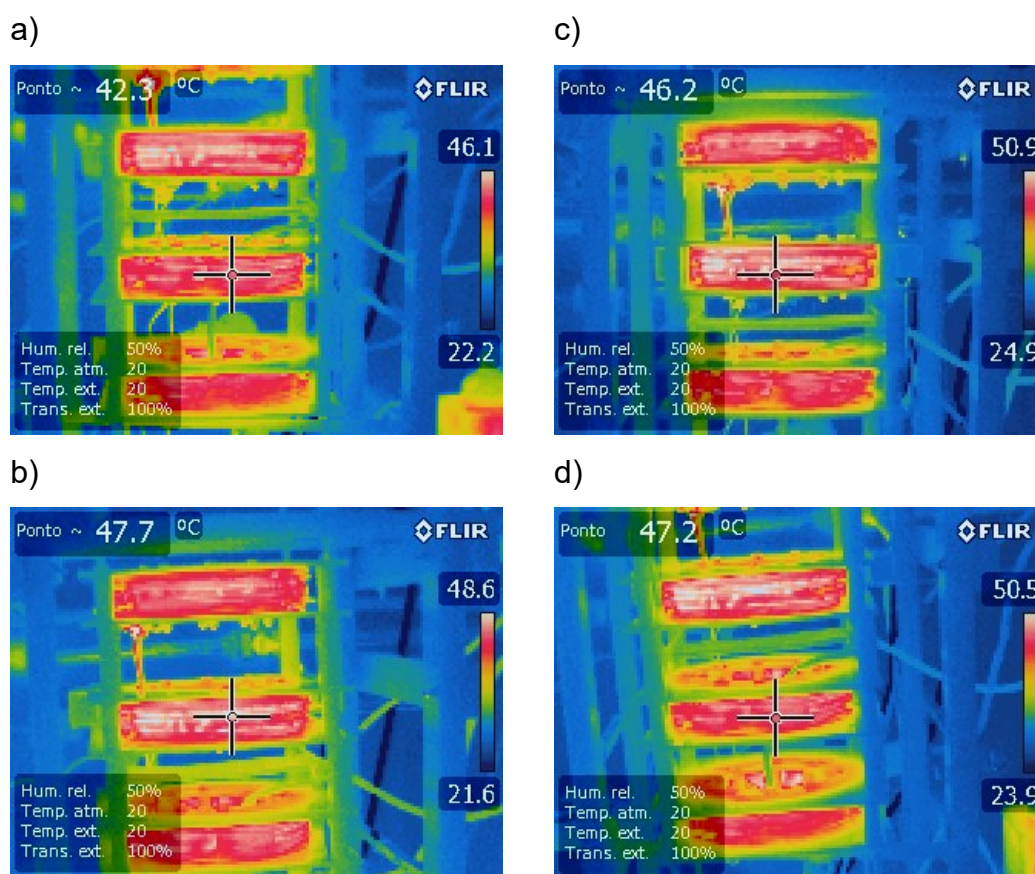
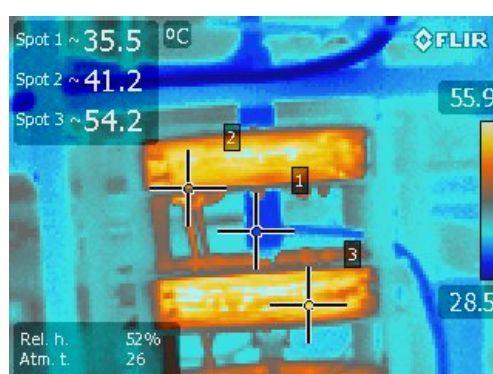


Figura 2J. Monitoramento cinético da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera infravermelha de termovisor modelo E40 FLIR nas fermentações assistidas por campo magnético – axial utilizando sistema de reciclo em U (102 mL/min) e densidade de fluxo magnético de 10 mT na produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 a 30°C, nos tempos de fermentação de: a) 2h, b) 4h, c) 6h e d) 8h.

a)



b)



c)

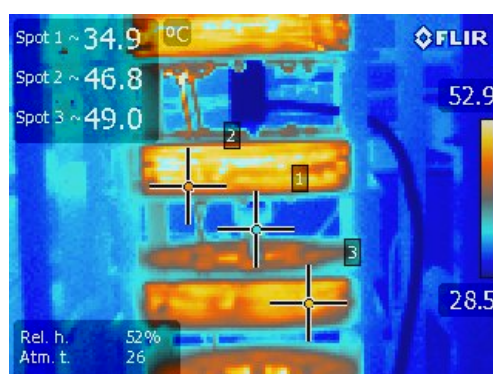


Figura 3J. Monitoramento cinético da temperatura das bobinas e do meio de cultivo utilizando câmera de infravermelho de termovisor modelo E40 FLIR nas fermentações assistidas por campo magnético - axial sem reciclo da suspensão e densidade de fluxo magnético de 10 mT na produção de etanol por *S. cerevisiae* X2180 a 30°C conduzidas até o consumo parcial da glicose (6 h). No tempo de fermentação de: a) 2 h, b) 4 h, c) 6 h.

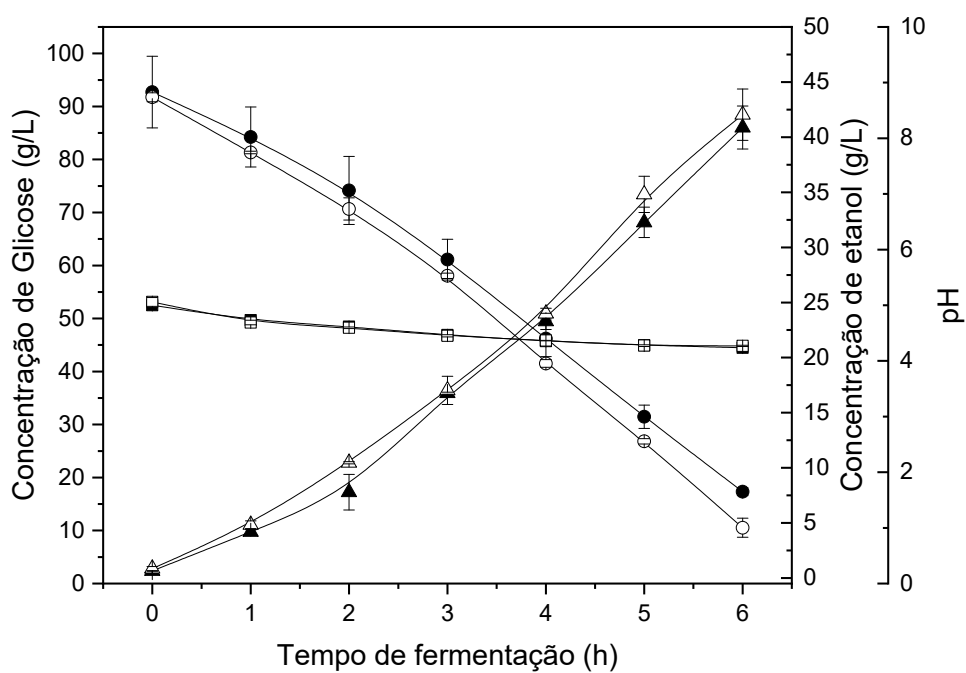


Figura 4J. Cinética de fermentação de *S. cerevisiae* X2180 na produção de etanol em biorreator assistido por campo magnético conduzida por 6h comparado ao controle. Símbolos: ● Concentração de glicose (controle); ▲ Concentração de etanol (controle); ■ pH (controle); ○ Concentração de glicose (campo magnético); △ Concentração de etanol (campo magnético); □ pH (campo magnético).

APÊNDICE K – Artigo publicado

Renewable Energy 169 (2021) 836–842



Contents lists available at ScienceDirect

Renewable Energy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/renene

Increases of bioethanol productivity by *S. cerevisiae* in unconventional bioreactor under ELF-magnetic field: New advances in the biophysical mechanism elucidation on yeasts

Cristilane M. de Andrade ^{a,1}, Antonio J.D. Cogo ^{b,1}, Victor Haber Perez ^{a,*},
Nathalia F. dos Santos ^a, Anna Lvovna Okorokova-Façanha ^b, Oselys Rodriguez Justo ^c,
Arnoldo Rocha Façanha ^b

^a Center of Science and Agropecuary Technologies, State University of Northern of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Bioscience and Biotechnology Center, State University of Northern of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Estácio de Sá University, Campos Dos Goytacazes, RJ, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 October 2020
Received in revised form
17 December 2020
Accepted 12 January 2021
Available online 16 January 2021

Keywords:
S. cerevisiae
Bioethanol
Unconventional bioreactor
Magnetic field
H⁺ efflux
P-type H⁺-ATPase

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the bioethanol productivity in an unconventional bioreactor assisted by extremely low frequency (ELF) - electromagnetic field and elucidate the biophysical mechanism of action by which ELF magnetic fields improve the bioethanol production by *S. cerevisiae*. Fermentations were carried out under axial field lines at 10 mT magnetic flux density (*B*), using three different recycling arrangements (spiral-shape tube, u-shape tube and whole bioreactor) in a closed loop. Fermentation kinetics were monitored by cell growth, substrate consumption, ethanol and by-product formation. In addition, electrophysiological measurements of the H⁺ ion fluxes were carried out in yeast cells sampled at different fermentation stages. ELF magnetic fields increased the glucose uptake, bioethanol production and H⁺ efflux, shortening in 2 h the fermentation time. The greatest effects of the ELF magnetic fields were obtained in the whole bioreactor arrangement, reaching an average increase of 33% in the bioethanol production. The results are consistent with a stimulatory effect of ELF magnetic fields on the plasma membrane H⁺-ATPase activity, as indicated by the specific increase of the vanadate-sensitive component of the yeast cells H⁺ efflux, providing a new biophysical mechanism of action for the biological effect of magnetic fields.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, there has been an intense research activity in the development of unconventional production processes for biofuels using magnetic catalyst particles containing immobilized enzymes and whole cells, or even free cells in bioreactors assisted by magnetic fields for biodiesel [1–3], biomethane [4–6] and bioethanol [7–10].

Bioethanol is the most widely used biofuel in the world with a global production of 114 billion litres in 2019 [11], for which the

production by fermentation is a well-established technology, however there is still demand for the development of unconventional processes that result in innovative improvements in first generation ethanol production and aiming also to leverage the production of second-generation biofuels. In the present work a mechanistic study is carried out, investigating the possible target of ELF magnetic fields in yeast cells, that may account for the stimulatory effects of magnetic-induced fermentation processes.

Fermentations assisted by magnetic fields for bioethanol production has increasingly attracted the attention of the scientific community as a promising unconventional technique, especially after the first reports on the positive effects of magnetic fields in bioethanol production [12–19]. More recently, our research group have developed empirical mathematical models for the magnetic-induced bioethanol production to better describe the phenomenological behavior of this unconventional bioprocess [20].

* Corresponding author. State University of Northern of Rio de Janeiro (UENF), (CCTA/ LTA - Processes Engineering Sector), Av Alberto Lamego 2000, Pq California, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

E-mail address: victorh@uenf.br (V.H. Perez).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.01.074>

0960-1481/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Several aspects related to the *S. cerevisiae* free-cell proliferation and fermentation under magnetic fields, including some biophysical considerations, have also been reviewed [21,22]. However, despite these and other advances, the issue remains controversial in the literature, with some conflicting data probably resulting from the diversity of strains used, differences among the experimental systems and due to also the wide range of magnetic field intensity and/or magnetic flux density values experimentally evaluated.

Thus, to solve this issue as well as towards the adaptation of this unconventional technology to the industrial scale, a first challenge will be to understand the biophysical basis of the magnetic field interactions with living cells. Such a knowledge would also help in analyzing and comparing the performances of different designs of bioreactors assisted by magnetic fields and their scale up. Once established a clear mechanism of action and the main cellular and molecular targets, a wider array of cell types could be analyzed to reveal and evaluate the magnetic field environmental impact and technical-economic balances necessary to discriminate the real potential of this technology.

Herein, the fermentation kinetics of bioethanol production under extremely low frequency (ELF) magnetic field was studied, in order to explore the biophysical and molecular basis of the metabolic changes observed in the yeast cell. A role for the P-type H^+ -ATPase is proposed, as a primary active transport system magnetogenic over-activated in the yeast cell membrane, generating the electrochemical H^+ gradient responsible for energizing most of the nutrients uptake required to supply higher fermentation rates.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain X2180 (*MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1*) was routinely maintained at 30 °C on solid YPD medium (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose and 2% agar).

Yeast extract, peptone (for microbiology grade) and glucose ($\geq 99.5\%$) used in microbial growth medium and Ethanol ($\geq 99.9\%$) and sodium orthovanadate (99.98%) used as standard and chemical, respectively, were purchased from Merck.

2.2. Fermentation for bioethanol production

The fermentation was performed using a culture medium containing yeast extract (10 g/L), peptone (20 g/L) and glucose (65 g/L) which was inoculated with 20 wt%/v biomass (75% moisture content, wet basis) aseptically weighed with respect to the volume of the total medium. Fermentations were carried out in a glass column fermenter with a working volume of 300 mL under anaerobic conditions at 30 °C.

2.2.1. Bioreactor assisted by ELF magnetic field

Experiments were performed in a bioreactor prototype assisted by extremely low frequency (ELF) magnetic field. The bioreactor was basically formed by glass column with jacket for temperature control of the culture medium and height/diameter (H/D) ratio = 250/14 mm [1]. The cellular suspension was subjected under axial magnetic field at 10 mT using three different recycling arrangements as previously described [23]. Briefly, a) recycling the cellular suspensions through a spiral-shaped tube, external to the fermenter with a magnetic field parallel to the coil axis; b) recycling the cellular suspensions through a U-shaped tube system with a magnetic field parallel to coil axis; and c) fermentation carried out in a fermenter entirely encircled by the magnetic field, i.e., the vessel was placed inside the coils with also external recirculation of

the cellular suspensions. The coils were energized by DC current and during magnetic field application an on/off scheme was adopted at intervals of 1h during fermentation. The measurements of magnetic flux density (B) were performed using a digital gaussmeter (model 5180, F.W. BELL, USA). The control experiment was carried out in the absence of magnetic fields for comparative purpose.

2.2.2. Monitoring fermentation kinetics

Glucose consumption, ethanol and glycerol production were monitored by HPLC (YL9100 HPLC System, YL Instruments Co., Ltd., Korea) equipped with Refractive Index detector and a Rezex RCM-Monosaccharide Ca^{2+} column (8%) at 60 °C, using ultra-pure water as the mobile phase with a flow of 0.7 mL/min. The cell growth was determined using a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, USA) by optical density at 600 nm, diluting conveniently the samples as suggested by the Beer-Lambert-Bouguer law. The pH of the medium was monitored using a pH-meter (BEL Engineering, Model W3B, Italy).

2.3. Extracellular proton fluxes determination

Proton fluxes across cellular membrane were measured at cell surface using the non-invasive Scanning Ion Selective Electrode Technique (SIET) as described previously [24,25]. Briefly, the microelectrode used for H^+ flux consisted of in a column back-filled firstly with electrolyte (15 mmol/L of KCl and 40 mmol/L KH_2PO_4 , pH 6.0) and front-loaded with H^+ selective cocktail (Sigma-Aldrich, hydrogen ionophore I, Cocktail B, Cat. no. 95293). Aliquots of cells withdrawn during fermentation at several interval of time were immediately centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min and immobilized on the agar matrix inside of measuring chamber. Vibrating electrodes were positioned near the cells surface and the net H^+ fluxes were measured for 10–15 min over an excursion distance of 15 μm as voltage differences (μV). For P-type H^+ -ATPase measurements, 1 mmol/L of sodium orthovanadate (Na_3VO_4 ; a P-type H^+ -ATPase inhibitor) at pH 7.2 was added to the medium and pre-incubated for 5 min prior to analysis. Vanadate-sensitive H^+ effluxes were calculated as the difference between the H^+ fluxes obtained from untreated and vanadate pre-treated cells.

3. Results and discussion

Standard fermentation was carried out without exposure to magnetic fields (control process), exhibiting typical profiles for the kinetics of sugar consumption, pH variation, formation of by-products (glycerol) and bioethanol production (Fig. 1).

Thus, glucose with an initial concentration of 65 g/L was practically depleted over 10 h of fermentation resulting in 30.92 g of ethanol/L of prepared culture medium, i.e., reaching a final yield of 47.6% in relation to the theoretical value of 51.11% stoichiometrically estimated, a result that can be considered satisfactory for this laboratory yeast strain. The *S. cerevisiae* X-2180 is a wild-type strain and not an industrial one selected for high performances in ethanol production, which is well characterized at the biochemical and molecular levels, and thus, useful to enzyme and electrophysiological studies on bench scale.

Fermentations were performed under ELF magnetic fields to evaluate the effects on the bioethanol production, imposing axial field lines at 10 mT in three versatile experimental systems (Figs. 2–4), a spiral-shape tube (Fig. 2a), a U-shape tube (Fig. 3a) and a whole bioreactor arrangement (Fig. 4a). In all cases, the ELF magnetic field accelerates the glucose consumption improving the bioethanol production. The best results were obtained with the whole bioreactor exposure to the magnetic field, reducing the

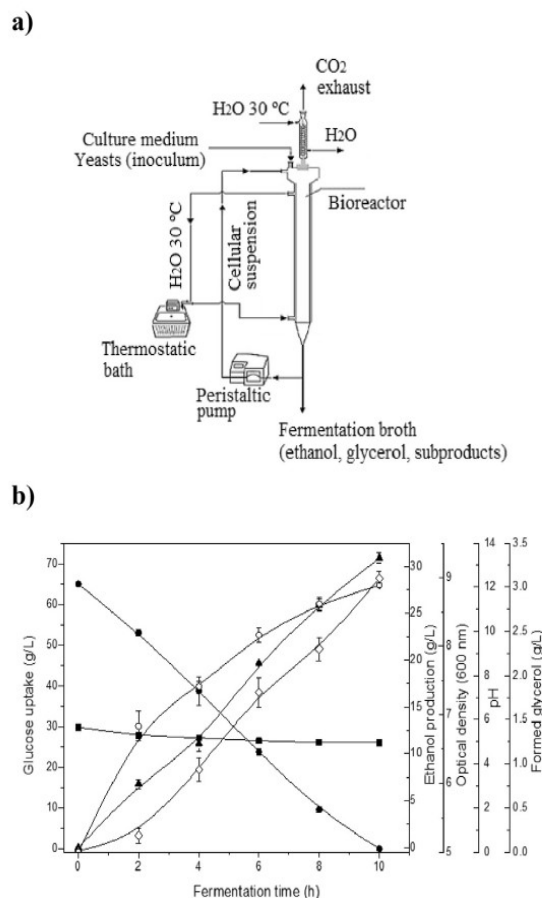


Fig. 1. Experimental setup (a) and fermentation kinetics (b) for control experiment (in the absence of ELF magnetic field) during alcoholic fermentation by *S. cerevisiae* X2180. Ethanol productivity: 3.09 g/Lh. Symbols: ● Glucose uptake (g/L); ▲ Ethanol production (g/L); ◇ Optical density (600 nm); ■ pH; ○ Formed glycerol (g/L).

fermentation time in 2h and reaching average increase of about 33% in the ethanol productivity (Fig. 4b).

These results are in agreement with previous studies [8,9], confirming that low frequency and intensity magnetic fields can exert positive effects on ethanol production by yeasts under anaerobic conditions, helping to resolve the controversy that arose from studies that questioned the existence of this effect [26,27].

Moreover, magnetic fields-related biological effects have also been reported by many others [12–19], although the results are essentially restricted to changes in cell growth, media pH variations, and increases in substrate consumption and ethanol productivity. In most cases, the phenomena are discussed mostly based only on changes in cell membrane permeability and/or undetermined modulations of cellular metabolism. More detailed investigations have recently been reported on bacteria exposed to magnetic fields [28], providing evidence for a role of the cell wall integrating a magnetoporation effect. The proposed increased mass concentration gradient generated at the cell wall surface could also contribute to the mass transfer driving force in yeast cell wall during the fermentation process assisted by magnetic fields. Nevertheless, the biochemical and molecular key elements that integrate the phenomena at the cell membrane level, remains largely elusive.

Glucose uptake by *S. cerevisiae* occurs by facilitated diffusion

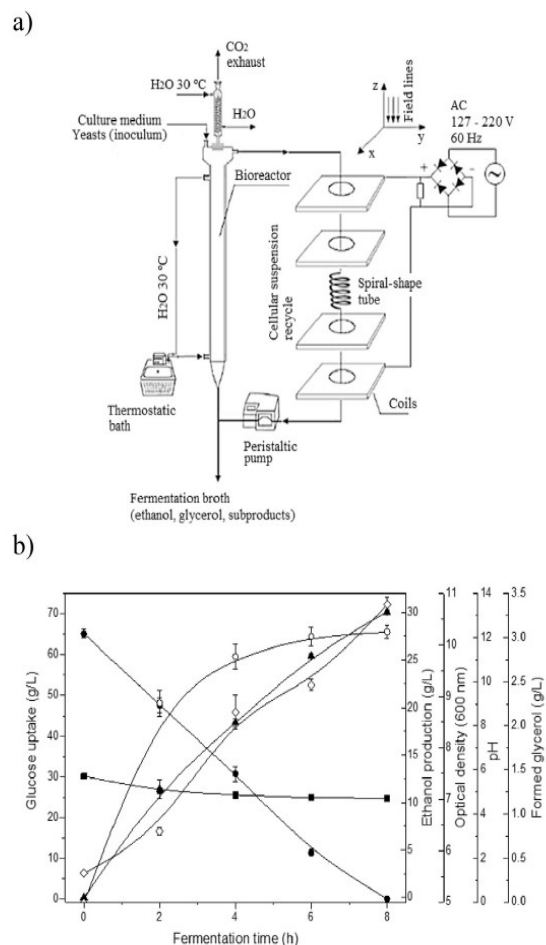


Fig. 2. Experimental setup (a) and fermentation kinetics (b) by *S. cerevisiae* X2180 in bioreactor assisted by ELF magnetic field at 10 mT, using Spiral-shape tube as treatment system. Ethanol productivity: 3.756 g/Lh. Symbols: ● Glucose uptake (g/L); ▲ Ethanol production (g/L); ◇ Optical density (600 nm); ■ pH; ○ Formed glycerol (g/L).

mediated by Hxt sugar transporters and does not require metabolic energy since the driving force for solute translocation is provided exclusively by the high concentration gradient of sugar over the cell membrane [29]. On the other hand, intracellular accumulation of other hexoses and disaccharides must be accomplished by coupling the uptake of a sugar molecule to the uptake of one or more H^+ ions via symporters also driven by the proton electrochemical gradient [29]. Furthermore, beyond the sugars uptake and glycolytic rates, the bioethanol production yield depends on the yeast cell nutritional balance during the fermentation process, which in turn depends on the maintenance of high levels of activation of the ion transport systems at the cell membrane [30].

In previous studies, we have postulated that electromagnetic fields can generate a potential difference in cell suspension culture media, inducing charge fluxes by capacitive effect, i.e., by the establishing non-uniform electric fields and induction currents in the fermentation medium [9]. As these eddy currents could alter the resting potentials in cells, the H^+ fluxes were evaluated electrophysiologically in yeast cells sampled from the bioreactor (Fig. 5) and the P-type H^+ -ATPase contribution was estimated by Na_3VO_4 (a P-type H^+ -ATPase specific inhibitor), since this proton pump generates and controls the electrochemical H^+ gradient generated

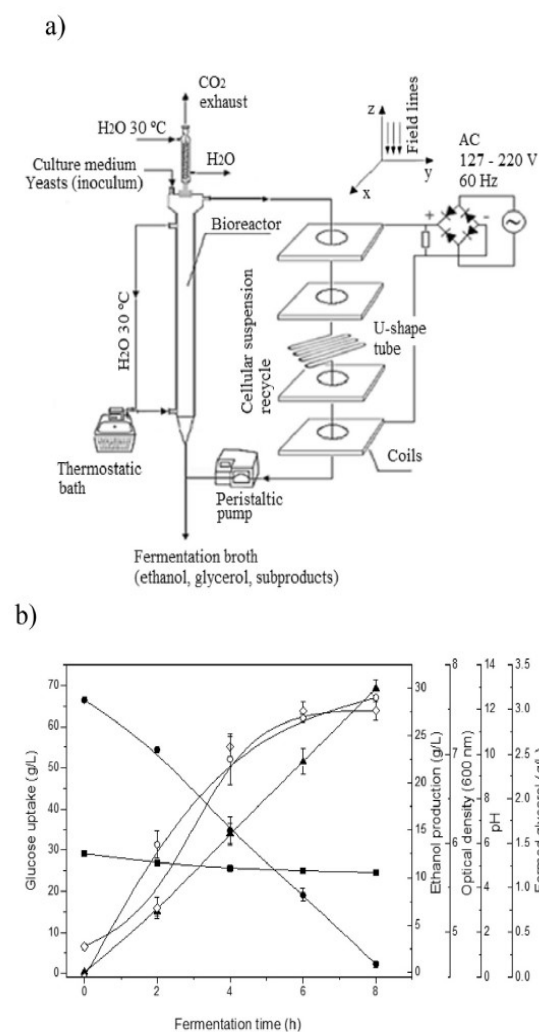


Fig. 3. Experimental setup and fermentation kinetics by *S. cerevisiae* X2180 in bioreactor assisted by ELF magnetic field at 10 mT, using U-shape tube as treatment system. Ethanol productivity: 3.751 g/Lh. Symbols: ● Glucose uptake (g/L); ▲ Ethanol production (g/L); ◇ Optical density (600 nm); ■ pH; ○ Formed glycerol (g/L).

across the cell membrane. Our data provide compelling evidence for an enhanced H^+ efflux driven by the P-type H^+ -ATPase, as a main component overactivated by the ELF magnetic field.

Despite a clear tendency of stimulatory effect found for all tested reactor arrangements (Fig. 5A), the most significant effects were related to the magnetic field imposed to the whole bioreactor, exhibiting about 2.5-folds higher vanadate-sensitive H^+ effluxes with respect to control experiment, at the same condition that most improved the bioethanol productivity. In fact, in Fig. 5A, different letters indicate statistically significant differences according to ANOVA and Tukey's test for confidence level of 95% ($p \leq 0.05$). Also, at this condition, fermentative yeasts need to take up and metabolize increasing amounts of amino acids and other nutrients to produce, in less time, more ethanol [30]. In addition, the profiles of the H^+ effluxes illustrated in Figures Fig. 5C and D confirm the effect of the magnetic field on the activity of the P-type H^+ pumps in yeasts since the statistical results showed high significance at the level of $p \leq 0.001$ when comparing the performance of yeasts in whole reactor exposed to 10 mT in relation to the system not

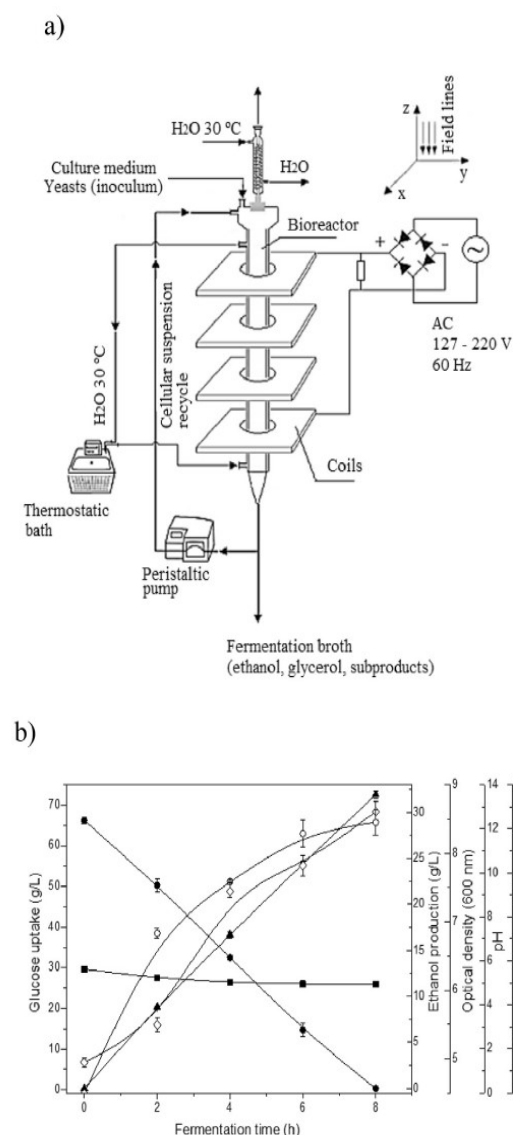


Fig. 4. Experimental setup and fermentation kinetics by *S. cerevisiae* X2180 in bioreactor assisted by ELF magnetic field at 10 mT, using whole bioreactor inside of magnetic field as treatment system. Ethanol productivity: 4.0 g/Lh. Symbols: ● Glucose uptake (g/L); ▲ Ethanol production (g/L); ◇ Optical density (600 nm); ■ pH; ○ Formed glycerol (g/L).

exposed (Fig. 5C).

Plasmalemmal P-type H^+ -ATPases catalyze ATP hydrolysis coupled to the translocation of H^+ ions across the yeast cell membrane, resulting in the establishment of a transmembrane electrochemical H^+ gradient, which in turn drives the active secondary transport of nutrients, including amino acid/ H^+ -symports and voltage-gated channels that translocate metal ions essential to optimal growth and fermentation yield potential [30,31]. It is worth noting that the stimulation of the H^+ efflux induced by the exposure of yeast cells to 10 mT magnetic field is almost completely antagonized by the addition of vanadate, an inhibitor of P-type ion ATPases. However, it does not induce any change on the vanadate-insensitive acidification, correlated to the CO_2 and organic acids derived from the fermentation process [32].

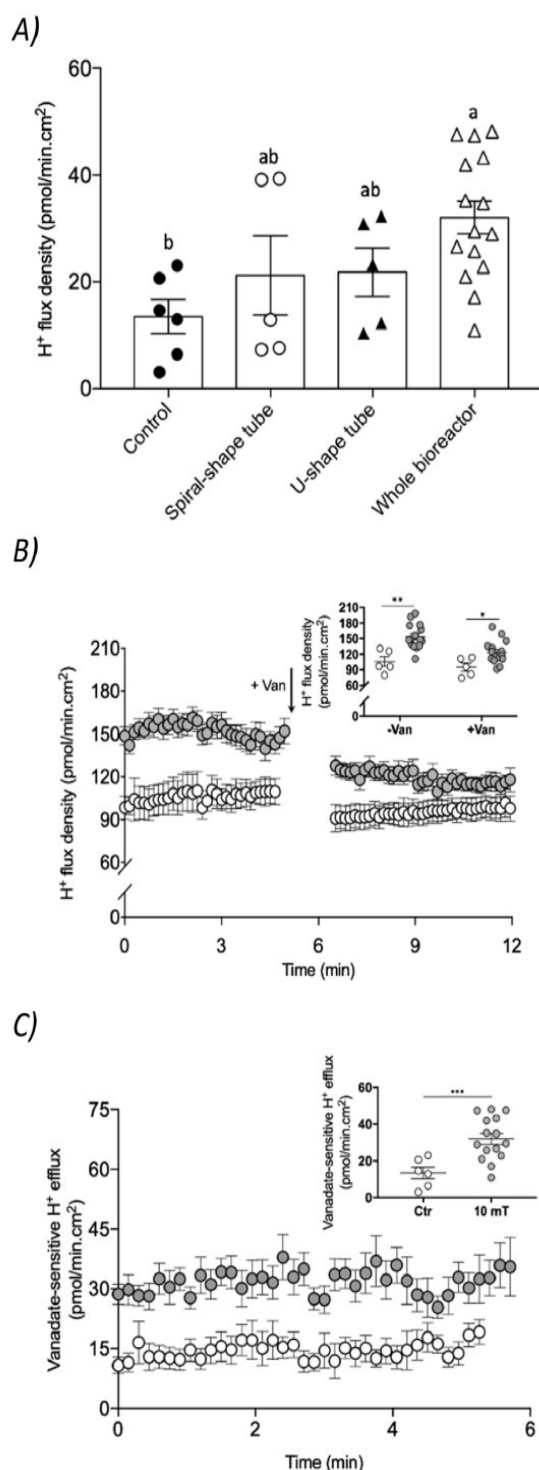


Fig. 5. Magnetic field effects on H^+ electrochemical gradient across the plasma membrane of *S. cerevisiae* X-2180: (A) Average of H^+ efflux density analyzed on yeasts surface upon the operational arrangements adopted to fermentation study. (B) H^+ effluxes by yeasts withdrawn from whole reactor; and (C) Vanadate-sensitive H^+ effluxes representing the specific activity of the plasma membrane P-type H^+ pumps by yeasts withdrawn from whole reactor. Symbols: \circ - control experiment (unexposed to magnetic field) and \bullet - yeasts exposed to magnetic field (10 mT). Note: Data from Fig. 5A were analyzed by ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$) where different letters indicate statistically significant differences. While, Fig. 5B and C were analyzed by t -

In agreement, magnetic field effects was also associated with activation of other P-type ATPases such as Na^+/K^+ -ATPase [33] and Ca^{2+} -ATPases of mammalian cell membranes [34] and more recently the Na^+ -ATPase of the fungus *M. purpureus* [35]. Likewise, the increase in the intracellular concentration of Ca^{2+} ions in bacteria [36] and Na^+ ; K^+ ; Zn^{2+} and Ca^{2+} in genetically modified *S. cerevisiae* [37] has also been reported under magnetic fields, but a possible involvement of an effect on the transmembrane electrochemical gradients on the modulation of ion uptake has not yet been explored up to now. In plants, the productivity and yield potential were shown to be higher at plants exposed to low magnetic field, an effect that was correlated with an increased content of nutrients, such as N, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn and Zn [38]. It is noteworthy to mention that plant cells like yeasts, have also their secondary active transport systems of nutrients and metabolites energized by transmembrane electrochemical H^+ gradients, generated by P-type H^+ -ATPases, which constitute the primary system of ion transport of their plasma membranes. Therefore, it tempting to speculate that the same mechanism of magnetic field-induced H^+ fluxes related to the yeast H^+ -ATPases activation, could also account for the nutritional stimulatory effects found in plants [38], also involving a magnetogenic effect on the plant H^+ pump counterpart.

Meanwhile, our results suggest that ELF magnetic fields might exert their effects specifically on the plasma membrane proton pump activity, energizing the secondary active transport systems coupled to the pump-driven H^+ electrochemical gradient, also influencing the whole bioelectrochemistry of the yeast cell membrane (Fig. 6). In fact, beyond its relevance to the cell nutrition, this proton pump also plays a key role in maintenance of extracellular and intracellular pH homeostasis allowing yeast cells to cope with the H^+ surplus generated by the higher glycolytic flux and overflow metabolism. This is especially relevant to industrial yeast strains selected to metabolize high glucose concentrations, since these cells undergo rapid fermentative growth, producing ethanol, CO_2 and organic acids, rapidly acidifying the medium, which requires robust mechanisms to maintain cytosolic pH underlying tightly regulated proton pump activities [29,39].

To address industrial applications, future studies should be performed using substrates from industrial practice, such as sugarcane juice and molasses or even hydrolysed corn starch, which provides essentially sucrose and other fermentable disaccharides. Since these can be hydrolysed by extracellular invertases producing other hexoses besides glucose, for which the transport must occur via proton symport in the yeasts [29], and considering the revealed mechanism, even better results can be expected.

In addition, these results can also be interesting to the second-generation bioethanol production in which glucose and other monosaccharides from biomass are available for fermentation. In this regard, the use of bioreactors assisted by magnetic fields may represent one of the promising alternatives due to the reduction in the fermentation times and increases in ethanol productivity, which might have profound technological and economic impacts on global production volumes.

4. Conclusions

Based on these data, we are proposing a new mechanism of action by which ELF magnetic fields interact with the yeast cells and improve the fermentation process, by increasing the H^+ pumping activity of the plasma membrane H^+ -ATPase, inducing a

test where asterisks indicate statistically significant differences (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

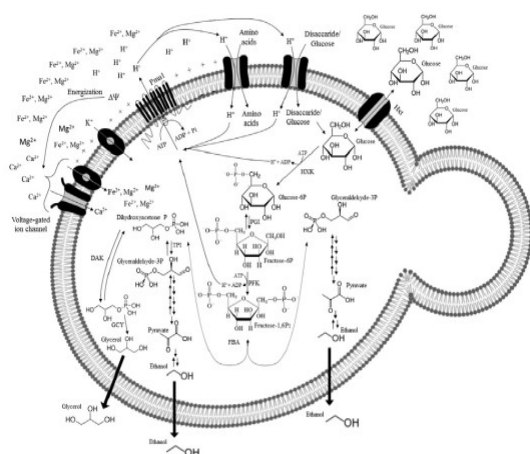


Fig. 6. Biophysical mechanism of action of extremely low frequency (ELF) magnetic field on *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation and the cellular targets. Hxt, plasma membrane facilitated diffusion glucose transporters; Pma1, P-type H⁺-ATPase represented as the primary H⁺ transport system chemiosmotically coupled to several secondary ion transporters of the yeast plasma membrane; Glycolytic pathway is represented inside the cell.

surplus in the chemiosmotic driving force to the higher uptake rates of ions and other substrates required to the process (Fig. 6). In addition to contributing to the understanding of the biological effect of magnetic fields, these findings can be used to increase the productivity of bioethanol under magnetic field on an industrial scale since fermentation times can be reduced by 2 h compared to conventional processes.

Future studies should be directed towards determining whether magnetic fields induce transcriptional and/or post transcriptional changes in ion pumps, channels, and other substrate transporters. Deciphering the magnetic-related modulation of these transmembrane transport systems may open new avenues to understand the triggering mechanisms of the positive interactions of magnetic fields with microorganisms of industrial interest as well as to avoid possible negative interactions not only of economic relevance, but also that related to the systemic health.

CRedit authorship contribution statement

Cristilane M. de Andrade: Investigation, Formal analysis, Validation, Writing - original draft. **Antonio J.D. Cogo:** Investigation, Formal analysis, Validation, Writing - original draft. **Victor Haber Perez:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Nathalia F. dos Santos:** Investigation, Writing - original draft. **Anna Lvovna Okorokova-Façanha:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Oselys Rodriguez Justo:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Arnoldo Rocha Façanha:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Lev Okorokov (Emeritus Professor-UENF, Brazil) for his helpful critical discussion of our

proposed model. We are also grateful to the following Brazilian agencies for financial support: Foundation Carlos Chagas Filho Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ-Grant no.: E-26/202688/2019 and E-26/202918/2017), Coordination for the Improvement of Higher-Level Personnel-Brazil (CAPES Finance Code 001; CAPES-FAPERJ/PAPD Post-doctoral fellowship (E26/203124/2017); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Process no.: 433235/2016-0 and 307547/2017-5 and Grants Program of the Estácio de Sá University for Research Productivity.

References

- [1] D.C. Cubides-Roman, V.H. Pérez, H.F. de Castro, C.E. Orrego, O.H. Giraldo, E.G. Silveira, G.F. David, Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field, *Fuel* 196 (2017) 481–487.
- [2] E.G. Silveira Junior, O.R. Justo, V.H. Perez, F. da Silva Melo, I. Reyer, A. Serrano-Lotina, F.J. Mompean, Biodiesel synthesis using a novel monolithic catalyst with magnetic properties (K₂CO₃/γ-Al₂O₃/Sepiolite/γ-Fe₂O₃) by ethanolic route, *Fuel* 271 (2020) 117650.
- [3] W. Xie, Y. Han, H. Wang, Magnetic Fe₃O₄/MCM-41 composite-supported sodium silicate as heterogeneous catalysts for biodiesel production, *Renew. Energy* 125 (2018) 675–681.
- [4] W. Huang, F. Yang, W. Huang, D. Wang, Z. Lei, Z. Zhang, Weak magnetic field significantly enhances methane production from a digester supplemented with zero valent iron, *Bioresour. Technol.* 282 (2019) 202–210.
- [5] G. Qu, P. Lv, Y. Cai, C. Tu, X. Ma, P. Ning, Enhanced anaerobic fermentation of dairy manure by microelectrolysis in electric and magnetic fields, *Renew. Energy* 146 (2020) 2758–2765.
- [6] H. Wang, J. Xu, L. Sheng, X. Liu, M. Zong, D. Yao, Anaerobic digestion technology for methane production using deer manure under different experimental conditions, *Energies* 12 (9) (2019) 1819.
- [7] G. Baskar, R. Naveen Kumar, X. Heronimus Melvin, R. Aiswarya, S. Soumya, *Sesbania aculeata* biomass hydrolysis using magnetic nanobiocomposite of cellulase for bioethanol production, *Renew. Energy* 98 (2016) 23–28.
- [8] K.J. Dussán, O.R. Justo, V.H. Perez, G.F. David, E.G.S. Junior, S.S. da Silva, Bioethanol production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by immobilized *S. Shehatae* in a fluidized bed fermenter under magnetic field, *BioEnergy Research* 12 (2) (2019) 338–346.
- [9] V.H. Perez, A.F. Reyes, O.R. Justo, D.C. Alvarez, R.M. Alegria, Bioreactor coupled with electromagnetic field generator: effects of extremely low frequency electromagnetic fields on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Prog.* 23 (5) (2007) 1091–1094.
- [10] Y. Xiang, Y. Xiang, Y. Jiao, L. Wang, Surfactant-modified magnetic CaFe-layered double hydroxide for improving enzymatic saccharification and ethanol production of *Artemisia ordosica*, *Renew. Energy* 138 (2016) 465–473.
- [11] Ren21, *Renewables 2020 Global Status Report*, REN21 Secretariat, Paris, 2020, ISBN 978-3-948393-00-7.
- [12] M. Berlot, T. Rehar, D. Fefer, M. Berovic, The influence of treatment of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum with a magnetic field on subsequent grape must fermentation, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27 (2013) 423–429.
- [13] M.A. da Motta, J.B.F. Muniz, A. Schuler, M. Da Motta, Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation, *Biotechnol. Prog.* 20 (1) (2004) 393–396.
- [14] A. Deutmeyer, R. Raman, P. Murphy, S. Pandey, Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*, *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2 (4) (2011) 207–213.
- [15] J. Dobsinský, J. Jedlička, Biological effect of magnetic field on the fermentation of wine, *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 11 (1) (2017) 575–579.
- [16] T. Galonja-Corghill, L. Kostadinović, Magnetically altered ethanol fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*, *B. C. Proc. Nat. Sci.* 117 (2009) 119–123.
- [17] V. Ivanova, J. Hristov, E. Dobrova, Z. Al-Hassan, I. Penchev, Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59 (2) (1996) 187–198.
- [18] A. Konopacka, R. Rakoczy, M. Konopacki, The effect of rotating magnetic field on bioethanol production by yeast strain modified by ferrimagnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 473 (2019) 176–183.
- [19] C.-Z. Liu, F. Wang, F. Ou-Yang, Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles, *Bioresour. Technol.* 100 (2) (2009) 878–882.
- [20] M.G. Mendoza-Turizo, O.R. Justo, V.H. Perez, I.C. Paz-Astudillo, C.A. Cardona, M.A. Mueses, C.M. Cabrera-Sanmartin, Modeling of bioethanol production in unconventional bioreactor assisted by electromagnetic field, *Int. J. Energy Res.* 41 (1) (2017) 103–112.
- [21] J. Hristov, Magnetic field assisted fluidization – a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses, *Rev. Chem. Eng.* 26 (3–4) (2010) 55–128.
- [22] J. Hristov, V. Perez, Critical analysis of data concerning *Saccharomyces*

- cerevisiae free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields, *Int Rev Chem Eng* 3 (1) (2011) 3–20.
- [23] G.F. David, V.H. Perez, O.R. Justo, D.C. Cubides, C.A. Cardona, J. Hristov, Glycerol bioconversion in unconventional magnetically assisted bioreactor seeking whole cell biocatalyst (intracellular lipase) production, *Chem. Eng. Res. Des.* 111 (2016) 243–252.
- [24] A.C. Ramos, A.R. Façanha, J.A. Feijó, Proton (H⁺) flux signature for the pre-symbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi, *New Phytol.* 178 (1) (2008) 177–188.
- [25] A.J. Dorighetto Cogo, K.D.R. Dutra Ferreira, L.A. Okorokov, A.C. Ramos, A.R. Façanha, A.L. Okorokova-Façanha, Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase during yeast to hyphae transition, *Biology open* 7 (2) (2018).
- [26] V. Anton-Leberre, E. Haanappel, N. Marsaud, L. Trouilh, L. Benbadis, H. Boucherie, S. Massou, J.M. François, Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioelectromagnetics* 31 (1) (2010) 28–38.
- [27] E.S. Otabe, S. Kuroki, J. Nikawa, Y. Matsumoto, T. Ooba, K. Kiso, H. Hayashi, Yeast cells proliferation on various strong static magnetic fields and temperatures, *J. Phys. Conf.* 156 (1) (2009) 1–8.
- [28] M. Konopacki, R. Rakoczy, The analysis of rotating magnetic field as a trigger of Gram-positive and Gram-negative bacteria growth, *Biochem. Eng. J.* 141 (2019) 259–267.
- [29] L.F. Bisson, Q. Fan, G.A. Walker, Sugar and glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*, in: J. Ramos, H. Sychrová, M. Kschischo (Eds.), *Yeast Membrane Transport*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 125–168.
- [30] J. Barnett, A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites 1, *Yeast* 25 (2008) 689–731.
- [31] R. Serrano, Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 947 (1) (1988) 1–28.
- [32] A. Peña, N.S. Sánchez, H. Álvarez, M. Calahorra, J. Ramírez, Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 15 (2) (2015) 1–13.
- [33] M. Blank, Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na,K-ATPase? *Bioelectromagnetics* 26 (8) (2005) 677–683.
- [34] J. Wei, J. Sun, H. Xu, L. Shi, L. Sun, J. Zhang, Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on intracellular calcium transients in cardiomyocytes, *Electromagn. Biol. Med.* 34 (1) (2015) 77–84.
- [35] X. Xiong, Z. Zhen, Y. Liu, M. Gao, S. Wang, L. Li, J. Zhang, Low-frequency magnetic field of appropriate strengths changed secondary metabolite production and Na⁽⁺⁾ concentration of intracellular and extracellular *Monascus purpureus*, *Bioelectromagnetics* 41 (4) (2020) 289–297.
- [36] P. Wu, W. Qu, M. Abdulrahman, Y. Guo, K. Xu, H. Ma, Study on inactivation mechanisms of *Listeria grayi* affected by pulse magnetic field via morphological structure, Ca²⁺ transmembrane transport and proteomic analysis, *Int. J. Food Sci. Technol.* 52 (9) (2017) 2049–2057.
- [37] M. Choe, W. Choe, S. Cha, I. Lee, Changes of cationic transport in AtCAX5 transformant yeast by electromagnetic field environments, *J. Biol. Phys.* 44 (3) (2018) 433–448.
- [38] A. Eşitken, M. Turan, Alternating magnetic field effects on yield and plant nutrient element composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. camarosa), *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci* 54 (3) (2004) 135–139.
- [39] M.F. Rosa, I. Sá-Correia, In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (3) (1991) 830–835.