

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – FEA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Estudo da Produção de Glutathione a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e Avaliação da Aplicação de Campos Magnéticos  
Durante as Fermentações

**Lucielen Oliveira dos Santos**

Engenheira de Alimentos

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Campinas

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59e Santos, Lucielen Oliveira dos  
Estudo da produção de glutathione a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações / Lucielen Oliveira dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Glutathione. 2. Campos magnéticos. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Delineamento experimental. 5. Fermentação submersa. I. Monte Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Study of the production of glutathione from *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of application of magnetic fields during fermentation

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glutathione, Magnetic field, *Saccharomyces cerevisiae*, Experimental design, Submerged fermentation

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre  
Jorge Alberto Vieira Costa  
Rodrigo de Oliveira Moraes  
Gabriela Alves Macedo  
Andrea Roberta Clemente  
Reinaldo Gaspar Basto

Data de defesa: 07/03/2008

Programa de Pós-Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
Orientador  
FEA-UNICAMP

---

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa  
Membro  
FURG

---

Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes  
Membro

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
Membro  
FEA-UNICAMP

---

Profa. Dra. Andréa Roberta Clemente  
Membro  
UNIARARAS

---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
Membro  
UNICENTRO



*Dedico aos meus pais, Lucília e Elmo, pelo amor, pelo carinho, pelo incentivo, pela confiança, pela ajuda nos momentos mais difíceis e por jamais terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.*



*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

*Chico Xavier*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado a vida e condições de subir mais um degrau em minha carreira profissional e me ajudar nos momentos mais difíceis que me deparei durante a realização desta tese;

A UNICAMP, uma instituição pública, gratuita e de qualidade, por ter me acolhido durante o curso de mestrado;

Ao CNPq pela bolsa de estudos;

Ao Banco Santander pela bolsa de estudo que me proporcionou realizar parte deste trabalho na Universidade de Salamanca - Espanha;

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela dedicação na orientação deste trabalho, pela compreensão, pelo incentivo, pela paciência nos momentos difíceis e principalmente pelo companheirismo e amizade;

Ao primeiro “desorientador” e amigo Jorge A. V. Costa por ter me mostrado o mundo da pesquisa fazendo com que despertasse meu interesse por esta área e, de certa forma, ser responsável por eu estar aqui hoje;

Ao Prof. Dr Jorge Cuellar Antequera pelo sua orientação durante minha estada na Universidade de Salamanca;

A todos os membros da Banca Examinadora que com sua experiência científica e conceituada qualificação enriqueceram as discussões deste trabalho através de suas sugestões;

Aos meus pais Elmo e Lucilia por todo o apoio em todas as etapas da minha vida, principalmente nas horas mais difíceis em que pensei em desistir de tudo e que com suas palavras de incentivo me fizeram superar as dificuldades, levantar a cabeça e dar volta por cima. Se não fossem vocês, eu não estaria aqui. Obrigado por cada palavra do outro lado do telefone que me transmitiram confiança e coragem, necessárias para que eu continuasse a

caminhada;

A minha madrinha Beatriz pelo apoio, carinho e incentivo durante todas as etapas da minha vida;

A Claudinha, Edinho e Rafael e pela amizade, carinho, auxílio na execução deste trabalho e pela paciência durante todos os dias no laboratório;

Aos meus amigos Abraão, Adri, Ale, Andréa, Batavo, Caiçara, Camila, Camilinha, César, Cinthia, Cláudio, Cristina, Cristhiane, Dani, Daniel, Eliane, Feni, Gabi, Geraldo, Gustavos, Jaque Fiúza, Jaqueline, Leila, Louise, Lucia, Márcia, Márcio, Mila, Moribe, Myllene, Nelisa, Olga, Otávio, Racks, Rodi, Rodrigo, Tati, Vanessa, Veri e tantos outros que sempre estiveram ao meu lado nas horas boas e nas horas difíceis da minha vida. Sei que estou esquecendo e omitindo vários nomes, me desculpem vocês sabem o quão importantes são. Muito obrigado a todos, não importa quantos e quais nomes vocês tenham.

## SUMÁRIO

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Índice de Figuras.....                                                                      | xi        |
| Índice de Tabelas.....                                                                      | xv        |
| Nomenclatura.....                                                                           | xix       |
| Resumo.....                                                                                 | xxiii     |
| Abstract.....                                                                               | xxv       |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                    | <b>5</b>  |
| 2.1    Objetivo Geral.....                                                                  | 5         |
| 2.2    Objetivos Específicos .....                                                          | 5         |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                       | <b>7</b>  |
| 3.1    Glutaciona .....                                                                     | 7         |
| 3.2    Produção de Glutaciona.....                                                          | 13        |
| 3.2.1    Produção de Glutaciona por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                   | 18        |
| 3.3    Estudos e Aplicações de Campos Magnéticos na Biotecnologia .....                     | 23        |
| 3.3.1    Aplicação de Campos Magnéticos no Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 31        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                           | <b>35</b> |
| 4.1    Microrganismo .....                                                                  | 35        |
| 4.2    Preparo do Inóculo.....                                                              | 35        |
| 4.3    Meio de Cultivo.....                                                                 | 35        |
| 4.4    Ensaio.....                                                                          | 36        |
| 4.4.1    Ensaio em Frascos Erlenmeyer – “shaker”.....                                       | 36        |
| 4.4.2    Ensaio em Fermentador de Bancada .....                                             | 39        |
| 4.4.3    Ensaio com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Bobinas.....                 | 41        |
| 4.4.4    Ensaio com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Ímãs .....                   | 42        |
| 4.5    Metodologia Analítica .....                                                          | 43        |
| 4.5.1    Determinação da Concentração Celular.....                                          | 43        |
| 4.5.2    Determinação de pH .....                                                           | 44        |
| 4.5.3    Determinação da Concentração de Glicose Residual.....                              | 44        |
| 4.5.4    Determinação da Concentração de Glutaciona .....                                   | 45        |
| 4.5.5    Determinação de Indução Magnética .....                                            | 45        |
| 4.6    Cálculos.....                                                                        | 45        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                       | <b>49</b> |

|            |                                                                            |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.1</b> | <b>Ensaios Frascos Erlenmeyer .....</b>                                    | <b>49</b>  |
| 5.1.1      | Delineamento Fatorial Fracionado (FF).....                                 | 49         |
| 5.1.2      | Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional (PD) .....               | 55         |
| 5.1.3      | Segundo Delineamento Composto Central Rotacional (SD) .....                | 64         |
| <b>5.2</b> | <b>Ensaios em Fermentador de Bancada.....</b>                              | <b>78</b>  |
| <b>5.3</b> | <b>Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Bobina .....</b> | <b>87</b>  |
| 5.3.1      | Sem Aplicação de Campos Magnéticos (controle) .....                        | 88         |
| 5.3.2      | Com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Bobina .....                | 89         |
| <b>5.4</b> | <b>Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Ímãs .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>6.</b>  | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                    | <b>105</b> |
| <b>7.</b>  | <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                              | <b>107</b> |
| <b>8.</b>  | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                     | <b>109</b> |
| <b>9.</b>  | <b>ANEXOS .....</b>                                                        | <b>119</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural da glutathiona.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 7  |
| <b>Figura 2:</b> Esquema da biossíntese de glutathiona (GSH).....                                                                                                                                                                                                                                                     | 8  |
| <b>Figura 3:</b> Metabolismo da glutathiona nas leveduras. (SHIMIZU et al., 1991) .....                                                                                                                                                                                                                               | 8  |
| <b>Figura 4:</b> Esquema do tratamento magnético da suspensão celular em fermentador de bancada .....                                                                                                                                                                                                                 | 43 |
| <b>Figura 5:</b> Acompanhamento da concentração celular (g/L) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante o FF ( $2^{5-2}$ ): (a) ensaios 1 a 6 (b) ensaios 7 a 11.....                                                                                                                                                | 50 |
| <b>Figura 6:</b> Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante o FF ( $2^{5-2}$ ): (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.....                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 7:</b> Acompanhamento da concentração celular (g/L) de <i>S. cerevisiae</i> durante o PD ( $2^3$ ): (a) ensaios 1 a 6, (b) ensaios 7 a 12 e (c) ensaios 13 a 17.....                                                                                                                                        | 56 |
| <b>Figura 8:</b> Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por <i>S. cerevisiae</i> durante o PD ( $2^3$ ): (a) ensaios 1 a 6, (b) ensaios 7 a 12 e (c) ensaios 13 a 17.....                                                                                                                             | 58 |
| <b>Figura 9:</b> Superfícies de resposta do PD ( $2^3$ ) para a conc. de GSH como uma função: (a) pH <sub>inicial</sub> e conc. de glicose, (b) conc. de glicose e temperatura e (c) pH <sub>inicial</sub> e temperatura.....                                                                                         | 63 |
| <b>Figura 10:</b> Acompanhamento da concentração celular (g/L) de <i>S. cerevisiae</i> durante o SD ( $2^2$ ): (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 12.....                                                                                                                                                            | 65 |
| <b>Figura 11:</b> Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por <i>S. cerevisiae</i> durante o SD ( $2^2$ ): (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 12.....                                                                                                                                                 | 66 |
| <b>Figura 12:</b> Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do SD ( $2^2$ ) para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> como uma função da concentração inicial de glicose e da temperatura.....                                                                                          | 71 |
| <b>Figura 13:</b> Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a concentração de GSH no SD ( $2^2$ ) em 72 h.....                                                                                                                                                                                  | 73 |
| <b>Figura 14:</b> Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do SD ( $2^2$ ) para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> como uma função da concentração inicial de glicose e da temperatura. ....                                                                                                   | 75 |
| <b>Figura 15:</b> Acompanhamento do ensaio 1FB (25°C, 40 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, com peptona e sem adição de aminoácidos) durante as 72 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> . Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L)..... | 78 |

**Figura 16:** Acompanhamento do ensaio 2FB (20°C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, com peptona e sem adição de aminoácidos) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L)..... 79

**Figura 17:** Acompanhamento do ensaio 3FB (20°C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos..... 80

**Figura 18:** Acompanhamento do ensaio 4FB (20°C, 54 g/L de glicose, 400 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos..... 81

**Figura 19:** Acompanhamento do ensaio 5FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos..... 82

**Figura 20:** Acompanhamento do ensaio 6FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos..... 83

**Figura 21:** Acompanhamento do ensaio 7FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com extrato de levedura e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos..... 84

**Figura 22:** Acompanhamento do ensaio 8FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com água de maceração de milho e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| indicam a adição de aminoácidos.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 85  |
| <b>Figura 23:</b> Concentração de GSH (mg/L) produzida por <i>S. cerevisiae</i> durante o DCM (a) ensaios com efeito estimulante (1, 3 e 4) e (b) ensaios com efeito inibitório (2 e pontos centrais) para 72 h de fermentação em relação ao ensaio controle.....                       | 91  |
| <b>Figura 24:</b> Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do DCM para a concentração celular como função do tempo de aplicação e da indução do CM.....                                                                                                                      | 95  |
| <b>Figura 25:</b> Fermentação controle (sem aplicação de CM) para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos. .... | 97  |
| <b>Figura 26:</b> Ensaio com aplicação de 24 h de CM para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.....          | 98  |
| <b>Figura 27:</b> Ensaio com aplicação de 48 h de CM para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.....          | 99  |
| <b>Figura 28:</b> Ensaio com aplicação de 72 h de CM para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.....          | 100 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição do meio YM usado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754.....                                 | 35 |
| <b>Tabela 2:</b> Composição do meio utilizado para a produção de glutatona.....                                                                                              | 36 |
| <b>Tabela 3:</b> Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento fatorial fracionado (FF), $2^{5-2}$ com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).....                 | 37 |
| <b>Tabela 4:</b> Matriz dos ensaios gerada para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD), $2^3$ com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).....  | 38 |
| <b>Tabela 5:</b> Matriz dos ensaios gerada para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).....    | 39 |
| <b>Tabela 6:</b> Ensaios feitos no fermentador de bancada (FB) .....                                                                                                         | 40 |
| <b>Tabela 7:</b> Matriz dos ensaios gerada para o delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM) $2^2$ com seus níveis codificados e reais (entre parênteses)..... | 42 |
| <b>Tabela 8:</b> Porcentagem de GSH produzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e fatores de conversão para o delineamento fatorial fracionado (FF) $2^{5-2}$ .....        | 52 |
| <b>Tabela 9:</b> Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) para o delineamento fatorial fracionado (FF) $2^{5-2}$ .....                                  | 53 |
| <b>Tabela 10:</b> Estimativa dos efeitos para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> no planejamento FF ( $2^{5-2}$ ) para 72 h.....                       | 54 |
| <b>Tabela 11:</b> Estimativa dos efeitos para a concentração celular produzida por <i>S. cerevisiae</i> no planejamento FF ( $2^{5-2}$ ) para 72 h.....                      | 54 |
| <b>Tabela 12:</b> Porcentagem de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> e fatores de conversão para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD) $2^3$ .....     | 59 |
| <b>Tabela 13:</b> Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD) $2^3$ .....                    | 60 |
| <b>Tabela 14:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do PD ( $2^3$ ), para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 48 h.....                       | 61 |
| <b>Tabela 15:</b> Análise de variância do PD ( $2^3$ ) para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 48 h.....                                            | 61 |
| <b>Tabela 16:</b> Porcentagem de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> e fatores de conversão para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ .....      | 67 |
| <b>Tabela 17:</b> Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) conversão para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ .....           | 68 |

|                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 18:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do SD ( $2^2$ ), para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 72 h.....                                                                   | 69  |
| <b>Tabela 19:</b> Análise de variância do SD ( $2^2$ ) para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 72 h.....                                                                                        | 69  |
| <b>Tabela 20:</b> Concentrações de GSH experimentais, previstas pelo modelo, desvios e desvios relativos para o SD ( $2^2$ ) em 72 h.....                                                                                | 72  |
| <b>Tabela 21:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do SD ( $2^2$ ), para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> em 72 h.....                                                                             | 74  |
| <b>Tabela 22:</b> Análise de variância do SD ( $2^2$ ) para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> em 72 h.....                                                                                                  | 74  |
| <b>Tabela 23:</b> Porcentagem máxima de GSH e fatores de conversão para as fermentações no fermentador de bancada (FB).....                                                                                              | 86  |
| <b>Tabela 24:</b> Concentração celular (g/L) de <i>S. cerevisiae</i> dos ensaios controle em 72 h.....                                                                                                                   | 88  |
| <b>Tabela 25:</b> Concentração de GSH (mg/L) produzida por <i>S. cerevisiae</i> dos ensaios controle em 72 h.....                                                                                                        | 89  |
| <b>Tabela 26:</b> Concentração celular (g/L) de <i>S. cerevisiae</i> e porcentagem de diferença de concentração celular (PDC) para os tempos de 24, 48 e 72 h do delineamento fatorial completo com aplicação do CM..... | 90  |
| <b>Tabela 27:</b> Porcentagem de diferença de concentração de GSH (PDG) produzida por <i>S. cerevisiae</i> para os tempos de 24, 48 e 72 h do delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM).....              | 92  |
| <b>Tabela 28:</b> Porcentagem de GSH e fatores de conversão para o delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM) e para o ensaio controle.....                                                                | 93  |
| <b>Tabela 29:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCM para a concentração celular em 48 h.....                                                                                                               | 94  |
| <b>Tabela 30:</b> Análise de variância do DCM para a concentração celular em 48 h.....                                                                                                                                   | 94  |
| <b>Tabela 31:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCM para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 48 h.....                                                                             | 96  |
| <b>Tabela 32:</b> Análise de variância do DCM para a concentração de GSH em 48 h.....                                                                                                                                    | 96  |
| <b>Tabela 33:</b> Resultados de PDC e PDG para 72 h de fermentação.....                                                                                                                                                  | 100 |
| <b>Tabela 34:</b> Porcentagem de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> e fatores de conversão para os ensaios com aplicação de CM e o ensaio controle após 72 h.....                                                    | 101 |
| <b>Tabela 35:</b> Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no delineamento                                                                                                                          |     |

|                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| fatorial fracionado (FF) $2^{5-2}$ .....                                                                                                                                     | 119 |
| <b>Tabela 36:</b> Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no delineamento fatorial fracionado (FF) $2^{5-2}$ .....                                                  | 120 |
| <b>Tabela 37:</b> Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no delineamento fatorial fracionado (FF) $2^{5-2}$ .....                                                  | 120 |
| <b>Tabela 38:</b> Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) $2^3$ .....                        | 121 |
| <b>Tabela 39:</b> Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) $2^3$ .....                                     | 122 |
| <b>Tabela 40:</b> Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) $2^3$ .....                                     | 123 |
| <b>Tabela 41:</b> Estimativa dos efeitos para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> no primeiro delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ) para 48 h.....   | 124 |
| <b>Tabela 42:</b> Estimativa dos efeitos para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> no primeiro delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ) para 72 h.....   | 124 |
| <b>Tabela 43:</b> Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ .....                         | 125 |
| <b>Tabela 44:</b> Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ .....                                      | 126 |
| <b>Tabela 45:</b> Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) $2^2$ .....                                      | 127 |
| <b>Tabela 46:</b> Resultados do ensaio 1FB feito no fermentador de bancada, utilizando 25 °C, 40 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, peptona e sem adição de aminoácidos..... | 128 |
| <b>Tabela 47:</b> Resultados do ensaio 2FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, peptona e sem adição de aminoácidos..... | 129 |
| <b>Tabela 48:</b> Resultados do ensaio 3FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,53 vvm, peptona e com adição de aminoácidos..... | 130 |
| <b>Tabela 49:</b> Resultados do ensaio 4FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 400 rpm, 0,53 vvm, peptona e com adição de aminoácidos..... | 131 |
| <b>Tabela 50:</b> Resultados do ensaio 5FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 0,46 vvm, peptona e com adição de aminoácidos..... | 132 |
| <b>Tabela 51:</b> Resultados do ensaio 6FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, peptona e com adição de aminoácidos.....  | 133 |

|                                                                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 52:</b> Resultados do ensaio 7FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, extrato de levedura e com adição de aminoácidos.....      | 134 |
| <b>Tabela 53:</b> Resultados do ensaio 8FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, água de maceração de milho e com adição de aminoácidos... | 135 |
| <b>Tabela 54:</b> Resultados de pH obtidos nos ensaios controle sem aplicação de CM.....                                                                                                     | 136 |
| <b>Tabela 55:</b> Resultados de pH e concentração de GSH (mg/L) obtidos nos ensaios do delineamento fatorial completo com aplicação de campos magnéticos (DCM).....                          | 136 |
| <b>Tabela 56:</b> Resultados do ensaio controle no fermentador de bancada sem aplicação de CM.<br>.....                                                                                      | 137 |
| <b>Tabela 57:</b> Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 24 h de CM.<br>.....                                                                                       | 138 |
| <b>Tabela 58:</b> Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 48 h de CM.<br>.....                                                                                       | 139 |
| <b>Tabela 59:</b> Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 72 h de CM.<br>.....                                                                                       | 140 |

## NOMENCLATURA

% GSH – porcentagem de glutathione – massa de glutathione em relação à massa de célula

$\mu$  - velocidade específica de crescimento

$\rho_G$  – velocidade específica de produção de glutathione

ADP – adenosina difosfato

AMM – água de maceração de milho

ATP – adenosina trifosfato

$C_{AC}$  – concentração celular ou de glutathione com aplicação do CM

$C_{controle}$  - concentração celular ou de glutathione do ensaio controle

Cd – cádmio

CDM – *chemically defined medium*

CM – campos magnéticos

Co – cobalto

$CO_2$  – dióxido de carbono

Cr - cromo

Cu – cobre

DCCR – delineamento composto central rotacional

DCM – delineamento fatorial completo com aplicação de campos magnéticos

DTNB – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

EL – extrato de levedura

FB – fermentador de bancada

$FeSO_4$  – sulfato ferroso

FF – delineamento fatorial fracionado

$g_{cél}$  – massa de células em gramas

$g_{glic}$  – massa de glicose em gramas

GSH – glutathione ou glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

$H_2O$  - água

HCl – ácido clorídrico

$KH_2PO_4$  – fosfato diácido de potássio

kHz – quilo Hertz

L – termo linear nos coeficientes de regressão

$mg_{GSH}$  – massa de glutathione em miligrama

$\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  – massa de glutathiona em miligrama por massa de célula em grama

$\text{MgSO}_4$  – sulfato de magnésio

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – sulfato de magnésio heptahidratado

Mn - manganês

NAC – N-acetil-L-cisteína

NaCl – cloreto de sódio

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

$\text{NaHCO}_3$  – bicarbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – sulfato de amônia

Ni – níquel

$\text{O}_2$  - oxigênio

OD – oxigênio dissolvido

$P_{0h}$  – concentração de produto em 0 h

$P_{72h}$  – concentração de produto em 72 h

PD - primeiro delineamento composto central rotacional

PDC - porcentagem de diferença da concentração celular com a aplicação de campos magnéticos em relação aos ensaios controle

PDG - porcentagem de diferença da concentração de glutathiona com a aplicação de campos magnéticos em relação aos ensaios controle

Q – termo quadrático nos coeficientes de regressão

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucleico mensageiro

$S_{0h}$  - concentração de substrato em 0 h

$S_{72h}$  - concentração de substrato em 72 h

SD – segundo delineamento composto central rotacional

Se - selênio

TCA – ácido tricarbóxico

Te- telúrio

UFC - unidades formadoras de colônias

v/v – volume por volume

vvm – volume de ar por volume de meio por minuto

$X_{0h}$  – concentração celular em 0 h

$X_{72h}$  – concentração celular em 72 h

Y – resposta experimental

$\hat{Y}$  - resposta prevista pelo modelo

YM – *yeast extract-malt extract* (meio extrato de levedura-extrato de malte)

$Y_{p/s}$  – fator de conversão de substrato em produto

$Y_{p/x}$  – fator de conversão de célula em produto

$Y_{x/s}$  – fator de conversão de substrato em célula

Zn – zinco

$ZnSO_4$  – sulfato de zinco



## RESUMO

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina. Uma de suas funções mais importantes é atuar como antioxidante contra os efeitos tóxicos do oxigênio e de outros compostos oxidativos. A GSH é importante em várias funções metabólicas nas células, tais como: proteção da oxidação por peróxidos, transporte de aminoácidos através da membrana celular e eliminação de metais pesados. Com a descoberta de mais funções e propriedades, este composto tornou-se de interesse nas indústrias de aditivos para alimentos, cosméticos e fármacos. Este tripeptídeo é normalmente produzido por fermentação com leveduras. A aplicação dos campos magnéticos (CM) nos processos fermentativos pode causar efeitos estimulantes ou inibitórios. Poucos trabalhos têm sido direcionados para aplicação de CM em *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de GSH e avaliar o efeito da aplicação de CM durante o processo. O microrganismo utilizado foi a levedura *S. cerevisiae* ATCC 7754 e o acompanhamento das fermentações foi feito com determinações de pH, concentrações celular, de glicose e de GSH. Na primeira etapa, em frascos Erlenmeyer (250 mL), foram feitos três delineamentos experimentais. Os níveis de temperatura, pH<sub>inicial</sub>, agitação, concentrações de inóculo e inicial de glicose foram estudados. A maior concentração de GSH obtida foi de 168,9 mg/L após 48 h, no ensaio a 24 °C, 300 rpm, pH<sub>inicial</sub> 5, 60 g/L de glicose e 5% de inóculo. Foi obtido um modelo de segunda ordem e o percentual de variação explicado por este foi de 95%. Os resultados mostraram que as melhores condições de cultivo foram 300 rpm, 20 °C, pH<sub>inicial</sub> 5, 54 g/L de glicose e 5% de inóculo. Na segunda etapa, feita em fermentador Bioflo III (5 L), as condições de agitação, aeração, fonte de nitrogênio e adição de aminoácidos foram estudadas. A maior concentração de GSH (205,7 mg/L) ocorreu em 72 h no ensaio feito a 20 °C, 500 rpm, 54 g/L de glicose, 1,1 vvm, com adição de aminoácidos e utilizando extrato de levedura. Na terceira etapa foi feita a aplicação de CM gerados por bobina. Para tal, foi utilizado um delineamento experimental e as variáveis tempo do tratamento e indução magnética foram estudadas. A concentração de GSH chegou a 340 mg/L, quando foram aplicados 25 mT por 16 h. Na quarta etapa o meio de cultivo foi recirculado passando por ímãs e foi variado o tempo de exposição ao CM. No ensaio com aplicação de 20 mT por 72 h foi observada a maior concentração de GSH, de 271,9 mg/L. Em todas as etapas o ensaio no qual foi obtida a maior concentração de GSH (340 mg/L) foi conduzido com aplicação de 25 mT por 16 h e nas seguintes condições de cultivo: 20 °C, pH<sub>inicial</sub> 5, 200 rpm, 54 g/L de glicose, 50 g/L de extrato de levedura, 12 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5% de inóculo (v/v), 3,2 vvm e com adição de aminoácidos durante a fermentação.



## ABSTRACT

Glutathione (GSH) is a tripeptide consisting of L-glutamate, L-cysteine and glycine. One of its most important functions is a role as an antioxidant against the toxic effects of oxygen and other oxidative compounds. GSH is important for several metabolic functions of cells, such as protection from oxidation by peroxides, transport of amino acids across cell membranes and elimination of heavy metals. Moreover the discovery of more functions and properties of GSH, this compound is of interest in the food additive, cosmetic and pharmaceuticals industries. This tripeptide is currently produced by yeast fermentation. The application of magnetic fields (MF) in the fermentative process can cause stimulants or inhibitory effects. Literature is very poor about the application of MF in *S. cerevisiae*. The objective of this work was to study the production of GSH and evaluate the application of MF fields in this process. The microorganism used was the yeast *S. cerevisiae* ATCC 7754 and the fermentations were monitored with the measurements of pH, concentrations of cell, glucose and GSH. In the first step, in the Erlenmeyer flasks (250 mL), have made three experimental design. The levels of temperature, pH<sub>initial</sub>, agitation rate, concentrations of glucose and inoculum were studied. The highest concentration of GSH was 168.9 mg/L after 48 h, in run at 24°C, 300 rpm, pH<sub>initial</sub> 5, 60 g/L of glucose and 5% of inoculum. It was obtained a second order model equation and the percent of variation explained by the model was 95%. The results showed that the optimal culture conditions were 300 rpm, 20°C, pH<sub>initial</sub> 5, 54 g/L of glucose and 5% of inoculum concentration. In the second step, made in fermentor Bioflo III (5 L), the conditions of agitation, aeration, a source of nitrogen and addition of amino acids were studied. The highest concentration of GSH (205.7 mg/L) occurred in 72 h in run at 20°C, 500 rpm, 54 g/L of glucose, 1.1 vvm, with the addition of amino acids and yeast extract as a source of nitrogen. The third step was the application of MF generated by coil, it was used an experimental design and variables time of treatment and induction were studied. The concentration of GSH reached was 340 mg/L, when it was applied 25 mT for 16 h. In the fourth step the fermentation medium was recycled through magnets and was varied the time of exposure to the MF. In run with application of 20 mT by 72 h was seen the highest concentration of GSH of 271.9 mg/L. At all stages in which the run was obtained the highest concentration of GSH (340 mg/L) was conducted with application of 25 mT by 16 h of cultivation in the following conditions: 20°C, pH<sub>initial</sub> 5, 200 rpm, 54 g/L of glucose, 50 g/L of yeast extract, 12 g/L of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5% of inoculum (v/v), 3.2 vvm and with the addition of amino acids during fermentation.



## 1. INTRODUÇÃO

O glutathione ou a glutathione ou GSH (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinylglycine) é um tripeptídeo sintetizado através de consecutivas reações enzimáticas. Possui várias funções metabólicas nas células, tais como: proteção da oxidação por peróxidos, transporte de aminoácidos através da membrana celular, eliminação de metais pesados, eliminação de metabólitos endógenos tóxicos e participação no metabolismo do nitrogênio e de compostos sulfurados (BAUER, 1986; PENNINCKX, 2002; ROLLINI, et al., 2005).

A quantidade deste composto na célula é abundante, por isso qualquer alteração na sua concentração pode ser percebida e usada como um sinal para ativar seus mecanismos de defesa. Da mesma forma alterações nos níveis de GSH têm sido observadas em pacientes com doenças como, intoxicações, diabetes, processos inflamatórios no pulmão, doenças coronarianas, câncer, HIV, cirrose hepática, inflamação no pâncreas, doenças neurodegenerativas e estados de imunodeficiência.

A GSH é considerada uma importante molécula de defesa do organismo. A sua função mais importante é atuar como antioxidante contra os efeitos tóxicos do oxigênio e outros compostos oxidantes. Pode ser usada como retardadora do envelhecimento, no tratamento de doenças do fígado, do pâncreas, HIV e como purificador de toxinas (ROLLINI e MANZONI, 2006).

Atualmente a GSH é amplamente empregada nas indústrias de aditivos para alimentos, farmacêutica, de nutrição esportiva e de cosméticos, por isso a sua demanda comercial tem aumentado (WEI et al., 2003a; WEI et al., 2003b).

Até a década de 80, a maioria das pesquisas com GSH era feita em tecidos animais, poucas eram realizadas em plantas e microrganismos (PENNINCKX, 2002). A produção de GSH pode ser realizada por métodos químicos, reações enzimáticas e através de fermentação com microrganismos, porém os métodos enzimáticos e químicos apresentam algumas desvantagens. Desta forma a produção industrial de GSH é feita por fermentação utilizando normalmente leveduras, nas quais são encontrados altos níveis de GSH, sendo as mais citadas *Candida* e *Saccharomyces*.

Comercialmente, é produzida por cepas de *S. cerevisiae* que acumulam grandes

quantidades de GSH intracelular (ALFAFARA et al., 1992a; ALFAFARA et al., 1992b).

A eletroestimulação é um método estabelecido na medicina há muitos anos, mas a sua aplicação em processos fermentativos é recente. Uma das razões pela qual a aplicação de campos magnéticos (CM) não é muito usada está no fato do desconhecimento das condições limites para cada microrganismo. Outro fato é a falta de reprodutibilidade das pesquisas com CM, devido às inúmeras variáveis que podem influenciar o processo, dentre estas pode-se citar o tipo de equipamento empregado, os métodos de detecção dos CM, o tempo de exposição, o estado fisiológico das células e as condições de cultivo.

Os efeitos dos CM magnéticos de baixa frequência nos sistemas biológicos têm sido reportados por diferentes pesquisadores, com resultados positivos no tratamento de doenças dos ossos e da pele. Os estudos com microrganismos mostraram acelerações ou inibições do crescimento celular (IVANOVA et al, 1996; RAO et al., 1997).

As respostas biológicas à aplicação dos CM não são lineares. Por isso, somente para alguns valores de frequência e indução magnética ocorre uma “janela” onde uma resposta significativa pode ser observada. Os efeitos de estímulo ou inibição dos campos são atribuídos a mudanças das biomembranas (lipídicas ou plasmáticas), mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das biomoléculas (proteínas).

A consequência da aplicação dos CM sobre o crescimento celular tem sido estudada do ponto de vista biofísico, mas a sua aplicação na biotecnologia não tem sido estudada em profundidade. Apenas na última década alguns estudos têm se dedicado a microrganismos de interesse biotecnológico (ZAPATA et al., 2002). Motta et al., (2004) citaram que poucos são os trabalhos relatados com a *S. cerevisiae*.

Nenhum trabalho foi encontrado reportando a aplicação de CM, gerados por bobinas ou ímãs, em cultivos com *S. cerevisiae* com o objetivo de produzir GSH.

Nas leveduras, a GSH encontra-se no interior da célula; desta forma o aumento da produção pode ocorrer de duas formas: aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular (WEN et al., 2004; WEN et al., 2006).

Neste trabalho, as duas estratégias foram utilizadas através do estudo das condições

de cultivo (pH, temperatura, agitação, aeração e concentração de inóculo), do tipo e concentração dos nutrientes (glicose, fonte de nitrogênio e adição de aminoácidos), do tipo de fermentador (frasco Erlenmeyer, fermentador de 300 mL e fermentador de bancada) e da aplicação de CM (gerados por bobina ou por ímãs). Foram utilizados delineamentos experimentais para reduzir o número de ensaios e analisar simultaneamente as variáveis estudadas, obtendo-se assim os efeitos de cada variável sobre as respostas da concentração celular e de GSH e também os modelos matemáticos que descrevem as condições do processo.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 avaliando a influência da aplicação de campos magnéticos durante o processo de fermentação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

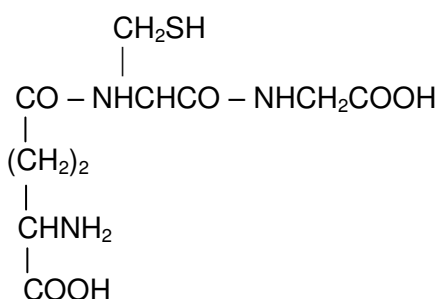
- Determinar temperatura, pH, agitação, concentração inicial de glicose e concentração de inóculo que promovam a máxima produção de glutatona em frascos Erlenmeyer;
- Otimizar o processo de obtenção de glutatona em frascos Erlenmeyer em relação aos parâmetros estudados;
- Avaliar a produção de glutatona no fermentador de bancada, utilizando as condições otimizadas de pH, temperatura, concentração de inóculo e de glicose nos frascos Erlenmeyer e determinar as melhores condições de agitação, aeração, adição de aminoácidos e fonte de nitrogênio;
- Verificar a influência dos campos magnéticos gerados por uma bobina durante a produção de glutatona em função do tempo de tratamento e indução magnética;
- Avaliar a influência de campos magnéticos gerados por ímãs no processo de produção de glutatona em fermentador de bancada com reciclo celular em função do tempo de tratamento magnético.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GLUTATIONA

Glutation ou glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina (Figura 1). Foi descoberta em um extrato etanólico de leveduras de panificação em 1888 e foi chamado de “philothion” (LI et al., 2004), sendo renomeado e isolado pela primeira vez em 1921 por Hopkins, a partir de leveduras, fígado e músculo de animais (LI et al., 2004; LIU et al., 1999).



**Figura 1:** Fórmula estrutural da glutathione.

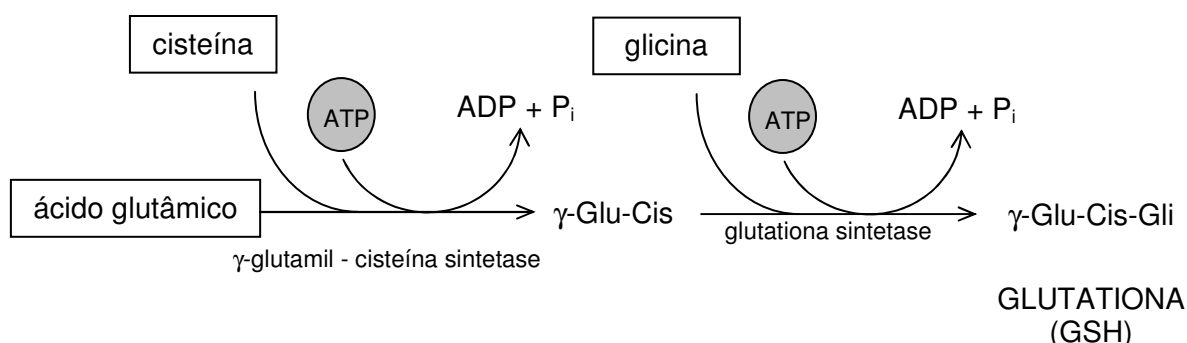
A GSH é o composto sulfurado não protéico encontrado em maiores quantidades na maioria das células de plantas, animais e microrganismos, sendo sua principal função evitar a oxidação celular (CHA et al., 2004; DONG et al., 2007; GOTOH et al., 2004; LI et al., 2003; LI et al., 2005; LIN et al., 2004; SCHMIDT e KONETZKA, 1986; SUZUKI et al., 1999; WEN et al., 2004; WEN et al., 2005).

Alguns autores citaram as quantidades de GSH encontradas em alguns organismos:

- 3 a 7 mmoles/kg de *Saccharomyces cerevisiae* (BAUER, 1986);
- 1% do peso seco da *S. cerevisiae* (ELSKENS et al., 1991);
- 0,5 a 1% do peso seco de *S. cerevisiae* (PENNINCKX, 2000);
- 0,5 a 10 mmol/L em células de mamíferos (ROVER Jr. et al. 2001);
- concentrações de até 10 mM na maioria das células vivas de organismos procarióticos e eucarióticos (PENNINCKX, 2002);
- 0,1 a 1% em leveduras selvagens (LI et al., 2004).

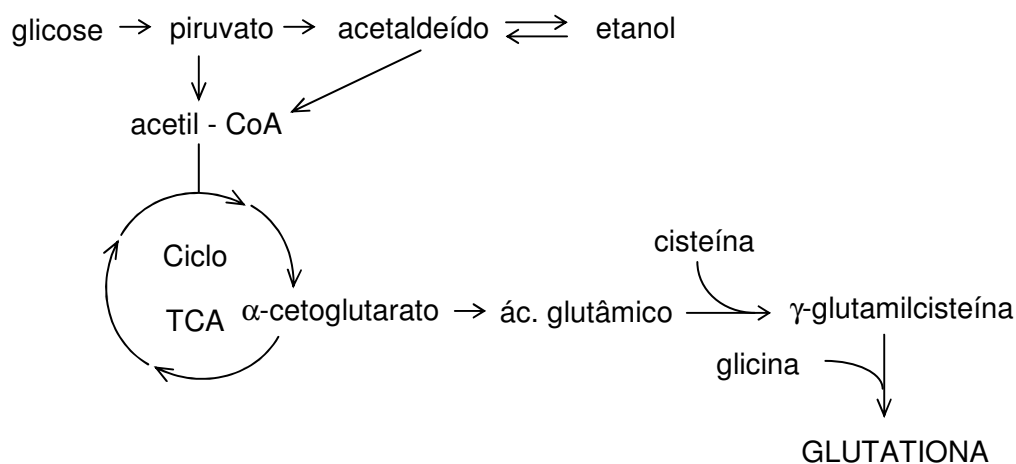
Algumas cepas de *Saccharomyces* e *Candida* foram submetidas a técnicas físicas e

químicas para obter cepas mutantes e, com isso, a quantidade de GSH chegou a 3-5% do peso seco (LI et al., 2004). A GSH é sintetizada através de consecutivas reações enzimáticas, catalisadas pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase (GSH I, EC 6.3.2.2) e glutathiona sintetase (GSH II, EC 6.3.2.3) a partir de ácido glutâmico, L-cisteína e glicina, na presença de ATP, que é desdobrado a ADP e fosfato para cada ligação peptídica produzida, conforme Figura 2 (BAUER, 1986; FAN et al., 2004; GRANT et al., 1996; LI et al., 1998; LI et al., 2005; MURATA et al., 1981; PENNINGX, 2002).



**Figura 2:** Esquema da biossíntese de glutathiona (GSH).

A Figura 3 apresenta o caminho metabólico da GSH dentro das leveduras. A glicose inicialmente é transformada em piruvato, que é transformado em acetil-CoA, participando assim do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com liberação de energia. Para a formação da GSH, o ácido glutâmico provém do  $\alpha$ -cetoglutarato, que é um composto do ciclo do TCA. Quando é fornecido à levedura um excesso de glicose ocorre a produção de etanol através do efeito Crabtree. Havendo quantidades insuficientes de glicose no meio, o etanol pode ser assimilado e a GSH produzida (SHIMIZU et al., 1991).



**Figura 3:** Metabolismo da glutathiona nas leveduras. (SHIMIZU et al., 1991)

Sakato e Tanaka (1992) relataram que a produção de GSH é linearmente dependente do tempo de consumo de etanol, pois não foi observado aumento nas concentrações de GSH após acabar o etanol do meio. A concentração de GSH intracelular está relacionada com a morfologia celular e a presença de etanol exerce um papel importante na mudança da morfologia das leveduras.

Wen et al. (2006) citaram que a concentração de etanol no meio tem grande efeito na concentração de GSH, sendo que altas concentrações inibem o crescimento celular, por isso, os níveis de etanol devem ser mantidos baixos.

Fahey et al. (1978) quantificaram a GSH em bactérias gram negativas e positivas. As bactérias foram cultivadas nos meios de cultivo e nas temperaturas adequados para cada cepa. A GSH foi detectada em poucas bactérias gram-positivas e na maioria das gram-negativas. Dentre as gram-positivas, a que apresentou a maior concentração foi *Streptococcus lactis* (5  $\mu\text{mol/g}$ ), e dentre as gram-negativas a *Escherichia coli* (30  $\mu\text{mol/g}$ ) e *Alcaligenes faecalis* (23  $\mu\text{mol/g}$ ).

Grant et al. (1996) relataram que o requerimento de GSH difere para organismos eucarióticos e procarióticos. É um componente essencial durante os processos metabólicos normais nas leveduras, o que não ocorre com as bactérias, nas quais não é um metabólito essencial. Stephen e Jamieson (1996) citaram que para a *S. cerevisiae* é um importante antioxidante, enquanto que para a *E. coli* é um antioxidante dispensável na sua composição. Li et al. (2005) citaram que a GSH é encontrada principalmente em microrganismos eucarióticos e em bactérias gram-negativas e raramente em bactérias gram-positivas.

A biossíntese da GSH em humanos ocorre em todos os tipos de células, sendo o fígado o principal produtor e exportador. Recentes estudos mostraram dados suficientes para afirmar que a cisteína é geralmente o aminoácido limitante na síntese de GSH em humanos, bem como em ratos, porcos e frangos (WU et al., 2004).

Cerca de 90% da GSH é normalmente encontrada na forma reduzida (GSH), porém várias outras formas estão presentes nas células microbianas, nos tecidos e no plasma. A glutathiona oxidada (GSSG), formada pela oxidação da GSH, pode ser reduzida através da glutathiona redutase na presença de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Além da GSSG, podem ocorrer outras formas, por exemplo, GS-S-CoA, CS-S-cis e GS-S-proteína

que são formadas através de “glutathionilação” (LI et al., 2004).

De forma complementar ao sistema de defesa enzimático, no qual participam a catalase e a superóxido dismutase, todas as células possuem um sistema de defesa não enzimático para proteger os constituintes celulares dos radicais livres e formas reativas do oxigênio e manter o potencial redox da célula (STEPHEN E JAMIESON, 1996). A função mais importante da GSH é atuar como antioxidante contra os efeitos tóxicos do oxigênio e outros compostos oxidantes. Ela não reage somente com o grupo  $\text{OH}^{\cdot}$  produzindo  $\text{H}_2\text{O}$ , mas também serve como um doador de elétrons para a enzima antioxidante, GSH peroxidase (FAN et al. 2004). Está envolvida nos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa contra espécies reativas do oxigênio. Sendo também um co-fator de enzimas envolvidas nos mecanismos antioxidantes de defesa (GRANT et al., 1996). Devido a sua função antioxidante atua na proteção do DNA, proteínas e outras biomoléculas contra perdas por oxidação geradas, por exemplo, devido a espécies reativas do oxigênio (LI et al., 2004; WU et al., 2004).

Sua função antioxidante está fortemente associada com o seu papel em manter o equilíbrio iônico das células, pois afeta amplamente as reações de oxidação e redução nestas (LIU et al., 1999; SHIMIZU et al., 1991; WEI et al., 2003a).

Tem a capacidade de proteger as células, durante condições de estresse, mantendo as funções básicas em condições normais (PENNINCKX, 2002; WEI et al., 2003a; WEI et al., 2003b). Nos tecidos vivos desempenha um papel importante na biorredução, na proteção contra estresse oxidativo, na desintoxicação de metabólitos endógenos tóxicos e de oxoaldeídos endógenos, na atividade enzimática, na biorredução de drogas e no metabolismo do enxofre e do nitrogênio (ELSKENS et al., 1991; PENNINCKX, 2000; PENNINCKX, 2002; ROLLINI e MANZONI, 2006). Acredita-se também que possui função de estoque, como glicogênio, trealose, polifosfatos e lipídios (ELSKENS et al., 1991).

A função de proteção celular da GSH está associada a uma reação não específica que ocorre entre o seu grupo sulfidril e o oxidante, sendo que o produto reduzido resultante geralmente não é tóxico (SCHMIDT e KONETZKA, 1986). Além disso, possui um importante papel nas funções imunes pela produção dos glóbulos brancos do sangue e é um dos agentes antiviróticos conhecidos mais potentes (LI et al., 2004; WU et al., 2004).

A GSH peroxidase, encontrada em muitos tecidos de origem animal, participa de um

importante sistema de defesa enzimático que atua contra o aumento de radicais livres. Outra enzima que age conjuntamente é a GSH redutase. Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutatona a sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo da GSH. Ela e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer. (ROVER Jr. et al. 2001).

Devido à sua quantidade abundante na célula e à presença de grupos sulfidril ativos, qualquer mudança nos níveis de GSH ou na proporção GSH/GSSG (glutathiona/glutathiona oxidada) pode ser percebida pela célula e usada como um sinal para ocorrer uma adaptação a uma situação de estresse (STEPHEN E JAMIESON, 1996).

Em particular, os problemas na síntese e metabolismo da GSH estão associados a algumas doenças, nas quais os seus níveis e os das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como no de outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo. As mudanças na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas, como anemias causadas por infecções ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes, no monitoramento da eficácia de alguns tratamentos usando N-acetil-L-cisteína (NAC) durante o metabolismo do paracetamol, no tratamento de pacientes com artrite reumatóide e na investigação do estresse oxidativo do miocárdio. Há alguns anos, foi reportada a diminuição dos níveis da GSH em hemácias e plasma de pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência (HIV-1), associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ROVER Jr. et al. 2001).

Em humanos, sua deficiência está ligada ao envelhecimento e várias doenças: infecção por HIV, cirrose hepática, doenças pulmonares, gastrointestinais, inflamação no pâncreas, diabetes e doenças neurodegenerativas (LI et al., 2004; WU et al., 2004). Em células cancerígenas a concentração de GSH chega a ser de 5 a 50 vezes maior do que em células normais (ROTH et al., 2002). Os estudos de Reinert et al. (1991) demonstraram que o conteúdo de GSH nos tecidos diminuiu drasticamente durante o desenvolvimento e progressão de um tumor de pele.

Sakato e Tanaka (1992) citaram que a GSH tem importantes aplicações no tratamento

de doenças do fígado, enquanto Liu et al. (1999) e Shimizu et al. (1991) relataram que, além da utilização no tratamento de doenças do fígado, pode ser usada como purificador de toxinas.

A GSH pode ser usada como uma fonte endógena de enxofre (ELSKENS, 1991; GHARIEB e GADD, 2004; PENNINCKX, 2000) e de nitrogênio na levedura *S. cerevisiae* (GHARIEB e GADD, 2004). A maior parte do excesso de enxofre é incorporada na GSH como um nutriente na presença de sulfato (PENNINCKX, 2000).

Gharieb e Gadd (2004) citaram que a GSH desempenha uma função de proteção da célula contra biocidas e certos íons metálicos. É um tripeptídeo importante no acúmulo e na desintoxicação de Cd (cádmio) e Se (selênio). Porém com outros íons mostrou independência à tolerância na *S. cerevisiae*. Dentre estes íons pode-se citar: Te (telúrio), Zn (zinco), Co (cobalto), Cu (cobre), Mn (manganês), Ni (níquel) e Cr (cromo).

Por ser considerada uma poderosa, versátil e importante molécula de defesa, pode ser usada como retardadora do envelhecimento e como uma importante droga no tratamento de numerosas doenças, tais como infecções por HIV, cirrose hepática e inflamações no pâncreas (ROLLINI e MANZONI, 2006).

O stress causa um aumento no consumo de energia nas leveduras, que induz a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras. A trealose e a GSH são exemplos destas moléculas produzidas pela *S. cerevisiae* sob condições de estresse, tais como: redução de nutrientes, choque osmótico ou aumento da temperatura (Dong et al., 2007).

Vários estudos sobre a produção de GSH têm sido feitos com células animais, bactérias e leveduras (LI et al. 1998). A descoberta de mais funções e propriedades da GSH tem aumentado o interesse e a demanda comercial das indústrias de aditivos para alimentos, de terapêuticos, farmacêutica, de nutrição esportiva e de cosméticos (LI et al. 1998; LI et al., 2004; NIE et al., 2005; WEI et al., 2003a; WEI et al., 2003b).

Zhang et al. (2007) citaram que a GSH é amplamente usada como um composto na indústria farmacêutica e tem o potencial de ser usada nas indústrias de aditivos para alimentos e indústrias de cosméticos.

Maccarone et al. (1985) estudaram a estabilidade de antocianinas em suco de laranja através da adição de antioxidantes. A GSH foi utilizada para reduzir as oxidações química e

enzimática. Foi observado que a GSH, em conjunto com ácido tartárico, foi capaz de estabilizar a cor, sendo que o melhor resultado foi observado quando a amostra foi pasteurizada e, em 100 mL de suco, adicionados 250 mg de ácido tartárico e 100 mg de GSH.

A GSH desempenha um papel no desenvolvimento do “flavor” em queijos. Por isso, o seu acúmulo e a hidrólise por bactérias ácido lácticas são de grande interesse. Estudos anteriores mostraram que a adição de GSH durante a produção de queijo aumentou o crescimento das bactérias, a proteólise, a estabilidade e a atividade das esterases, a formação de metanetiol e de sulfito de hidrogênio e aumentou o desenvolvimento das características de “flavor” do queijo Cheddar (FERNÁNDES e STEELE, 1993; WIEDERHOLT e STEELE, 1994). O mecanismo pelo qual a GSH influencia o desenvolvimento de “flavor” é desconhecido, entretanto algumas possibilidades podem ser citadas: 1) contribuição para a formação de potencial redox baixo; 2) estabilização das enzimas; 3) atuação como um cofactor para as enzimas; 4) ação como um precursor para os compostos sulfurados do “flavor”, tais como metanotiol e sulfito de hidrogênio (WIEDERHOLT e STEELE, 1994).

A levedura *S. cerevisiae* possui uma membrana celular contendo duas camadas de fosfolípídios, e somente moléculas pequenas (por exemplo: O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) conseguem passar através da membrana livremente. Em geral, a GSH não pode ser excretada no meio a partir de células vivas. A excreção somente pode ser provocada através da ruptura da membrana celular (WEI et al., 2003b).

Gotoh et al. (2004) estudaram a separação de GSH dos seus aminoácidos (cisteína, glicina e ácido glutâmico) através de nanofiltração e os resultados mostraram que isto é possível durante a síntese enzimática da GSH.

### 3.2 PRODUÇÃO DE GLUTATIONA

As pesquisas com a produção enzimática e por fermentação da GSH foram mais intensas entre 1976 e 1985, no Japão. A produção de GSH por fermentação com leveduras e sua comercialização começaram no início dos anos 80. Desde então, o número de patentes da produção de GSH diminuiu drasticamente. A produção enzimática não tem sido empregada devido aos seus altos custos (LI et al., 2004).

Pode ser produzida a partir de métodos químicos, reações enzimáticas e através de fermentação com microrganismos (WEN et al., 2004). Alguns métodos químicos e enzimáticos têm sido estudados. Entretanto, o método enzimático não tem aplicação prática, pois as enzimas envolvidas requerem ATP para realizar as suas reações e um sistema de regeneração para um desempenho favorável. Na síntese química ocorre o envolvimento de um grupo sulfidril altamente suscetível à oxidação, além da adição do peptídeo  $\gamma$ -glutamil que também dificulta a síntese (GOTOH et al. 2004).

A GSH pode ser produzida a partir de microrganismos tais como a cianobactéria *Phormidium lapideum* (SAWA, et al., 1986) e a bactéria *E. coli* (LI et al., 1998; MURATA et al., 1980; SCHMIDT e KONETZKA, 1986). Algumas espécies de leveduras têm habilidade de acumular GSH nas células. Por isso, a fermentação com leveduras é o método mais prático e eficiente para se produzir industrialmente. As leveduras mais utilizadas são cepas de *S. cerevisiae* e *Candida* (ALFAFARA et al., 1992a; ALFAFARA et al., 1992b; GOTOH et al., 2004; LI et al., 2004; WEI, et al., 2003a; WEI, et al., 2003b; WEN et al., 2004; WEN et al., 2005).

Wen et al. (2005) concluíram que a produção de GSH por fermentação pode ser dividida em três fases: I, II e III. Na fase I (0-8 h) ocorre o consumo de glicose e a produção de etanol: os níveis de glicose diminuem gradualmente, enquanto as concentrações de etanol e de GSH aumentam. Na fase II (8-14 h) acontece a utilização do etanol: o crescimento celular ocorre de forma mais lenta e o etanol é utilizado como fonte de carbono para o crescimento celular e para a síntese de GSH. Na fase III (14-24 h) ocorre a chamada fase estacionária: a glicose e o etanol são consumidos e as células param de crescer. A GSH é acumulada nas fases II e III.

Foram encontradas maiores concentrações de GSH na *E. coli* quando esta foi cultivada em condições aeróbias. Os maiores valores foram observados durante a fase estacionária, mas durante a formação de esporos GSH não foi detectada (FAHEY et al., 1978).

Izawa et al. (1995), avaliando a adaptação da *S. cerevisiae* S288C ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, observaram que os níveis de GSH encontrados durante a fase estacionária ( $6,89 \mu\text{mol/g}_{\text{célula}}$ ) foram aproximadamente três vezes maiores do que na fase logarítmica ( $2,22 \mu\text{mol/g}_{\text{cél}}$ ).

Suzuki et al. (1999) citaram que na *E. coli* a GSH foi acumulada durante a fase

exponencial e a concentração chegou ao seu valor máximo no começo da fase estacionária. Este tripeptídeo também pode ser utilizado como uma fonte exógena de cisteína e glicina.

Um fator limitante para o acúmulo de GSH na célula é o oxigênio dissolvido (OD). Nas células de leveduras a síntese deste tripeptídeo requer a participação de moléculas de ATP. Altos níveis de OD são favoráveis para a produção de ATP e regeneração do ADP a ATP, favorecendo assim a produção de GSH. Durante a fermentação, a formação de etanol é indesejada, pois não favorece o crescimento celular. Os fatores mais importantes que afetam uma fermentação tipo batelada alimentada são o acúmulo de etanol e a concentração de oxigênio no meio de fermentação. Valores de  $\mu$  (velocidade específica de crescimento) relativamente baixos, nutrientes em quantidade suficiente e altos valores de OD são benéficos para evitar o acúmulo de etanol e fazer com que sejam alcançados altos níveis de concentração celular e de GSH (LIN et al., 2004).

Na cianobactéria *Phormidium lapideum*, Sawa et al. (1986) observaram que 20% da GSH foi encontrada na forma intracelular e 80% foi excretada para fora da célula.

Nas leveduras, a GSH encontra-se no interior da célula. Desta forma, o aumento da produção pode ocorrer de duas formas: aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular (WEN et al., 2004; WEN et al., 2006). Comparativamente é mais fácil aumentar a concentração celular através das tecnologias de fermentação desenvolvidas, do que aumentar o conteúdo intracelular de GSH. Porém, a segunda opção é mais atraente, porque além de aumentar a concentração de GSH pode ocorrer a facilitação nas etapas de “downstream” (WEN et al., 2004). A excreção da GSH no meio é uma etapa a mais durante o processo de produção. Para isto, devem ser estudadas formas de aumentar os níveis de GSH extracelular, mas poucos trabalhos têm sido realizados neste sentido (WEI et al., 2003b).

A fermentação de batelada alimentada é um dos métodos mais eficientes para alcançar altos níveis de densidade celular com leveduras. Entretanto, a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) durante a batelada alimentada deve ser cuidadosamente controlada para evitar um declínio da concentração intracelular da GSH (LI et al., 2004).

De acordo com Tadayuki et al. (1985), citado por Wei et al., (2003a), o crescimento celular, a formação de GSH e o seu conteúdo intracelular são influenciados pela temperatura.

Em geral a temperatura ótima para o crescimento celular e produção de GSH são diferentes.

Wei et al., (2003a) estudaram os efeitos da temperatura na fermentação em batelada usando *Candida utilis* WSH 02-08. A máxima concentração de GSH foi a 26°C e o crescimento celular foi a 30°C. Como as temperaturas necessárias para obter os máximos valores de concentração celular e de GSH foram diferentes, foi utilizada uma estratégia de manter a temperatura a 30°C nas primeiras 8 h e depois diminuir para 26°C a fim de aumentar a produção de GSH. Nestas condições foi alcançada a maior concentração de GSH, 385 mg/L.

As enzimas envolvidas na síntese da GSH utilizam magnésio e potássio como cofatores, sendo que as quantidades destes elementos encontradas nas células de leveduras são aproximadamente 1,9 e 0,1% (peso seco), respectivamente. Porém, Bauer (1986) não observou aumento na produção de GSH quando estes minerais foram adicionados ao meio de cultivo.

Fernandes e Steele (1993) citaram que o tipo de meio de crescimento afetou a concentração do conteúdo intracelular da GSH, mas não a sua presença ou ausência.

Liu et al. (2004) relataram que a biossíntese de GSH requer, além de ATP, os três aminoácidos precursores (ácido glutâmico, cisteína e glicina). Sem a suplementação destes no meio, as concentrações intracelulares foram mantidas nos seus níveis fisiológicos e a síntese de GSH foi inibida.

Murata et al. (1980) estudaram o processo de produção de GSH em coluna por *E. coli* imobilizada em gel de carragena. O reator foi composto por dois sistemas reacionais. No primeiro a produção de GSH foi catalisada pela enzima GSH sintetase e no segundo o ATP consumido na produção de GSH foi regenerado. O tempo de vida útil da coluna foi de oito dias.

Ohwada e Sagisaka (1990) observaram aumento nos níveis de GSH quando as células de *E. coli* foram submetidas a estresse osmótico, através da adição de NaCl ou sacarose. Os níveis de GSH aumentaram 2,5 vezes com a sacarose (0,51 M) e 4 vezes com o NaCl (0,1-0,4 M). Com concentrações de NaCl superiores a 0,6 M, a GSH foi excretada da célula para o meio. No ensaio em que foram adicionados os aminoácidos precursores, foi obtida uma concentração de GSH 10 vezes maior que nos ensaios sem a adição.

Li et al. (1998) estudaram a produção de GSH por *E. coli* WSH-KE1 modificada

geneticamente. Foram feitas fermentações (batelada alimentada) em fermentador de 2 L, com meio contendo extrato de levedura, glicose, sais minerais e os aminoácidos precursores, sendo estudadas três estratégias de alimentação de nutrientes. A adição de aminoácidos no começo da fermentação inibiu o crescimento do microrganismo. Porém, quando esta mistura foi adicionada após 12 h de fermentação, as quantidades de concentração celular e de GSH foram maiores. Os mesmos autores observaram que a adição de glicose durante o processo de batelada alimentada pode aumentar os níveis de GSH intracelular e a concentração celular. Os melhores valores de concentração celular (80 g/L), produtividade (3,2 g/L.h) e concentração de GSH (880 mg/L) foram observados no ensaio com alimentação exponencial.

Li et al. (2003) avaliaram a concentração de GSH em várias subespécies e cepas de *Lactococcus lactis*. Para tal, foram utilizadas condições aeróbias e anaeróbias de crescimento e dois meios de crescimento, M17 e CDM (“chemically defined médium”). A GSH não foi detectada nas 21 cepas quando utilizado o meio CDM e nem sempre o acúmulo de GSH estava relacionado com a aeração.

Li et al. (2005), utilizando *Lactococcus lactis* NZ 9000 modificada geneticamente, avaliaram a produção de GSH em dois meios de cultura, M17 e CDM (meio definido previamente por Li et al. 2003). Foi observado que no meio M17 a concentração de GSH foi oito vezes maior do que no meio CDM. Isto indicou que a composição do meio de cultura pode afetar significativamente a produção de GSH. Os três aminoácidos precursores da GSH foram adicionados em combinações diferentes, para aumentar a produção de GSH utilizando o meio CDM. Nos ensaios com adição de cisteína, ocorreu um aumento da atividade da enzima GSH sintetase, promovendo o aumento da conversão da  $\gamma$ -glutamilcisteína em GSH, por mecanismo não. A cisteína foi um aminoácido fundamental para a síntese da GSH, sendo que a manutenção dos níveis celulares depende da disponibilidade e do transporte até as células.

Nie et al. (2005) citaram que a síntese de GSH foi essencial para o crescimento celular em condições de estresse. Desta forma, se a levedura for submetida a tais condições a produção de GSH possivelmente aumentará. Foram feitas fermentações utilizando *C. utilis* WSH-02-08 e os efeitos que o estresse, através do pH baixo, e a adição de glicose durante a fermentação, causam na célula, foram estudados. Foi utilizado um fermentador de 7 L, com aeração de 5 L/min, agitação de 300 rpm e 10% de inóculo. Paralelamente, foram realizados experimentos com controle de pH. A concentração de GSH foi maior nos ensaios com controle

de pH (332 mg/L) em relação aos ensaios sem controle (171 mg/L). Quando as células foram submetidas a pH baixo ocorreu a excreção da GSH para o meio e este fato foi importante, pois simplifica os processos de extração do produto. A maior concentração de GSH (737,1 mg/L) foi observada no ensaio em que o pH foi mantido em 5,5 por 24 h, após este período foi diminuído para 1,2 durante 3 h e em 27 h de fermentação foi adicionado glicose (30 g/L) e o pH elevado para 5,5.

Rollini et al. (2005) investigaram o acúmulo de GSH em algumas espécies de *Candida* (13 cepas) e *Pichia* (11 cepas). As fermentações foram conduzidas em um meio suplementado com diferentes fontes de carbono, metanol, etanol e glicose. As maiores concentrações celulares foram evidenciadas com glicose (9,9 g/L para *C. nemodendra*) e etanol (9,7 g/L para *P. pastoris*), enquanto os menores valores foram observados com metanol (menor que 4,0 g/L para 80% das cepas de *Candida* e para 40% de *Pichia*). Entretanto as porcentagens de GSH foram maiores utilizando metanol como fonte de carbono, 3,9 e 3,5% para *C. pini* e *P. philodendri*, respectivamente.

### 3.2.1 Produção de Glutathiona por *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida por conseguir diferentes mecanismos adaptativos, com o intuito de sobreviver mesmo em condições de estresse, sendo que as mais comuns incluem choques de pH e de temperatura, estresse oxidativo, choque osmótico e os produtos de fermentação tóxicos, principalmente o etanol (PENNINCKX, 2000).

Murata et al. (1981) estudaram a produção de GSH utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* IFO 2044 em gel de poliácridamida e compararam com células não imobilizadas. As melhores condições foram: glicose 0,5 M, tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), cloreto de magnésio 0,02 M e 0,025 M de cada um dos três aminoácidos precursores. Nas células imobilizadas a GSH foi excretada no meio, enquanto nas células não imobilizadas a GSH foi acumulada na célula. As maiores concentrações de GSH foram encontradas após 24 h de incubação com as células imobilizadas.

Bauer (1986) verificou que utilizando *S. cerevisiae* para produção de GSH as temperaturas nas quais foram obtidas a mínima e a máxima concentração foram 26°C e 28,8°C, respectivamente. Altas concentrações de GSH foram observadas quando se aumentou o nível

dos aminoácidos cisteína e ácido glutâmico no meio de cultivo.

Shimizu et al. (1991) estudaram a otimização da produção de GSH através do controle da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) em fermentação em batelada alimentada, utilizando *S. cerevisiae* KY5711. Estes autores citaram que a produtividade depende da fonte de carbono utilizada. Da mesma forma, o valor máximo de  $\mu$  coincidiu com o máximo  $\rho_G$  (velocidade específica de produção de GSH) que decresceu quando houve produção de etanol ou quando a concentração de glicose presente foi muito alta. Para valores de  $\mu \leq 0,3 \text{ h}^{-1}$  o conteúdo de GSH foi constante e para valores de  $\mu$  maiores que  $0,3 \text{ h}^{-1}$  o conteúdo de GSH diminuiu.

Alfafara et al. (1992a) estudaram o efeito da adição de 7,4 mM de cisteína, glicina e ácido glutâmico na produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* KY5711 em frascos Erlenmeyer. Foi utilizado glicose (10 g/L), temperatura de 30°C e pH<sub>inicial</sub> 5. Em todos os ensaios, após 6 h de fermentação, a glicose foi completamente consumida e após este período o crescimento celular pode ter ocorrido devido ao consumo do etanol. Nos ensaios com adição de cisteína foram obtidas concentrações maiores de GSH e não foi observado crescimento celular na segunda fase (fase de consumo do etanol), o que indicou que este foi o aminoácido “chave” durante a síntese da GSH e que a cisteína pode inibir de alguma forma a assimilação do etanol. Não há uma explicação de como a cisteína inibiu a assimilação do etanol e a forma de como ela atuou na síntese da GSH é aparentemente complexa, pois foi observado que o seu modo de atuação foi diferente de como um precursor atua. Quando a concentração inicial de cisteína foi de 2 a 3 mM foram obtidas 7 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>/h de GSH e concentrações maiores não promoveram aumento do produto.

Alfafara et al. (1992b) analisaram a produção de GSH com *S. cerevisiae* KY5711 e para tal utilizaram temperatura de 30°C e pH controlado em 5,4. Durante a fermentação, a concentração de cisteína foi mantida em 3 mM através de alimentação constante, porém foi verificado que houve um declínio nos valores da velocidade específica de crescimento e velocidade de produção de GSH após longos períodos de exposição à cisteína. A máxima conversão de célula em produto foi de 12-14 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>. Quando a alimentação de cisteína foi feita em pontos isolados durante a fermentação os resultados foram melhores em relação a alimentação constante (aproximadamente 22 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>). Uma das opções para aumentar a

produção seria dividir a fermentação em duas etapas: crescimento celular e produção de GSH.

Sakato e Tanaka (1992) avaliaram o processo de fermentação em batelada alimentada para obtenção de GSH em fermentador de 30 L. O microrganismo utilizado foi *S. cerevisiae* KY 6186 e as condições da fermentação foram: pH 5,1, temperatura de 30°C, aeração de 11 L/min e 350 rpm. O meio usado para a alimentação foi melaço de cana de açúcar (100 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,5 g/L) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,5 g/L). Comparando com o processo convencional foi obtido aumento de cerca de 40% na concentração de GSH.

Liu et al., em 1999, estudaram a otimização do meio da cultura para produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* ATCC 7754. As fermentações foram conduzidas em frascos de Hinton (50 mL) contendo 10 mL de meio, a 30°C, 150 rpm e 4% de inóculo. Várias fontes de carbono, nitrogênio e sais foram testadas para determinar os melhores componentes, tanto para a produção de GSH como para a produção de células. A maior concentração de GSH (115,28 mg/L) foi obtida com o meio contendo 5,20% de glicose, 4,84% de peptona e 1,16% de sulfato de magnésio. A maior concentração celular (9,45 g/L) foi obtida com o meio composto por 8,45% de glicose, 8,86% de peptona e 1,63 de sulfato de magnésio.

Wei et al. (2003b) avaliaram o efeito da adição de surfactantes durante a produção de GSH por *S. cerevisiae* WSH-J701. As fermentações foram feitas em frascos Erlenmeyer e as condições de cultivo foram pH<sub>inicial</sub> 5, 30 g/L de glicose, 200 rpm e 1% de inóculo. Após 32 h de cultivo a concentração foi de 64,7 mg/L e a produção de GSH estava associada ao crescimento celular. Em relação à adição de surfactantes, somente quando baixas concentrações foram adicionadas ao meio ocorreu aumento da quantidade de GSH total e sua excreção para o meio extracelular. Este fato ocorreu quando as concentrações de sulfato de sódio dodecil estavam entre 0,001 e 0,1 g/L, brometo de cetiltrimetilamonio entre 0,001 e 0,01 g/L, éter lauril polioxietileno entre 0,01 e 5,0 g/L.

Cha et al. (2004) estudaram a influência da adição de aminoácidos, sais, fonte de carbono e nitrogênio na produção de GSH por *S. cerevisiae* FF-8. Foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer a 30°C e 100 rpm por 72 h. Várias fontes de carbono foram testadas (glicose, galactose, frutose, lactose, maltose e sacarose) e o melhor resultado (57,6 mg/L) foi conseguido com glicose. Foram testadas dez fontes de nitrogênio e o melhor resultado, 88,4 mg/L, foi encontrado quando utilizado extrato de levedura. Dentre todos os sais testados, o único que inibiu a produção de GSH foi o  $\text{FeSO}_4$ , e o melhor resultado foi com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (144,8

mg/L). Em relação aos aminoácidos, a maior concentração de GSH (204 mg/L) foi obtida quando a L-cisteína foi adicionada. O meio de cultivo com melhor resultado continha: glicose 3%, extrato de levedura 3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06% e L-cisteína 0,06%.

Fan et al. (2004) utilizaram *E. coli* modificada geneticamente através da inserção de um gene da *S. cerevisiae* YSG-26 para a produção de GSH. A maior conversão de células em produto foi de 13,1  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  obtido após 36 h.

Lin et al. (2004) analisaram a produção de S-adenosil-L-metionina e GSH através de fermentação em batelada alimentada e obtiveram 0,81 g/L de GSH e concentração celular de 105 g/L. Para tal, utilizaram *S. cerevisiae* ZJUS1 e as condições de cultivo foram: concentração inicial de glicose de 10 g/L, concentração de glicose na alimentação de 800 g/L, velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) mantida em  $0,13 \text{ h}^{-1}$ , pH controlado em 5 e temperatura de 28°C.

Liu et al. (2004) utilizaram *S. cerevisiae* proveniente de uma indústria cervejeira para a produção de GSH. Foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer (500 mL) e em fermentador de 15 L. Nos frascos as condições de cultivo foram 28°C, 180-190 rpm por 24 h e foram testados os efeitos da concentração de glicose e do volume de meio. Os maiores resultados ( $\cong 10 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ) foram obtidos com 10 g/L de glicose e com 10 mL de meio. No fermentador as condições foram 500 rpm, 28°C e os níveis de aeração foram testados. O maior resultado (18  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ) foi obtido com 3,0 vvm.

Wen et al. (2004) estudaram a adição de aminoácidos durante a fermentação para aumentar a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* T65. As condições de cultivo utilizadas nos frascos Erlenmeyer foram: 30°C, 20% (v/v) de inóculo e 180 rpm por 24 h. Vários aminoácidos foram testados e também diferentes estratégias para adição destes. O melhor resultado (153,2 mg/L) foi obtido quando 2 mM de cisteína foram adicionados após 2 h de fermentação e em 7 h adicionados 10 mM de ácido glutâmico, 10 mM de glicina e 10 mM de serina. No fermentador de 5 L foram feitas fermentações de batelada alimentada, sendo adicionada uma solução de vários nutrientes e glicose (60 g/L). Após 6 h de cultivo foram adicionados 2 mM de cisteína e em 35 h de fermentação, 10 mM de ácido glutâmico, 10 mM de glicina e 10 mM de serina. Após 44 h de incubação foram obtidas as maiores concentrações celulares e de GSH sendo estas 133 g/L e 1875 mg/L, respectivamente.

Wen et al. (2005) estudaram a otimização da composição de aminoácidos adicionados

durante a fermentação para produção de GSH. Foi utilizado *S. cerevisiae* T65 e dois tipos de biorreatores (frascos Erlenmeyer e fermentador de 5 L). Nos frascos Erlenmeyer as condições de agitação e temperatura foram: 180 rpm e 30°C por 24 h, respectivamente. Através de um planejamento experimental foi observado que os aminoácidos deveriam ser adicionados em duas etapas: 2 mM de cisteína após 2 h de fermentação e após 7 h, 10 mM de ácido glutâmico, 18 mM de glicina e 3,35 mM de cisteína. A porcentagem de GSH chegou a 1,836%. No fermentador, o pH foi controlado em 5,5 e a temperatura em 30°C. Na fermentação sem adição de aminoácidos a concentração de GSH foi de 170,14 mg/L, enquanto que com a adição de aminoácidos (2 mM após 6 h e 10 mM de ácido glutâmico, 18 mM de glicina e 3,35 mM de cisteína após 12 h) alcançou 329,3 mg/L.

Rollini e Manzoni (2006) avaliaram a influência de alguns parâmetros da fermentação na produção de GSH por *S. cerevisiae* CBS 117. Os parâmetros estudados foram a temperatura (24 ou 30°C) e as concentrações de sulfato de amônio (1 ou 5 g/L), sulfato de magnésio (0,2 ou 1,2 g/L) e de açúcar de beterraba (20 ou 80 g/L). As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer com pH<sub>inicial</sub> de 5,8, 10% de inóculo e 200 rpm, por 24 h. A maior porcentagem de GSH, 1,85%, foi observada no ensaio a 24°C com 5 g/L de sulfato de amônio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio e 20 g/L de açúcar. Não foi detectada GSH no sobrenadante das culturas, o que comprovou a sua natureza intracelular. As condições de fermentação que favoreceram o crescimento celular não corresponderam às condições do maior acúmulo de GSH nas células.

Wen et al. (2006) maximizaram a produção de GSH em fermentação de batelada alimentada através da adição de glicose e aminoácidos em fermentador de 5 L. Foi utilizada uma cepa de *S. cerevisiae* T65, o pH foi mantido a 5,5 e a temperatura a 30°C. Foram feitas três fermentações controlando os níveis de etanol no meio e a glicose foi adicionada de acordo com estes níveis. Na primeira, os níveis foram mantidos até 7,7%, na segunda entre 1,16 e 2,2% e na terceira entre 0,08 e 0,65%. Foi verificado que os níveis mais baixos favoreceram a produção de GSH, desta forma foi feita mais uma fermentação mantendo os níveis de etanol baixos e com a adição dos aminoácidos precursores nos tempos de 24, 44 e 56 h. O melhor resultado foi de 2190 mg/L após 60 h de fermentação.

Dong et al. (2007) avaliaram o efeito das altas pressões no acúmulo de GSH e trealose em *S. cerevisiae*. O meio de cultivo continha, dentre outros nutrientes, 30 g/L de glicose, a

concentração de inóculo foi de 10% (v/v), fermentador de 300 mL (contendo 150 mL de meio), pH<sub>inicial</sub> 6,0 e temperatura de 30°C. O tempo de cultivo foi de 36 h, sendo que pressões de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 MPa foram aplicadas por 2 h. Numa etapa posterior pressões de 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 MPa foram aplicadas por tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 h. A concentração celular apresentou uma dependência com a pressão, sendo que com o aumento da pressão foi observada uma redução das taxas de crescimento. O crescimento celular começou a diminuir após 26 h de cultivo. A morfologia da levedura mudou significativamente com o aumento da pressão comparando-se com os cultivos à pressão atmosférica. O melhor resultado foi observado com pressão de 1,0 MPa por 6 h, a concentração de GSH foi de 103 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub> e este valor foi 68,8% maior em relação ao cultivo à pressão atmosférica.

Wang et al. (2007), utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* G14, avaliaram a produção de GSH em frascos Erlenmeyer (250 mL) e em fermentador de 5 L. Nos frascos foram avaliadas as quantidades adicionadas de aminoácidos precursores, sendo que a maior concentração foi de 530 mg/L na fermentação feita com 4 mM de cada um dos três aminoácidos. No fermentador foi estudado o controle da adição de glicose de acordo com a concentração de etanol e o quociente de respiração e também o efeito da adição dos aminoácidos em diferentes tempos (0, 16, 32 e 48 h). A adição de glicose iniciou após 10 h de fermentação e no ensaio sem adição de aminoácidos foram obtidas 1620 mg/L de GSH após 52 h de cultivo. No ensaio com adição dos aminoácidos após 32 h de fermentação, a concentração máxima foi de 2020 mg/L após 38 h de cultivo.

Zhang et al. (2007) otimizaram o meio de cultivo para a produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* T65. Os ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL de meio. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm. 24 h e 20% de inóculo. O meio otimizado continha: glicose (70 g/L), extrato de levedura (3 g/L), peptona (5 g/L), extrato de malte (70 g/L), melaço (20 g/L), MgSO<sub>4</sub> (5,6 g/L), ZnSO<sub>4</sub> (16 mg/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7 g/L) e tiamina (0,2 mg/L). A concentração de GSH chegou a 74,6 mg/L, que foi 1,81 vezes maior que o ensaio controle.

### 3.3 ESTUDOS E APLICAÇÕES DE CAMPOS MAGNÉTICOS NA BIOTECNOLOGIA

As variáveis mais importantes em processos de fermentação submersa e que devem ser controladas para um bom desempenho dos microrganismos são temperatura, pH,

concentração de nutrientes, pressão, luminosidade, agitação e concentração de oxigênio. Além disso, qualquer corpo sobre a terra está submetido ao efeito de outras variáveis menos palpáveis, mas de igual importância, como os campos magnéticos (CM) (ZAPATA et al., 2002).

A estimulação ou inibição dos processos celulares por CM é de interesse considerável tanto na biologia celular quanto na biotecnologia, não só para estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também para determinar seu potencial em aplicações práticas. Diferentes aspectos têm sido investigados com respeito às suas alterações devido à energia eletromagnética, em relação ao crescimento celular, às reações enzimáticas, à síntese de biopolímeros e ao transporte na membrana nas células (LEI e BERG, 1998).

Algumas das razões pelas quais a eletroestimulação é raramente aplicada aos processos de fermentação são os seus mecanismos complicados, bem como o desconhecimento das condições limite a nível molecular da maioria dos processos de fermentação, particularmente daqueles que envolvem sínteses de produtos extracelulares. Acredita-se que os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos nas pesquisas com CM e as diferenças nos resultados obtidos pelos diferentes pesquisadores podem ocorrer pelos delineamentos experimentais usados, linhagens dos microrganismos, tempo de exposição, sistema usado para a geração e métodos de detecção dos campos (MITTENZWEY et al., 1996).

Baixas frequências (50 ou 60 Hz) e baixos CM podem influenciar os processos metabólicos. A resposta biológica não é linear, de forma que somente para alguns valores de frequência e indução magnética ocorre uma “janela” onde uma resposta significativa pode ser observada. Dependendo da forma e dos valores dos parâmetros característicos (intensidade, frequência, comprimento ou tempo constante no caso dos pulsos) podem ocorrer diferentes efeitos (BLANK, 1993; FOLOGEA et al., 1998). Quando são utilizados campos elétricos intensos dois processos podem estar envolvidos ao mesmo tempo: a estimulação da taxa de divisão celular nas culturas e a morte das células devido à ação do campo (FOLOGEA et al., 1998).

Berg, em 1999, citou que vários efeitos da aplicação de CM e campos elétricos em humanos, organismos, células e em reações enzimáticas homogêneas têm sido descritos tanto em ensaios em laboratórios, quanto sob condições ambientais. Entretanto, há pouca reprodutibilidade dos trabalhos em relação às “janelas eletromagnéticas” observadas no que diz

respeito à frequência, indução magnética e tempo dos tratamentos, além das condições de cultivo (temperatura, componentes do meio, condutividade, etc.).

A natureza dos efeitos produzidos pelos CM depende da energia e da distribuição espacial do campo. A inibição ou estimulação das atividades vitais dos microrganismos pode ser obtida através da escolha apropriada dos parâmetros dos CM (PICHKO e POVALYAEVA, 1996).

Vários são os estudos a respeito dos efeitos dos CM em organismos vivos, porém estes normalmente são conflitantes. Apesar de alguns apresentarem efeitos negativos, a maioria deles apresenta efeitos positivos no crescimento celular, porque os efeitos dependem do CM e o tipo de microrganismo exposto. A razão deste efeito não é totalmente entendida em detalhes, contudo pode-se afirmar que o CM não possui um efeito letal nos microrganismos, mas pode afetar as taxas de crescimento celular (YAVUZ e CELEBI, 2000).

Os efeitos dos campos foram estudados em células, tecidos e organismos vivos. A viabilidade do crescimento celular, a atividade das enzimas, o transporte de íons e a transcrição ou expressão gênicas foram investigados com a obtenção de diferentes resultados (NOVÁK et al., 2007).

Os efeitos dos CM sobre o crescimento celular podem ser classificados em inibitório, estimulante ou nulo (ZAPATA et al., 2002). Os pesquisadores têm várias teorias e explicações acerca de como os CM afetam os microrganismos e as células.

Estudos mostram que com a aplicação de CM podem ocorrer alterações nas taxas de síntese do DNA, RNA e proteína, efeitos no crescimento celular, bem como aumento nos níveis das enzimas envolvidas nestes processos e mudanças nas propriedades da superfície celular (BINNINGER e UNGVICHIAN, 1997). Fologea et al. (1998) citaram que o mecanismo da eletroestimulação não é bem conhecido, mas pode estar ligado a mudanças na membrana, pois durante a eletroestimulação sabe-se que ocorre o aumento dos fluxos na membrana plasmática. Outra explicação pode estar baseada na eletro-ativação de alguns sistemas enzimáticos ou caminhos metabólicos relacionados a alguns processos que acontecem em nível de membrana.

Os efeitos de estímulo ou inibição dos campos são atribuídos a mudanças das

biomembranas (lipídicas ou plasmáticas), mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das biomoléculas (proteínas) (FOJT et al., 2004; STRASÁK et al., 2002; ZAPATA et al., 2002; ZAPATA et al., 2005). Os campos afetam a direção da migração e alteram o crescimento e a reprodução dos microrganismos, gerando uma modificação da velocidade de crescimento celular (ZAPATA et al., 2002; ZAPATA et al., 2005). Pode ocorrer também a formação de radicais livres devido à exposição aos campos (FOJT et al., 2004; STRASÁK et al., 2002).

A utilização de campos de densidade extremamente baixa possibilita a utilização desta tecnologia nos sistemas de cultivo de maior tamanho, sem que o custo dos dispositivos necessários para a implantação deste sistema aumente consideravelmente (ZAPATA et al., 2002).

O estresse térmico (aumento da temperatura) causa nas células uma indução na síntese de certas proteínas. A aplicação de CM é interpretada como um estresse pela célula e o sistema responde através dos mesmos mecanismos. Em células expostas ao CM foram observados desvios no caminho da síntese de proteínas em relação às células sem exposição ao CM. As distribuições do peso molecular e do ponto isoelétrico das proteínas de células submetidas à estimulação com CM ou temperatura são semelhantes, porém deve-se enfatizar que a energia aplicada é bem diferente, pois a energia do CM é muito menor que a energia térmica. As observações permitiram concluir que existem receptores com sensibilidades bem diferentes para cada modalidade e a resposta de cada receptor é proporcional à energia (BLANK, 1993).

Gerencser et al. (1962) investigaram o crescimento de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*) sob a influência de CM de 1,5 T. Paralelamente foram feitos ensaios controle (sem aplicação de CM), sendo que todos os cultivos foram feitos a 27°C por 10 h. Até 6 h de cultivo não foram observadas diferenças entre os ensaios controle e com CM. Em 7 h as culturas com CM apresentaram menores contagens do que no controle. Esta diferença foi maior em 8 h e diminuiu até 10 h quando a cultura controle e com CM apresentaram aproximadamente o mesmo número de células. Assim, a máxima inibição do *S. aureus* e *S. marcescens* foi observada entorno de 6 a 7 h.

Moore (1979) expôs quatro bactérias (*Halobacterium halobium* NRC-34020, *Bacillus subtilis* ATCC 6683, *Staphylococcus epidermis* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721) e uma

levedura a CM de 5–90 mT. As duas bactérias gram negativas (*P. aeruginosa* e *H. halobium*) mostraram crescimento um pouco maior em resposta ao CM em relação às duas bactérias gram positivas (*B. subtilis* e *S. epidermis*) e à levedura. A estimulação máxima do crescimento celular foi a 15 mT e a máxima inibição a 30 mT.

Ramon et al. (1987) observaram o crescimento de cepa mutante de *B. subtilis* FJ7 submetida à aplicação de CM com um par de bobinas Helmholtz com 16 cm de diâmetro, sendo testados os níveis de frequência (800 ou 1000 Hz) e de indução magnética (0,8; 1,6 e 2,5 mT) durante a aplicação dos campos por 30 h. As maiores concentrações celulares foram obtidas com a aplicação de 2,5 mT e 1 kHz.

Grosse et al. (1988) verificaram o efeito dos CM na produção do antibiótico “nourseothricin” por *Streptomyces noursei* ZIMET 43716 durante 150 h de fermentação. Um par de bobinas Helmholtz gerou CM homogêneo menor que 2 mT, sendo este campo fornecido na forma de pulsos com duração máxima de 5 ms. Foram feitos dois ensaios, A e B, com e sem aplicação de CM, respectivamente. A formação do antibiótico foi mais rápida no ensaio A até 50 h, porém no final da fermentação os valores de “nourseothricin” no ensaio B foram maiores.

A eletroestimulação na produção de celulase por *Trichoderma reesei* 43804 (cepa mutante) foi estudada por Kerns et al. (1993) através da utilização de PEMIC (correntes pulsáveis induzidas eletromagneticamente) utilizando uma bobina Helmholtz. Foi observado aumento da produção de celulase, mas este acréscimo ocorreu devido ao aumento da concentração da enzima secretada no caldo de fermentação e não devido à mudança na atividade específica do complexo celular secretado.

Okuno et al. (1993) avaliaram o efeito de CM durante o crescimento de *E. coli* B/rWP2 e *E. coli* B usando diferentes temperaturas e meios de cultivo (meio sintético e meio complexo). O aparato experimental gerou CM de 11,7 T e com as duas cepas no meio complexo foi observado aumento do crescimento celular em relação aos ensaios controle. Com o meio sintético, as taxas de crescimento reduziram significativamente. Quando o crescimento celular ocorreu a temperaturas menores do que a temperatura ótima, os CM aumentaram as taxas de crescimento, independente do meio utilizado, enquanto que em temperaturas mais elevadas do que a ótima o crescimento celular foi menor.

Chacón et al. (1995) estudaram a influência do CM no processo de produção de

biomassa utilizando a levedura *Candida utilis* Y-660. Os resultados alcançados mostraram que o CM estimulou o crescimento celular em aproximadamente 20%. O modelo matemático obtido descreveu um comportamento não linear do processo. A avaliação do planejamento experimental mostrou a influência dos fatores estudados (indução magnética e tempo de tratamento), sendo as variáveis mais significativas o tempo de tratamento da suspensão celular e o efeito de interação de ambas as variáveis.

Mittenzwey et al. (1996) expuseram diferentes bactérias a CM de baixa frequência (2 a 50 Hz) com variação da indução eletromagnética (1 a 10 mT) através de um gerador de CM. Outras variáveis estudadas foram a temperatura e o tempo de exposição, sendo medidos a concentração celular, a síntese de proteínas e a luminescência das bactérias. Os resultados obtidos discordaram dos reportados por outros autores, que encontraram elevados efeitos dos CM, especialmente na cultura de células eucarióticas. Os autores citaram que as bactérias são totalmente resistentes aos CM, provavelmente devido a seus mecanismos de compensação e auto-regulação. Os resultados deste estudo indicaram que os CM nas bactérias podem atuar como um fator co-estressante. Outros processos como, por exemplo, o aquecimento pode ativar estes mecanismos.

Pichko e Povalyaeva (1996) estudaram os efeitos dos CM de baixa frequência na produção de diferentes metabólitos por alguns microrganismos. Em seu estudo, foi utilizado um dispositivo comercial gerador de CM de indução linear (50 Hz e 0,1 T). A exposição do *Penicillium solitum* por 20 min aumentou em 40% a produção da enzima Solizim (complexo de enzimas lipolíticas), porém a exposição por 30 ou 40 min diminuiu a produção em 119 e 108%, respectivamente. Com o *Aspergillus awamori*, o tratamento magnético por 30 min aumentou 18% a biossíntese de glucoamilase sem mudanças na concentração celular, enquanto que em 40 min não houve aumento na atividade. A aplicação por 20 min com *Streptomyces robeus* aumentou a produção de glicoisomerase em 40% e com *B. subtilis* por 40 min aumentou de 30 a 40% a produção de proteinase. Os autores concluíram que os efeitos dos CM nos processos de fermentação estudados, ocorreram devido a uma combinação de efeitos induzidos pelos campos, incluindo ativação dos sistemas enzimáticos, aceleração do transporte de nutrientes e estimulação do metabolismo celular.

Rao et al. (1997) estudaram a influência do CM no cultivo submerso de microrganismos para a degradação de fenol utilizando colunas de bolha e reator air-lift. No

estudo, foi demonstrado que a degradação do fenol no reator air-lift foi mais rápida e que o CM aumentou a velocidade específica de crescimento dos microrganismos, sendo o valor máximo com 22 mT. Os CM foram gerados através da passagem de corrente elétrica por fios de cobre envoltos nos tubos de alumínio.

Hirano et al. (1998) verificaram o comportamento da microalga *Spirulina platensis* IAM M-135 frente à aplicação de CM em condições autotróficas (cultivo com luz) e heterotróficas (cultivo no escuro). O crescimento foi acompanhado através da medida de densidade ótica e foram feitas determinações de ficocianina, clorofila, beta caroteno e gliceroglicolípídios. No cultivo autotrófico foram testados CM de 0,005; 0,01; 0,02; 0,035; 0,04 e 0,07 T. E no cultivo heterotrófico 0,01 e 0,07 T. Os ensaios foram conduzidos por 20 dias. Paralelamente foram feitos cultivos controle, somente submetidos ao CM terrestre (aproximadamente 0,05 mT). No cultivo autotrófico com 0,01 T foi obtida a maior velocidade específica de crescimento ( $0,22 \text{ d}^{-1}$ ). Nos cultivos heterotróficos o conteúdo de ficocianina foi 54% maior com 0,01 T. Em relação à clorofila e beta caroteno não houve diferença significativa e o conteúdo de gliceroglicolípídios foi afetado negativamente com o aumento do CM. A conclusão foi que uma intensidade de campo de 0,01 T aumentou as taxas de crescimento da microalga e a síntese de ficocianina.

Lei e Berg (1998) estudaram o efeito da “janela eletromagnética” na velocidade de crescimento de *Corynebacterium glutamicum* 227. Para isto foi usado um par de bobinas Helmholtz (5 cm de diâmetro) e observado que, com 15 Hz e 3,4 mT, a formação de ATP aumentou em mais de 20% após 8 h de exposição. Para condições de 50 Hz e 4,9 mT, o ATP aumentou em mais de 30% depois de 6 h de exposição contínua. Em ambos os casos, foi observada eletroestimulação do crescimento celular. Na pequena faixa estudada foram encontradas duas “janelas”: 15 Hz e 3,4 mT, 50 Hz e 4,9 mT. O tempo de exposição total foi de 8 h.

Yavuz e Celebi (2000) avaliaram o efeito dos CM no tratamento de águas residuárias com lodo ativado. Para tal, foram variados a indução eletromagnética (8,9 a 46,6 mT) e o pH (6,0 a 8,5). Os experimentos foram conduzidos por 40 h em dois fermentadores de 300 mL, sendo um destes envolto com fios de cobre nos quais era aplicada a corrente elétrica. A velocidade de remoção do substrato aumentou proporcionalmente ao incremento da indução magnética até 17,8 mT, quando então a velocidade começou a diminuir. CM menores que 8,9 mT não apresentaram nenhum efeito na remoção e para valores maiores que 46,6 mT foi

observado efeito negativo. A máxima remoção (44%) foi em pH 7,5 e 17,8 mT.

Hattori et al. (2001) investigaram o efeito dos CM (0,08 T) no aumento da sedimentação de lodo ativado. A aplicação dos CM aumentou a sedimentação e também o tamanho do floco, comparando-se com o lodo sem aplicação de CM.

Strasák et al. (2002), estudando o comportamento da *E. coli* K12 frente a CM aplicados por uma bobina (1,9 A; 50 Hz; 2,7-10 mT; 0-12 min), observaram que o número de unidades formadoras de colônias (UFC) diminuiu com o tempo de exposição e este decréscimo foi exponencial. O CM inibe uma pequena parte das bactérias, enquanto as outras conseguem se desenvolver normalmente, por isso o número de colônias diminuiu.

Utsunomiya et al. (2003) avaliaram os efeitos dos CM na produção de “porphyrin” por *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203. Através de ímãs, CM de 0,13 a 0,3 T foram aplicados por 96 h. A máxima produção de 35,8 mg/L foi alcançada com 0,3 T, sendo que este resultado foi 5,3 vezes maior do que o encontrado no ensaio controle (6,7 mg/L).

Fojt et al. (2004) compararam os efeitos dos CM em três bactérias (*E. coli*, *Leclercia adecarboxylata* e *S. aureus*). Foi utilizada uma bobina com 23,5 cm de diâmetro (1,9 A; 50 Hz, 12 min e 2,7-10 mT). As bactérias foram expostas durante a fase logarítmica de crescimento (após 4,5 h de inoculação). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi usado para quantificar os resultados e em todas as amostras diminuiu exponencialmente. A bactéria mais sensível foi *E. coli* e a mais resistente, *S. aureus*.

Alvarez et al. (2006) estudaram a aplicação de CM no processo de obtenção de nisina por *L. lactis* ATCC 7962, usando permeado de soro de queijo como substrato durante a fermentação. Para tal, foi utilizado um sistema de recirculação do meio de cultivo através de um par de ímãs. Através de planejamento completo ( $2^3$ ) foram estudadas as variáveis indução magnética (5; 12,5 ou 20 mT), tempo de tratamento magnético (4, 8 ou 12 h) e a velocidade do reciclo celular (0,85; 1,175 ou 1,50 m/s). Os melhores resultados de produção de nisina foram obtidos com 4 h, 1,50 m/s e 5 mT. Nestas condições o fator de conversão de substrato em produto (nisina) ( $Y_{P/S}$ ) e de célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) foram 3 e 5 vezes maior, respectivamente.

A microalga *Spirulina platensis* foi cultivada durante 7 dias por Li et al. (2007) em um fermentador air-lift (3,5 L) com aplicação de CM máximo de 0,55 T. Campos de até 0,4 T

estimularam o crescimento da microalga, enquanto que campos maiores inibiram o crescimento. Dentro da faixa estudada os melhores resultados foram alcançados com 0,25 T, onde o peso seco aumentou em 22% em um período de tempo inferior a dois dias em relação ao controle. Os autores concluíram que campos de 0,25 T devem ser aplicados para aumentar o crescimento da microalga em cultivos em fermentadores air-lift.

### 3.3.1 Aplicação de Campos Magnéticos no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Van Nostran et al. (1967) avaliaram durante o crescimento de *S. cerevisiae*, o efeito da aplicação de CM a diferentes pressões osmóticas e temperaturas. O CM foi gerado através de uma bobina e o campo aplicado foi de 0,46 T. As concentrações celulares foram medidas nos tempos de 24, 48 e 72 h. A análise estatística mostrou que o maior efeito foi dos CM, que reduziram a concentração celular ao longo do tempo. Também foram observadas interações significativas entre a temperatura e o CM em 24 h e entre a temperatura e a pressão osmótica em todos os tempos.

A influência da aplicação de CM de 1,5 T por 15 h no crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 7752 foi avaliada por Malko et al. (1994). Para tal, foi usado um “clinical magnetic resonance imager”. Comparando os resultados com e sem a aplicação de CM, foi observado que não houve uma diferença estatística entre os ensaios. Ou seja, a aplicação do CM de 1,5 T não aumentou a taxa de crescimento da *S. cerevisiae*.

Ivanova et al. (1996) estudaram o uso de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em reator de leito fixo, estabilizado magneticamente para a produção contínua de etanol. O processo de fermentação foi feito em uma coluna (40 cm de diâmetro e 80 cm de altura), sendo aplicado CM externo transversal ao fluxo do fluido. A aplicação dos CM (12,6-41,4 mT) aumentou 1,5 vezes a produção de etanol, comparando-se aos processos convencionais que usam reator de leito empacotado.

Através da utilização de um dispositivo comercial gerador de CM, Pichko e Povalyaeva (1996) constataram os efeitos dos CM de baixa frequência (50 Hz e 0,1 T) em alguns microrganismos. Com a *S. cerevisiae* XII ocorreu aumento de 12% no acúmulo de biomassa com uma exposição ao CM de 40 min.

Binninger e Ungvichian (1997) estudaram os efeitos do CM de baixa frequência (60 Hz) na expressão genética da levedura *S. cerevisiae*. Para isto, utilizaram exposições contínuas de 20  $\mu$ T durante um período de 15 gerações (aproximadamente 24 h). Como a exposição ao campo não afetou significativamente a taxa de crescimento, foram investigados os efeitos celulares menos evidentes. As mudanças na quantidade de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) foram determinadas por eletroforese em gel. Na maior parte do RNAm examinado (44 a 67%), os efeitos nos níveis transcritos não foram diferentes daqueles observados nos experimentos expostos. Porém, uma proporção significativa de RNAm (26 a 38%) foi aumentada em duas vezes nas células expostas ao CM, e só uma pequena porcentagem de RNAm (7 a 18%) mostrou níveis inferiores aos das células controle (inferior a 50%).

Mehedintu e Berg (1997) estudaram a resposta do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* H192 à aplicação de CM, numa região de indução magnética de 0,2 a 0,5 mT, produzidos por um par de bobinas Helmholtz (5 cm de diâmetro), com frequência entre 10 e 100 Hz. Os experimentos tiveram duração de 10 h, com amostras a cada 2 h. Os autores observaram que a 50 Hz e 0,2 mT ocorreu inibição no crescimento celular de aproximadamente 16%, em relação ao controle, enquanto que, a 50 Hz e 0,5 mT, foi observado efeito estimulante no crescimento celular de  $25 \pm 5\%$ , aumentando também a produção de ATP. A temperatura influenciou o efeito do CM aplicado, demonstrando que o número de parâmetros envolvidos na eletroestimulação é maior do que o inicialmente estimado.

Motta et al. (2001) verificaram o comportamento da levedura *S. cerevisiae* DAUFPE-1012 quando exposta a CM de 110 e 220 mT com auxílio de ímãs. Na primeira condição um ímã foi colocado embaixo do frasco Erlenmeyer (25 mL com 10 mL de meio) e na segunda dois ímãs aos lados do frasco. Os ensaios foram monitorados através de medidas do CO<sub>2</sub> produzido e medidas espectrofotométricas do crescimento celular. Os níveis de CO<sub>2</sub> foram 36,1% maiores com 220 mT e 7% com 110 mT, em relação aos ensaios controle. Os valores de absorbância após 24 h de cultivo no ensaio controle, com 110 mT e 220 mT, foram 0,965; 0,763 e 1,665, respectivamente. Com CM de 220 mT foi observado um aumento de 1,84% no crescimento celular.

Barboza (2002) verificou o comportamento da variação da população de *S. cerevisiae* (fermento liofilizado) em placas de Petri submetidas a CM de 31 mT, produzido através de ímãs colocados em cima e embaixo de cada placa. Para os ensaios controle algumas placas foram

deixadas nas mesmas condições, mas sem a influência dos CM. O ensaio foi conduzido por 30 h e alíquotas foram retiradas para análise de microscopia. A contagem média realizada visualmente no microscópio óptico foi 50% menor para o grupo tratado com CM, em relação ao grupo controle.

Zapata et al. (2002) estudaram os efeitos dos CM no crescimento de *S. cerevisiae* 1320 (Laboratórios Alfred Jorgesen). O crescimento do microrganismo em meio líquido foi feito durante 15 a 18 h. Os CM foram gerados através de bobinas (diâmetro interno 3,8 cm) e a determinação da concentração celular foi feita através da medida do peso seco. Foram feitos alguns planejamentos experimentais para avaliar a influência do tempo de aplicação do CM (5 a 325 s), da frequência (10 a 100 kHz) e do fluxo deste campo (2 a 62  $\mu$ T). A combinação destas variáveis na qual foi obtida a maior concentração celular foi 30 s, 100 kHz e 20 mG (2  $\mu$ T). Nestas condições os valores foram 30% maiores que no cultivo controle. Estes mesmos autores citaram que no trabalho de Galar e Martínez (1985) foi observado que CM com frequências de 120, 60 e 0 Hz têm efeitos diferentes sobre o crescimento de *S. cerevisiae*, sendo estimulantes, inibitórios e nulos, respectivamente.

Iwasaka et al. (2004) avaliaram o efeito dos CM no comportamento da levedura *S. cerevisiae* IAM7148 cultivada em meio líquido e exposta a um campo de 5 a 14 T (gerado através de um ímã supercondutor). Após 16 h de incubação a velocidade de crescimento diminuiu. As propriedades físicas do meio de cultura foram avaliadas, com o objetivo de descobrir o mecanismo responsável pelo decréscimo celular com a aplicação do CM. O papel do magnetismo na mudança dos processos de transporte gasoso, a pressão hidrostática exercida na levedura e a mudança na sedimentação da levedura podem ser os efeitos do CM sobre o sistema de respiração da levedura que causaram as mudanças observadas no comportamento desta.

Motta et al. (2004) avaliaram a aplicação de CM estáticos (220 mT por 24 h) na fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* DAUFPE-1012, sendo usados cinco ímãs (1,7 x 0,5 cm) colocados ao redor do fermentador. Nos ensaios com CM foi observado que a glicose foi totalmente consumida até o final da fermentação, sendo a taxa de consumo 1,3 vezes maior em relação ao ensaio controle (sem aplicação de CM). As taxas de produção etanol e biomassa foram 3,4 e 3,0 vezes maiores, respectivamente. Os resultados mostraram também que as leveduras magnetizadas produziram uma quantidade maior de álcool por grama de glicose por

unidade de biomassa e ocorreu uma menor inibição do crescimento celular devido ao álcool formado.

Ruiz-Gómez et al. (2004) observaram o comportamento da *S. cerevisiae* WS8105-1C quando as culturas foram expostas a CM obtidos através de um par de bobinas Helmholtz (40 cm de diâmetro). Os ensaios foram conduzidos a 50 Hz, com 0,35 ou 2,45 mT e o tempo de incubação foi de 24 ou 72 h. Paralelamente, foi conduzido um ensaio controle e nas condições avaliadas não houve alterações no crescimento celular. Estes resultados estão em discordância com os trabalhos de Mehedintu e Berg (1997) e Motta et al. (2004). São muitos os parâmetros que influenciam os ensaios: intensidade do CM, frequência, tempo de exposição, tipo de célula, temperatura e estado biológico das células. A discordância dos resultados pode ser explicada através das diferentes condições de produção dos CM, bem como o controle de todos os parâmetros acima citados.

Zapata et al. (2005) utilizaram leveduras comerciais de panificação (*S. cerevisiae*) adquiridas na cidade de Medellin, Colômbia. Os ensaios foram feitos em fermentadores de 400 mL, a 25°C e com 1 vvm. Para obter os CM foi utilizado um sistemas de bobinas (diâmetro 8,2 cm), sendo o campo de 250 mG (25  $\mu$ T) e o tempo de aplicação de 200 s. Foram feitos quatro ensaios (A, B, C e D). Os ensaios A e B foram realizados com aplicação de CM antes de iniciar o cultivo, porém o ensaio A foi feito sem aeração e o ensaio B com aeração. O ensaio C foi com aeração e com duas aplicações de CM antes de iniciar o cultivo e após 4 h de cultivo. O ensaio D com aeração e com três aplicações, antes de iniciar o cultivo, com 2 h e 4 h de cultivo. O melhor resultado foi obtido no ensaio B após 25 h de cultivo, a concentração celular chegou a aproximadamente 27 g/L, 14,4% maior em relação ao cultivo sem CM.

Novák et al. (2007) estudaram a aplicação de CM com auxílio de uma bobina (diâmetro de 23,5 cm) no cultivo de *S. cerevisiae* CCY 21-4-59. A corrente elétrica aplicada foi de 1,9 A, gerando um CM de 10 mT e tempo de 60 min. Foram observados efeitos inibitórios nos ensaios em placas de petri com ágar, como em meio líquido em frascos Erlenmeyer. A inibição ocorreu logo no início da aplicação do CM. Os autores comparam os resultados deste trabalho com *S. cerevisiae* com outros trabalhos feitos com bactérias (*E. coli*, *L. adecarboxylata* e *S. aureus*) e concluíram que as bactérias são mais sensíveis à aplicação de CM do que as leveduras.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para a produção de glutatona (GSH) foi o *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, obtido junto à Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas-SP). Para a manutenção da cepa foi usado ágar inclinado utilizando o meio YM (yeast extract – malt extract) e os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C). Na Tabela 1 é mostrada a composição do meio YM.

**Tabela 1:** Composição do meio YM usado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754.

| Composto            | Concentração (g/L) |
|---------------------|--------------------|
| Glicose             | 10,0               |
| Peptona             | 5,0                |
| Extrato de levedura | 3,0                |
| Extrato de malte    | 3,0                |
| Ágar                | 20,0               |

### 4.2 PREPARO DO INÓCULO

A fermentação para a obtenção do inóculo foi feita em “shaker” (Marconi, mod. MA 830), sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM sem ágar (Tabela 1) esterilizados a 121 °C por 15 min. As condições de cultivo para o preparo do inóculo foram 30 °C e 150 rpm por 24 h. A concentração celular do inóculo (determinada de acordo com o item 4.5.1) variou entre 1,4 e 1,5 g/L.

### 4.3 MEIO DE CULTIVO

Na Tabela 2 é mostrada a composição do meio para a produção de GSH. O pH e a concentração de glicose foram ajustados de acordo com os delineamentos experimentais. A glicose foi esterilizada separadamente (121 °C por 15 min) e antes da inoculação foi misturada aos outros componentes do meio.

O acerto do pH do meio foi feito utilizando HCl ou NaOH (2 N), conforme necessário.

**Tabela 2:** Composição do meio utilizado para a produção de glutatona.

| Composto                             | Concentração    |
|--------------------------------------|-----------------|
| Glicose                              | 20,0 – 96,8 g/L |
| Peptona                              | 50 g/L          |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 12 g/L          |
| Cisteína                             | 3,0 mM          |

#### 4.4 ENSAIOS

##### 4.4.1 Ensaios em Frascos Erlenmeyer – “shaker”

As fermentações foram feitas em “shaker” (Marconi, mod. MA 830) utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação (meio + inóculo). O tempo de fermentação foi de 72 h e amostras foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h. Na Tabela 3 é mostrada a matriz do delineamento fatorial fracionado (FF) com os seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

Estas primeiras fermentações foram feitas de acordo com o FF ( $2^{5-2}$ ) de resolução III com 3 pontos centrais totalizando 11 ensaios. As variáveis estudadas foram: agitação, pH<sub>inicial</sub>, temperatura, concentração de inóculo e concentração inicial de glicose. A análise da matriz de respostas de concentração de GSH do FF foi feita com auxílio do software *Statistica* versão 5.0 (Statsoft Inc. 2325, Tulsa, OK).

**Tabela 3:** Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento fatorial fracionado (FF),  $2^{5-2}$  com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

| Ensaio | Temperatura<br>(°C) | Agitação<br>(rpm) | pH <sub>inicial</sub> | Conc. Inóculo<br>(% v/v) | Conc. Inicial<br>Glicose (g/L) |
|--------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1FF    | -1 (26)             | -1 (100)          | -1 (5)                | +1 (15)                  | +1 (70)                        |
| 2FF    | +1 (30)             | -1 (100)          | -1 (5)                | -1 (5)                   | -1 (30)                        |
| 3FF    | -1 (26)             | +1 (300)          | -1 (5)                | -1 (5)                   | +1 (70)                        |
| 4FF    | +1 (30)             | +1 (300)          | -1 (5)                | +1 (15)                  | -1 (30)                        |
| 5FF    | -1 (26)             | -1 (100)          | +1 (7)                | +1 (15)                  | -1 (30)                        |
| 6FF    | +1 (30)             | -1 (100)          | +1 (7)                | -1 (5)                   | +1 (70)                        |
| 7FF    | -1 (26)             | +1 (300)          | +1 (7)                | -1 (5)                   | -1 (30)                        |
| 8FF    | +1 (30)             | +1 (300)          | +1 (7)                | +1 (15)                  | +1 (70)                        |
| 9FF    | 0 (28)              | 0 (200)           | 0 (6)                 | 0 (10)                   | 0 (50)                         |
| 10FF   | 0 (28)              | 0 (200)           | 0 (6)                 | 0 (10)                   | 0 (50)                         |
| 11FF   | 0 (28)              | 0 (200)           | 0 (6)                 | 0 (10)                   | 0 (50)                         |

Com base nestes resultados, foram determinadas as variáveis significativas e foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR). Foi utilizado um DCCR ( $2^3$ ), com total de 17 ensaios (6 pontos axiais e 3 pontos centrais), sendo o  $\alpha$  igual a 1,6812. Neste planejamento a concentração de inóculo foi fixada em 5% e a agitação em 300 rpm e as variáveis estudadas foram: temperatura, pH<sub>inicial</sub> e concentração inicial de glicose. Na Tabela 4 é mostrada a matriz do primeiro delineamento composto central rotacional (PD).

**Tabela 4:** Matriz dos ensaios gerada para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD),  $2^3$  com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

| Ensaio | Temperatura<br>(°C) | pH <sub>inicial</sub> | Conc. Inicial<br>Glicose (g/L) |
|--------|---------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1PD    | -1 (24)             | -1 (5)                | -1 (60)                        |
| 2PD    | +1 (28)             | -1 (5)                | -1 (60)                        |
| 3PD    | -1 (24)             | +1 (7)                | -1 (60)                        |
| 4PD    | +1 (28)             | +1 (7)                | -1 (60)                        |
| 5PD    | -1 (24)             | -1 (5)                | +1 (80)                        |
| 6PD    | +1 (28)             | -1 (5)                | +1 (80)                        |
| 7PD    | -1 (24)             | +1 (7)                | +1 (80)                        |
| 8PD    | +1 (28)             | +1 (7)                | +1 (80)                        |
| 9PD    | -1,68 (20,6)        | 0 (6)                 | 0 (70)                         |
| 10PD   | +1,68 (31,4)        | 0 (6)                 | 0 (70)                         |
| 11PD   | 0 (26)              | -1,68 (3,3)           | 0 (70)                         |
| 12PD   | 0 (26)              | +1,68 (8,6)           | 0 (70)                         |
| 13PD   | 0 (26)              | 0 (6)                 | -1,68 (43,2)                   |
| 14PD   | 0 (26)              | 0 (6)                 | +1,68 (96,8)                   |
| 15PD   | 0 (26)              | 0 (6)                 | 0 (70)                         |
| 16PD   | 0 (26)              | 0 (6)                 | 0 (70)                         |
| 17PD   | 0 (26)              | 0 (6)                 | 0 (70)                         |

A análise dos resultados do PD mostrou a necessidade de realizar outro planejamento para tentar otimizar as condições de produção da GSH. Devido a este fato, foi feito o segundo delineamento composto central rotacional ( $2^2$ ), com  $\alpha$  igual a 1,4142, 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Nesta etapa as variáveis estudadas foram a temperatura e concentração inicial de glicose. O pH<sub>inicial</sub>, a concentração de inóculo e a agitação foram fixados em 5, 5% (v/v) e 300 rpm, respectivamente. Na Tabela 5 são mostrados a matriz dos ensaios gerada pelo segundo delineamento composto central rotacional (SD), os níveis codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas.

**Tabela 5:** Matriz dos ensaios gerada para o segundo delineamento composto central rotacional (SD)  $2^2$  com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

| Ensaio | Temperatura<br>(°C) | Conc. Inicial<br>Glicose (g/L) |
|--------|---------------------|--------------------------------|
| 1SD    | -1 (21,5)           | -1 (25,86)                     |
| 2SD    | +1 (28,5)           | -1 (25,86)                     |
| 3SD    | -1 (21,5)           | +1 (54,14)                     |
| 4SD    | +1 (28,5)           | +1 (54,14)                     |
| 5SD    | -1,41 (20)          | 0 (40)                         |
| 6SD    | +1,41 (30)          | 0 (40)                         |
| 7SD    | 0 (25)              | -1,41 (20)                     |
| 8SD    | 0 (25)              | +1,41 (60)                     |
| 9SD    | 0 (25)              | 0 (40)                         |
| 10SD   | 0 (25)              | 0 (40)                         |
| 11SD   | 0 (25)              | 0 (40)                         |
| 12SD   | 0 (25)              | 0 (40)                         |

Depois de realizar as fermentações dos três planejamentos experimentais, nos quais foram estudadas as condições de cultivo para a produção de GSH nos frascos Erlenmeyer, foram feitas fermentações utilizando o meio YM para comparar com os resultados obtidos com a otimização das condições de cultivo. As condições destes ensaios foram: 20°C, 300 rpm, 5% de inóculo, tempo de fermentação 72 h e amostras em 0, 24, 48 e 72 h.

#### 4.4.2 Ensaios em Fermentador de Bancada

Em uma primeira etapa foram definidas nos frascos Erlenmeyer as melhores condições de pH<sub>inicial</sub>, concentração inicial de glicose, concentração de inóculo, agitação e temperatura para a produção de GSH. Após esta etapa, foram feitas fermentações em fermentador de bancada New-Brunswick-Bioflo III (5 L), nas quais foram avaliadas as influências da fonte de nitrogênio, agitação, aeração e adição de aminoácidos durante a produção de GSH.

O ar foi fornecido através de um compressor, sendo utilizado um filtro com lã de vidro para remover impurezas e microrganismos contaminantes. Um banho ultratermostatizado (Marconi) foi acoplado ao fermentador para garantir o funcionamento a baixas temperaturas (< 25°C). O nível da espuma formada durante a fermentação foi controlado através da utilização de um sensor que acionava uma bomba para injetar antiespumante (Dow Corning FG-10) quando necessário. O volume de meio de fermentação utilizado (meio + inóculo) foi de 3,5 L e continha glicose (40 ou 54 g/L), fonte de nitrogênio (50 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (12 g/L). O meio foi esterilizado juntamente com o fermentador (121°C, 20 min), com exceção da glicose que foi esterilizada separadamente em frascos Erlenmeyer. Antes da adição de 5% (v/v) de inóculo, a glicose foi adicionada ao fermentador e o  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  do meio acertado para 5,0 utilizando HCl ou NaOH (2 N). O tempo de fermentação foi de 72 h com retirada de amostras durante este período. Na Tabela 6 são mostrados os ensaios feitos no fermentador de bancada (FB).

**Tabela 6:** Ensaios feitos no fermentador de bancada (FB)

| Ensaio | Temperatura<br>(°C) | Conc. inicial de<br>glicose (g/L) | Agitação<br>(rpm) | Aeração<br>(vvm) | Fonte de<br>nitrogênio | Adição de<br>aminoácidos |
|--------|---------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| 1FB    | 25                  | 40                                | 300               | 0,46             | peptona                | não                      |
| 2FB    | 20                  | 54                                | 300               | 0,46             | peptona                | não                      |
| 3FB    | 20                  | 54                                | 300               | 0,53             | peptona                | sim                      |
| 4FB    | 20                  | 54                                | 400               | 0,53             | peptona                | sim                      |
| 5FB    | 20                  | 54                                | 500               | 0,53             | peptona                | sim                      |
| 6FB    | 20                  | 54                                | 500               | 1,1              | peptona                | sim                      |
| 7FB    | 20                  | 54                                | 500               | 1,1              | EL*                    | sim                      |
| 8FB    | 20                  | 54                                | 500               | 1,1              | AMM**                  | sim                      |

\* EL – extrato de levedura

\*\* AMM - água de maceração de milho

A adição de aminoácidos durante a fermentação foi estudada no fermentador de bancada. Por isso, em algumas fermentações, após 6 h foram adicionados 2 mM de cisteína e, após 28 h, adicionados 3,35 mM de cisteína, 10 mM de ácido glutâmico e 18 mM de glicina. Os aminoácidos foram dissolvidos em quantidades suficientes de água destilada e esterilizados separadamente em frascos Erlenmeyer.

#### 4.4.3 Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Bobinas

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Polímeros do Departamento de Ingeniería Química y Textil da Universidade de Salamanca - Espanha.

Para avaliar a influência da aplicação dos campos magnéticos (CM) durante a produção de GSH foi utilizada uma bobina com as seguintes características: diâmetro do fio 0,3 cm, diâmetro interno 10 cm, diâmetro externo 18 cm e altura 8,0 cm. A bobina foi acoplada a uma fonte de alimentação (Grelco modelo 50 A) capaz de fornecer intensidade de corrente elétrica de 50 ampères e diferença de potencial máxima de 15 volts. Dependendo da corrente aplicada na bobina a indução magnética variou de 25,0 a 34,3 mT.

Esta bobina foi colocada ao redor de um fermentador de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação (meio + inóculo). A concentração de inóculo foi de 5% (v/v) e o meio de fermentação continha (em g/L): glicose (54), extrato de levedura (50) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (12). O  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  foi de 5, a agitação de 200 rpm e o fermentador estava imerso em banho termostaticado para manter a temperatura em 20°C. O ar obtido através de compressor passava por um filtro com lã de vidro, sendo a taxa de aeração de 3,2 vvm. O tempo de fermentação foi de 72 h e as amostras foram retiradas em 0, 24, 48 e 72 h. Após 6 h de fermentação foi adicionado 2 mM de cisteína e após 28 h adicionados 3,35 mM de cisteína, 10 mM de ácido glutâmico e 18 mM de glicina. Os aminoácidos foram dissolvidos em quantidades suficientes de água destilada e esterilizados separadamente (121°C, 15 min).

Com o objetivo de verificar como a aplicação de CM influencia a produção de GSH, primeiramente foram feitas três fermentações sem a aplicação de campo (fermentações controle), nas mesmas condições de temperatura, agitação, pH, aeração e nutrientes.

Para os ensaios com aplicação de CM foi utilizado um delineamento fatorial completo ( $2^2$ ) com 3 pontos centrais totalizando 7 ensaios. As variáveis estudadas foram: indução magnética e o tempo de exposição ao CM. A análise da matriz de respostas da concentração de GSH foi feita com auxílio do software *Statistica* versão 5.0. Na Tabela 7 são mostrados a matriz dos experimentos do delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM), os níveis codificados e os níveis reais para cada variável estudada.

**Tabela 7:** Matriz dos ensaios gerada para o delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM)  $2^2$  com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

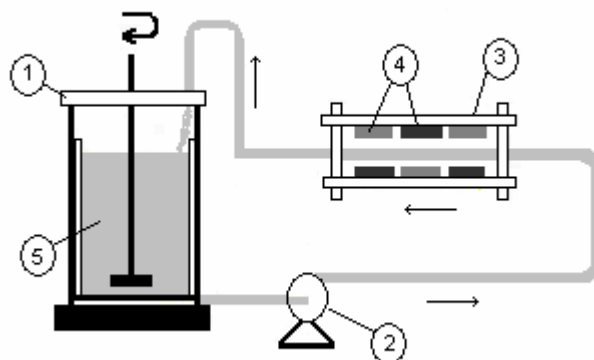
| Ensaio | Indução Magnética | Tempo de exposição |
|--------|-------------------|--------------------|
|        | (mT)              | (h)                |
| 1DCM   | -1 (25,0)         | -1 (8)             |
| 2DCM   | +1 (34,3)         | -1 (8)             |
| 3DCM   | -1 (25,0)         | +1 (16)            |
| 4DCM   | +1 (34,3)         | +1 (16)            |
| 5DCM   | 0 (29,6)          | 0 (12)             |
| 6DCM   | 0 (29,6)          | 0 (12)             |
| 7DCM   | 0 (29,6)          | 0 (12)             |

#### 4.4.4 Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Ímãs

Depois de analisar os resultados obtidos com a aplicação dos CM com bobina, verificou-se a influência de CM gerados por ímãs durante a produção de GSH. O fermentador New-Brunswick-Bioflo III (5 L) foi adaptado a um sistema de reciclo da suspensão celular através de um magnetizador com ímãs, conforme mostrado na Figura 4.

Nas fermentações com aplicação de CM foram utilizadas as melhores condições de cultivo observadas nas fermentações anteriores. O meio continha (em g/L): glicose (54), extrato de levedura (50) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (12), sendo 3,5 L o volume de meio de fermentação (meio + inóculo). O fermentador com o meio de fermentação (sem a glicose) foi esterilizado a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min. A glicose foi esterilizada separadamente em frascos Erlenmeyer e adicionada ao fermentador antes da inoculação e do acerto do  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  5.

A temperatura, aeração, agitação, tempo de fermentação e concentração de inóculo foram de  $20^\circ\text{C}$ , 1,1 vvm, 500 rpm, 72 h e 5% (v/v), respectivamente. O ar foi fornecido por compressor e filtrado através da passagem por lã de vidro.

**Legenda:**

1- Fermentador de bancada Bioflo III

2- Bomba para recirculação da suspensão celular

3- Magnetizador de indução variável

4- Ímãs

5- Suspensão celular/meio de cultura

**Figura 4:** Esquema do tratamento magnético da suspensão celular em fermentador de bancada

Durante a fermentação foram adicionados os aminoácidos precursores da GSH (após 6 h: 2 mM de cisteína e após 28 h: 3,35 mM de cisteína, 10 mM de ácido glutâmico e 18 mM de glicina) e foram retiradas amostras em intervalos regulares de tempo.

Primeiramente foi feita uma fermentação controle sem aplicação de CM e com reciclo celular, nas mesmas condições de temperatura, agitação, pH, aeração e nutrientes. Posteriormente, foram feitas três fermentações variando o tempo de aplicação do CM em 24, 48 e 72 h. Os ímãs foram colocados a uma distância de 5 mm do tubo de reciclo; com isso o CM aplicado foi de 20 mT (200 Gauss).

O reciclo celular foi feito através da utilização de uma bomba peristáltica (Anko 913 MITY Flex, USA) e a velocidade de reciclo celular foi de 5,2 cm/s.

## 4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

### 4.5.1 Determinação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi feita por espectrofotometria. Para tal, foi feita a leitura de absorbância do meio de cultura a 600 nm utilizando espectrofotômetro HACH (Mod.

DR/4000U). Quando necessário, a amostra foi diluída com água destilada. O sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra foi utilizado como branco para eliminar a interferência do meio de cultivo.

Para obter a concentração celular (g/L) foi feita uma curva padrão, sendo a levedura cultivada nas mesmas condições do inóculo. Após 24 h de incubação parte do meio foi centrifugado (4000 rpm por 20 min) e o sobrenadante descartado. A massa celular foi lavada com água destilada seguindo-se de secagem em estufa a vácuo (65°C) até peso constante. No restante do meio fermentado foram feitas diferentes diluições com água destilada e em cada uma delas determinada a absorbância. Com base no resultado de massa celular seca foi determinada a concentração celular para cada diluição. A partir destes dados foi plotado o gráfico da absorbância *versus* concentração celular e obtida a curva padrão para cálculo da concentração celular (g/L).

#### **4.5.2 Determinação de pH**

A determinação de pH de cada amostra foi feita diretamente através de potenciômetro Digimed (Mod. DM 20μP).

#### **4.5.3 Determinação da Concentração de Glicose Residual**

A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase utilizando um “kit” enzimático e colorimétrico para determinação de glicose (Bio-Diagnóstica). Para a análise foi utilizado o sobrenadante das amostras retiradas durante a fermentação e cada uma diluída com água destilada conforme necessário. Após a diluição, 20 μL de amostra e 2 mL do reagente foram misturados e incubados a 37°C por 10 min. Paralelamente, foi feita a determinação do padrão (20 μL de padrão e 2 mL do reagente) e do branco (2 mL do reagente), sendo que ambos foram incubados nas mesmas condições das amostras.

Para o cálculo da concentração de glicose a leitura de absorbância do branco foi subtraída da leitura de absorbância das amostras e do padrão. Posteriormente a leitura das amostras foi dividida pelo padrão e multiplicada pelo fator de diluição. Os resultados de concentração de glicose foram expressos em g/L.

#### 4.5.4 Determinação da Concentração de Glutathiona

Para a determinação de GSH foi utilizado o método de Owens e Belcher (1965). O meio fermentado foi centrifugado e o sobrenadante separado das células. Uma solução de etanol 40% (v/v) foi adicionada às células e feita a extração por 2 h a 30 °C. Em 0,5 mL de amostra foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 M; pH 8,0) e 0,03 mL de DTNB (5,5`-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). Após 3 min de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro HACH (Mod. DR/4000U) a 412 nm. Paralelamente foi feito o branco da reação utilizando a solução de etanol 40% (v/v). A quantidade de GSH foi calculada através de uma curva padrão, sendo utilizada L-glutathiona reduzida (Fluka, Japão). Os resultados foram expressos em mg/L.

A solução de GSH foi preparada dissolvendo-se 0,01 g em HCl 0,01 N (resfriado) até o volume de 100 mL. A solução foi mantida congelada para não ocorrer oxidação. Para o preparo da solução de DTNB, 0,396 g deste reagente e 0,15 g de NaHCO<sub>3</sub> foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). O volume foi ajustado para 100 mL e a solução mantida congelada até o momento do uso.

#### 4.5.5 Determinação de Indução Magnética

Nos experimentos feitos com CM gerados por bobina foi utilizado um gaussímetro (MG-50P, Walker Scientific Inc., USA) para verificar os níveis de indução utilizados de acordo com a corrente elétrica aplicada na bobina.

Para fixar os níveis de indução magnética no magnetizador (ímãs) foi usado um teslâmetro MG-3D, modelo MG-3A, com possibilidade de medição de 0,001 a 10 Tesla.

### 4.6 CÁLCULOS

Através da equação 1 foi calculada a porcentagem de GSH (%) que relaciona a massa de GSH (g) em relação a massa celular (g) para determinado tempo de fermentação.

$$\text{GSH (\%)} = \frac{\text{massa GSH (g)}}{\text{massa celular (g)}} * 100 \quad \text{equação (1)}$$

As equações 2, 3 e 4 foram utilizadas para calcular os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ), respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{72h} - P_{0h}}{S_{0h} - S_{72h}} \quad \text{equação (2)}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{72h} - X_{0h}}{S_{0h} - S_{72h}} \quad \text{equação (3)}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{72h} - P_{0h}}{X_{72h} - X_{0h}} \quad \text{equação (4)}$$

Com as equações 5 e 6 foram calculados os desvios e desvios relativos das respostas obtidas experimentalmente em relação as previstas pelos modelos.

$$\text{Desvio} = Y - \hat{Y} \quad \text{equação (5)}$$

$$\text{Desvio relativo} = \left( \frac{Y - \hat{Y}}{Y} \right) * 100 \quad \text{equação (6)}$$

Onde:  $Y$  = resposta experimental e  $\hat{Y}$  = resposta prevista pelo modelo

Para comparar os resultados de concentração celular e de GSH obtidos nos ensaios com aplicação de CM, através de magnetizador ou através de bobina, em relação aos ensaios controle, sem aplicação de CM, foram utilizadas as equações 7 e 8. Sendo que o valor de PDC representa a porcentagem de diferença da concentração celular com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle e o valor de PDG a porcentagem de diferença da concentração de GSH com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle.

$$PDC = \left( \frac{C_{AC} - C_{controle}}{C_{controle}} \right) * 100 \quad \text{equação (7)}$$

Onde:  $C_{AC}$  = concentração celular com aplicação do CM

$C_{\text{controle}}$  = concentração celular do ensaio controle

$$\text{PDG} = \left( \frac{C_{\text{AC}} - C_{\text{controle}}}{C_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad \text{equação (8)}$$

Onde:  $C_{\text{AC}}$  = concentração de GSH com aplicação do CM

$C_{\text{controle}}$  = concentração de GSH do ensaio controle



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

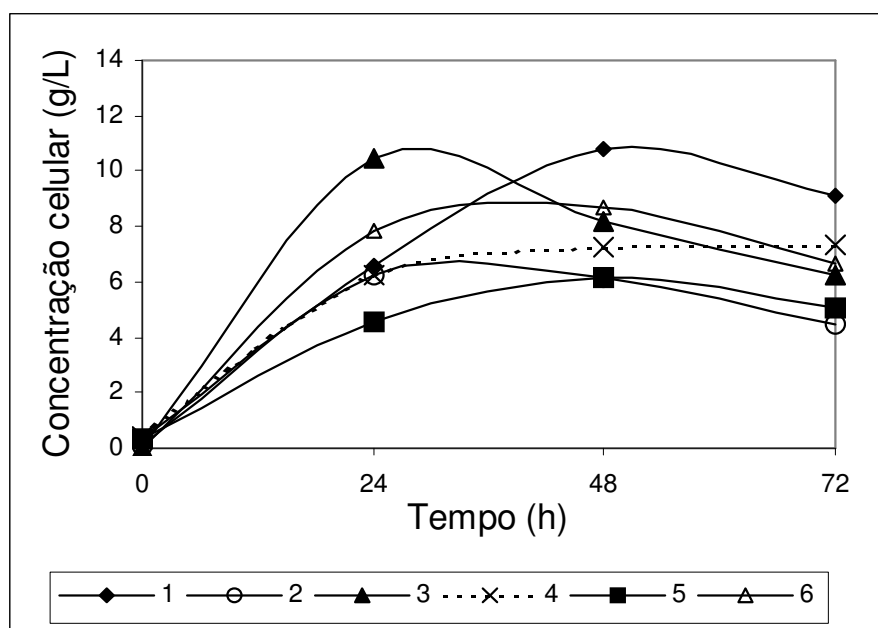
### 5.1 ENSAIOS EM FRASCOS ERLENMEYER

#### 5.1.1 Delineamento Fatorial Fracionado (FF)

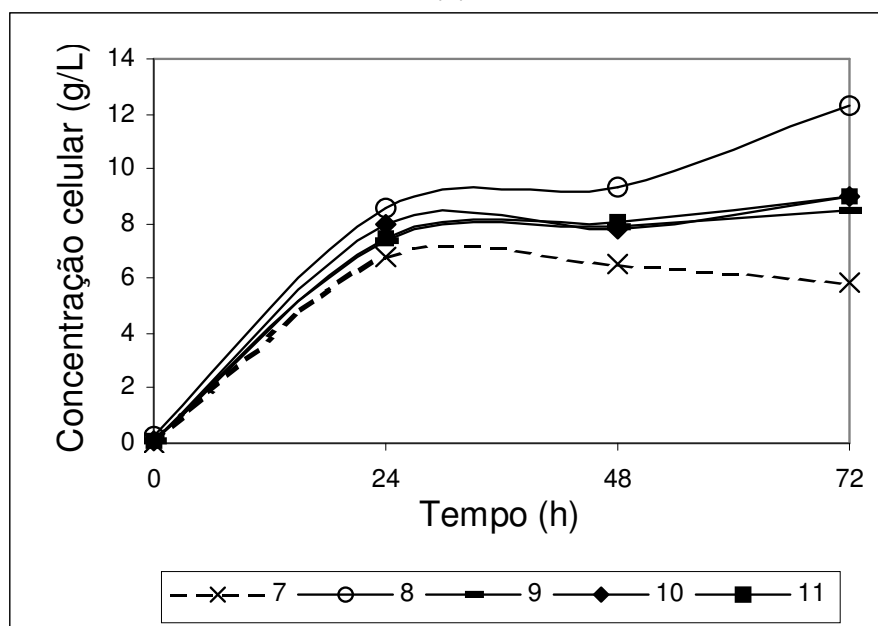
O delineamento fatorial fracionado ( $2^{5-2}$ ) foi utilizado para obter resultados preliminares da concentração de GSH e avaliar a influência das variáveis estudadas (agitação, temperatura, pH, concentração de inóculo e concentração inicial de glicose). As variáveis utilizadas no delineamento fatorial fracionado (FF), os seus níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios realizados são apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 35 (anexos) são mostrados os resultados da concentração inicial de glicose e de pH durante a fermentação. Com exceção dos ensaios 6FF, 8FF e 9FF, o pH final foi maior que o pH inicial e para 72 h variou de 5,40 a 7,14. Em relação à fonte de carbono (glicose), ela foi totalmente consumida pela levedura durante as primeiras 24 h de fermentação. O crescimento depois deste período pode ter ocorrido devido ao consumo de outros nutrientes, ou até mesmo do etanol produzido pela levedura.

Os resultados de concentração celular podem ser visualizados na Tabela 36 (anexos), e a Figura 5 apresenta estes valores graficados em relação ao tempo de fermentação. A maior concentração celular (12,3 g/L) foi obtida no ensaio 8FF, após 72 h de fermentação, sendo que este ensaio foi feito a 30 °C, 300 rpm, pH<sub>inicial</sub> 7, 15% de inóculo e 70 g/L de glicose. Os outros dois ensaios nos quais foram obtidas as maiores concentrações celulares foram o 1FF (10,8 g/L em 48 h) e o 3FF (10,4 g/L em 24 h). Estes dois ensaios foram conduzidos a 26 °C, pH<sub>inicial</sub> 5, e 70 g/L de glicose, enquanto que no ensaio 1FF a agitação foi de 100 rpm e 15% de inóculo, no ensaio 3FF foi 300 rpm e 5% de inóculo. Pôde-se observar que as maiores concentrações celulares foram obtidas nos ensaios que possuíam a maior concentração inicial de glicose, com exceção do ensaio 6FF.



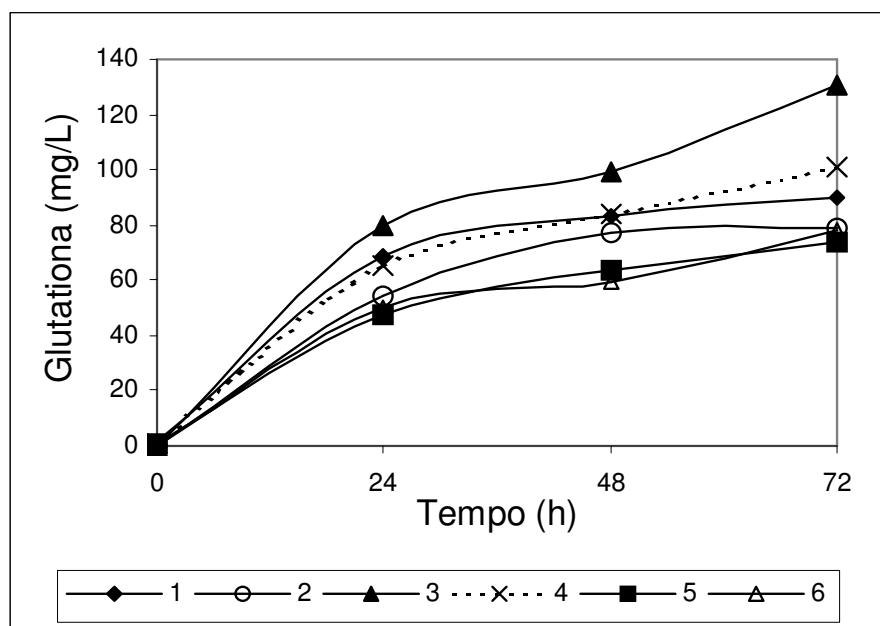
(a)



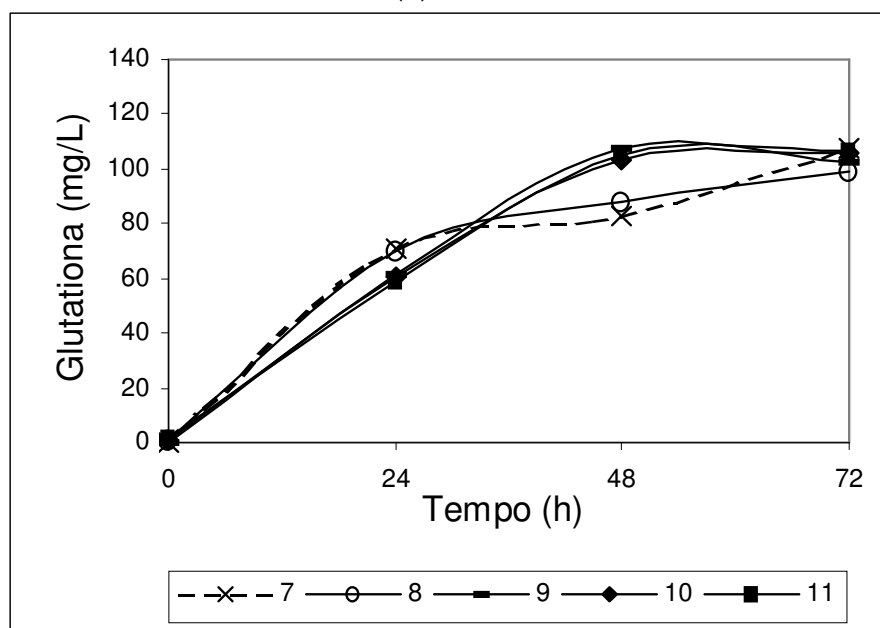
(b)

**Figura 5:** Acompanhamento da concentração celular (g/L) de *Saccharomyces cerevisiae* durante o FF ( $2^{5-2}$ ): (a) ensaios 1 a 6 (b) ensaios 7 a 11.

A Tabela 37 (anexos) e a Figura 6 mostram os resultados da concentração de GSH (mg/L) ao longo da fermentação. A maior concentração foi de 130,4 mg/L após 72 h no ensaio 3FF (26°C, 300 rpm, pH<sub>inicial</sub> 5, 5% de inóculo e 70 g/L de glicose). Nos 3 pontos centrais e no ensaio 7FF também foram observadas concentrações elevadas de GSH.



(a)



(b)

**Figura 6:** Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por *Saccharomyces cerevisiae* durante o FF ( $2^{5-2}$ ): (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.

Em relação à influência da temperatura durante a fermentação pôde-se observar que os maiores valores de concentração celular e de GSH foram obtidos em diferentes ensaios. Enquanto a maior concentração celular foi obtida no ensaio a 30°C, a maior concentração de GSH foi encontrada a 26°C. Este fato também foi observado por Wei et al. (2003a), que

estudaram o efeito da temperatura na fermentação em batelada para produção de GSH usando *Candida utilis* WSH 02-08 em fermentações com tempo total de 32 h. A maior concentração de GSH (385 mg/L) foi obtida quando a temperatura foi mantida em 30°C nas primeiras 8 h e depois diminuída para 26°C até o final da fermentação. Desta forma na primeira etapa foi estimulado o crescimento celular e na segunda a produção de GSH.

Na Tabela 8 são mostrados os valores de porcentagem de GSH (%), fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) dos ensaios do FF, que foram obtidos através das equações 1 a 4, respectivamente.

**Tabela 8:** Porcentagem de GSH produzida por *Saccharomyces cerevisiae* e fatores de conversão para o delineamento fatorial fracionado (FF)  $2^{5-2}$

| Ensaio | Glutathiona (%) |      |      | Fatores de conversão                                 |                                                     |                                                     |
|--------|-----------------|------|------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|        | 24 h            | 48 h | 72 h | $Y_{P/S}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{X/S}$<br>(g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{P/X}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> ) |
| 1FF    | 1,0             | 0,8  | 1,0  | 1,27                                                 | 0,13                                                | 10,10                                               |
| 2FF    | 0,9             | 1,2  | 1,8  | 2,64                                                 | 0,15                                                | 17,93                                               |
| 3FF    | 0,8             | 1,2  | 2,1  | 1,86                                                 | 0,09                                                | 20,87                                               |
| 4FF    | 1,0             | 1,2  | 1,4  | 3,32                                                 | 0,23                                                | 14,29                                               |
| 5FF    | 1,0             | 1,0  | 1,5  | 2,43                                                 | 0,16                                                | 15,55                                               |
| 6FF    | 0,6             | 0,7  | 1,2  | 1,12                                                 | 0,10                                                | 11,73                                               |
| 7FF    | 1,0             | 1,3  | 1,8  | 3,59                                                 | 0,19                                                | 18,45                                               |
| 8FF    | 0,8             | 0,9  | 0,8  | 1,40                                                 | 0,17                                                | 8,15                                                |
| 9FF    | 0,8             | 1,4  | 1,2  | 2,05                                                 | 0,17                                                | 12,29                                               |
| 10FF   | 0,8             | 1,3  | 1,2  | 2,09                                                 | 0,18                                                | 11,84                                               |
| 11FF   | 0,8             | 1,3  | 1,2  | 2,11                                                 | 0,18                                                | 11,90                                               |

Com exceção dos ensaios 8FF a 11FF, os maiores valores de porcentagem de GSH foram observados após 72 h de fermentação, sendo o maior valor de 2,1% obtido no ensaio 3FF. Em relação aos fatores de conversão, a maior conversão de substrato em produto foi de 3,59 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub> no ensaio 7FF (26°C, 300 rpm, pH<sub>inicial</sub> 7, 5% inóculo e 30 g/L de glicose), substrato em célula foi 0,23 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub> no ensaio 4FF (30°C, 300 rpm, pH<sub>inicial</sub> 5, 15% inóculo e 30 g/L de glicose) e célula em produto foi de 20,87 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub> no ensaio 3FF (26°C, 300 rpm,

pH<sub>inicial</sub> 5, 5% inóculo e 70 g/L de glicose). No ensaio 3FF foram conseguidos os melhores resultados de concentração e porcentagem de GSH e conversão de substrato em produto.

A Tabela 9 mostra os valores de produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) obtidos durante os ensaios do delineamento fatorial fracionado (FF).

**Tabela 9:** Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) para o delineamento fatorial fracionado (FF) 2<sup>5-2</sup>

| Ensaio | Produtividade celular (g/L.h) |      |      | Produtividade em GSH (mg/L.h) |      |      |
|--------|-------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|
|        | 24 h                          | 48 h | 72 h | 24 h                          | 48 h | 72 h |
| 1FF    | 0,28                          | 0,23 | 0,13 | 2,85                          | 1,73 | 1,25 |
| 2FF    | 0,26                          | 0,13 | 0,06 | 2,28                          | 1,60 | 1,10 |
| 3FF    | 0,43                          | 0,17 | 0,09 | 3,31                          | 2,08 | 1,81 |
| 4FF    | 0,26                          | 0,15 | 0,10 | 2,73                          | 1,75 | 1,40 |
| 5FF    | 0,19                          | 0,13 | 0,07 | 1,98                          | 1,33 | 1,03 |
| 6FF    | 0,33                          | 0,18 | 0,09 | 2,09                          | 1,24 | 1,09 |
| 7FF    | 0,28                          | 0,14 | 0,08 | 2,94                          | 1,72 | 1,49 |
| 8FF    | 0,36                          | 0,20 | 0,17 | 2,90                          | 1,83 | 1,37 |
| 9FF    | 0,31                          | 0,16 | 0,12 | 2,58                          | 2,24 | 1,43 |
| 10FF   | 0,33                          | 0,16 | 0,13 | 2,52                          | 2,15 | 1,47 |
| 11FF   | 0,31                          | 0,17 | 0,13 | 2,47                          | 2,19 | 1,49 |

Os melhores valores de produtividades celulares e em GSH foram obtidos para 24 h de fermentação em todos os ensaios. Os máximos valores foram no ensaio 3FF, sendo estes de 0,43 g/L.h e 3,31 mg/L, respectivamente.

Avaliando-se a Figura 6 (Tabela 37 em anexo) pôde-se constatar o aumento da concentração de GSH durante a fermentação. A partir dos valores médios para 48 h (86,6 mg/L) e 72 h (97,7 mg/L) e porcentagem de GSH para 48 h (1,12) e 72 h (1,37), verificou-se que a diferença entre os valores para os tempos de 48 h e 72 h foi pequena. Porém, como o objetivo deste trabalho foi otimizar a concentração de GSH, fez-se a análise estatística para o tempo de 72 h de fermentação. A Tabela 10 mostra a estimativa dos efeitos para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* no planejamento do FF através do SS residual.

**Tabela 10:** Estimativa dos efeitos para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* no planejamento FF ( $2^{5-2}$ ) para 72 h.

|                         | Efeito (mg/L) | Desvio Padrão | t(5)  | p      |
|-------------------------|---------------|---------------|-------|--------|
| Média*                  | 97,66         | 2,14          | 45,63 | 0,0000 |
| Temperatura*            | -11,37        | 5,02          | -2,27 | 0,0728 |
| Agitação*               | 28,92         | 5,02          | 5,76  | 0,0022 |
| pH <sub>inicial</sub> * | -10,52        | 5,02          | -2,10 | 0,0901 |
| Concentração de inóculo | -7,97         | 5,02          | -1,59 | 0,1730 |
| Conc.inicial de glicose | 8,97          | 5,02          | 1,79  | 0,1338 |

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

Temperatura, agitação e pH<sub>inicial</sub> apresentaram efeito significativo na concentração de GSH, a um nível de confiança de 90%. As variáveis concentrações de inóculo e inicial de glicose não apresentaram efeitos significativos. Enquanto a temperatura e o pH<sub>inicial</sub> apresentaram efeitos negativos, a agitação apresentou efeito positivo. Isto mostrou que para aumentar a concentração de GSH devem-se aumentar os valores de agitação e diminuir a temperatura e o pH<sub>inicial</sub>. Os pontos centrais apresentaram um pequeno desvio padrão ( $\pm 2,3$ ), o que demonstrou boa repetibilidade do processo. Foi feita a análise estatística dos resultados de concentração celular para o tempo de 72 h de fermentação e na Tabela 11 são mostrados os efeitos das variáveis sobre esta resposta.

**Tabela 11:** Estimativa dos efeitos para a concentração celular produzida por *S. cerevisiae* no planejamento FF ( $2^{5-2}$ ) para 72 h.

|                           | Efeito (mg/L) | Desvio Padrão | t(5)  | p      |
|---------------------------|---------------|---------------|-------|--------|
| Média*                    | 7,61          | 0,45          | 16,84 | 0,0000 |
| Temperatura               | 1,15          | 1,06          | 1,08  | 0,3274 |
| Agitação                  | 1,60          | 1,06          | 1,51  | 0,1915 |
| pH <sub>inicial</sub>     | 0,65          | 1,06          | 0,61  | 0,5665 |
| Concentração de inóculo*  | 2,65          | 1,06          | 2,50  | 0,0545 |
| Conc. inicial de glicose* | 2,90          | 1,06          | 2,74  | 0,0410 |

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

Contrariamente aos resultados obtidos na análise estatística da concentração de GSH, as variáveis que foram significativas a um nível de confiança de 90% para a concentração

celular foram: a concentração de inóculo e de glicose. Todos os efeitos foram positivos, o que mostrou que para aumentar a concentração celular devemos aumentar a concentração de inóculo e inicial de glicose. Como o objetivo deste trabalho foi aumentar os níveis de GSH produzidos pela levedura, para elaborar o próximo delineamento experimental foram levados em consideração os resultados da análise estatística dos dados de concentração de GSH.

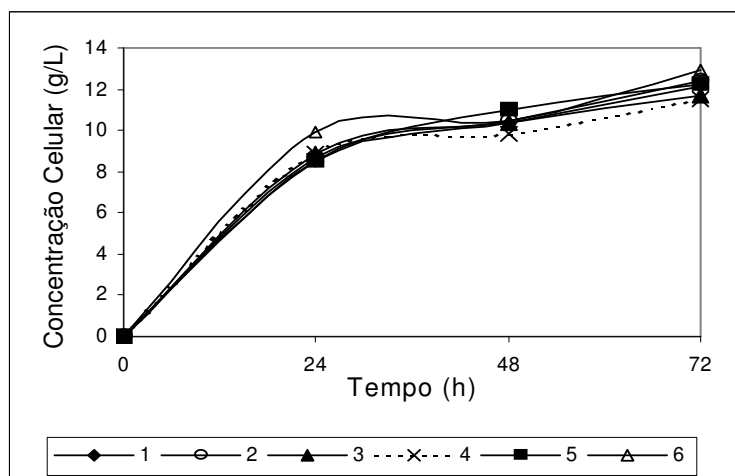
A variável que mais influenciou na concentração de GSH foi a agitação, seguida pela temperatura e o  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ . Como não era possível aumentar os níveis de agitação, em função do tipo de “shaker” utilizado nas fermentações em frascos Erlenmeyer, no próximo delineamento experimental para todos os ensaios a agitação foi fixada em 300 rpm (nível +1). Da mesma forma, no primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR), os valores de  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  testados permaneceram os mesmos e foram acrescentados os pontos axiais ( $\text{pH}_{\text{inicial}}$  3,3 e 8,7). A faixa de  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  não foi deslocada, pois em pH menores que 3,3 provavelmente a levedura não se desenvolveria em condições satisfatórias. Se for considerado um nível de confiança de 85%, nível este aceitável para processos biotecnológicos, a variável concentração inicial de glicose seria significativa e na análise estatística de concentração celular foi um parâmetro significativo, sendo a variável que mais influenciou a resposta. Com isso no próximo DCCR foi estudado o comportamento das variáveis:  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , temperatura e concentração inicial de glicose.

### 5.1.2 Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional (PD)

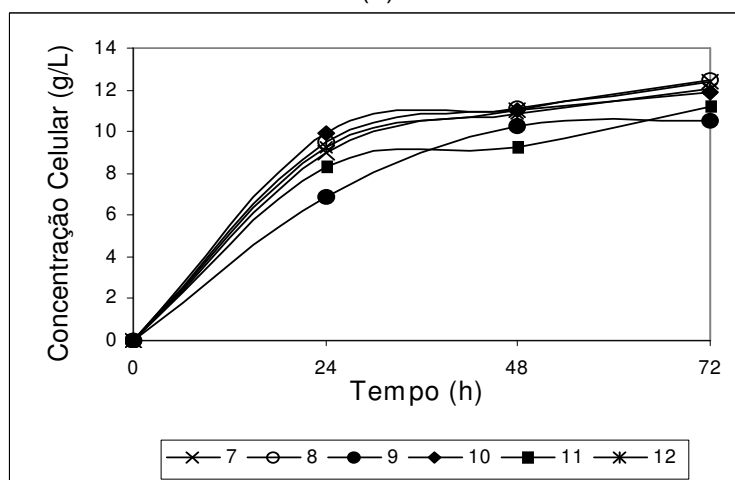
Este primeiro delineamento composto central rotacional (PD) foi feito com o intuito de incrementar os níveis de GSH produzidos pela levedura e conseqüentemente encontrar as melhores condições de  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , temperatura e concentração inicial de glicose.

Na Tabela 38 (anexos) são mostrados os valores da concentração inicial de glicose (g/L) e de pH durante as 72 h de fermentação. Da mesma forma que no FF, a glicose foi totalmente consumida até 24 h de fermentação. Em relação ao pH, em 48 h de fermentação o pH dos 17 ensaios variou de 3,46 a 7,01, e em 72 h variou de 3,55 a 6,44.

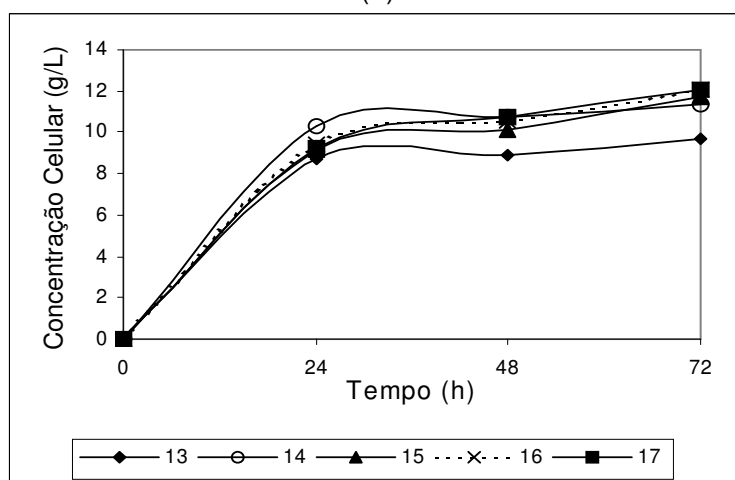
Os valores de concentração celular durante os ensaios PD estão indicados na Tabela 39 (anexos) e na Figura 7.



(a)



(b)

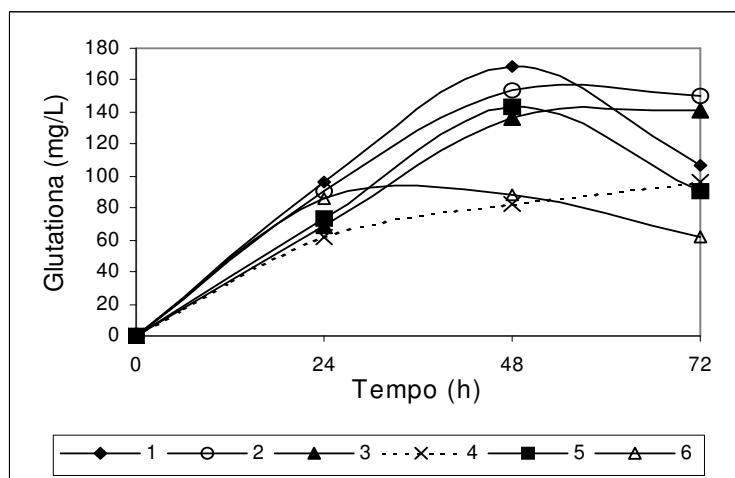


(c)

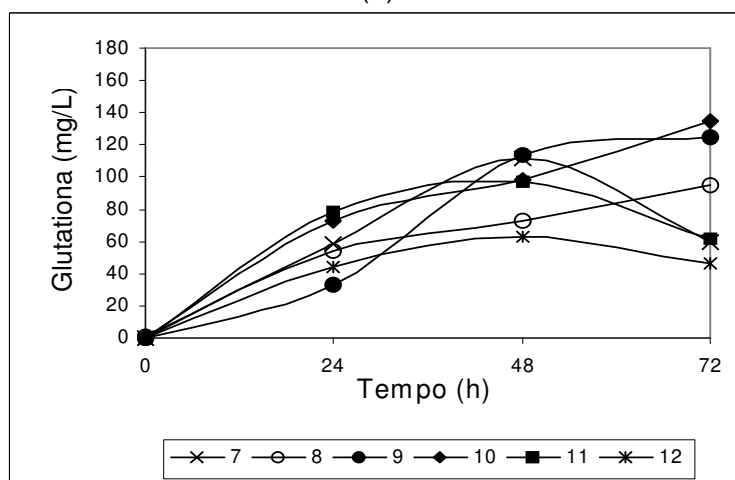
**Figura 7:** Acompanhamento da concentração celular (g/L) de *S. cerevisiae* durante o PD ( $2^3$ ):  
(a) ensaios 1 a 6, (b) ensaios 7 a 12 e (c) ensaios 13 a 17.

A maior concentração celular (12,9 g/L) foi obtida no ensaio 6PD em 72 h, cujas condições foram 28 °C, pH<sub>inicial</sub> 5 e 80 g/L de glicose. No ensaio com a menor concentração inicial de glicose (43,2 g/L) foi produzida a menor concentração celular (9,7 g/L). Os dados graficados na Figura 7 mostraram que até 24 h a levedura encontrava-se na fase exponencial e após este período até o final da fermentação, na fase estacionária de crescimento. Os valores médios de concentração celular para os 17 ensaios para 48 h e 72 h foram 10,4 g/L e 11,8 g/L, respectivamente.

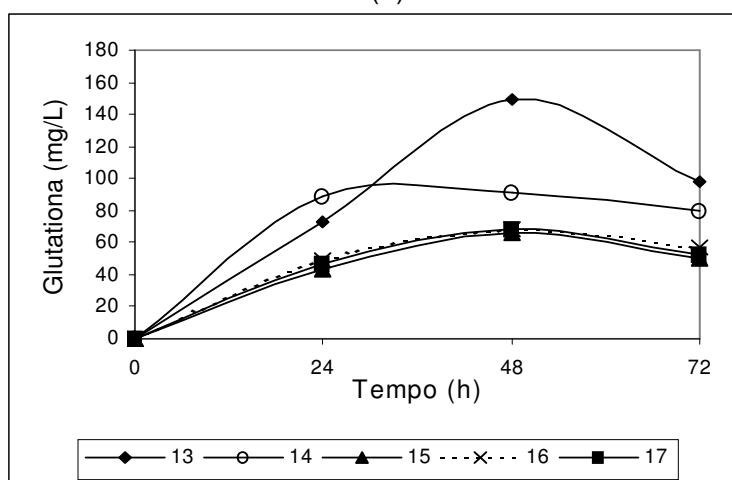
Os resultados da concentração de GSH são mostrados na Tabela 40 (anexos) e na Figura 8. No ensaio 1PD, após 48 h, foi observada a maior concentração de GSH (168,9 mg/L) e este ensaio foi feito a 24 °C, pH 5 e 60 g/L de glicose. Outro valor elevado foi observado no ensaio 2PD (28 °C; pH<sub>inicial</sub> 5; 60 g/L de glicose), pois após 48 h a concentração de GSH chegou a 154,0 mg/L. Dentre os 17 ensaios realizados nas diferentes condições observou-se que a concentração de GSH em 48 h variou de 62,6 a 168,9 mg/L e para 72 h variou de 45,8 a 149,9 mg/L; isto indicou a grande variação da concentração de GSH em função dos níveis das variáveis do delineamento e do tempo de fermentação, mostrando a importância de se estabelecer as condições de cultivo adequadas para a produção de GSH.



(a)



(b)



(c)

**Figura 8:** Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por *S. cerevisiae* durante o PD ( $2^3$ ): (a) ensaios 1 a 6, (b) ensaios 7 a 12 e (c) ensaios 13 a 17.

Os valores de porcentagem de GSH e fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) para os ensaios do PD são mostrados na Tabela 12, estes valores foram calculados através das Equações 1 a 4.

**Tabela 12:** Porcentagem de GSH produzida por *S. cerevisiae* e fatores de conversão para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD)  $2^3$ .

| Ensaio | Glutaciona (%) |      |      | Fatores de conversão                                             |                                                                 |                                                                 |
|--------|----------------|------|------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|        | 24 h           | 48 h | 72 h | $Y_{P/S}$<br>( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ ) | $Y_{X/S}$<br>( $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ ) | $Y_{P/X}$<br>( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ) |
| 1PD    | 1,1            | 1,6  | 0,9  | 1,77                                                             | 0,20                                                            | 8,79                                                            |
| 2PD    | 1,0            | 1,5  | 1,2  | 2,50                                                             | 0,21                                                            | 12,09                                                           |
| 3PD    | 0,8            | 1,3  | 1,2  | 2,35                                                             | 0,19                                                            | 12,09                                                           |
| 4PD    | 0,7            | 0,8  | 0,8  | 1,61                                                             | 0,19                                                            | 8,38                                                            |
| 5PD    | 0,9            | 1,3  | 0,7  | 1,13                                                             | 0,15                                                            | 7,44                                                            |
| 6PD    | 0,9            | 0,8  | 0,5  | 0,77                                                             | 0,16                                                            | 4,74                                                            |
| 7PD    | 0,7            | 1,0  | 0,5  | 0,75                                                             | 0,15                                                            | 4,84                                                            |
| 8PD    | 0,6            | 0,7  | 0,8  | 1,18                                                             | 0,16                                                            | 7,55                                                            |
| 9PD    | 0,5            | 1,1  | 1,2  | 1,78                                                             | 0,15                                                            | 11,92                                                           |
| 10PD   | 0,7            | 0,9  | 1,1  | 1,92                                                             | 0,17                                                            | 11,32                                                           |
| 11PD   | 0,9            | 1,0  | 0,5  | 0,88                                                             | 0,16                                                            | 5,51                                                            |
| 12PD   | 0,5            | 0,6  | 0,4  | 0,65                                                             | 0,17                                                            | 3,81                                                            |
| 13PD   | 0,8            | 1,7  | 1,0  | 2,20                                                             | 0,22                                                            | 10,19                                                           |
| 14PD   | 0,9            | 0,9  | 0,7  | 0,82                                                             | 0,12                                                            | 7,03                                                            |
| 15PD   | 0,5            | 0,7  | 0,4  | 0,72                                                             | 0,17                                                            | 4,33                                                            |
| 16PD   | 0,5            | 0,7  | 0,5  | 0,81                                                             | 0,17                                                            | 4,72                                                            |
| 17PD   | 0,5            | 0,6  | 0,4  | 0,75                                                             | 0,17                                                            | 4,34                                                            |

A maior porcentagem de GSH na célula foi de 1,7% obtida no ensaio 13PD a 26°C,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  6 e 43,2 g/L de glicose. No ensaio 2PD (28°C;  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  5; 60 g/L de glicose) encontrou-se as maiores conversões de substrato em produto e célula em produto. O mesmo fator de conversão de célula em produto (12,09  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ) foi observado no ensaio 3PD e no ensaio 13PD a maior conversão de substrato em célula. A Tabela 13 mostra os valores de produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD).

**Tabela 13:** Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) para o primeiro delineamento composto central rotacional (PD) 2<sup>3</sup>.

| Ensaio | Produtividade celular<br>(g/L.h) |      |      | Produtividade em GSH<br>(mg/L.h) |      |      |
|--------|----------------------------------|------|------|----------------------------------|------|------|
|        | 24 h                             | 48 h | 72 h | 24 h                             | 48 h | 72 h |
| 1PD    | 0,35                             | 0,22 | 0,17 | 4,00                             | 2,35 | 1,48 |
| 2PD    | 0,36                             | 0,22 | 0,17 | 3,76                             | 2,14 | 2,08 |
| 3PD    | 0,37                             | 0,22 | 0,16 | 2,86                             | 1,89 | 1,96 |
| 4PD    | 0,37                             | 0,21 | 0,16 | 2,56                             | 1,15 | 1,34 |
| 5PD    | 0,36                             | 0,23 | 0,17 | 3,04                             | 1,99 | 1,26 |
| 6PD    | 0,41                             | 0,22 | 0,18 | 3,59                             | 1,23 | 0,85 |
| 7PD    | 0,37                             | 0,23 | 0,17 | 2,45                             | 1,55 | 0,83 |
| 8PD    | 0,40                             | 0,23 | 0,17 | 2,27                             | 1,01 | 1,32 |
| 9PD    | 0,29                             | 0,21 | 0,15 | 1,37                             | 1,58 | 1,73 |
| 10PD   | 0,41                             | 0,23 | 0,16 | 3,02                             | 1,37 | 1,86 |
| 11PD   | 0,35                             | 0,19 | 0,16 | 3,25                             | 1,34 | 0,85 |
| 12PD   | 0,39                             | 0,23 | 0,17 | 1,82                             | 0,87 | 0,64 |
| 13PD   | 0,36                             | 0,18 | 0,13 | 3,02                             | 2,08 | 1,36 |
| 14PD   | 0,43                             | 0,22 | 0,16 | 3,69                             | 1,26 | 1,10 |
| 15PD   | 0,38                             | 0,21 | 0,16 | 1,80                             | 0,93 | 0,70 |
| 16PD   | 0,39                             | 0,22 | 0,17 | 2,06                             | 0,95 | 0,79 |
| 17PD   | 0,38                             | 0,22 | 0,17 | 1,94                             | 0,94 | 0,73 |

As máximas produtividades celular e em GSH foram observadas em 24 h de fermentação, sendo seus valores de 0,43 g/L.h e 4,00 mg/L.h, respectivamente. Para o tempo de 48 h, no qual foi obtida a máxima concentração de GSH, a maior produtividade em GSH foi de 2,35 mg/L.h no ensaio 1PD.

As curvas da Figura 8 (Tabela 40 em anexo) mostraram que na maioria dos ensaios a concentração de GSH diminuiu após 48 h de fermentação. Este fato pode ser ratificado ao ser avaliado a concentração média de GSH para 48 h (104,3 mg/L) e 72 h (88,5 mg/L), e também a porcentagem de GSH para 48 h (1,0%) e 72 h (0,75%). Desta forma, a análise estatística para o PD foi feita para o tempo de 48 h.

No PD foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% ( $p < 0,05$ ). Na Tabela 14 são mostrados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios do PD, sem excluir os termos não significativos, com 5% de significância. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,8828. Na tabela os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos letra Q.

**Tabela 14:** Coeficiente de regressão e desvio padrão do PD ( $2^3$ ), para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 48 h.

|                         | Coeficiente de Regressão | Desvio Padrão | t(7)  | p-valor |
|-------------------------|--------------------------|---------------|-------|---------|
| Média*                  | 66,75                    | 10,30         | 6,48  | 0,000   |
| (1) Temperatura (L) *   | -13,73                   | 4,84          | -2,84 | 0,025   |
| Temperatura (Q) *       | 17,01                    | 5,32          | 3,19  | 0,015   |
| (2) pH (L) *            | -15,18                   | 4,84          | -3,14 | 0,016   |
| pH (Q)                  | 7,65                     | 5,32          | 1,44  | 0,191   |
| (3) Conc. glicose (L) * | -16,44                   | 4,84          | -3,40 | 0,011   |
| Conc. glicose (Q) *     | 22,08                    | 5,32          | 4,15  | 0,004   |
| 1 L x 2 L               | -2,87                    | 6,32          | -0,45 | 0,662   |
| 1 L x 3 L               | -3,15                    | 6,32          | -0,50 | 0,633   |
| 2 L x 3 L               | 7,15                     | 6,32          | 1,13  | 0,295   |

\* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

A Tabela 15 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os ensaios PD, nesta etapa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos.

**Tabela 15:** Análise de variância do PD ( $2^3$ ) para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 48 h.

| Fonte de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F <sub>calculado</sub> | p-valor |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------------|---------|
| Regressão         | 15625,23          | 5                  | 3125,05        | 9,94                   | 0,00085 |
| Resíduos          | 3458,17           | 11                 | 314,38         |                        |         |
| Total             | 19083,40          | 16                 |                |                        |         |

Porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) = 81,9;  $F_{5;11;0,1} = 2,45$

A partir dos resultados da análise estatística percebeu-se que, com exceção do termo quadrático do pH e a interação entre as variáveis, todas as variáveis foram significativas a um nível de confiança de 95%. O valor do  $F_{\text{calculado}}$  para regressão foi altamente significativo (p-valor 0,00085) e foi aproximadamente quatro vezes maior que  $F_{\text{tabelado}}$ .

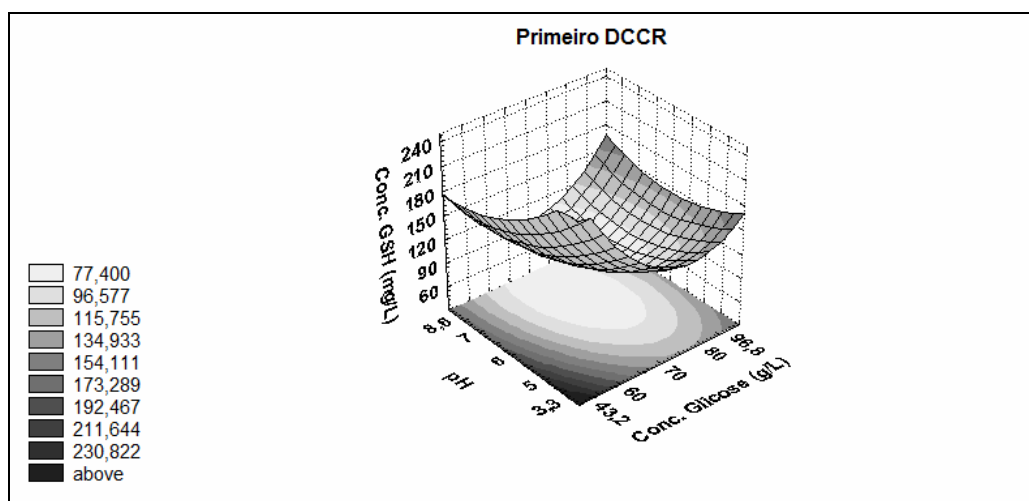
A variação entre os coeficientes de regressão com todos os parâmetros (modelo com 10 parâmetros) e os coeficientes de regressão sem os parâmetros estatisticamente não significativos (modelo com 6 parâmetros) foi pequena. Desta forma foi utilizado o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, que possuiu um percentual de variação explicado pelo modelo de 82% ( $R^2$ ). A equação 9 é o modelo codificado obtido que descreve as superfícies de resposta da concentração de GSH para o PD, onde  $X_1$  = temperatura,  $X_2$  = pH<sub>inicial</sub> e  $X_3$  = concentração inicial de glicose.

$$\text{Conc. GSH (mg/L)} = 76,6 - 13,7 \cdot X_1 + 14,7 \cdot X_1^2 - 15,2 \cdot X_2 - 16,4 \cdot X_3 + 19,8 \cdot X_3^2 \text{ equação (9)}$$

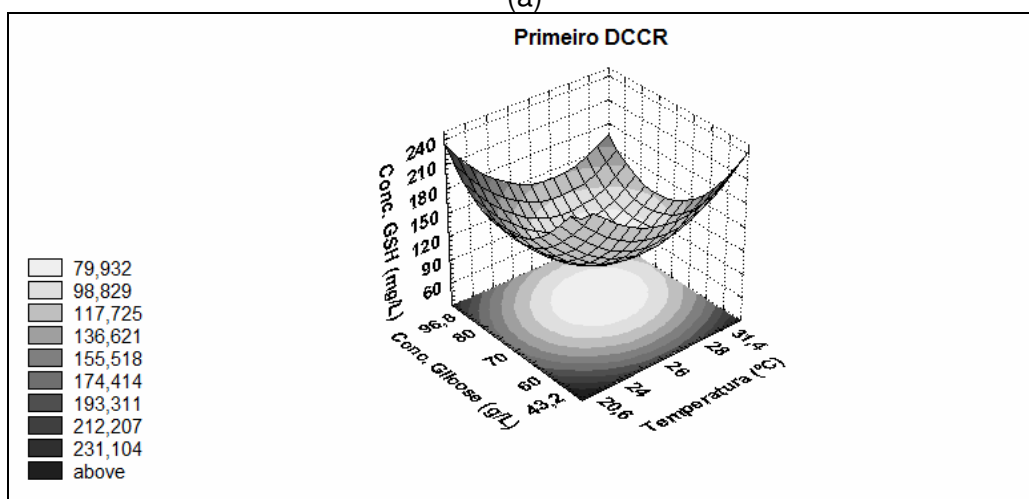
Os requisitos para a construção das superfícies foram atendidos, desta forma estão mostrados na Figura 9. Apesar disto, analisando esta figura, verificou-se que nas regiões estudadas de concentração inicial de glicose, temperatura e pH<sub>inicial</sub> foram obtidas regiões de mínimo para a concentração de GSH. Devido a este fato, fez-se necessário a realização de outro planejamento com o objetivo de otimizar as condições de cultivo para a produção de GSH em frascos Erlenmeyer.

As superfícies de resposta mostraram que provavelmente utilizando concentração inicial de glicose menor que 60 g/L, pH<sub>inicial</sub> inferior a 6,0 e temperatura menor que 25°C obter-se-ia maiores concentrações de GSH. Porém analisando os pontos axiais referentes ao pH (ensaios 11PD e 12PD) e o melhor resultado da concentração de GSH para os ensaios do PD, pôde-se concluir que o pH poderia ser fixado em 5,0 no próximo DCCR. Este fato também pode ser verificado na Figura 9, onde mostra que a concentração de glutatona varia pouco com mudanças no pH do meio.

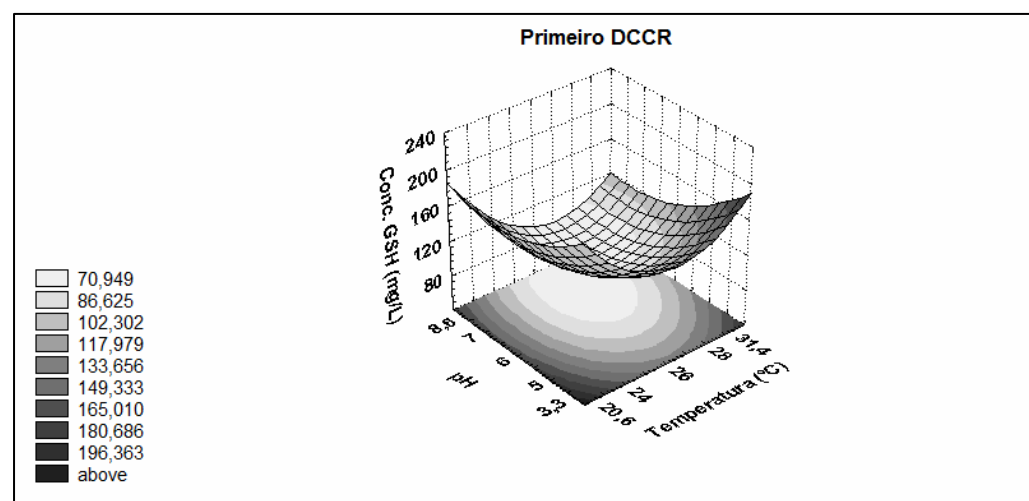
Da mesma forma, a análise dos pontos axiais da concentração inicial de glicose (ensaios 13PD e 14PD) demonstrou que altas concentrações de glicose inibiram a produção de GSH pela levedura. Em relação à temperatura, os melhores resultados de GSH foram obtidos em temperaturas baixas (níveis inferiores).



(a)



(b)



(c)

**Figura 9:** Superfícies de resposta do PD ( $2^3$ ) para a conc. de GSH como uma função: (a)  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  e conc. de glicose, (b) conc. de glicose e temperatura e (c)  $\text{pH}_{\text{inicial}}$  e temperatura.

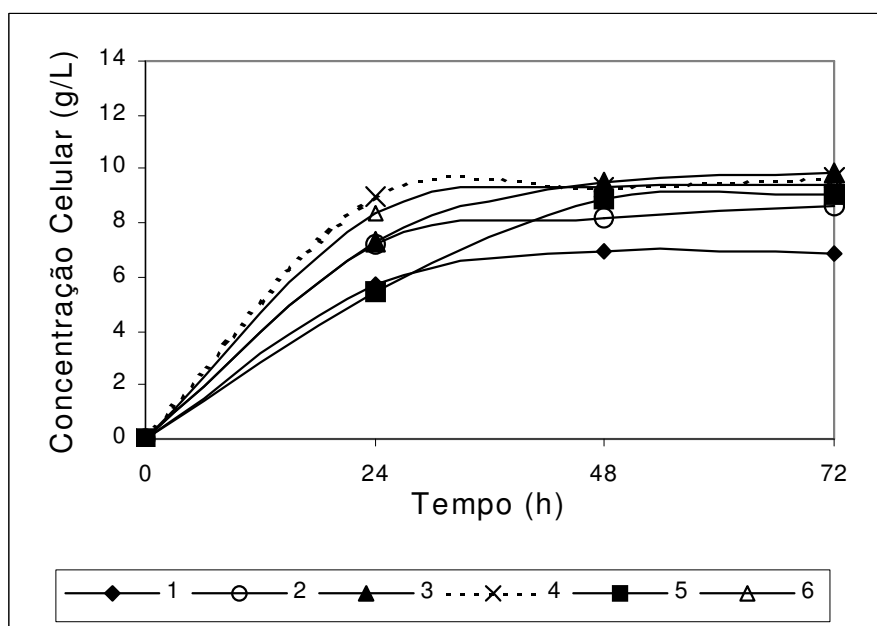
Em relação à análise estatística dos resultados de concentração celular (g/L) para 48 h e 72 h de fermentação, todas as variáveis não foram estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95% (Tabelas 41 e 42 anexos). Os resultados desta análise para o PD não foram apresentados e considerados para a elaboração do segundo DCCR, no qual foram avaliadas as influências da temperatura e da concentração de glicose nas faixas de 20 a 30 °C e 20 e 60 g/L, respectivamente.

### 5.1.3 Segundo Delineamento Composto Central Rotacional (SD)

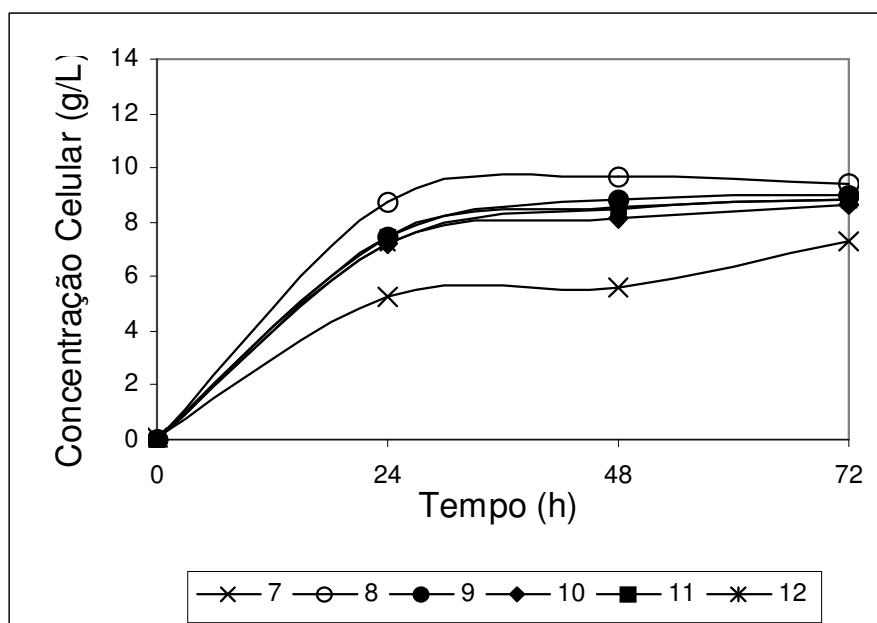
Para otimizar a produção de GSH nos frascos Erlenmeyer foi necessário realizar o segundo delineamento composto central rotacional (SD), sendo as variáveis estudadas, concentração inicial de glicose e temperatura. Os resultados de concentração inicial de glicose (g/L) e de pH durante as 72 h de fermentação estão expressos na Tabela 43 (anexos). A glicose, como nos outros dois delineamentos, foi totalmente consumida até 24 h de fermentação. O pH dos 12 ensaios após 48 h variou de 4,91 a 6,02 e para 72 h variou de 5,00 a 6,56.

A Figura 10 e a Tabela 44 (anexos) mostram os valores de concentração celular dos ensaios do SD ao longo da fermentação. No ensaio 3SD feito a 21,5 °C e 54,14 g/L de glicose foi observada a maior concentração celular (9,9 g/L) após 72 h de incubação. Nos ensaios 1SD, 2SD e 7SD feitos com as menores concentrações de glicose (20 e 25,86 g/L), foram observados os menores valores de concentração celular 6,9; 7,5 e 7,3 g/L, respectivamente. Na Figura 10 pôde-se constatar que até 24 h, na maioria dos ensaios, a levedura encontrava-se na fase exponencial e após este período na fase estacionária de crescimento.

A variação da concentração de GSH ao longo da fermentação pode ser visualizada na Figura 11 e na Tabela 45 (anexos). No ensaio 5SD (20 °C e 40 g/L de glicose) após 72 h, foi encontrada a maior concentração de GSH (154,5 mg/L). Nos ensaios 3SD e 8SD, também foram conseguidas quantidades consideráveis de GSH, 146,2 e 144,8 mg/L, respectivamente. Nos 12 ensaios a concentração de GSH variou de 103,7 a 154,5 mg/L após 72 h de incubação.

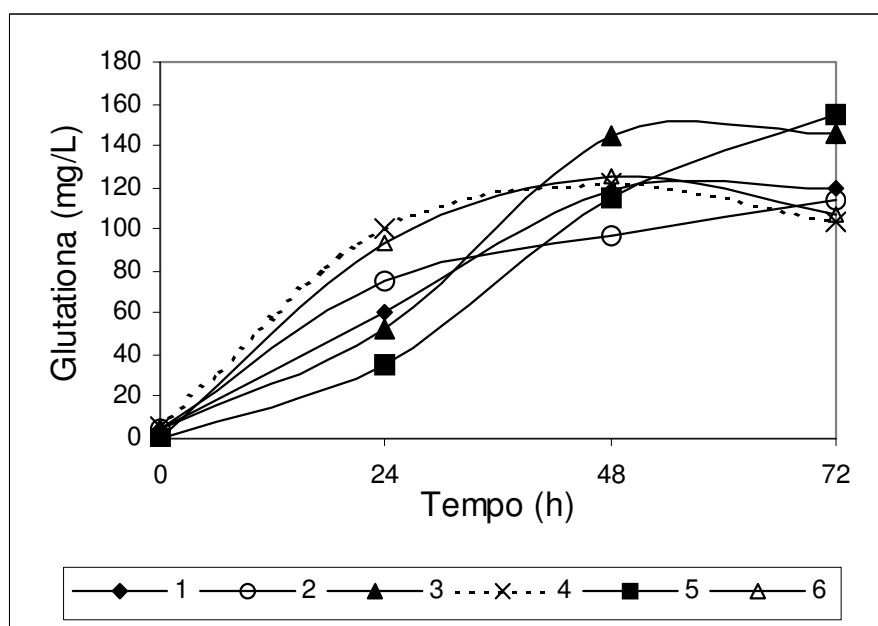


(a)

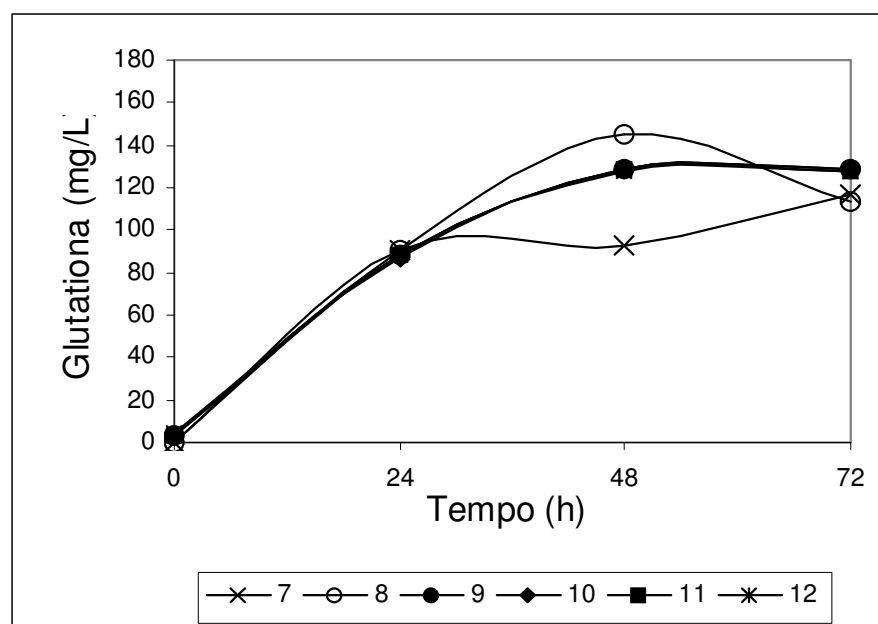


(b)

**Figura 10:** Acompanhamento da concentração celular (g/L) de *S. cerevisiae* durante o SD ( $2^2$ ):  
(a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 12.



(a)



(b)

**Figura 11:** Acompanhamento da concentração de GSH (mg/L) produzida por *S. cerevisiae* durante o SD ( $2^2$ ): (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 12.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados de porcentagem de GSH e os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) para os ensaios do SD, calculados através das Equações 1 a 4.

**Tabela 16:** Porcentagem de GSH produzida por *S. cerevisiae* e fatores de conversão para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | GSH (%) |      |      | Fatores de conversão                                 |                                                     |                                                     |
|--------|---------|------|------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|        | 24 h    | 48 h | 72 h | $Y_{P/S}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{X/S}$<br>(g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{P/X}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> ) |
| 1SD    | 1,1     | 1,7  | 1,7  | 4,45                                                 | 0,26                                                | 16,80                                               |
| 2SD    | 1,2     | 1,4  | 1,5  | 4,24                                                 | 0,29                                                | 14,62                                               |
| 3SD    | 0,7     | 1,5  | 1,5  | 2,61                                                 | 0,18                                                | 14,38                                               |
| 4SD    | 1,1     | 1,3  | 1,1  | 1,81                                                 | 0,18                                                | 10,18                                               |
| 5SD    | 0,7     | 1,3  | 1,7  | 3,86                                                 | 0,23                                                | 16,96                                               |
| 6SD    | 1,1     | 1,3  | 1,1  | 2,69                                                 | 0,23                                                | 11,50                                               |
| 7SD    | 1,7     | 1,7  | 1,6  | 5,83                                                 | 0,36                                                | 16,04                                               |
| 8SD    | 1,0     | 1,5  | 1,2  | 1,89                                                 | 0,16                                                | 12,10                                               |
| 9SD    | 1,2     | 1,5  | 1,4  | 3,14                                                 | 0,22                                                | 14,07                                               |
| 10SD   | 1,2     | 1,6  | 1,5  | 3,13                                                 | 0,21                                                | 14,56                                               |
| 11SD   | 1,2     | 1,5  | 1,5  | 3,12                                                 | 0,22                                                | 14,23                                               |
| 12SD   | 1,2     | 1,5  | 1,4  | 3,08                                                 | 0,22                                                | 14,01                                               |

Com respeito à porcentagem de GSH nas células, o maior valor foi de 1,7% encontrado nos ensaios 1SD e 5SD para 72 h de fermentação. No ensaio 7SD (25°C e 20 g/L de glicose) foram observados os maiores valores de conversão de substrato em produto e substrato em célula, 5,83 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub> e 0,36 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub>, respectivamente. Uma das explicações pode estar no fato de que neste ensaio foi utilizada a menor concentração inicial de glicose. A maior conversão de célula em produto foi de 16,96 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub> no ensaio 5SD (20°C e 40 g/L). Desta forma no ensaio 5SD, foram observados os maiores valores de concentração de GSH, porcentagem de GSH e conversão de célula em produto.

Os resultados de produtividade celular e em GSH conversão para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) estão expressos na Tabela 17.

**Tabela 17:** Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) conversão para o segundo delineamento composto central rotacional (SD) 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Produtividade celular<br>(g/L.h) |      |      | Produtividade em GSH<br>(mg/L.h) |      |      |
|--------|----------------------------------|------|------|----------------------------------|------|------|
|        | 24 h                             | 48 h | 72 h | 24 h                             | 48 h | 72 h |
| 1SD    | 0,24                             | 0,15 | 0,10 | 2,52                             | 2,47 | 1,67 |
| 2SD    | 0,26                             | 0,15 | 0,10 | 3,15                             | 2,01 | 1,59 |
| 3SD    | 0,30                             | 0,20 | 0,14 | 2,19                             | 3,02 | 2,03 |
| 4SD    | 0,37                             | 0,20 | 0,13 | 4,20                             | 2,54 | 1,44 |
| 5SD    | 0,23                             | 0,18 | 0,13 | 1,49                             | 2,39 | 2,15 |
| 6SD    | 0,35                             | 0,20 | 0,13 | 3,89                             | 2,61 | 1,49 |
| 7SD    | 0,22                             | 0,12 | 0,10 | 3,75                             | 1,92 | 1,62 |
| 8SD    | 0,36                             | 0,20 | 0,13 | 3,78                             | 3,02 | 1,58 |
| 9SD    | 0,31                             | 0,18 | 0,12 | 3,68                             | 2,68 | 1,79 |
| 10SD   | 0,30                             | 0,17 | 0,12 | 3,66                             | 2,68 | 1,78 |
| 11SD   | 0,31                             | 0,18 | 0,12 | 3,66                             | 2,67 | 1,78 |
| 12SD   | 0,30                             | 0,18 | 0,12 | 3,67                             | 2,67 | 1,77 |

Para todos os ensaios as produtividades foram maiores em 24 h, sendo os valores máximos de produtividade celular de 0,37 g/L.h e produtividade em GSH de 4,20 mg/L.h, ambas obtidas no ensaio 4SD.

Avaliando-se as curvas da Figura 11 e os resultados expressos na Tabela 45 (anexos), bem como os valores médios dos ensaios para 48 h (122,7 mg/L) e 72 h (124,1 mg/L), pôde-se verificar um pequeno aumento da concentração de GSH de 48 para 72 h de incubação. Como o objetivo deste planejamento foi obter o modelo que descrevesse o comportamento da concentração de GSH em função dos parâmetros estudados para os melhores resultados de produção de GSH, a análise estatística dos ensaios do SD foi feita para 72 h de fermentação.

Na Tabela 18 são apresentados todos os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de GSH do SD, sem excluir os termos não significativos, com 5% de significância.

**Tabela 18:** Coeficiente de regressão e desvio padrão do SD ( $2^2$ ), para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 72 h.

|                       | <b>Coeficiente de Regressão</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>t (6)</b> | <b>p-valor</b> |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Média*                | 128,15                          | 2,02                 | 63,35        | 0,000          |
| (1) Temperatura (L) * | -14,30                          | 1,43                 | -10,00       | 0,000          |
| Temperatura (Q)       | 0,96                            | 1,60                 | 0,60         | 0,512          |
| (2) Conc. Glicose (L) | 1,42                            | 1,43                 | 1,00         | 0,358          |
| Conc. Glicose (Q) *   | -7,04                           | 1,60                 | -4,40        | 0,004          |
| 1 L x 2 L *           | -9,22                           | 2,02                 | -4,56        | 0,004          |

\* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

O coeficiente de correlação obtido para este planejamento foi de 0,9599. Através dos dados da Tabela 18 pôde-se verificar que as variáveis significativas a um nível de confiança de 95% para os ensaios SD foram: temperatura (L), concentração de glicose (Q) e a interação entre estas duas variáveis. A Tabela 19 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o SD. Da mesma forma que nos ensaios do PD os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados e adicionados aos resíduos. O novo coeficiente de correlação obtido foi 0,9508.

**Tabela 19:** Análise de variância do SD ( $2^2$ ) para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 72 h.

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F<sub>calculado</sub></b> | <b>p-valor</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Regressão                | 2326,09                   | 3                         | 775,36                | 51,56                        | 0,00001        |
| Resíduos                 | 120,30                    | 8                         | 15,04                 |                              |                |
| Total                    | 2446,35                   | 11                        |                       |                              |                |

Porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) = 95%;  $F_{3;8;0,1} = 2,92$

A variação entre os coeficientes de regressão com todos os parâmetros (modelo com 6 parâmetros) e os coeficientes de regressão sem os parâmetros estatisticamente não significativos (modelo com 4 parâmetros) foi pequena. Desta forma optou-se por utilizar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos.

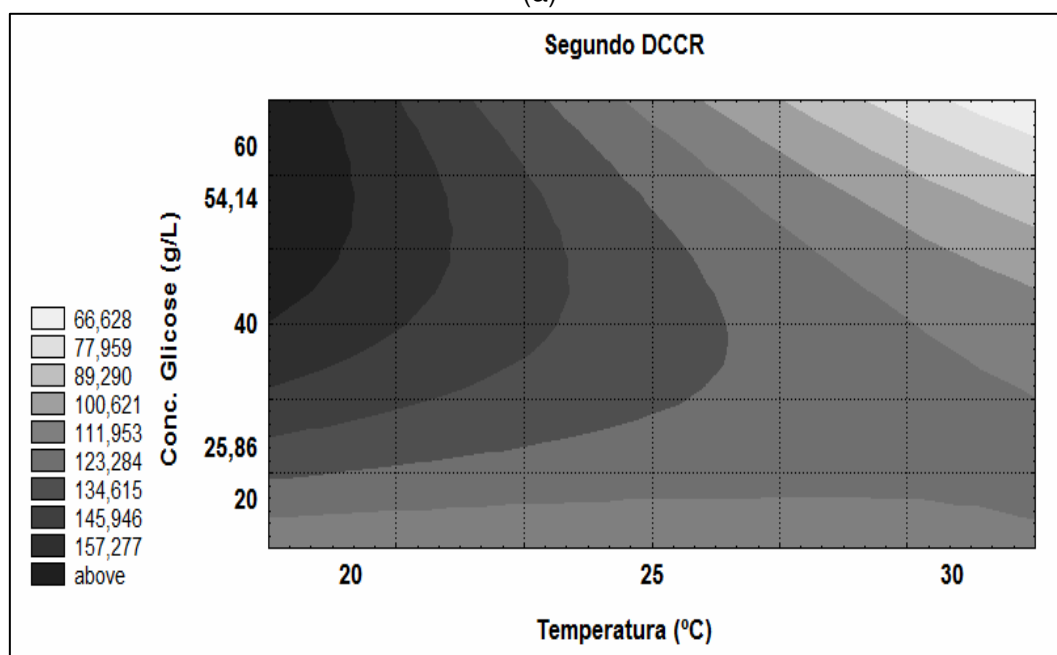
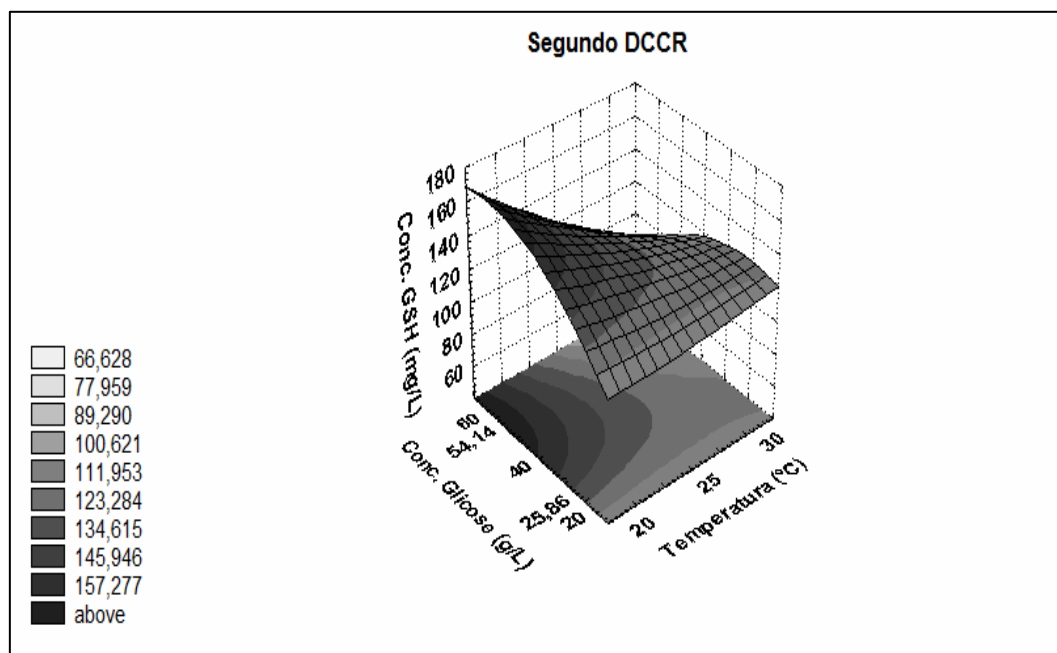
A equação 10 é o modelo com as variáveis codificadas que representa a concentração de GSH em mg/L em função da temperatura e da concentração inicial de glicose nas faixas estudadas do SD, onde  $X_1$  = temperatura e  $X_2$  = concentração inicial de glicose.

$$\text{Conc. de GSH (mg/L)} = 128,91 - 14,30 \cdot X_1 - 7,23 \cdot X_2^2 - 9,2 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad \text{equação (10)}$$

Este modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 19. Verificou-se que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequada ( $R^2$  95%) e  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão foi altamente significativo (p-valor 0,00001) e 17,6 vezes maior que  $F_{\text{tabelado}}$ .

O modelo foi altamente significativo, sendo possível construir as superfícies de respostas (Figura 12) e definir as regiões de interesse. O desvio padrão para os ensaios nos pontos centrais de temperatura e concentração inicial de glicose foi pequeno ( $\pm 0,38$ ) o que comprova a repetibilidade do processo.

Verificou-se através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno da Figura 12 (a) e (b), que as condições que provavelmente aumentarão a produção de GSH são temperatura de 20°C e concentração inicial de glicose entre 40 e 60 g/L.



**Figura 12:** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do SD ( $2^2$ ) para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* como uma função da concentração inicial de glicose e da temperatura.

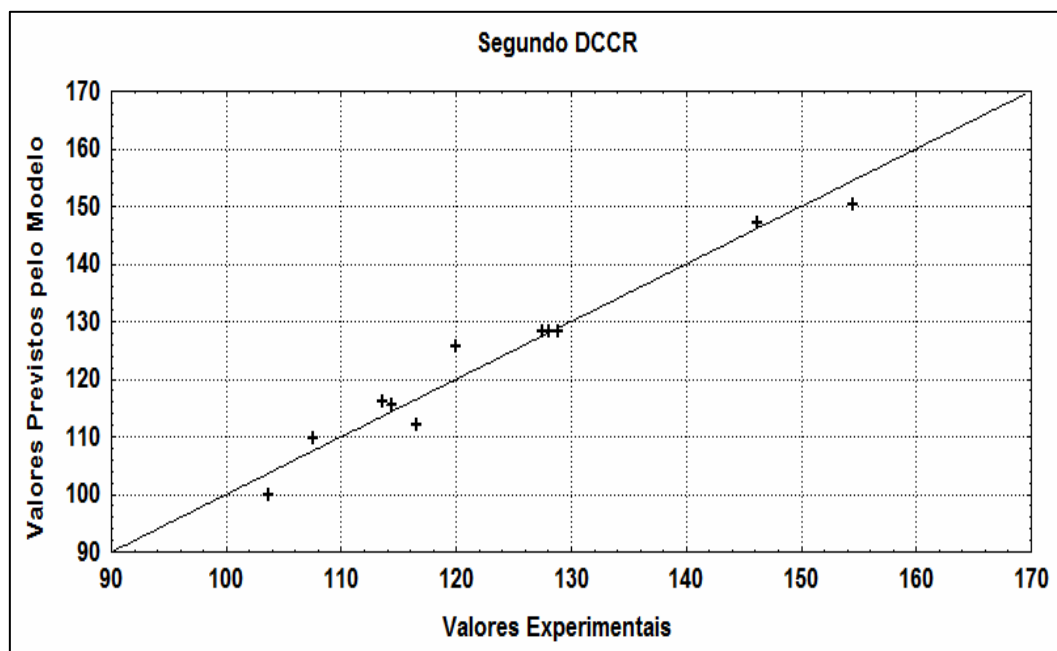
A Tabela 20 apresenta os valores experimentais das concentrações de GSH e os valores previstos pelo modelo, que foram validados pela ANOVA, bem como os desvios e desvios relativos para cada ensaio do SD, que foram calculados através das equações 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 20:** Concentrações de GSH experimentais, previstas pelo modelo, desvios e desvios relativos para o SD (2<sup>2</sup>) em 72 h.

| <b>Ensaio</b> | <b>Conc. GSH<br/>experimental (mg/L)</b> | <b>Conc. GSH<br/>prevista (mg/L)</b> | <b>Desvio</b> | <b>Desvio relativo<br/>(%)</b> |
|---------------|------------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------|
| 1SD           | 120,0                                    | 126,8                                | -6,8          | -5,67                          |
| 2SD           | 114,4                                    | 116,6                                | -2,2          | -1,92                          |
| 3SD           | 146,2                                    | 145,2                                | 1,0           | 0,68                           |
| 4SD           | 103,7                                    | 98,1                                 | 5,6           | 5,40                           |
| 5SD           | 154,5                                    | 149,2                                | 5,3           | 3,43                           |
| 6SD           | 107,6                                    | 108,7                                | -1,1          | -1,02                          |
| 7SD           | 116,5                                    | 114,4                                | 2,1           | 1,80                           |
| 8SD           | 113,6                                    | 114,4                                | -0,8          | -0,70                          |
| 9SD           | 128,8                                    | 128,9                                | -0,1          | -0,08                          |
| 10SD          | 128,2                                    | 128,9                                | -0,7          | -0,55                          |
| 11SD          | 128,1                                    | 128,9                                | -0,8          | -0,62                          |
| 12SD          | 127,5                                    | 128,9                                | -1,4          | -1,10                          |

Os dados da Tabela 20 mostraram que os desvios e os desvios relativos foram baixos em todos os ensaios. Os desvios variaram de 0,1 a 6,8, enquanto que os desvios relativos variaram de 0,08 a 5,67%. Os ensaios que foram constatados os maiores desvios e desvios relativos (1SD, 4SD e 5SD) não se encontravam nas regiões em que a concentração de GSH foi maximizada, em temperaturas  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  e concentração inicial de glicose  $\geq 40$  g/L.

A Figura 13 apresenta os valores observados experimentalmente versus os valores previstos pelo modelo para a concentração de GSH, observando-se boa concordância entre eles como era de se esperar pelo resultado da ANOVA.



**Figura 13:** Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a concentração de GSH no SD ( $2^2$ ) em 72 h.

Apesar do melhor resultado do SD ser inferior ao obtido no PD, os valores médios de concentração de GSH para 48 e 72 h foram maiores, 122,7 e 124,1 mg/L, respectivamente. Isto mostrou que neste planejamento, nas faixas estudadas de temperatura e concentração inicial de glicose, foram obtidos resultados mais satisfatórios para a concentração de GSH. Este fato pode ser ratificado através das Figuras 9 e 12, nas quais se pode constatar que no PD foram obtidas regiões de concentração mínima de GSH e já o SD apresentou uma região de máximo para a concentração de GSH. A análise estatística dos dados de concentração celular no SD foi feita para 72 h de fermentação.

Na Tabela 21 são apresentados todos os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração celular do SD, sem excluir os termos não significativos, com 5% de significância.

**Tabela 21:** Coeficiente de regressão e desvio padrão do SD ( $2^2$ ), para a concentração celular de *S. cerevisiae* em 72 h.

|                        | <b>Coeficiente de Regressão</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>t (6)</b> | <b>p-valor</b> |
|------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Média*                 | 8,80                            | 0,18                 | 47,62        | 0,000          |
| (1) Temperatura (L)    | 0,10                            | 0,13                 | 0,79         | 0,461          |
| Temperatura (Q)        | 0,14                            | 0,15                 | 0,97         | 0,369          |
| (2) Conc. Glicose (L)* | 1,01                            | 0,13                 | 7,72         | 0,000          |
| Conc. Glicose (Q) *    | -0,30                           | 0,15                 | -2,05        | 0,086          |
| 1 L x 2 L              | -0,21                           | 0,18                 | -1,13        | 0,303          |

\* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

Os dados da Tabela 21 mostraram que as variáveis significativas a um nível de confiança de 90% para a concentração celular dos ensaios do SD foram: concentração inicial de glicose (L) e (Q). O coeficiente de correlação obtido para este planejamento foi 0,9186. A Tabela 22 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o SD. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados e adicionados aos resíduos. O novo coeficiente de correlação obtido foi 0,8802.

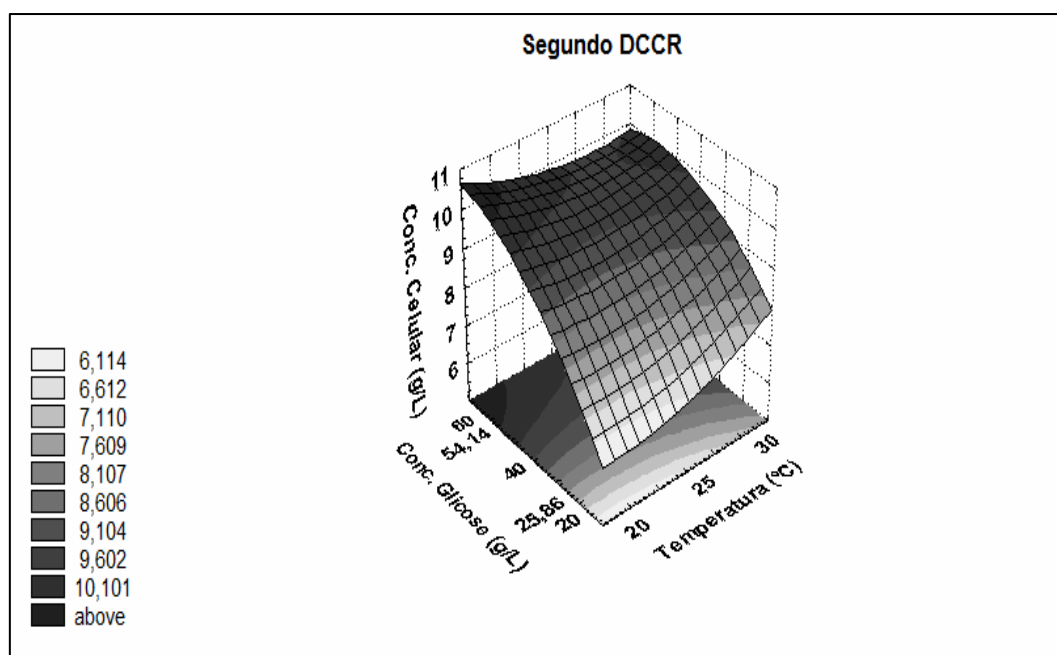
**Tabela 22:** Análise de variância do SD ( $2^2$ ) para a concentração celular de *S. cerevisiae* em 72 h.

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F<sub>calculado</sub></b> | <b>p-valor</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Regressão                | 8,87                      | 2                         | 4,44                  | 34,15                        | 0,00006        |
| Resíduos                 | 1,21                      | 9                         | 0,13                  |                              |                |
| Total                    | 10,08                     | 11                        |                       |                              |                |

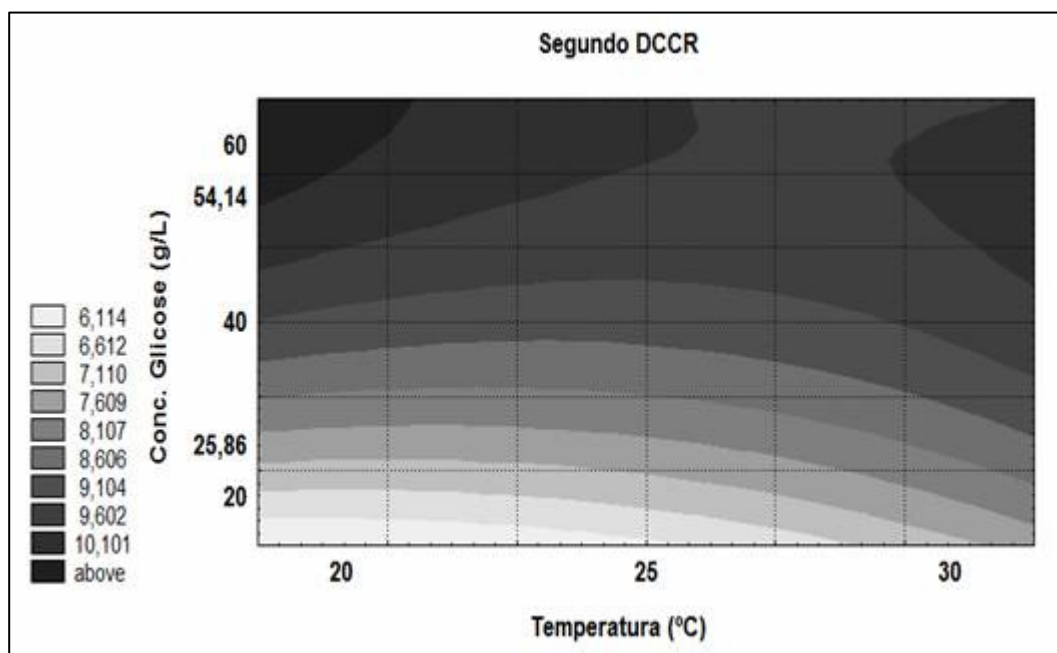
porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) = 88%;  $F_{2;9;0,1} = 3,01$

Na equação 11 é mostrado o modelo com as variáveis codificadas que representa a concentração celular em função da concentração inicial de glicose nas faixas estudadas do SD, onde  $X_1$  = concentração inicial de glicose.

$$\text{Conc. Celular (g/L)} = 8,92 - 1,01 \cdot X_1 - 0,33 \cdot X_1^2 \quad \text{equação (11)}$$



(a)



(b)

**Figura 14:** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do SD ( $2^2$ ) para a concentração celular de *S. cerevisiae* como uma função da concentração inicial de glicose e da temperatura.

A análise de variância mostrada na Tabela 22 validou o modelo da equação 11. A porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de  $R^2$  88% e o  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão foi altamente significativo (p-valor 0,00006) e aproximadamente onze vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ .

Desta forma, foi possível construir as superfícies de resposta e curva de contorno, como mostrado na Figura 14.

A variação entre os coeficientes de regressão com todos os parâmetros (modelo com 6) e sem os parâmetros estatisticamente não significativos (modelo com 3) foi pequena, com isso utilizou-se o modelo com os 3 parâmetros significativos.

Através da grande variação dos resultados obtidos nos três delineamentos experimentais, verificou-se a importância de estudar a influência das condições de cultivo durante os processos fermentativos. Zhang et al. (2007) citaram que a otimização dos meios de cultivo é importante nas pesquisas com fermentação. As fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e outros compostos podem influenciar o crescimento celular e o acúmulo de produtos metabólicos nas células microbianas. A otimização dos meios é a base para obter altos rendimentos e economia nos processos biotecnológicos.

Nos sobrenadantes das amostras foram feitas determinações de GSH, porém não foi detectada em nenhuma amostra. Isto comprovou as verificações feitas por Rollini e Manzoni (2006) que também não encontraram GSH no sobrenadante das amostras, comprovando sua natureza intracelular.

Comparando-se com os resultados de concentração celular e de GSH obtidos por outros autores em frascos Erlenmeyer com a mesma cepa de *S. cerevisiae* e com outras, pôde-se afirmar que neste trabalho foram obtidos resultados satisfatórios. A maior concentração de GSH encontrada nos ensaios foi 168,9 mg/L e concentração celular de 12,9 g/L.

Liu et al. (1999), estudando a otimização do meio para a produção de GSH com a mesma cepa utilizada neste trabalho (ATCC 7754), obtiveram a concentração máxima de 124,93 mg/L. Wei et al. (2003b) com *S. cerevisiae* WSH-J701 após 32 h de cultivo a concentração de GSH foi de 64,7 mg/L. Wen et al. (2004) utilizando *S. cerevisiae* T65 avaliaram a adição de aminoácidos durante as fermentações e obtiveram o máximo de 153,2 mg/L. Zhang et al. (2007) otimizaram o meio de cultivo para a *S. cerevisiae* T65 e obtiveram concentração de glutatona de 74,6 mg/L. Todos estes autores obtiveram concentrações menores que a máxima obtida neste estudo, sendo esta de 168,9 mg/L obtida no primeiro DCCR a 24°C, pH 5, 60 g/L de glicose, 5% de inóculo e 300 rpm.

Alguns autores estudando as condições de cultivo e adição de aminoácidos, conseguiram concentrações de GSH maiores. Cha et al. (2004), após otimizar as condições de cultivo para a produção de GSH, conseguiram concentração de 204 mg/L com *S. cerevisiae* FF-8. Wang et al. (2007) utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* G14 avaliaram a adição de aminoácidos e a maior concentração foi de 530 mg/L na fermentação feita com 4 mM de cada um dos três aminoácidos, que compõem a GSH.

Wen et al. (2005) estudaram a otimização da composição de aminoácidos adicionados durante a fermentação com *S. cerevisiae* T65 a porcentagem de GSH chegou a 1,836%. Rollini e Manzoni (2006) com *S. cerevisiae* CBS 1171 obtiveram valores de porcentagem de GSH entre 0,33 e 1,85%. Estes resultados também foram inferiores ao máximo obtido neste estudo, 2,1% no ensaio 3FF que foi conduzido a 26°C, 300 rpm, pH 5, 5% de inóculo e 70 g/L de glicose.

O melhor resultado expresso em  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  obtido por Fan et al. (2004) utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* modificada geneticamente foi 13,1  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ , enquanto Shimizu et al. (1991), utilizando *S. cerevisiae* KY5711 obtiveram rendimento de GSH de 10  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ . Liu et al. (2004) utilizaram *S. cerevisiae* de uma indústria cervejeira e os maiores resultados foram de  $\cong 10 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ . Estes resultados de conversão de célula em produto foram menores que o observado no ensaio 3FF, 20,8  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  (26°C, 300 rpm, pH 5, 5% de inóculo e 70 g/L de glicose).

Alfajara et al. (1992b) obtiveram 12-14  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  em ensaio no qual a concentração de cisteína foi mantida em 3 mM através de alimentação constante. Quando a alimentação de cisteína foi feita em pontos isolados durante a fermentação os resultados foram melhores que com a alimentação constante (aproximadamente 22  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ).

Dong et al. (2007) aplicando altas pressões no cultivo de *S. cerevisiae* observaram com pressão de 1,0 MPa por 6 h, a conversão de célula em produto de 103  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  e este valor foi 68,8% maior em relação ao cultivo à pressão atmosférica.

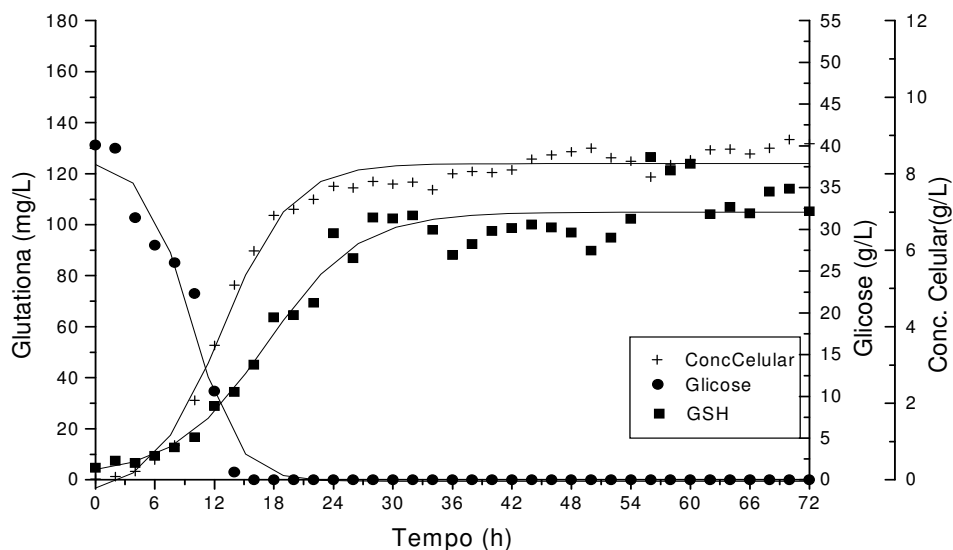
Em relação à concentração celular, o maior resultado foi de 12,9 g/L no ensaio 6PD. Liu et al. (1999), Wei et al. (2003b), Wen et al. (2004), Cha et al. (2004) e Rollini e Manzoni (2006) obtiveram concentrações celulares de 9,45 g/L, 5,4 g/L, 9,4 g/L, 8,85 g/L e 10,5 g/L, respectivamente.

A partir dos resultados dos três delineamentos em frascos Erlenmeyer decidiu-se que no fermentador de bancada as condições a serem utilizadas deveriam ser: temperatura de 20°C, concentração inicial de glicose de 54 g/L, pH<sub>inicial</sub> 5 e concentração de inóculo de 5%.

## 5.2 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA

Com base nos resultados observados nas fermentações para a produção de GSH nos frascos Erlenmeyer, foram feitos ensaios no fermentador de bancada, com o objetivo de definir as melhores condições de aeração, agitação, fonte de nitrogênio e a adição de aminoácidos para este tipo de fermentador.

Na Figura 15 são mostrados os resultados de concentração de GSH, celular de *S. cerevisiae* e de glicose do ensaio 1FB feito no fermentador de bancada. Na Tabela 46 (anexos) além destes resultados é mostrado o acompanhamento do pH ao longo da fermentação.



**Figura 15:** Acompanhamento do ensaio 1FB (25°C, 40 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, com peptona e sem adição de aminoácidos) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*.

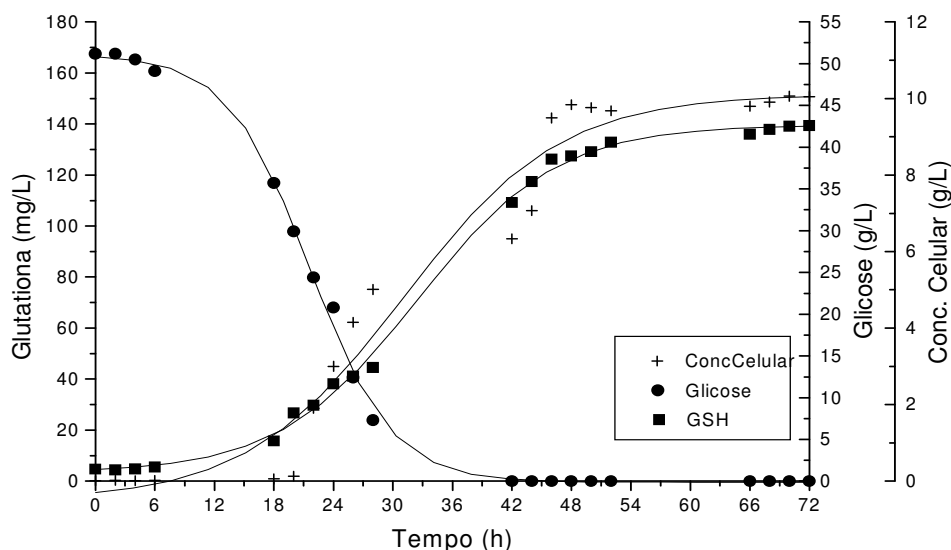
Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Na Figura 15 pôde-se verificar que a glicose foi consumida pela levedura até 16 h de fermentação. O pH variou ao longo da fermentação, de 5,0 a 5,85. Em relação ao

comportamento da levedura, conseguiu-se distinguir claramente as três fases de crescimento: 0 a 6 h a fase lag, 6 a 18 h a fase exponencial e após este período fase estacionária.

A concentração celular após 36 h variou pouco de 7,91 a 8,89 g/L e o maior valor foi observado em 70 h de fermentação. A concentração de GSH variou de 4,7 a 126,6 mg/L, com seu máximo valor obtido em 56 h.

Os resultados de concentração de GSH, celular e de glicose do ensaio 2FB são mostrados na Figura 16 e na Tabela 47 (anexos). Nesta mesma tabela também são apresentados os valores de pH.

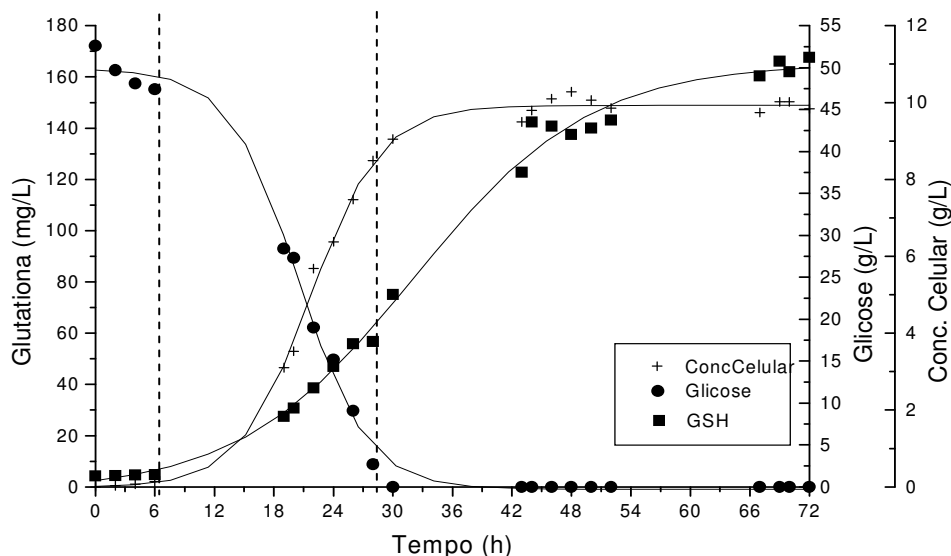


**Figura 16:** Acompanhamento do ensaio 2FB (20°C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, com peptona e sem adição de aminoácidos) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*.

Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Como a concentração inicial de glicose no ensaio 2FB foi maior que no ensaio 1FB, a glicose foi totalmente consumida somente após 28 h de fermentação. O pH mínimo observado durante a fermentação foi de 4,33 e o máximo de 5,30. A concentração celular obtida neste ensaio também foi maior (10,15 g/L em 70 h), bem como a concentração de GSH, 139,4 mg/L após 72 h de fermentação. A concentração de GSH variou de 4,7 a 139,4 mg/L.

O ensaio 1FB foi feito a 25°C e o ensaio 2FB foi 20°C, como indicou os ensaios nos frascos Erlenmeyer para estimular a produção de GSH. A concentração de GSH aumentou de 126,6 mg/L (1FB) para 139,4 mg/L (2FB). Na Tabela 48 (anexos) e Figura 17 são mostrados os resultados do ensaio 3FB.

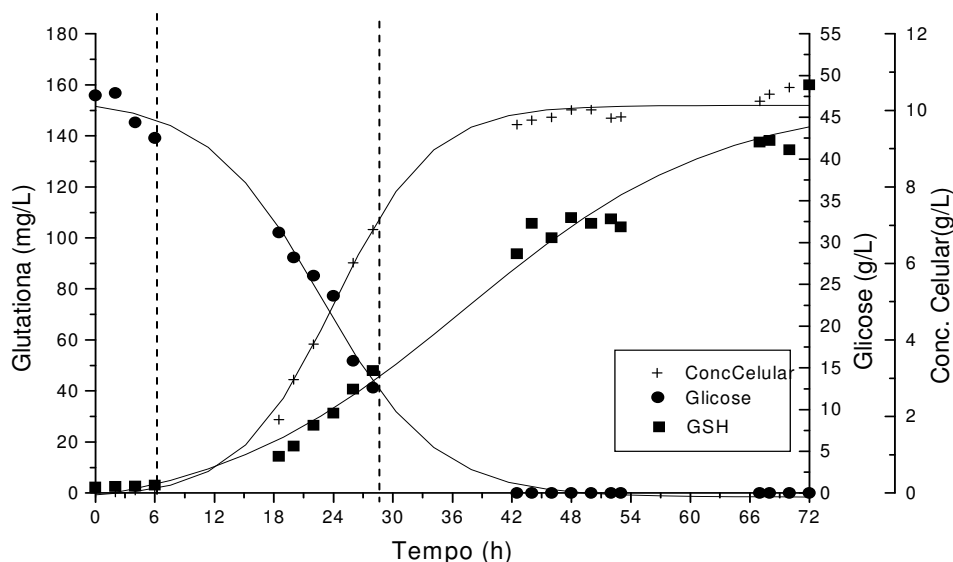


**Figura 17:** Acompanhamento do ensaio 3FB (20°C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

Os resultados deste ensaio mostraram que a glicose foi consumida até 30 h de fermentação. O pH variou de 4,05 a 4,61. A maior concentração celular foi de 10,28 g/L, em 48 h de fermentação. Como eram esperados, devido à adição dos aminoácidos em 6 e 28 h de fermentação, os resultados de concentração de GSH deste ensaio foram maiores que nos ensaios anteriores no fermentador de bancada. Em 72 h de fermentação a concentração de GSH foi de 167,6 mg/L.

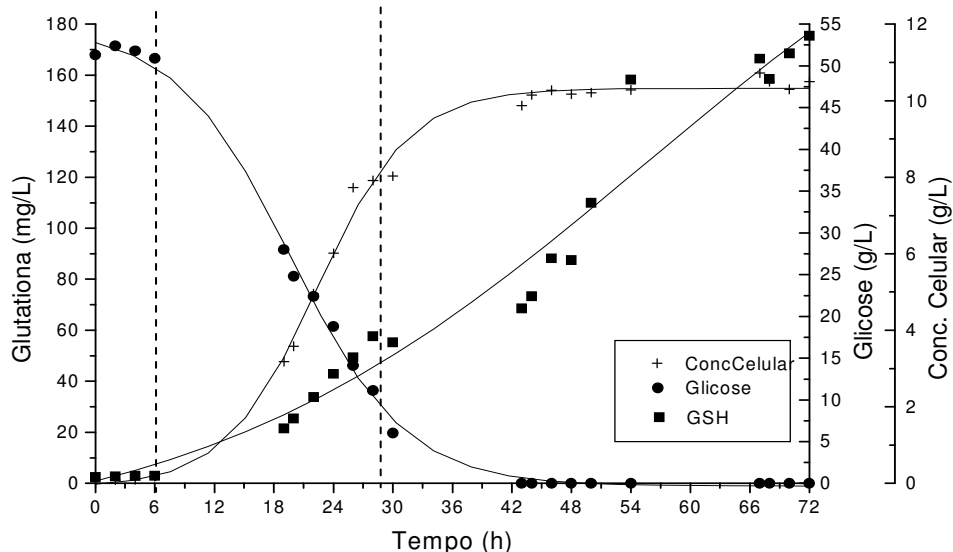
Na Tabela 49 (anexos) e na Figura 18 são mostrados os resultados durante o ensaio 4FB. A glicose foi totalmente consumida entre 28 e 42,5 h, como não foram tiradas amostras neste período não se pôde afirmar com precisão com quanto tempo de fermentação a glicose foi totalmente consumida.

A variação do pH nesta fermentação foi de 4,07 a 5,20. A maior concentração celular foi de 10,6 g/L após 70 h de fermentação. Em relação à concentração de GSH, o maior resultado foi de 159,9 mg/L em 72 h.



**Figura 18:** Acompanhamento do ensaio 4FB (20°C, 54 g/L de glicose, 400 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

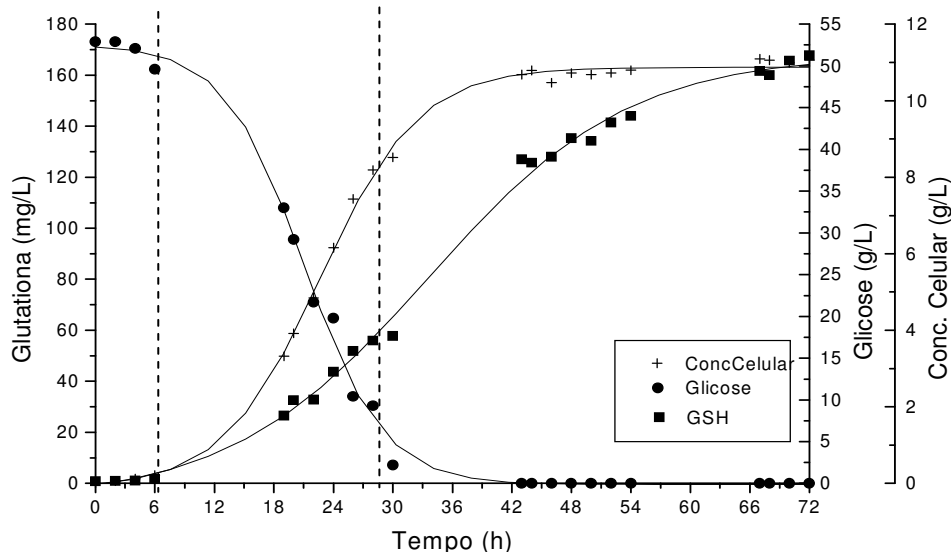
Na Figura 19 e Tabela 50 (anexos) podem ser visualizados os resultados do ensaio 5FB. O pH oscilou entre 4,11 e 5,13. A concentração de glicose chegou à zero entre 30 e 43 h. A maior concentração celular foi de 10,72 g/L em 67 h. Já a maior concentração de GSH foi observada em 72 h, sendo o valor de 175,4 mg/L.



**Figura 19:** Acompanhamento do ensaio 5FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 0,53 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

Os ensaios 3FB, 4FB e 5FB foram feitos com o intuito de avaliar o efeito da agitação durante a fermentação em 300, 400 e 500 rpm. Os planejamentos feitos nos frascos Erlenmeyer indicaram que a agitação deveria ser aumentada para incrementar a concentração de GSH, porém no “shaker” utilizado não era possível aumentar a agitação acima de 300 rpm. Os resultados destes três ensaios indicaram que a agitação influenciou a concentração de GSH, sendo que o melhor resultado observado no ensaio com maior agitação. Devido a este fato, nas outras fermentações no fermentador de bancada, a agitação foi de 500 rpm.

A Tabela 51 (anexos) e Figura 20 apresentam os resultados do ensaio 6FB. A variação do pH foi de 3,84 a 5,03 e a maior concentração celular foi de 11,09 g/L em 67 h. Como observado no ensaio 5FB a glicose foi totalmente consumida entre 30 e 43 h.

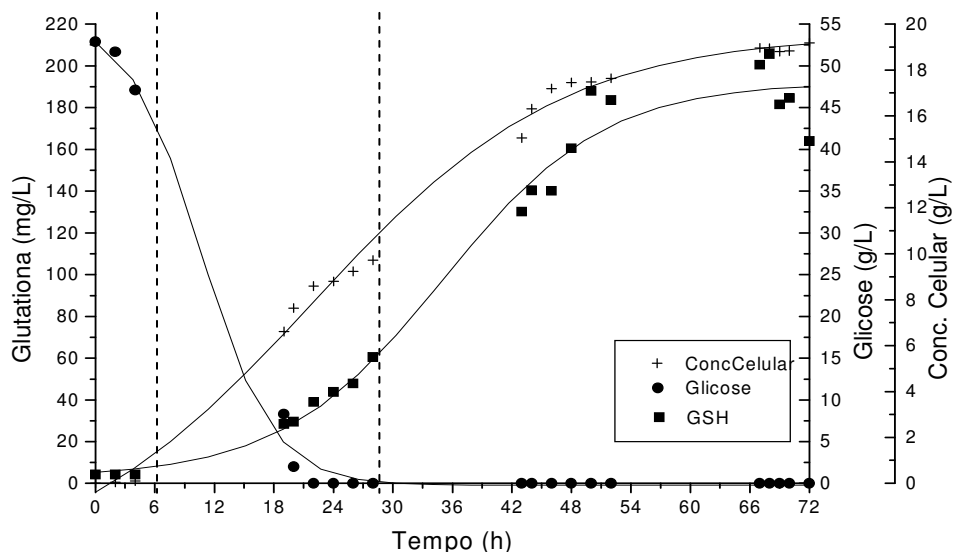


**Figura 20:** Acompanhamento do ensaio 6FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com peptona e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

A maior concentração de GSH foi de 167,8 mg/L após 72 h de fermentação. Este ensaio foi feito para avaliar a influência da aeração na concentração de GSH e como os resultados da concentração celular e de GSH foram semelhantes para os dois ensaios (5FB e 6FB), decidiu-se manter a aeração em 1,1 vvm nos próximos ensaios.

LIN et al. (2004) citaram que o oxigênio dissolvido é um fator limitante para o acúmulo de GSH na célula. Nas células de leveduras a síntese deste tripeptídeo requer a participação de moléculas de ATP e altos níveis de OD são favoráveis para a produção de ATP e a regeneração do ADP a ATP, favorecendo assim a produção de GSH.

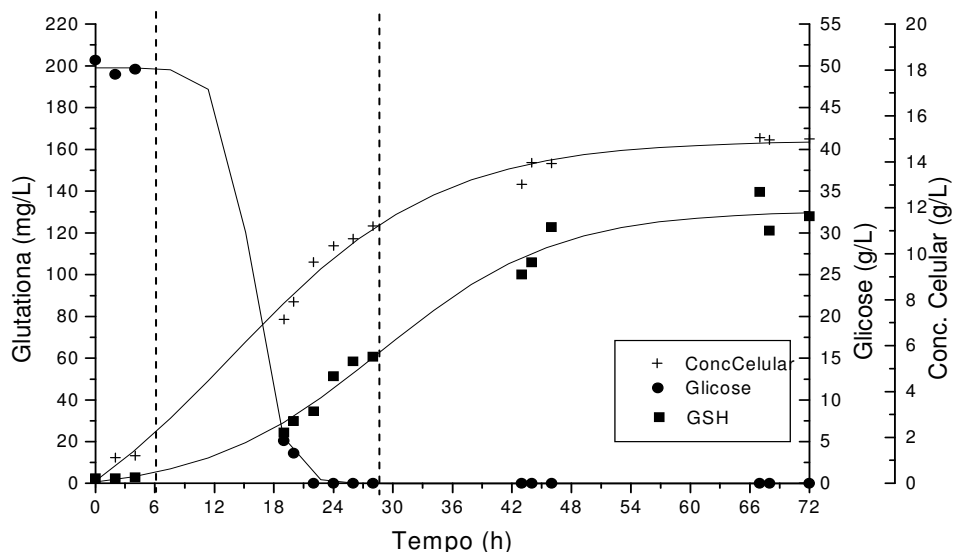
Os resultados do ensaio 7FB podem ser observados na Tabela 52 (anexos) e na Figura 21. Os ensaios 7FB e 8FB foram feitos com o objetivo de avaliar a fonte de nitrogênio na produção de GSH.



**Figura 21:** Acompanhamento do ensaio 7FB (20°C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com extrato de levedura e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

O pH variou de 4,31 a 5,19 e a glicose foi totalmente consumida entre 20 e 22 h. A maior concentração celular foi encontrada no final da fermentação com valor de 19,19 g/L. A concentração de GSH teve o seu maior valor em 68 h, 205,7 mg/L.

Os resultados do ensaio 8FB são visualizados na Tabela 53 (anexos) e na Figura 22. O pH oscilou entre 4,11 e 5,60. A glicose foi consumida entre 20 e 22 h e em 67 h de fermentação foram obtidas as maiores concentrações de células e de GSH, 15,05 g/L e 139,5 mg/L, respectivamente. Nos ensaios 6FB, 7FB e 8FB foi variada a fonte de nitrogênio, peptona, extrato de levedura e água de maceração de milho, respectivamente. Foi constatado que com o extrato de levedura foi conseguida a maior concentração de GSH.



**Figura 22:** Acompanhamento do ensaio 8FB (20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com água de maceração de milho e com adição de aminoácidos nos tempos de 6 e 28 h) durante as 72 h de fermentação por *S. cerevisiae*. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

As maiores concentrações celular e de GSH encontradas nos ensaios no fermentador de bancada foram de 19,2 g/L e 205,7 mg/L, respectivamente. Ambos os resultados foram observados no ensaio 7FB, que foi conduzido a 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, com extrato de levedura e adição de aminoácidos.

A Tabela 23 apresenta os valores de porcentagem de GSH máximos obtidos durante as fermentações no fermentador de bancada e os fatores de conversão, calculados através das equações 1 a 4.

**Tabela 23:** Porcentagem máxima de GSH e fatores de conversão para as fermentações no fermentador de bancada (FB).

| Ensaio | GSH (%) <sup>*</sup> | Fatores de conversão                                 |                                                     |                                                     |
|--------|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|        |                      | $Y_{P/S}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{X/S}$<br>(g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{P/X}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> ) |
| 1FB    | 1,60 <sub>(56)</sub> | 2,51                                                 | 0,22                                                | 11,50                                               |
| 2FB    | 1,38 <sub>(72)</sub> | 2,49                                                 | 0,19                                                | 13,36                                               |
| 3FB    | 1,70 <sub>(72)</sub> | 3,02                                                 | 0,18                                                | 16,60                                               |
| 4FB    | 1,51 <sub>(72)</sub> | 2,92                                                 | 0,20                                                | 14,90                                               |
| 5FB    | 1,67 <sub>(72)</sub> | 3,25                                                 | 0,19                                                | 16,70                                               |
| 6FB    | 1,52 <sub>(72)</sub> | 3,11                                                 | 0,20                                                | 15,17                                               |
| 7FB    | 1,09 <sub>(72)</sub> | 3,03                                                 | 0,36                                                | 8,54                                                |
| 8FB    | 0,93 <sub>(67)</sub> | 2,37                                                 | 0,28                                                | 8,53                                                |

\* valor entre parênteses corresponde ao tempo de fermentação da máxima porcentagem GSH.

A máxima porcentagem de GSH foi alcançada após 72 h no ensaio 3FB (1,70%). No ensaio 5FB foi observada a maior conversão de célula em produto (16,70 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>) e substrato em produto (3,25 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub>) e no ensaio 7FB a maior conversão de substrato em célula (0,36 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub>).

Nos ensaios 1FB, 2FB, 7FB e 8FB ocorreu crescimento celular plenamente associado à produção de GSH, o que era esperado por se tratar de um produto intracelular. Porém nos ensaios 3FB, 4FB, 5FB e 6FB foi observada produção contínua de GSH independente do consumo de glicose e da fase de crescimento celular. Os melhores resultados de concentração de GSH foram alcançados durante a fase estacionária. Este mesmo comportamento foi observado por Izawa et al. (1995) e Suzuki et al. (1999).

A maioria dos resultados encontrados no fermentador de bancada neste trabalho foram inferiores aos observados por outros autores. Na maior parte dos casos estes utilizaram fermentação em batelada alimentada com adição de aminoácidos, que indicou ser a estratégia mais eficiente para incrementar as concentrações de GSH. No ensaio 7FB (20°C, 54 g/L glicose, 500 rpm, com adição de aminoácidos, 1,1 vvm e extrato de levedura) foram observadas as maiores concentrações de GSH 205,7 mg/L e celular 19,2 g/L.

Lin et al. (2004) através de fermentação em batelada alimentada obtiveram 0,81 g/L de GSH e concentração celular de 105 g/L, utilizando *S. cerevisiae* ZJUS1. Wen et al. (2004),

empregando *S. cerevisiae* T65 e cultivo de batelada alimentada sem adição de aminoácidos, obtiveram 702,5 mg/L após 42 h e no ensaio com adição de aminoácidos 1875 mg/L após 44 h de fermentação. Wen et al. (2005), utilizando a mesma cepa de *S. cerevisiae* e fermentador de 5 L estudaram a adição de aminoácidos durante a fermentação. No ensaio sem a adição de aminoácidos foram produzidas 170,14 mg/L após 24 de fermentação. Já no ensaio com adição de aminoácidos em 6 e 12 h de fermentação, após 24 h foram encontrados 329,3 mg/L.

Wen et al. (2006) maximizaram a produção de GSH em fermentação de batelada alimentada através da adição de glicose e aminoácidos em fermentador de 5 L com *S. cerevisiae* T65. A maior concentração foi de 2190 mg/L após 60 h de fermentação. Wang et al. (2007) utilizando *S. cerevisiae* G14 em fermentador de 5 L no ensaio com adição dos aminoácidos após 32 h de fermentação, a concentração máxima foi de 2020 mg/L após 38 h de cultivo.

A maior conversão de célula em produto foi alcançada no ensaio 5FB com valor de 16,7 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél.</sub>. Liu et al. (2004) utilizaram fermentador de 15 L e *S. cerevisiae* de uma indústria cervejeira e a maior conversão de célula em produto foi de 18 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél.</sub>

### 5.3 ENSAIOS COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS GERADOS POR BOBINA

A partir dos resultados obtidos anteriormente foram definidas as condições de cultivo das fermentações com a aplicação de campos magnéticos gerados por bobina e por ímãs. Nestas fermentações as condições de cultivo foram pH<sub>inicial</sub> 5, 20°C, 54 g/L de glicose, 50 g/L de extrato de levedura e com adição de aminoácidos. Utilizando a bobina para aplicar o CM a agitação foi de 200 rpm e com ímãs foi de 500 rpm. Esta diferença se deu em função do tipo de equipamento utilizado para os dois tipos de fermentação.

Nas fermentações com bobina as variáveis estudadas foram: o tempo de exposição e a indução magnética. Primeiramente, foram feitas três fermentações controle (sem aplicação de CM) com o objetivo de verificar como a aplicação de CM influenciou a produção de GSH e a concentração celular.

### 5.3.1 Sem Aplicação de Campos Magnéticos (controle)

A Tabela 54 (anexos) mostra os resultados de pH durante as fermentações controle. Para 48 h o pH variou de 5,04 a 5,63 e para 72 h de fermentação de 4,62 a 4,71. Pôde-se observar através dos resultados que o comportamento do pH foi semelhante para todos os experimentos. Na Tabela 24 estão os resultados de concentração celular (g/L) durante a fermentação para os ensaios controle e a média destes valores.

**Tabela 24:** Concentração celular (g/L) de *S. cerevisiae* dos ensaios controle em 72 h

| Ensaio | Concentração Celular (g/L) |            |            |
|--------|----------------------------|------------|------------|
|        | 24 h                       | 48 h       | 72 h       |
| 1      | 6,3                        | 9,7        | 12,8       |
| 2      | 6,2                        | 9,8        | 13,9       |
| 3      | 6,4                        | 10,9       | 14,0       |
| média  | 6,3 ± 0,1                  | 10,2 ± 0,7 | 13,6 ± 0,7 |

± desvio padrão

Nas três amostras (24, 48 e 72 h) o desvio padrão foi pequeno, mostrando que o processo de fermentação teve reprodutibilidade. Para avaliar, durante a fermentação, os efeitos da aplicação dos CM em relação à concentração celular, os valores de referência utilizados foram as médias das concentrações dos ensaios controle para cada amostra de 24, 48 e 72 h de fermentação, sendo estes 6,3; 10,2 e 13,6 g/L, respectivamente.

Os resultados de concentração de GSH (mg/L) para os ensaios controle e a média destes valores são apresentados na Tabela 25. Para 24, 48 e 72 h, as médias das concentrações foram de 33,8; 116,1 e 244,7 mg/L, respectivamente. Estes valores foram usados como referência para avaliar a influência da aplicação dos CM durante as fermentações.

**Tabela 25:** Concentração de GSH (mg/L) produzida por *S. cerevisiae* dos ensaios controle em 72 h

| Ensaio | Glutathiona (mg/L) |           |           |
|--------|--------------------|-----------|-----------|
|        | 24 h               | 48 h      | 72 h      |
| 1      | 31,2               | 110,4     | 238,9     |
| 2      | 37,5               | 120,8     | 248,2     |
| 3      | 32,8               | 116,9     | 247,0     |
| média  | 33,8±3,2           | 116,1±5,3 | 244,7±5,0 |

± desvio padrão

### 5.3.2 Com Aplicação de Campos Magnéticos Gerados por Bobina

As variáveis utilizadas no delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM), os seus níveis reais e codificados e a matriz dos ensaios realizados são apresentados na Tabela 7. Na Tabela 55 (anexos) estão apresentados os resultados de pH e concentração de GSH dos ensaios do DCM. Para 72 h de fermentação o pH dos ensaios variou de 5,03 a 7,15 e para 48 h variou de 4,84 a 5,22.

Na Tabela 26 estão expressos os valores de concentração celular e porcentagem de diferença da concentração celular (PDC) com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle durante 72 h de fermentação. O valor médio da concentração celular dos ensaios controle foi de 13,6 g/L. Através da equação 7 foram calculados os valores de PDC.

A concentração celular variou de 12,4 a 14,5 g/L em 48 h e 14,8 a 16,3 g/L em 72 h de fermentação. O ensaio 3DCM apresentou a maior concentração celular (16,3 g/L) seguido do ensaio 1DCM (16,1 g/L). Nestes dois ensaios foram aplicados 25 mT por um tempo 16 e 8 h, respectivamente.

**Tabela 26:** Concentração celular (g/L) de *S. cerevisiae* e porcentagem de diferença de concentração celular (PDC) para os tempos de 24, 48 e 72 h do delineamento fatorial completo com aplicação do CM.

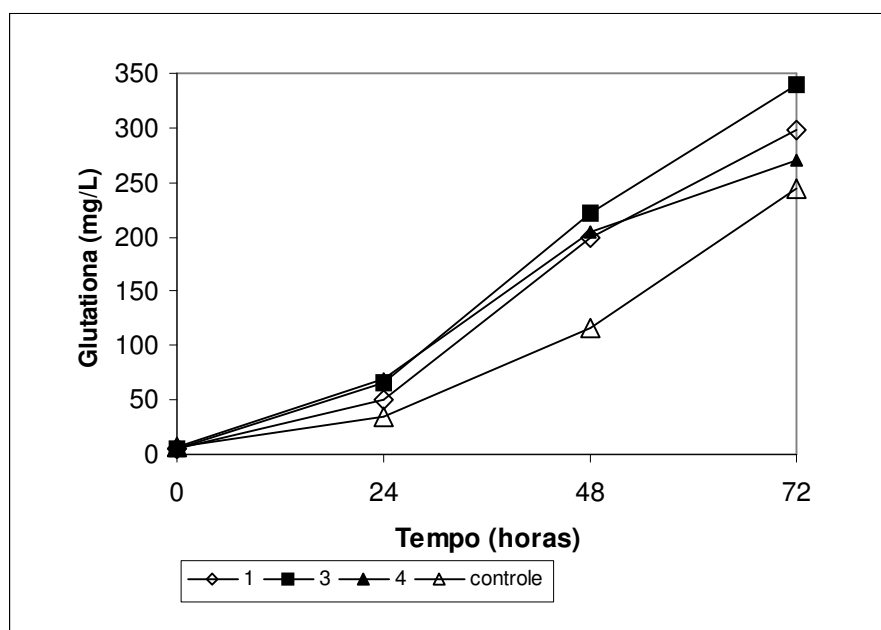
| Ensaio | Conc. Celular (g/L) |      |      | PDC (%)* |        |        |
|--------|---------------------|------|------|----------|--------|--------|
|        | 24 h                | 48 h | 72 h | 24 h     | 48 h   | 72 h   |
| 1DCM   | 7,0                 | 12,4 | 16,1 | + 10,6   | + 22,0 | + 18,5 |
| 2DCM   | 7,5                 | 13,4 | 14,9 | + 19,0   | + 31,3 | + 9,4  |
| 3DCM   | 7,8                 | 14,5 | 16,3 | + 23,3   | + 42,1 | + 19,6 |
| 4DCM   | 8,9                 | 13,4 | 15,0 | + 41,4   | + 31,5 | + 10,2 |
| 5DCM   | 7,2                 | 13,0 | 14,8 | + 14,5   | + 27,4 | + 9,2  |
| 6DCM   | 8,2                 | 13,0 | 14,8 | + 29,5   | + 27,3 | + 8,5  |
| 7DCM   | 8,4                 | 13,0 | 14,8 | + 33,3   | + 27,3 | + 8,6  |

\* (+) efeito estimulante e (-) efeito inibitório

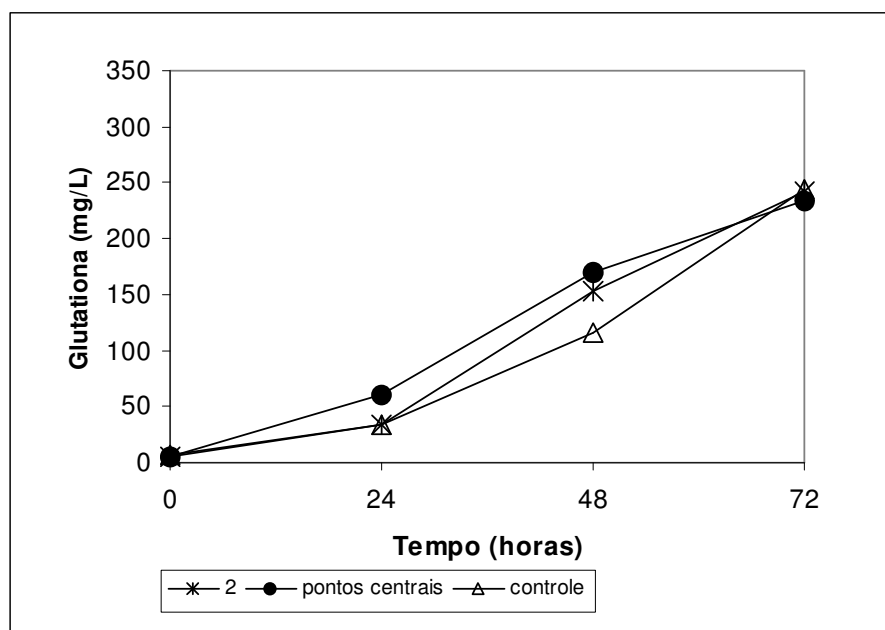
Através dos resultados pôde-se verificar que, nas faixas de indução magnética e tempo de aplicação dos CM, houve um incremento da concentração celular a partir de 24 h para todos os ensaios, e este ganho de acordo com o tempo de fermentação variou de 8,5 a 42,1%. Após 48 h de fermentação os valores de PDC diminuíram em todos os ensaios, o que pode ter ocorrido devido aos CM. Porém, até 72 h de fermentação, pode-se afirmar que, nas condições estudadas, não houve inibição do crescimento celular devido à aplicação dos CM.

A Figura 23 mostra os resultados de concentração de GSH nos ensaios do DCM. Os ensaios 5DCM, 6DCM e 7DCM são os pontos centrais, que nesta figura foram representados pelo valor médio destes três ensaios.

A concentração de GSH variou de 153,3 a 222,1 mg/L após 48 h e 231,7 a 340,0 mg/L para 72 h de fermentação. O maior valor (340,0 mg/L) foi observado no ensaio 3DCM, no qual foram aplicados 25,0 mT por 16 h. Ao final da fermentação foi observado que nos ensaios 2DCM, 5DCM, 6DCM e 7DCM ocorreu um efeito inibitório, ou seja, as concentrações de GSH observadas foram menores que no ensaio controle. Entretanto para os ensaios 1DCM, 3DCM e 4DCM as concentrações de GSH foram maiores que no ensaio controle, portanto a aplicação do CM estimulou a produção de GSH.



(a)



(b)

**Figura 23:** Concentração de GSH (mg/L) produzida por *S. cerevisiae* durante o DCM (a) ensaios com efeito estimulante (1, 3 e 4) e (b) ensaios com efeito inibitório (2 e pontos centrais) para 72 h de fermentação em relação ao ensaio controle.

Mehedintu e Berg (1997) citaram que quando as curvas de concentração celular do ensaio controle e dos ensaios com aplicação de campos se cruzam, ou seja, há uma intersecção, é observada uma “janela eletromagnética” negativa, que sugere dependência do tempo de exposição. Ou seja, a concentração no ensaio com CM será menor que no ensaio controle.

As curvas dos pontos centrais e do ensaio 2DCM se cruzaram, o que indicou que nestes ensaios foram encontradas duas “janelas eletromagnéticas” negativas. As condições destes ensaios foram 29,6 mT por 12 h e 34,3 mT por 8 h. Na Tabela 27 são mostrados os valores de porcentagem de diferença da concentração de GSH com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle (PDG), calculados de acordo com a equação 8.

**Tabela 27:** Porcentagem de diferença de concentração de GSH (PDG) produzida por *S. cerevisiae* para os tempos de 24, 48 e 72 h do delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM).

| Ensaio | PDG (%)* |        |        |
|--------|----------|--------|--------|
|        | 24 h     | 48 h   | 72 h   |
| 1DCM   | + 51,1   | + 71,5 | + 21,8 |
| 2DCM   | + 0,1    | + 32,1 | - 0,9  |
| 3DCM   | + 95,7   | + 91,3 | + 39,0 |
| 4DCM   | + 103,4  | + 75,4 | + 10,7 |
| 5DCM   | + 52,9   | + 54,6 | - 4,7  |
| 6DCM   | + 100,0  | + 41,3 | - 3,5  |
| 7DCM   | + 91,9   | + 42,3 | - 5,3  |

\* (+) efeito estimulante e (-) efeito inibitório

Até 48 h de fermentação para todos os ensaios foram observados efeitos estimulantes devido à ação dos CM, para a concentração de GSH, em relação aos ensaios controle. Porém, após 72 h, foram encontradas concentrações de GSH menores que no controle, porém dentro da faixa de erro experimental para este tipo de fermentação. Como constatado, para a concentração celular (PDC), após 48 h de fermentação os valores de PDG diminuíram sugerindo que o CM acelerou a fermentação no início.

A Tabela 28 mostra os valores de porcentagem de GSH e fatores de conversão de substrato em produto, substrato em célula e célula em produto, calculados através das equações 1 a 4. Considerando a porcentagem de GSH, o maior valor foi de 2,1% no ensaio 3DCM. Pôde-se verificar que não houve ganho significativo nos ensaios DCM em relação ao ensaio controle e em alguns ensaios as concentrações de GSH foram menores.

**Tabela 28:** Porcentagem de GSH e fatores de conversão para o delineamento fatorial completo com aplicação do CM (DCM) e para o ensaio controle.

| Ensaio   | GSH (%) |      |      | Fatores de conversão                                 |                                                     |                                                     |
|----------|---------|------|------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|          | 24 h    | 48 h | 72 h | $Y_{P/S}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{X/S}$<br>(g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{P/X}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> ) |
| controle | 0,5     | 1,1  | 1,8  | 4,41                                                 | 0,25                                                | 17,54                                               |
| 1DCM     | 0,7     | 1,6  | 1,8  | 5,44                                                 | 0,30                                                | 18,26                                               |
| 2DCM     | 0,5     | 1,1  | 1,6  | 4,39                                                 | 0,27                                                | 16,00                                               |
| 3DCM     | 0,9     | 1,5  | 2,1  | 6,19                                                 | 0,30                                                | 20,62                                               |
| 4DCM     | 0,8     | 1,5  | 1,8  | 4,90                                                 | 0,28                                                | 17,70                                               |
| 5DCM     | 0,7     | 1,4  | 1,6  | 4,23                                                 | 0,27                                                | 15,42                                               |
| 6DCM     | 0,8     | 1,3  | 1,6  | 4,26                                                 | 0,27                                                | 15,62                                               |
| 7DCM     | 0,8     | 1,3  | 1,6  | 4,18                                                 | 0,27                                                | 15,33                                               |

No ensaio 3DCM (25,0 mT, 16 h) foram observados os três maiores fatores de conversão de substrato em produto, substrato em célula e célula em produto, sendo estes, 6,19 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub>, 0,30 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub> e 20,62 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>, respectivamente. No ensaio 1DCM a conversão de substrato em célula também alcançou valor de 0,30 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub>.

A análise estatística para os dados de concentração celular foi feita no tempo de 48 h, pois para todos os ensaios foi observado que após este tempo de fermentação ocorreu diminuição do valor de PDC. Os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios do DCM, sem excluir os termos não significativos, com 10% de significância, estão apresentados na Tabela 29. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,8627.

As variáveis significativas a um nível de confiança de 90% para a concentração celular em 48 h foram o tempo de aplicação do CM e a interação entre o tempo e a indução.

**Tabela 29:** Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCM para a concentração celular em 48 h.

|                              | <b>Coeficiente de Regressão</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>t (3)</b> | <b>p-valor</b> |
|------------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Média*                       | 13,24                           | 0,13                 | 104,43       | 0,0000         |
| Indução                      | -0,34                           | 0,17                 | -0,20        | 0,8504         |
| Tempo*                       | 0,52                            | 0,17                 | 3,10         | 0,0533         |
| Interação (indução x tempo)* | -0,51                           | 0,17                 | -3,03        | 0,0561         |

\* fatores estatisticamente significativos (90% confiança)

A Tabela 30 apresenta a ANOVA para o DCM, onde os parâmetros não significativos foram eliminados e adicionados aos resíduos. O novo coeficiente de correlação obtido foi 0,8608.

**Tabela 30:** Análise de variância do DCM para a concentração celular em 48 h.

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F<sub>calculado</sub></b> | <b>p-valor</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Regressão                | 2,12                      | 2                         | 1,06                  | 13,25                        | 0,02           |
| Resíduos                 | 0,34                      | 4                         | 0,08                  |                              |                |
| Total                    | 2,46                      | 6                         |                       |                              |                |

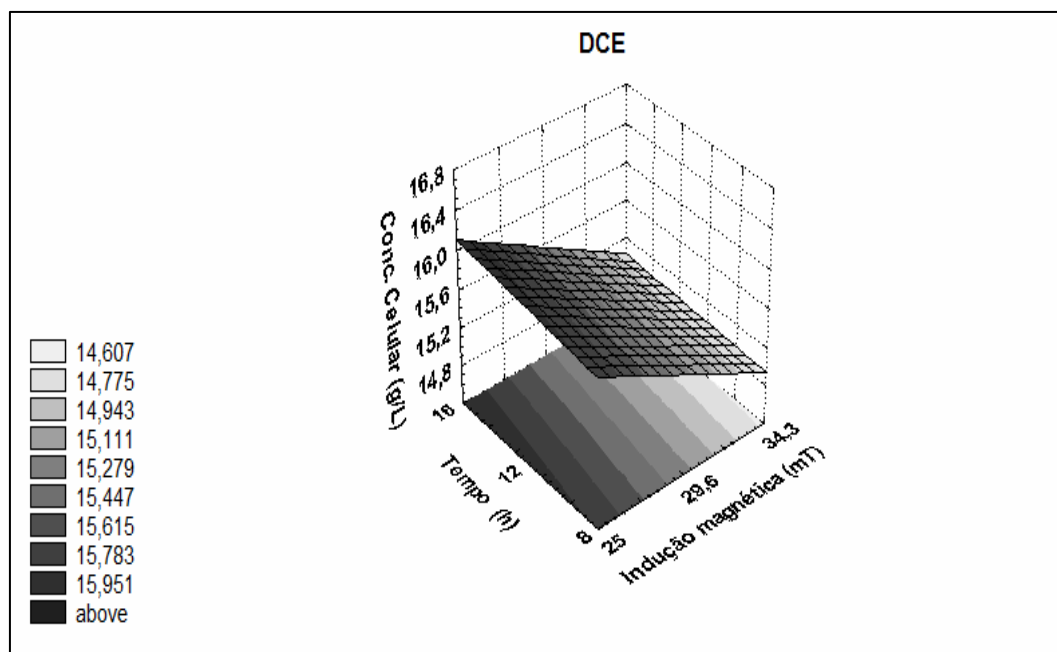
% variação explicada ( $R^2$ ) = 86%;  $F_{2;4;0,1} = 4,32$

A equação 12 é o modelo com as variáveis codificadas que representa a concentração celular em função do tempo de aplicação e da indução magnética, nas faixas estudadas do DCM, onde  $X_1$  = tempo de aplicação do CM e  $X_2$  = indução magnética.

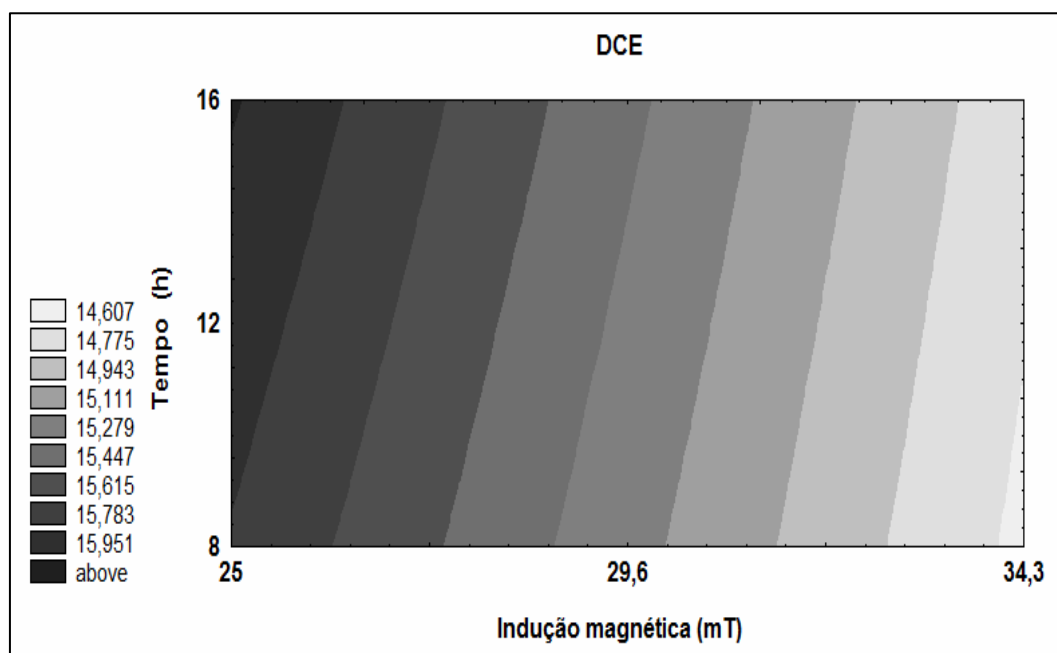
$$\text{Conc. Celular (g/L)} = 13,24 + 0,52 \cdot X_1 - 0,51 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad \text{equação (12)}$$

Este modelo foi validado através da ANOVA (Tabela 30), o  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão foi significativo (p-valor 0,02) e três vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ . A variação entre os coeficientes de regressão com todos os parâmetros (modelo com 4) e sem os parâmetros estatisticamente não significativos (modelo com 3) foi pequena, com isso utilizou-se o modelo com os 3 parâmetros significativos. Este modelo apresentou variação explicada de 86%. A Figura 24 mostra as

superfícies de resposta e curva de contorno da concentração celular para 48 h de fermentação com aplicação de CM.



(a)



(b)

**Figura 24:** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) do DCM para a concentração celular como função do tempo de aplicação e da indução do CM.

Os valores de PDG após 48 h diminuíram em todos os ensaios (Tabela 27), indicando que a aplicação de CM teve efeito estimulante maior na concentração de GSH para 48 h de fermentação. O valor do desvio padrão para os pontos centrais foi de  $\pm 8,6$ . A análise estatística foi feita com apenas 75% de confiança, o que se considerou valor relativamente baixo. A obtenção da curvatura dos dados, através da análise estatística da produção de GSH, demonstrou que deveriam ter sido feitos os pontos axiais para obter melhores resultados, pois um modelo quadrático adequar-se-ia melhor aos valores experimentais. Porém, devido a problemas operacionais (limitação do equipamento), não foi possível fazer os pontos axiais do DCM. Na Tabela 31 são mostrados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios do DCM, sem excluir os termos não significativos.

**Tabela 31:** Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCM para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 48 h.

|                             | <b>Coeficiente de Regressão</b> | <b>Desvio Padrão</b> | <b>t (3)</b> | <b>p-valor</b> |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Média*                      | 183,85                          | 7,60                 | 24,19        | 0,0001         |
| Indução*                    | -16,06                          | 10,05                | -1,60        | 0,2085         |
| Tempo*                      | 18,33                           | 10,05                | 1,82         | 0,1657         |
| Interação (indução x tempo) | 6,81                            | 10,05                | 0,68         | 0,5465         |

\* fatores estatisticamente significativos (75% confiança)

As variáveis significativas com 75% de confiança foram o tempo de aplicação do CM e a indução magnética. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,6787. A Tabela 32 apresenta a análise de variância (ANOVA), onde os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados e adicionados aos resíduos. O novo coeficiente de correlação obtido foi de 0,6295.

**Tabela 32:** Análise de variância do DCM para a concentração de GSH em 48 h.

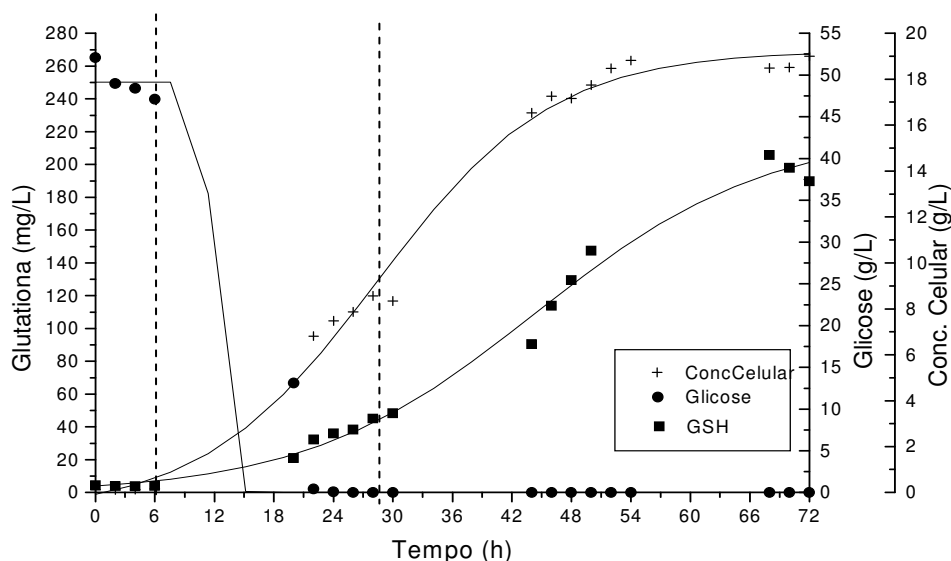
| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F<sub>calculado</sub></b> | <b>p-valor</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Regressão                | 3376,56                   | 2                         | 1188,28               | 3,40                         | 0,14           |
| Resíduos                 | 1398,99                   | 4                         | 349,75                |                              |                |
| Total                    | 3775,56                   | 6                         |                       |                              |                |

% variação explicada ( $R^2$ ) = 63%;  $F_{2;4;0,25} = 2,0$

Os resultados da ANOVA mostraram que o  $F_{\text{calculado}}$  foi apenas 1,7 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  e o valor de  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão não foi significativo (p-valor 0,14). Como a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi baixa (63%) e a relação entre o  $F_{\text{calculado}}$  e o  $F_{\text{tabelado}}$  não foi pelo menos duas vezes maior, não foi recomendado obter modelo para os resultados de concentração de GSH com a aplicação do CM. O que se pôde concluir deste planejamento foi que a indução pareceu apresentar efeito negativo e o tempo efeito positivo, mostrando que para aumentarmos a concentração de GSH deveríamos aumentar o tempo de exposição ao CM, bem como diminuir os níveis de indução magnética.

#### 5.4 ENSAIOS COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS GERADOS POR ÍMÃS

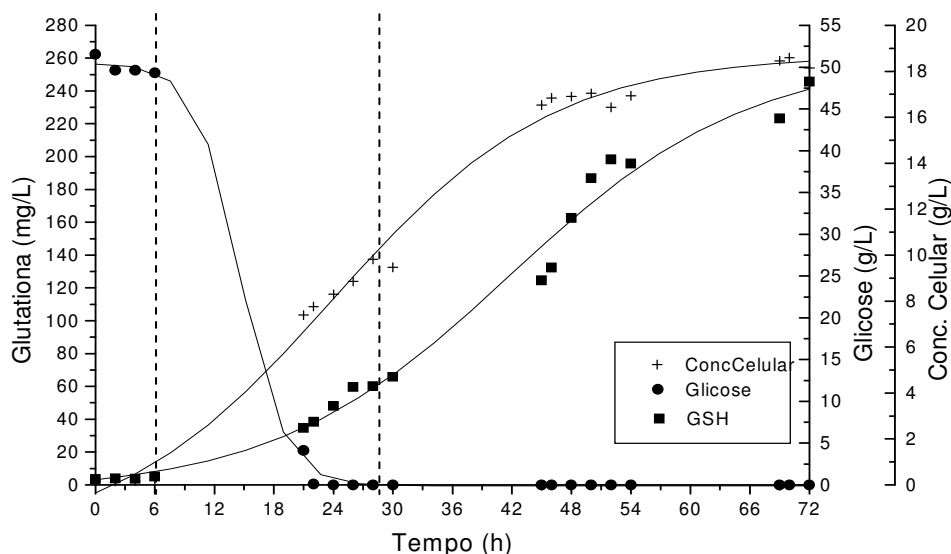
Após a realização das fermentações com aplicação de CM com bobina foram feitas fermentações com aplicação de CM gerados por ímãs. Para tal, o meio de cultura foi circulado através de três pares de ímãs dispostos de forma a gerar três pulsos de onda quadrada com os quais a intensidade dos CM chegou ao máximo de 20 mT, sendo testados o tempo de aplicação nas primeiras 24, 48 e 72 h de cultivo.



**Figura 25:** Fermentação controle (sem aplicação de CM) para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

A Tabela 56 (anexos) e a Figura 25 apresentam os resultados obtidos durante a fermentação controle, sem aplicação de CM, mas com circulação do meio de cultura através da bomba peristáltica. O pH após 72 h chegou a 6,52 e a sua variação ao longo da fermentação foi entre 4,44 e 6,52. A glicose foi consumida pela levedura até 24 h de fermentação, a máxima concentração celular foi de 19,0 g/L, alcançada após 72 h e a concentração máxima de GSH foi 205,8 mg/L em 68 h de fermentação. Estes dois valores foram utilizados como referência para comparação com os ensaios com aplicação de CM.

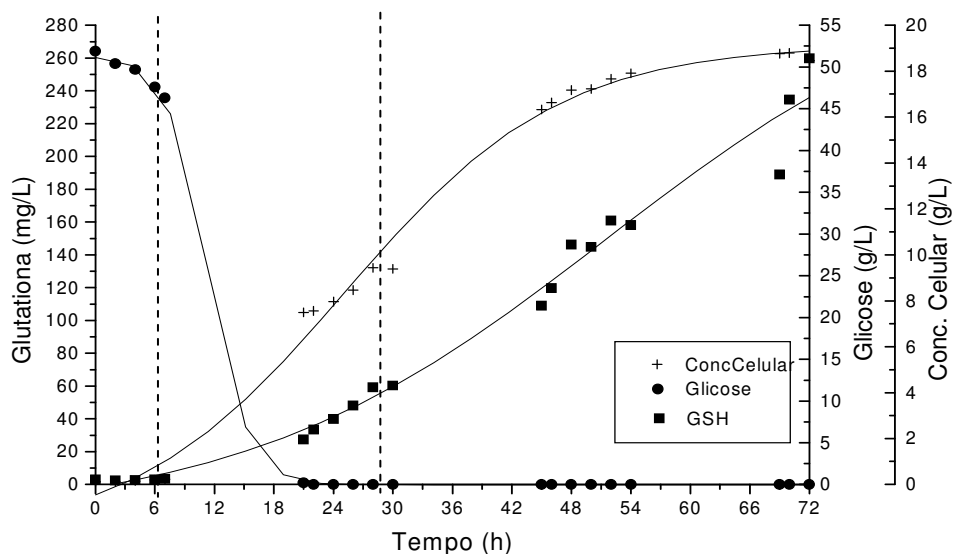
No primeiro ensaio, a aplicação do CM ocorreu de 0 a 24 h de fermentação. Os resultados observados durante esta fermentação estão apresentados na Tabela 57 (anexos) e Figura 26. Nestas condições a glicose foi consumida até 22 h e o pH final foi de 5,44, porém sua variação ao longo da fermentação foi de 4,22 a 5,66. A concentração celular máxima foi de 18,6 g/L após 70 h e a máxima concentração de GSH em 72 h foi de 245,7 mg/L.



**Figura 26:** Ensaio com aplicação de 24 h de CM para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).  
As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

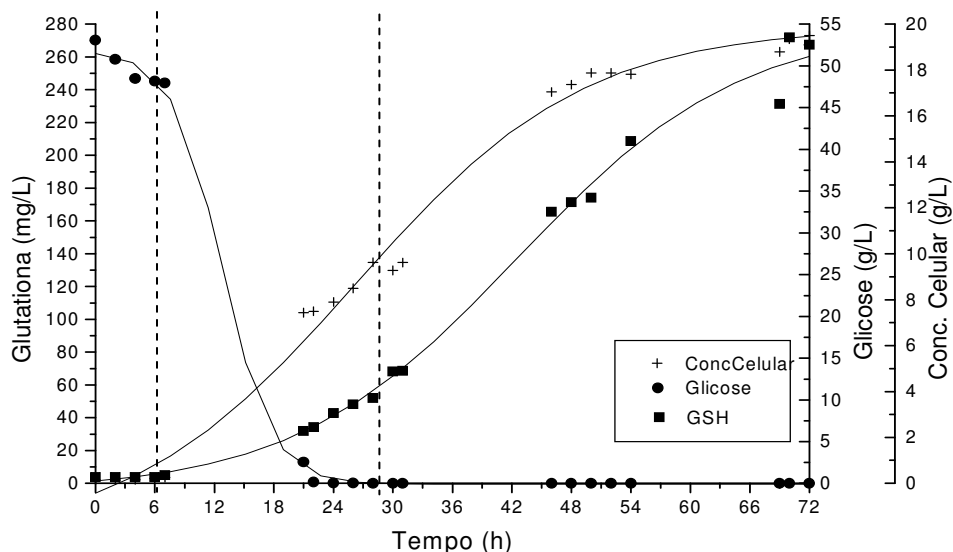
No segundo ensaio a aplicação do CM foi feita de 0 a 48 h. O pH deste ensaio em 72 h foi de 5,59 e variou de 4,38 a 5,59. Nestas condições a glicose foi consumida até 21 h e a máxima concentração celular obtida entre 69-70 h foi 18,8 g/L. A maior concentração de GSH

foi de 259,9 g/L após 72 h de fermentação. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 58 (anexos) e Figura 27.



**Figura 27:** Ensaio com aplicação de 48 h de CM para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

A Tabela 59 (anexos) e a Figura 28 mostram os resultados do ensaio com aplicação de 72 de CM. Pôde-se constatar que o pH variou de 4,33 a 6,02, sendo este último o valor obtido a 72 h. A glicose foi consumida até 26 h de fermentação e em 72 h foi conseguida a maior concentração celular (19,5 g/L). A maior concentração de GSH foi de 271,9 mg/L após 70 h.



**Figura 28:** Ensaio com aplicação de 72 h de CM para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (+) concentração celular (g/L), (•) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L). As linhas tracejadas verticais indicam a adição de aminoácidos.

Através das equações 7 e 8 foram calculados os valores PDC e PDG para os ensaios com CM, sendo utilizados os maiores valores de concentração celular e de GSH para cada ensaio. Estes resultados estão apresentados na Tabela 33.

**Tabela 33:** Resultados de PDC e PDG para 72 h de fermentação.

| Ensaio     | Concentração celular (g/L) | PDC (%)* | GSH (mg/L) | PDG (%)* |
|------------|----------------------------|----------|------------|----------|
| Controle   | 19,0                       | -        | 205,8      | -        |
| 24 h de CM | 18,6                       | - 2,11   | 245,7      | + 19,4   |
| 48 h de CM | 18,8                       | - 1,05   | 259,9      | + 26,3   |
| 72 h de CM | 19,5                       | + 2,63   | 271,9      | + 32,1   |

\* (+) efeito estimulante e (-) efeito inibitório

Em relação à concentração celular somente com 72 h de aplicação do CM foi observado um pequeno efeito estimulante em relação ao ensaio controle. Com 24 e 48 h de aplicação do CM os valores de PDC foram pequenos e podem ser devido aos erros inerentes ao processo, podendo-se dizer que a aplicação de CM apresentou efeito nulo em relação à concentração celular. Entretanto, para a concentração de GSH em todos os ensaios foram

observados efeitos estimulantes que variaram de 19,4 a 32,1%, sendo este maior valor foi alcançado com a aplicação do CM durante toda a fermentação (72 h).

A Tabela 34 mostra os valores de porcentagem de GSH e os fatores de conversão de substrato em produto, substrato em célula e célula e produto, calculados através das equações 1 a 4.

**Tabela 34:** Porcentagem de GSH produzida por *S. cerevisiae* e fatores de conversão para os ensaios com aplicação de CM e o ensaio controle após 72 h

| Ensaio     | GSH<br>(%) | Fatores de conversão                                 |                                                     |                                                     |
|------------|------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|            |            | $Y_{P/S}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{X/S}$<br>(g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> ) | $Y_{P/X}$<br>(mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> ) |
| Controle   | 1,0        | 3,43                                                 | 0,35                                                | 9,81                                                |
| 24 h de CM | 1,3        | 4,48                                                 | 0,33                                                | 13,46                                               |
| 48 h de CM | 1,4        | 4,75                                                 | 0,34                                                | 14,00                                               |
| 72 h de CM | 1,4        | 4,88                                                 | 0,36                                                | 13,62                                               |

Em relação à porcentagem de GSH na célula, pôde-se verificar que houve aumento nos ensaios com aplicação do CM em relação ao ensaio controle. Porém, para o fator de conversão de substrato em célula não houve diferença entre os valores. No que diz respeito à conversão de substrato em produto e célula em produto os valores foram maiores com a aplicação do CM, chegando a 4,88 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub> para 72 h de CM e 14,00 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub> para 48 h de CM, respectivamente.

A vantagem da aplicação de CM com o uso de ímãs é o reciclo celular, pois este sistema facilita o “scale-up”. Alvarez et al (2006) citaram que são vários os dispositivos desenvolvidos para a aplicação de CM em processos fermentativos, mas estes apresentam dificuldades para fazer o “scale-up”, devido a seus elevados custos, uma vez que foram produzidos para cobrir a totalidade ou grande parte do fermentador. A vantagem do uso de ímãs é a flexibilidade para controlar o tempo de exposição, pois os ímãs atuam somente sobre o meio que é reciclado independente do tamanho do fermentador. Desta forma, a construção de grandes magnetizadores pode ser evitada.

Nenhum trabalho relatou a aplicação de CM durante a produção de GSH por fermentação, desta forma não foi possível fazer comparações com dados bibliográficos. A maior

concentração de GSH com aplicação de CM foi de 340,0 mg/L obtida após 72 h de fermentação, quando utilizada uma bobina para produzir os campos com indução de 25 mT por 16 h. A porcentagem de diferença da concentração de GSH em relação ao ensaio controle foi de 39 % (efeito estimulante). Neste mesmo ensaio em 48 h de fermentação, a concentração de GSH chegou a 222,1 mg/L e isto representou incremento de 91,3%.

O maior efeito estimulante da concentração celular foi obtido com campos gerados com bobina, com valor de 42,1%, em relação ao ensaio controle sem aplicação de CM. Alguns autores relataram a aplicação de CM em cultivos com *S. cerevisiae*. A influência da aplicação de CM de 1,5 T por 15 h no crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 7752 foi avaliada por Malko et al. (1994). Comparando os resultados com e sem a aplicação de CM, foi observado que não houve uma grande diferença estatística entre os ensaios, ou seja, a aplicação do CM de 1,5 T não aumentou a concentração celular.

Pichko e Povalyaeva (1996) obtiveram aumento de 12% na concentração celular de *S. cerevisiae* XII utilizando um dispositivo comercial gerador de CM (0,1 T e 40 min). Mehedintu e Berg (1997) observaram inibição de 16% utilizando 0,2 mT e 10 h de aplicação e estímulo de 25% com 0,5 mT e 10 h. Motta et al. (2001) constataram o aumento de 1,84% no crescimento celular da *S. cerevisiae* DAUFPE-1012, quando aplicado CM de 220 mT através de ímãs. Nos ensaios feitos por Zapata et al. (2002) o ensaio que proporcionou a maior concentração celular foi 30 s, 100 kHz e 2  $\mu$ T. Nestas condições as concentrações foram 30% maiores que no cultivo controle.

Motta et al. (2004) avaliaram a aplicação de CM estáticos (220 mT por 24 h) gerados por ímãs durante o cultivo de *S. cerevisiae* DAUFPE-1012; a produção de biomassa foi 3,0 vezes maior. Ruiz-Gómez et al. (2004) observaram o comportamento da *S. cerevisiae* WS8105-1C quando exposta a CM de 0,35 ou 2,45 mT e tempo de exposição de 24 ou 72 h, não houve alterações no crescimento celular. Zapata et al. (2005) utilizando aplicação de CM de 25  $\mu$ T antes de iniciar a fermentação com leveduras comerciais de panificação (*S. cerevisiae*), conseguiram aumento de 14,4%. Novák et al. (2007), aplicando CM de 10 mT por 60 min no cultivo de *S. cerevisiae* CCY 21-4-59, observaram efeitos inibitórios tanto nos experimentos feitos em placas de petri com ágar, como em meio líquido em frascos Erlenmeyer.

Os resultados obtidos neste trabalho foram importantes e demonstraram que os CM influenciaram o crescimento celular da levedura *S. cerevisiae*.

Novák et al. (2007) concluíram que as bactérias são mais sensíveis à aplicação de CM do que as leveduras. Na maioria dos trabalhos com bactérias são observados efeitos inibitórios.

A contradição observada nos trabalhos com aplicação de CM está relacionada com o número de parâmetros que influenciam os ensaios: intensidade do CM, frequência, tempo de exposição, tipo de célula, temperatura e estado biológico das células. A discordância dos resultados pode ser explicada através das diferentes condições de produção dos CM, bem como o controle de todos os parâmetros acima citados.

A GSH é um poderoso antioxidante encontrado em todas as células, sendo sua principal função atuar como antioxidante contra os efeitos dos radicais livres e outros compostos oxidantes. Fojt et al. (2004) e Strasák et al. (2004) citaram que durante a aplicação de CM pode ocorrer a formação de radicais livres. Isto pode ser uma das explicações para os efeitos estimulantes observados principalmente até 48 h de fermentação em relação à concentração de GSH, quando aplicados CM por bobina e até 72 h de fermentação com CM gerados com ímãs. A aplicação dos CM gerou radicais livres na levedura e esta reagiu ativando seus mecanismos de defesa, como por exemplo a produção de GSH.

Nie et al. (2005) citaram que a síntese de GSH é essencial para o crescimento celular em condições de estresse, se a levedura for submetida a tais condições a produção de GSH deve aumentar. Segundo Blank (1993) a aplicação de CM é interpretada como um estresse pela célula e o sistema responde através dos mesmos mecanismos.

A maior concentração de GSH obtida com o meio YM após 72 h de incubação nos frascos Erlenmeyer foi de 40,3 mg/L e a concentração celular de 3,9 g/L. A produção de GSH foi dividida em quatro etapas: fermentações em frascos Erlenmeyer, em fermentador de bancada, em fermentador com aplicação de CM com o uso de bobina e em fermentador de bancada com aplicação de CM com uso de ímãs. Os melhores resultados de produção de GSH obtidos nestas quatro etapas foram 168,9 mg/L, 205,7 mg/L, 340,0 mg/L e 271,9 mg/L, respectivamente. Em relação a concentração celular, as maiores concentrações nas quatro etapas foram 12,9 g/L, 19,2 g/L, 16,3 g/L e 19,5 g/L.

Através da equação 11 foram calculadas as porcentagens de diferença entre a concentração de GSH nestes ensaios em relação ao ensaio com meio YM, sendo as diferenças de porcentagem de GSH nas quatro etapas de 319,1; 410,4; 743,7 e 544,7%. Com a equação

10 foram calculadas as porcentagens de diferença entre a concentração celular nestes ensaios em relação ao ensaio com meio YM e os resultados foram 230,8; 393,3; 317,9 e 400% maiores que no meio YM.

Este estudo mostrou que as condições para produção de GSH são de fundamental importância, pois as variações de concentração obtidas nas quatro etapas foram grandes, pois a levedura utilizada foi a mesma. Portanto, deve-se ter atenção ao tipo de fermentador, agitação, aeração, concentração de nutrientes, concentração de inóculo,  $\text{pH}_{\text{inicial}}$ , modo de aplicação dos CM e adição de aminoácidos.

Wen et al. (2004 e 2006) relataram que a GSH encontra-se no interior das células das leveduras; desta forma, o aumento da produção pode ocorrer de duas formas: aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular. Neste trabalho foram aplicadas as duas formas, tanto aumentando o conteúdo intracelular através da aplicação dos CM e da adição dos aminoácidos, como aumentando a concentração celular através do estudo das condições de cultivo e também da aplicação dos CM.

## 6. CONCLUSÕES

A otimização da produção de glutathiona em frascos Erlenmeyer por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 não foi conseguida, porém foi obtida uma região de ótimo, na qual foi obtido um modelo com o percentual de variação explicado de 95% e as melhores condições para a produção de GSH em frascos Erlenmeyer foram: temperatura 20°C, pH 5, agitação de 300 rpm, 5% de inóculo e 54 g/L de concentração inicial de glicose. A maior concentração de GSH foi de 168,9 mg/L (48 h de fermentação), no ensaio a 24°C, 300 rpm, pH 5, 60 g/L de glicose e 5% de inóculo. Em relação à concentração celular, o maior valor (12,9 g/L) foi obtido no ensaio a 28°C, 300 rpm, pH 5, 80 g/L de glicose e 5% de inóculo e a maior porcentagem de GSH foi 2,1%.

No fermentador de bancada os melhores resultados foram observados utilizando-se: 20°C, 500 rpm, 54 g/L de glicose, 1,1 vvm de aeração, com adição de aminoácidos durante a fermentação e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Nestas condições foi obtida após 68 h a maior concentração celular (19,2 g/L) e após 72 h a maior concentração de GSH (205,7 mg/L);

A aplicação dos campos magnéticos gerados, por uma bobina ou por ímãs, afetou a produção de GSH e de biomassa durante as fermentações, sendo conseguidos efeitos estimulantes, inibitórios ou nulos dependendo da indução magnética e do tempo de exposição aos campos magnéticos.

Com o uso de bobina a máxima concentração celular foi 16,3 g/L quando foram aplicados 25 mT por 16 h, isto representou um efeito estimulante de 19,6% em relação ao ensaio controle sem aplicação de campos magnéticos. Nas faixas estudadas de tempo de exposição (8 a 16 h) e indução magnética (25,0 a 34,3 mT) não ocorreu efeito inibitório para a concentração celular nas 72 h de fermentação. Para os resultados de GSH após 72 h de fermentação, um incremento de 39% foi observado, quando aplicado 25 mT por 16 h. A maior concentração de GSH nestas condições foi de 340 mg/L. Em todos os ensaios até 48 h de fermentação, foram observados efeitos estimulantes devido à aplicação de campos magnéticos nas faixas estudadas. Para 72 h de fermentação foram encontradas três janelas eletromagnéticas positivas para a produção de GSH: 25 mT por 8 h; 25 mT por 16 h e 34,3 mT por 16 h.

Com a aplicação dos CM utilizando um magnetizador foram observados efeitos estimulantes para a produção de GSH e de biomassa. As maiores concentrações celular (19,5 g/L) e de GSH (271,9 mg/L) foram conseguidas no ensaio com aplicação de CM durante as 72 h de fermentação, representando incremento 2,63% e 32,1% em relação ao ensaio controle.

Em todos os ensaios feitos para a produção de GSH por fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 o melhor resultado foi 340 mg/L, obtido com aplicação de CM (25 mT por 16 h) gerados por bobina, sendo as condições de cultivo de: 20°C, pH<sub>inicial</sub> 5, 200 rpm, 54 g/L de glicose, 50 g/L de extrato de levedura, 12 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5% de inóculo (v/v), 3,2 vvm e com adição de aminoácidos durante a fermentação.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer fermentações no fermentador de bancada tipo batelada alimentada;
- Aumentar as quantidades de aminoácidos adicionadas durante as fermentações;
- Estudar a adição de aminoácidos em duas etapas nos frascos Erlenmeyer;
- Testar outras velocidades de reciclo celular durante a aplicação de campos magnéticos gerados pelo magnetizador;
- Avaliar fontes de carbono e nitrogênio de menor custo;
- Combinar fermentações tipo batelada alimentada com aplicação de campos magnéticos com uso de ímãs;
- Estudar a produção de GSH com outras cepas de *S. cerevisiae* e outras levedura;
- Avaliar modificações na morfologia celular devido a aplicação de campos magnéticos.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAFARA, C. G.; KANDA, A.; SHIOI, T.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 538-540, 1992a.

ALFAFARA, C.; MIURA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 141-146, 1992b.

ALVAREZ, D. C.; PÉREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; ALEGRE, R. M. Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1967-1973, 2006.

BARBOZA, M. A. **Ação de Campos Magnéticos em Alguns Sistemas Químicos e Biológicos**. 2002. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BAUER, W. A comparison between a conventional submerged culture fermenter and a new concept gas/solid fluid bed bioreactor for glutathione production. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 64, n. 4, p. 561-566, 1986.

BERG, H. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 48, n. 2, p. 355-360, 1999.

BINNINGER, D. M.; UNGVICHIAN, V. Effects of 60 Hz AC magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 83-89, 1997.

BLANK, M. Biological effects of electromagnetic fields. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 32, n. 3, p. 203-210, 1993.

CHA, J.; PARK J.; JEON, B.; LEE, Y.; CHO, Y. Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 51-55, 2004.

- CHACÓN, A. D.; HABER, P. V.; FONG, R. A.; MÁS, D. S.; SERGUERA, N. M.; RODRIGUEZ, J. O. Influencia del campo electromagnético en el crecimiento da la levadura *Candida utilis* Y-660. **Revista Tecnología Química**, v. 15, n. 2, p. 52-60, 1995.
- DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 226-230, 2007
- ELSKENS, M. T.; JASPERS, C. J.; PENNINCKX, M. J. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 637-644, 1991.
- FAHEY, R. C.; BROWN, W. C.; ADAMS, W. B.; WORSHAM, M. B. Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1126-1129, 1978.
- FAN, X.; HE, X.; GUO, X.; QU, N.; WANG, C.; ZHANG, B. Increasing glutathione formation by functional expression of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 5, p. 415-417, 2004.
- FERNÁNDES, L.; STEELE, J. L. Glutathione content of lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 5, p. 1233-1242, 1993.
- FOJT, L.; STRASÁK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. **Bioelectrochemistry**, v. 63, n. 1/2, p. 337-341, 2004.
- FOLOGEA, D.; VASSU-DIMOV, T.; STOICA, I.; CSUTAK, O.; RADU, M. Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, n. 2, p. 285-287, 1998.
- GERENCSEI, V. F.; BARNOTHY, M. F.; BARNOTHY, J. M. Inhibition of bacterial growth by magnetic fields. **Nature**, v. 10, n. 4854, p. 539-541, 1962.
- GHARIEB, M. M.; GADD, G. M. Role of glutathione in detoxification of metal (loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 183-188, 2004.
- GOTOH, T.; IGUCHI, H.; KIKUCHI, K. Separation of glutathione and its related amino acids by nanofiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 165-170, 2004.

- GRANT, C. M.; MacIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 29, n. 6, p. 511-515, 1996.
- GROSSE, H. H.; BAUER, E.; BERG, H. Electrostimulation during fermentation. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 20, n. 1/3, p. 279-285, 1988.
- HATTORI, S.; WATANABE, M.; OSONO, H.; TOGII, H.; SASAKI, K. Effects of an external magnetic field on the flock size and sedimentation of activated sludge. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 833-838, 2001.
- HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313-316, 1998.
- IVANOVA, V.; HRISTOV, J.; DOBREVA, E.; AL-HASSAN, Z.; PENCHEV, I. Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 187-198, 1996.
- IWASAKA, M.; IKEHATA, M.; MIYAKOSHI, J.; UENO, S. Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. **Bioelectrochemistry**, v. 65, n. 1, p. 59-68, 2004.
- IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 73-76, 1995.
- KERNS, G.; BAUER, E.; BERG, H. Electrostimulation of cellulase fermentation by pulsatile electromagnetically induced currents. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 32, n. 1, p. 89-94, 1993.
- LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 2, p. 261-265, 1998.
- LI, Y.; CHEN, J.; MAO, Y.; LUN, S.; KOO, Y. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 709-714, 1998.

- LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5739-5745, 2003.
- LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 83-90, 2005.
- LI, Y.; WEI, G.; CHEN, J. Glutathione: a review on biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 3, p. 233-242, 2004.
- LI, Z.; GUO, S.; LI, L.; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700-705, 2007.
- LIN, J.; TIAN, J.; YOU, J.; JIN, Z.; XU, Z.; CEN, P. An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 19-25, 2004.
- LIU, C.; HWANG, C.; LIAO, C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 1999.
- LIU, H.; LIN, J. P.; CEN, P. L.; PAN, Y. J. Co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione from spent brewer's yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1993-1997, 2004.
- MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 4, p. 901-904, 1985.
- MALKO, J. A.; CONSTANTINIDIS, I.; DILLEHAY, D.; FAJMAN, W. A. Search for influence of 1.5 tesla magnetic field on growth of yeast cells. **Bioelectromagnetics**, v. 15, n. 6, p. 495-501, 1994.
- MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 67-70, 1997.

- MITTENZWEY, R.; SÜBMUTH, R.; MEI, W. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria - the question of a co-stressing factor. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 40, n. 1, p. 21-27, 1996.
- MOORE, R. L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 10, 1979.
- MOTTA, M. A.; MONTENEGRO, E. J. N.; STAMFORD, T. L. M.; SILVA, A. R.; SILVA, F. R. Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 5, p. 970-973, 2001.
- MOTTA, M. A.; MUNIZ, J. B. F.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 393-396, 2004.
- MURATA, K.; TANI, K.; KATO, J.; CHIBATA, I. Glutathione production coupled with an ATP regeneration system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 1/2, p. 11-21, 1980.
- MURATA, K.; TANI, K.; KATO, J.; CHIBATA, I. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 72-77, 1981.
- NIE, W.; WEI, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 378-384, 2005.
- NOVÁK, J.; STRASÁK, L.; FOJT, L.; SLANINOVÁ, I.; VETERL, V. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 115-121, 2007.
- OHWADA, T.; SAGISAKA, S. An increase in levels of glutathione in *Escherichia coli* B caused by osmotic stress. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 3371-3372, 1990.
- OKUNO, K.; TUCHIYA, K.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperatures. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 103-106, 1993.

OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, n. 3, p. 705-711, 1965.

PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 737-742, 2000.

PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 295-305, 2002.

PICHKO, V. B.; POVALYAEVA, I. V. Electromagnetic stimulation of microorganism productivity: possible mechanisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 425-428, 1996.

RAMON, C.; MARTIN, J. T.; POWELL, M. R. Low-level, magnetic-field-induced growth modification of *Bacillus subtilis*. **Bioelectromagnetics**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 1987.

RAO, T. B. M. L. R.; SONOLIKAR, R. L.; SAHEB, S. P. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and air-lift bioreactor with submerged microorganisms. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 21/22, p. 4155-4160, 1997.

REINERS, J. J.; KODARI, E.; CAPPEL, R. E.; GILBERT, H. F. Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part II: quantitation of glutathione and glutathione disulfide. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 12, p. 2345-2352, 1991.

ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1501-1505, 2006.

ROLLINI, M.; PAGANI, H.; RIBOLDI, S.; MANZONI, M. Influence of carbon source on glutathione accumulation in methylotrophic yeasts. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 199-203, 2005.

ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine – relation to glutathione metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 2002.

- ROVER Jr, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.
- RUIZ-GÓMEZ, M. J.; PRIETO-BARCIA, M. I.; RISTORI-BOGAJO, E.; MARTÍNEZ-MORILLO, M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 2, p. 151-155, 2004.
- SAKATO, K.; TANAKA, H. Advanced control of glutathione fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 8, p. 904-912, 1992.
- SAWA, Y.; SHINDO, H.; NISHIMURA, S.; OCHIAI, H. Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 50, n. 5, p. 1361-1363, 1986.
- SCHMIDT, M. G.; KONETZKA, W. A. Glutathione overproduction by selenite-resistant *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 825-827, 1986.
- SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 196-205, 1991.
- STEPHEN, D. W. S.; JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2/3, p. 207-212, 1996.
- STRASÁK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. **Bioelectrochemistry**, v. 55, n. 1/2, p. 161-164, 2002.
- SUZUKI, H.; HASHIMOTO, W.; KUMAGAI, H. Glutathione metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, n. 3, p. 175-184, 1999.
- UTSUNOMIYA, T.; YAMANE, Y.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Stimulation of porphyrin production by application of an external magnetic field to a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 401-404, 2003.

- VAN NOSTRAN, F. E.; REYNOLDS, R. J.; HEDRICK, H. G. Effects of a high magnetic field at different osmotic pressures and temperatures on multiplication of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 561-563, 1967.
- WANG, Z.; TAN, T.; SONG, J. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 108-111, 2007.
- WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Application of two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 11, p. 887-890, 2003a.
- WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1133-1138, 2003b.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2424-2428, 2006.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3474-3479, 2005.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 6/7, p. 501-507, 2004.
- WIEDERHOLT, K. M.; STEELE, J. L. Glutathione accumulation in Lactococci. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 5, p. 1183-1188, 1994.
- WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.
- YAVUZ, H.; CELEBI, S. S. Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 22-27, 2000.
- ZAPATA, J. E.; HOYOS, M.; MORENO, G. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciencia**, v. 30, n. 7, p. 409- 413, 2005.

ZAPATA, J. E.; MORENO, G.; MÁRQUEZ, E. J. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciencia**, v. 27, n. 10, p. 544- 550, 2002.

ZHANG, T.; WEN, S.; TAN, T. Optimization of the medium for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 454-458, 2007.



## 9. ANEXOS

**Tabela 35:** Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no delineamento fatorial fracionado (FF) 2<sup>5-2</sup>.

| Ensaio | Glicose* (g/L) | pH   |      |      |
|--------|----------------|------|------|------|
|        |                | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1FF    | 68,1           | 5,15 | 5,19 | 5,46 |
| 2FF    | 28,4           | 5,09 | 5,51 | 5,74 |
| 3FF    | 66,6           | 4,38 | 4,92 | 5,40 |
| 4FF    | 28,9           | 5,51 | 5,84 | 5,50 |
| 5FF    | 27,3           | 6,48 | 6,90 | 6,86 |
| 6FF    | 68,6           | 5,26 | 5,64 | 5,96 |
| 7FF    | 29,5           | 6,71 | 6,95 | 7,14 |
| 8FF    | 68,9           | 5,74 | 6,20 | 6,59 |
| 9FF    | 47,2           | 5,67 | 6,04 | 5,95 |
| 10FF   | 48,2           | 5,78 | 5,84 | 6,07 |
| 11FF   | 50,5           | 5,72 | 5,87 | 6,12 |

\* Concentração de glicose (g/L) no início da fermentação.

**Tabela 36:** Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no delineamento fatorial fracionado (FF) 2<sup>5-2</sup>..

| Ensaio | Concentração Celular* (g/L) |              |              |
|--------|-----------------------------|--------------|--------------|
|        | 24 h                        | 48 h         | 72 h         |
| 1FF    | 6,6 ± 0,011                 | 10,8 ± 0,000 | 9,1 ± 0,003  |
| 2FF    | 6,2 ± 0,005                 | 6,1 ± 0,001  | 4,5 ± 0,001  |
| 3FF    | 10,4 ± 0,002                | 8,2 ± 0,001  | 6,3 ± 0,003  |
| 4FF    | 6,2 ± 0,011                 | 7,2 ± 0,009  | 7,4 ± 0,020  |
| 5FF    | 4,5 ± 0,011                 | 6,2 ± 0,000  | 5,1 ± 0,001  |
| 6FF    | 7,9 ± 0,001                 | 8,7 ± 0,003  | 6,7 ± 0,001  |
| 7FF    | 6,8 ± 0,001                 | 6,6 ± 0,004  | 5,8 ± 0,006  |
| 8FF    | 8,6 ± 0,015                 | 9,4 ± 0,006  | 12,3 ± 0,018 |
| 9FF    | 7,4 ± 0,021                 | 7,9 ± 0,011  | 8,5 ± 0,016  |
| 10FF   | 8,0 ± 0,013                 | 7,8 ± 0,001  | 9,0 ± 0,014  |
| 11 FF  | 7,4 ± 0,013                 | 8,1 ± 0,004  | 9,0 ± 0,001  |

\* ± desvio padrão

**Tabela 37:** Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no delineamento fatorial fracionado (FF) 2<sup>5-2</sup>..

| Ensaio | Glutathiona* (mg/L) |              |              |
|--------|---------------------|--------------|--------------|
|        | 24 h                | 48 h         | 72 h         |
| 1FF    | 68,4 ± 0,00         | 82,9 ± 0,00  | 90,2 ± 0,01  |
| 2FF    | 54,6 ± 0,04         | 76,8 ± 0,01  | 79,2 ± 0,01  |
| 3FF    | 79,5 ± 0,02         | 99,6 ± 0,01  | 130,4 ± 0,00 |
| 4FF    | 65,5 ± 0,02         | 83,8 ± 0,01  | 100,7 ± 0,01 |
| 5FF    | 47,5 ± 0,04         | 63,7 ± 0,02  | 74,0 ± 0,04  |
| 6FF    | 50,3 ± 0,01         | 59,4 ± 0,10  | 78,2 ± 0,05  |
| 7FF    | 70,7 ± 0,01         | 82,5 ± 0,06  | 107,6 ± 0,00 |
| 8FF    | 69,7 ± 0,02         | 88,0 ± 0,02  | 98,6 ± 0,12  |
| 9FF    | 61,8 ± 0,06         | 107,6 ± 0,01 | 102,6 ± 0,00 |
| 10FF   | 60,5 ± 0,03         | 103,1 ± 0,00 | 105,7 ± 0,01 |
| 11FF   | 59,2 ± 0,02         | 105,0 ± 0,00 | 107,1 ± 0,01 |

\* ± desvio padrão

**Tabela 38:** Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) 2<sup>3</sup>.

| Ensaio | Glicose* (g/L) | pH   |      |      |
|--------|----------------|------|------|------|
|        |                | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1PD    | 57,4           | 4,29 | 5,38 | 5,76 |
| 2PD    | 58,1           | 5,00 | 5,65 | 6,19 |
| 3PD    | 57,3           | 4,63 | 6,80 | 6,44 |
| 4PD    | 57,1           | 6,00 | 6,44 | 6,32 |
| 5PD    | 76,1           | 4,27 | 5,30 | 5,31 |
| 6PD    | 78,1           | 4,24 | 5,24 | 5,51 |
| 7PD    | 80,4           | 4,49 | 5,86 | 6,24 |
| 8PD    | 76,9           | 4,80 | 6,40 | 6,32 |
| 9PD    | 69,1           | 4,71 | 6,07 | 5,85 |
| 10PD   | 68,9           | 5,16 | 5,63 | 5,90 |
| 11PD   | 69,7           | 3,02 | 3,46 | 3,55 |
| 12PD   | 67,0           | 5,74 | 7,01 | 5,67 |
| 13PD   | 42,1           | 5,48 | 5,70 | 5,89 |
| 14PD   | 95,3           | 3,93 | 4,53 | 4,33 |
| 15PD   | 70,4           | 4,14 | 4,82 | 4,38 |
| 16PD   | 68,9           | 4,08 | 4,77 | 4,71 |
| 17PD   | 68,7           | 3,98 | 4,83 | 4,62 |

\* Concentração de glicose (g/L) no início da fermentação.

**Tabela 39:** Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) 2<sup>3</sup>.

| Ensaio | Concentração Celular* (g/L) |              |              |
|--------|-----------------------------|--------------|--------------|
|        | 24 h                        | 48 h         | 72 h         |
| 1PD    | 8,5 ± 0,018                 | 10,4 ± 0,006 | 12,1 ± 0,006 |
| 2PD    | 8,7 ± 0,016                 | 10,4 ± 0,008 | 12,4 ± 0,004 |
| 3PD    | 8,9 ± 0,009                 | 10,4 ± 0,010 | 11,7 ± 0,001 |
| 4PD    | 8,9 ± 0,011                 | 9,9 ± 0,001  | 11,5 ± 0,006 |
| 5PD    | 8,5 ± 0,009                 | 11,0 ± 0,004 | 12,2 ± 0,001 |
| 6PD    | 9,9 ± 0,011                 | 10,5 ± 0,002 | 12,9 ± 0,005 |
| 7PD    | 9,0 ± 0,011                 | 11,0 ± 0,002 | 12,4 ± 0,002 |
| 8PD    | 9,5 ± 0,008                 | 11,1 ± 0,013 | 12,5 ± 0,017 |
| 9PD    | 6,9 ± 0,008                 | 10,3 ± 0,006 | 10,5 ± 0,005 |
| 10PD   | 9,9 ± 0,002                 | 11,0 ± 0,004 | 11,9 ± 0,008 |
| 11PD   | 8,4 ± 0,006                 | 9,2 ± 0,002  | 11,2 ± 0,001 |
| 12PD   | 9,3 ± 0,008                 | 10,8 ± 0,032 | 12,1 ± 0,010 |
| 13PD   | 8,7 ± 0,008                 | 8,9 ± 0,006  | 9,7 ± 0,003  |
| 14PD   | 10,3 ± 0,001                | 10,7 ± 0,006 | 11,3 ± 0,005 |
| 15PD   | 9,1 ± 0,013                 | 10,1 ± 0,037 | 11,7 ± 0,023 |
| 16PD   | 9,4 ± 0,011                 | 10,5 ± 0,012 | 12,0 ± 0,002 |
| 17PD   | 9,2 ± 0,005                 | 10,8 ± 0,043 | 12,1 ± 0,001 |

\* ± desvio padrão

**Tabela 40:** Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (PD) 2<sup>3</sup>.

| Ensaio | Glutathiona* (mg/L) |              |              |
|--------|---------------------|--------------|--------------|
|        | 24 h                | 48 h         | 72 h         |
| 1PD    | 96,0 ± 0,01         | 168,9 ± 0,01 | 106,5 ± 0,01 |
| 2PD    | 90,2 ± 0,01         | 154,0 ± 0,00 | 149,9 ± 0,00 |
| 3PD    | 68,6 ± 0,02         | 136,4 ± 0,01 | 140,9 ± 0,00 |
| 4PD    | 61,4 ± 0,04         | 82,9 ± 0,02  | 96,8 ± 0,02  |
| 5PD    | 72,9 ± 0,00         | 143,0 ± 0,01 | 90,7 ± 0,02  |
| 6PD    | 86,1 ± 0,01         | 88,4 ± 0,00  | 61,3 ± 0,01  |
| 7PD    | 58,9 ± 0,02         | 112,0 ± 0,03 | 60,0 ± 0,02  |
| 8PD    | 54,4 ± 0,01         | 73,0 ± 0,02  | 95,0 ± 0,01  |
| 9PD    | 32,8 ± 0,01         | 113,6 ± 0,00 | 124,9 ± 0,03 |
| 10PD   | 72,4 ± 0,05         | 98,4 ± 0,04  | 134,2 ± 0,02 |
| 11PD   | 78,0 ± 0,04         | 96,7 ± 0,04  | 61,5 ± 0,35  |
| 12PD   | 43,8 ± 0,24         | 62,6 ± 0,32  | 45,8 ± 0,02  |
| 13PD   | 72,5 ± 0,01         | 149,7 ± 0,01 | 97,8 ± 0,00  |
| 14PD   | 88,4 ± 0,01         | 91,0 ± 0,03  | 79,5 ± 0,01  |
| 15PD   | 43,3 ± 0,01         | 66,6 ± 0,00  | 50,7 ± 0,00  |
| 16PD   | 49,5 ± 0,01         | 68,7 ± 0,01  | 56,7 ± 0,01  |
| 17PD   | 46,6 ± 0,05         | 68,0 ± 0,03  | 52,3 ± 0,01  |

\* ± desvio padrão

**Tabela 41:** Estimativa dos efeitos para a concentração celular de *S. cerevisiae* no primeiro delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ) para 48 h.

|                        | Efeito (mg/L) | Desvio Padrão | t(5)  | p      |
|------------------------|---------------|---------------|-------|--------|
| Média*                 | 10,44         | 0,33          | 31,43 | 0,0000 |
| (1) Temperatura (L)    | 0,05          | 0,31          | 0,16  | 0,8804 |
| Temperatura (Q)        | 0,33          | 0,34          | 0,97  | 0,3624 |
| (2) pH (L)             | 0,40          | 0,31          | 1,29  | 0,2375 |
| pH (Q)                 | -0,10         | 0,34          | -0,30 | 0,7740 |
| (3) Conc. glicose (L)* | 0,82          | 0,31          | 2,62  | 0,0345 |
| Conc. glicose (Q)      | -0,28         | 0,34          | -0,83 | 0,4325 |
| 1 L x 2 L              | 0,01          | 0,41          | 0,02  | 0,9806 |
| 1 L x 3 L              | 0,01          | 0,41          | 0,02  | 0,9806 |
| 2 L x 3 L              | 0,28          | 0,41          | 0,69  | 0,5093 |

\* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

**Tabela 42:** Estimativa dos efeitos para a concentração celular de *S. cerevisiae* no primeiro delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ) para 72 h.

|                       | Efeito (mg/L) | Desvio Padrão | t(5)  | p      |
|-----------------------|---------------|---------------|-------|--------|
| Média*                | 11,86         | 0,52          | 22,95 | 0,0000 |
| (1) Temperatura (L)   | 0,48          | 0,48          | 0,98  | 0,3571 |
| Temperatura (Q)       | - 0,01        | 0,53          | -0,03 | 0,9782 |
| (2) pH (L)            | - 0,02        | 0,48          | -0,04 | 0,9657 |
| pH (Q)                | 0,30          | 0,53          | 0,57  | 0,5878 |
| (3) Conc. glicose (L) | 0,75          | 0,48          | 1,54  | 0,1669 |
| Conc. glicose (Q)     | -0,50         | 0,53          | -0,93 | 0,3820 |
| 1 L x 2 L             | -0,27         | 0,63          | -0,43 | 0,6823 |
| 1 L x 3 L             | 0,16          | 0,63          | 0,26  | 0,8013 |
| 2 L x 3 L             | 0,26          | 0,63          | 0,40  | 0,6977 |

\* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

**Tabela 43:** Concentração inicial de glicose (g/L) e valores de pH obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Glicose* (g/L) | pH   |      |      |
|--------|----------------|------|------|------|
|        |                | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1SD    | 24,0           | 4,96 | 6,02 | 5,94 |
| 2SD    | 24,0           | 5,64 | 5,96 | 5,94 |
| 3SD    | 51,9           | 4,27 | 4,93 | 5,00 |
| 4SD    | 53,5           | 5,09 | 4,91 | 5,31 |
| 5SD    | 37,6           | 4,48 | 5,48 | 6,12 |
| 6SD    | 39,4           | 5,01 | 5,66 | 5,73 |
| 7SD    | 19,2           | 5,60 | 5,72 | 6,56 |
| 8SD    | 59,0           | 4,45 | 5,20 | 5,24 |
| 9SD    | 38,0           | 5,06 | 5,80 | 5,70 |
| 10SD   | 38,9           | 5,08 | 5,47 | 5,56 |
| 11SD   | 39,1           | 4,97 | 5,33 | 5,56 |
| 12SD   | 38,8           | 5,09 | 5,45 | 5,60 |

\* Concentração de glicose (g/L) no início da fermentação

**Tabela 44:** Resultados da concentração celular (g/L) obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Concentração Celular* (g/L) |             |             |
|--------|-----------------------------|-------------|-------------|
|        | 24 h                        | 48 h        | 72 h        |
| 1SD    | 5,7 ± 0,009                 | 7,0 ± 0,001 | 6,9 ± 0,003 |
| 2SD    | 6,1 ± 0,004                 | 7,1 ± 0,020 | 7,5 ± 0,009 |
| 3SD    | 7,3 ± 0,007                 | 9,6 ± 0,012 | 9,9 ± 0,033 |
| 4SD    | 9,0 ± 0,018                 | 9,4 ± 0,020 | 9,7 ± 0,014 |
| 5SD    | 5,5 ± 0,003                 | 8,9 ± 0,009 | 9,1 ± 0,011 |
| 6SD    | 8,3 ± 0,003                 | 9,4 ± 0,015 | 9,4 ± 0,007 |
| 7SD    | 5,3 ± 0,003                 | 5,6 ± 0,006 | 7,3 ± 0,009 |
| 8SD    | 8,8 ± 0,025                 | 9,7 ± 0,007 | 9,4 ± 0,018 |
| 9SD    | 7,5 ± 0,023                 | 8,8 ± 0,014 | 9,0 ± 0,004 |
| 10SD   | 7,2 ± 0,004                 | 8,2 ± 0,018 | 8,6 ± 0,002 |
| 11SD   | 7,4 ± 0,025                 | 8,6 ± 0,011 | 8,8 ± 0,008 |
| 12SD   | 7,2 ± 0,013                 | 8,5 ± 0,002 | 8,8 ± 0,001 |

\* ± desvio padrão

**Tabela 45:** Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos no segundo delineamento composto central rotacional (SD) 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Glutathione* (mg/L) |              |              |
|--------|---------------------|--------------|--------------|
|        | 24 h                | 48 h         | 72 h         |
| 1SD    | 60,5 ± 0,00         | 118,7 ± 0,01 | 120,0 ± 0,01 |
| 2SD    | 75,5 ± 0,02         | 96,3 ± 0,02  | 114,4 ± 0,03 |
| 3SD    | 52,5 ± 0,00         | 144,8 ± 0,03 | 146,2 ± 0,01 |
| 4SD    | 100,8 ± 0,02        | 121,8 ± 0,03 | 103,7 ± 0,03 |
| 5SD    | 35,8 ± 0,02         | 114,7 ± 0,02 | 154,5 ± 0,00 |
| 6SD    | 93,4 ± 0,01         | 125,2 ± 0,00 | 107,6 ± 0,01 |
| 7SD    | 90,0 ± 0,00         | 92,2 ± 0,01  | 116,5 ± 0,02 |
| 8SD    | 90,7 ± 0,03         | 144,8 ± 0,04 | 113,6 ± 0,00 |
| 9SD    | 88,4 ± 0,02         | 128,8 ± 0,02 | 128,8 ± 0,02 |
| 10SD   | 87,7 ± 0,01         | 128,5 ± 0,00 | 128,2 ± 0,01 |
| 11SD   | 87,9 ± 0,00         | 128,4 ± 0,03 | 128,1 ± 0,02 |
| 12SD   | 88,1 ± 0,17         | 128,1 ± 0,01 | 127,5 ± 0,03 |

\* ± desvio padrão

**Tabela 46:** Resultados do ensaio 1FB feito no fermentador de bancada, utilizando 25 °C, 40 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, peptona e sem adição de aminoácidos.

| Tempo (h) | Concentração Celular (g/L) | Glutathiona (mg/L) | Glicose (g/L) | pH   | GSH (%) |
|-----------|----------------------------|--------------------|---------------|------|---------|
| 0         | 0,02                       | 4,7                | 40,1          | 5,00 | -       |
| 2         | 0,08                       | 7,5                | 39,7          | 5,05 | -       |
| 4         | 0,22                       | 6,6                | 31,4          | 5,03 | -       |
| 6         | 0,52                       | 9,4                | 28,1          | 4,91 | -       |
| 8         | 0,91                       | 12,7               | 26,0          | 4,90 | -       |
| 10        | 2,08                       | 16,7               | 22,3          | 4,81 | -       |
| 12        | 3,51                       | 28,9               | 10,6          | 4,74 | 0,82    |
| 14        | 5,09                       | 34,4               | 0,9           | 4,70 | 0,68    |
| 16        | 5,98                       | 45,1               | 0             | 4,73 | 0,75    |
| 18        | 6,91                       | 63,6               | 0             | 4,78 | 0,92    |
| 20        | 7,07                       | 64,6               | 0             | 4,98 | 0,91    |
| 22        | 7,33                       | 69,4               | 0             | 5,14 | 0,95    |
| 24        | 7,67                       | 96,6               | 0             | 5,30 | 1,26    |
| 26        | 7,63                       | 86,8               | 0             | 5,39 | 1,14    |
| 28        | 7,80                       | 102,8              | 0             | 5,29 | 1,32    |
| 30        | 7,73                       | 102,4              | 0             | 5,32 | 1,33    |
| 32        | 7,78                       | 103,6              | 0             | 5,23 | 1,33    |
| 34        | 7,58                       | 98,0               | 0             | 5,21 | 1,29    |
| 36        | 8,00                       | 88,1               | 0             | 5,44 | 1,10    |
| 38        | 8,06                       | 92,4               | 0             | 5,28 | 1,15    |
| 40        | 8,03                       | 97,5               | 0             | 5,30 | 1,21    |
| 42        | 8,10                       | 98,6               | 0             | 5,55 | 1,22    |
| 44        | 8,38                       | 100,1              | 0             | 5,45 | 1,19    |
| 46        | 8,49                       | 98,9               | 0             | 5,66 | 1,16    |
| 48        | 8,57                       | 96,9               | 0             | 5,68 | 1,13    |
| 50        | 8,67                       | 89,8               | 0             | 5,71 | 1,04    |
| 52        | 8,42                       | 94,9               | 0             | 5,59 | 1,13    |
| 54        | 8,33                       | 102,3              | 0             | 5,52 | 1,23    |
| 56        | 7,91                       | 126,6              | 0             | 5,46 | 1,60    |
| 58        | 8,23                       | 121,3              | 0             | 5,51 | 1,47    |
| 60        | 8,36                       | 123,9              | 0             | 5,47 | 1,48    |
| 62        | 8,62                       | 104,1              | 0             | 5,72 | 1,21    |
| 64        | 8,64                       | 107,0              | 0             | 5,52 | 1,24    |
| 66        | 8,52                       | 104,4              | 0             | 5,55 | 1,23    |
| 68        | 8,67                       | 112,9              | 0             | 5,67 | 1,30    |
| 70        | 8,89                       | 114,1              | 0             | 5,85 | 1,28    |
| 72        | 8,78                       | 105,3              | 0             | 5,81 | 1,20    |

**Tabela 47:** Resultados do ensaio 2FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,46 vvm, peptona e sem adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathione<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,01                                      | 4,7                           | 51,2                     | 5,02      | -                  |
| 2                    | 0,02                                      | 4,4                           | 51,2                     | 5,00      | -                  |
| 4                    | 0,06                                      | 4,8                           | 50,5                     | 5,00      | -                  |
| 6                    | 0,13                                      | 5,5                           | 49,1                     | 4,97      | -                  |
| 18                   | 1,90                                      | 15,7                          | 35,7                     | 4,65      | 0,83               |
| 20                   | 3,00                                      | 26,7                          | 29,9                     | 4,56      | 0,89               |
| 22                   | 4,15                                      | 29,7                          | 24,4                     | 4,50      | 0,71               |
| 24                   | 5,01                                      | 38,1                          | 20,8                     | 4,42      | 0,76               |
| 26                   | 6,33                                      | 41,2                          | 12,4                     | 4,36      | 0,65               |
| 28                   | 7,07                                      | 44,5                          | 7,3                      | 4,33      | 0,63               |
| 42                   | 9,49                                      | 109,2                         | 0                        | 5,01      | 1,15               |
| 44                   | 9,84                                      | 117,4                         | 0                        | 5,05      | 1,19               |
| 46                   | 9,76                                      | 126,2                         | 0                        | 5,09      | 1,29               |
| 48                   | 9,68                                      | 127,4                         | 0                        | 5,11      | 1,32               |
| 50                   | 9,80                                      | 129,1                         | 0                        | 5,11      | 1,32               |
| 52                   | 9,91                                      | 132,9                         | 0                        | 5,18      | 1,34               |
| 66                   | 10,06                                     | 136,0                         | 0                        | 5,22      | 1,35               |
| 68                   | 10,05                                     | 137,9                         | 0                        | 5,28      | 1,37               |
| 70                   | 10,15                                     | 139,1                         | 0                        | 5,26      | 1,37               |
| 72                   | 10,09                                     | 139,4                         | 0                        | 5,30      | 1,38               |

**Tabela 48:** Resultados do ensaio 3FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 300 rpm, 0,53 vvm, peptona e com adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathiona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,00                                      | 4,3                           | 52,6                     | 4,85      | -                  |
| 2                    | 0,03                                      | 4,4                           | 49,7                     | 4,87      | -                  |
| 4                    | 0,07                                      | 4,7                           | 48,1                     | 4,89      | -                  |
| 6                    | 0,14                                      | 4,8                           | 47,4                     | 4,88      | -                  |
| 19                   | 3,10                                      | 27,5                          | 28,4                     | 4,59      | 0,89               |
| 20                   | 3,53                                      | 30,7                          | 27,3                     | 4,5       | 0,87               |
| 22                   | 5,68                                      | 38,7                          | 19,0                     | 4,48      | 0,68               |
| 24                   | 6,38                                      | 47,0                          | 15,2                     | 4,42      | 0,74               |
| 26                   | 7,48                                      | 55,8                          | 9,1                      | 4,25      | 0,75               |
| 28                   | 8,49                                      | 56,7                          | 2,7                      | 4,27      | 0,67               |
| 30                   | 9,05                                      | 75,0                          | 0                        | 4,05      | 0,83               |
| 43                   | 9,50                                      | 122,8                         | 0                        | 4,53      | 1,29               |
| 44                   | 9,79                                      | 142,4                         | 0                        | 4,46      | 1,46               |
| 46                   | 10,10                                     | 140,8                         | 0                        | 4,54      | 1,39               |
| 48                   | 10,28                                     | 137,6                         | 0                        | 4,53      | 1,34               |
| 50                   | 10,06                                     | 140,1                         | 0                        | 4,42      | 1,39               |
| 52                   | 9,86                                      | 143,2                         | 0                        | 4,46      | 1,45               |
| 67                   | 9,74                                      | 160,3                         | 0                        | 4,59      | 1,65               |
| 69                   | 10,02                                     | 166,1                         | 0                        | 4,58      | 1,66               |
| 70                   | 10,02                                     | 162,1                         | 0                        | 4,58      | 1,62               |
| 72                   | 9,84                                      | 167,6                         | 0                        | 4,61      | 1,70               |

**Tabela 49:** Resultados do ensaio 4FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 400 rpm, 0,53 vvm, peptona e com adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathiona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,00                                      | 2,2                           | 47,6                     | 5,20      | -                  |
| 2                    | 0,02                                      | 2,5                           | 47,9                     | 5,00      | -                  |
| 4                    | 0,07                                      | 2,6                           | 44,4                     | 5,15      | -                  |
| 6                    | 0,14                                      | 3,0                           | 42,5                     | 5,13      | -                  |
| 18,5                 | 1,92                                      | 14,3                          | 31,2                     | 4,52      | 0,74               |
| 20                   | 2,96                                      | 18,3                          | 28,2                     | 4,5       | 0,62               |
| 22                   | 3,89                                      | 26,5                          | 26,0                     | 4,45      | 0,68               |
| 24                   | 5,16                                      | 31,3                          | 23,6                     | 4,34      | 0,61               |
| 26                   | 6,02                                      | 40,7                          | 15,8                     | 4,24      | 0,68               |
| 28                   | 6,88                                      | 47,9                          | 12,6                     | 4,21      | 0,70               |
| 42,5                 | 9,63                                      | 93,7                          | 0                        | 4,07      | 0,97               |
| 44                   | 9,74                                      | 105,6                         | 0                        | 4,12      | 1,08               |
| 46                   | 9,82                                      | 100,0                         | 0                        | 4,24      | 1,02               |
| 48                   | 10,01                                     | 107,9                         | 0                        | 4,33      | 1,08               |
| 50                   | 10,02                                     | 133,3                         | 0                        | 4,54      | 1,05               |
| 52                   | 9,80                                      | 142,2                         | 0                        | 4,51      | 1,10               |
| 53                   | 9,83                                      | 122,9                         | 0                        | 4,77      | 1,06               |
| 67                   | 10,24                                     | 137,5                         | 0                        | 4,62      | 1,34               |
| 68                   | 10,42                                     | 138,2                         | 0                        | 4,65      | 1,33               |
| 70                   | 10,60                                     | 134,5                         | 0                        | 4,62      | 1,27               |
| 72                   | 10,58                                     | 159,9                         | 0                        | 4,63      | 1,51               |

**Tabela 50:** Resultados do ensaio 5FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 0,46 vvm, peptona e com adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathiona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,00                                      | 2,4                           | 51,3                     | 5,13      | -                  |
| 2                    | 0,08                                      | 2,7                           | 52,4                     | 5,02      | -                  |
| 4                    | 0,09                                      | 3,0                           | 51,8                     | 5,06      | -                  |
| 6                    | 0,17                                      | 3,0                           | 50,9                     | 5,07      | -                  |
| 19                   | 3,18                                      | 21,5                          | 28,0                     | 4,61      | 0,68               |
| 20                   | 3,58                                      | 25,4                          | 24,8                     | 4,58      | 0,71               |
| 22                   | 4,96                                      | 33,8                          | 22,4                     | 4,58      | 0,68               |
| 24                   | 6,01                                      | 42,9                          | 18,8                     | 4,42      | 0,71               |
| 26                   | 7,73                                      | 49,4                          | 14,1                     | 4,31      | 0,64               |
| 28                   | 7,91                                      | 57,7                          | 11,1                     | 4,20      | 0,73               |
| 30                   | 8,03                                      | 55,3                          | 6,0                      | 4,11      | 0,69               |
| 43                   | 9,87                                      | 68,5                          | 0,0                      | 4,40      | 0,69               |
| 44                   | 10,15                                     | 73,3                          | 0,0                      | 4,42      | 0,72               |
| 46                   | 10,27                                     | 88,2                          | 0,0                      | 4,55      | 0,86               |
| 48                   | 10,17                                     | 87,5                          | 0,0                      | 4,51      | 0,86               |
| 50                   | 10,21                                     | 110,0                         | 0,0                      | 4,54      | 1,08               |
| 54                   | 10,28                                     | 158,2                         | 0,0                      | 4,60      | 1,54               |
| 67                   | 10,72                                     | 166,5                         | 0,0                      | 4,67      | 1,55               |
| 68                   | 10,50                                     | 158,5                         | 0,0                      | 4,64      | 1,51               |
| 70                   | 10,30                                     | 168,6                         | 0,0                      | 4,57      | 1,64               |
| 72                   | 10,50                                     | 175,4                         | 0,0                      | 4,57      | 1,67               |

**Tabela 51:** Resultados do ensaio 6FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, peptona e com adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathiona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,00                                      | 0,8                           | 52,9                     | 5,03      | -                  |
| 2                    | 0,06                                      | 1,0                           | 52,9                     | 4,98      | -                  |
| 4                    | 0,12                                      | 1,1                           | 52,1                     | 4,99      | -                  |
| 6                    | 0,21                                      | 1,7                           | 49,6                     | 4,94      | -                  |
| 19                   | 3,32                                      | 26,5                          | 33,0                     | 4,48      | 0,80               |
| 20                   | 3,92                                      | 32,6                          | 29,2                     | 4,42      | 0,83               |
| 22                   | 4,85                                      | 32,8                          | 21,7                     | 4,35      | 0,68               |
| 24                   | 6,16                                      | 43,8                          | 19,8                     | 4,28      | 0,71               |
| 26                   | 7,43                                      | 51,9                          | 10,4                     | 4,21      | 0,70               |
| 28                   | 8,19                                      | 55,9                          | 9,3                      | 4,11      | 0,68               |
| 30                   | 8,52                                      | 57,8                          | 2,2                      | 3,84      | 0,68               |
| 43                   | 10,68                                     | 127,0                         | 0,0                      | 4,39      | 1,19               |
| 44                   | 10,79                                     | 125,7                         | 0,0                      | 4,31      | 1,17               |
| 46                   | 10,47                                     | 128,0                         | 0,0                      | 4,36      | 1,22               |
| 48                   | 10,72                                     | 135,3                         | 0,0                      | 4,42      | 1,26               |
| 50                   | 10,68                                     | 134,2                         | 0,0                      | 4,43      | 1,26               |
| 52                   | 10,73                                     | 141,4                         | 0,0                      | 4,46      | 1,32               |
| 54                   | 10,80                                     | 144,0                         | 0,0                      | 4,44      | 1,33               |
| 67                   | 11,09                                     | 161,7                         | 0,0                      | 4,69      | 1,46               |
| 68                   | 11,06                                     | 160,0                         | 0,0                      | 4,62      | 1,45               |
| 70                   | 10,99                                     | 165,7                         | 0,0                      | 4,70      | 1,51               |
| 72                   | 11,06                                     | 167,8                         | 0,0                      | 4,79      | 1,52               |

**Tabela 52:** Resultados do ensaio 7FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, extrato de levedura e com adição de aminoácidos.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathione<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> | <b>GSH<br/>(%)</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------|
| 0                    | 0,00                                      | 4,2                           | 52,9                     | 5,16      | -                  |
| 2                    | 0,04                                      | 4,2                           | 51,7                     | 5,04      | -                  |
| 4                    | 0,10                                      | 4,2                           | 47,1                     | 5,07      | -                  |
| 19                   | 6,61                                      | 28,5                          | 8,3                      | 4,34      | 0,43               |
| 20                   | 7,63                                      | 29,5                          | 2,0                      | 4,31      | 0,39               |
| 22                   | 8,59                                      | 38,9                          | 0,0                      | 4,43      | 0,45               |
| 24                   | 8,79                                      | 43,8                          | 0,0                      | 4,51      | 0,50               |
| 26                   | 9,23                                      | 47,8                          | 0,0                      | 4,69      | 0,52               |
| 28                   | 9,72                                      | 60,5                          | 0,0                      | 4,81      | 0,62               |
| 43                   | 15,04                                     | 130,2                         | 0,0                      | 4,67      | 0,87               |
| 44                   | 16,31                                     | 140,4                         | 0,0                      | 4,67      | 0,86               |
| 46                   | 17,20                                     | 140,1                         | 0,0                      | 4,63      | 0,81               |
| 48                   | 17,46                                     | 160,5                         | 0,0                      | 4,62      | 0,92               |
| 50                   | 17,48                                     | 188,0                         | 0,0                      | 4,57      | 1,08               |
| 52                   | 17,64                                     | 183,7                         | 0,0                      | 4,55      | 1,04               |
| 67                   | 18,97                                     | 200,5                         | 0,0                      | 5,16      | 1,06               |
| 68                   | 18,95                                     | 205,7                         | 0,0                      | 5,17      | 1,09               |
| 69                   | 18,81                                     | 181,5                         | 0,0                      | 5,18      | 0,96               |
| 70                   | 18,84                                     | 184,6                         | 0,0                      | 5,16      | 0,98               |
| 72                   | 19,19                                     | 163,9                         | 0,0                      | 5,19      | 0,85               |

**Tabela 53:** Resultados do ensaio 8FB feito no fermentador de bancada, utilizando 20 °C, 54 g/L de glicose, 500 rpm, 1,1 vvm, água de maceração de milho e com adição de aminoácidos.

| Tempo<br>(h) | Concentração     |  | Glutathione<br>(mg/L) | Glicose<br>(g/L) | pH   |
|--------------|------------------|--|-----------------------|------------------|------|
|              | Celular<br>(g/L) |  |                       |                  |      |
| 0            | 0,00             |  | 2,5                   | 50,7             | 4,97 |
| 2            | 1,12             |  | 2,5                   | 49,0             | 4,97 |
| 4            | 1,20             |  | 2,8                   | 49,6             | 4,90 |
| 19           | 7,14             |  | 24,3                  | 5,1              | 4,28 |
| 20           | 7,91             |  | 29,8                  | 3,6              | 4,20 |
| 22           | 9,64             |  | 34,5                  | 0,0              | 4,11 |
| 24           | 10,34            |  | 51,2                  | 0,0              | 4,28 |
| 26           | 10,65            |  | 58,4                  | 0,0              | 4,36 |
| 28           | 11,21            |  | 60,6                  | 0,0              | 4,77 |
| 43           | 13,03            |  | 100,0                 | 0,0              | 5,60 |
| 44           | 13,97            |  | 105,9                 | 0,0              | 5,57 |
| 46           | 13,93            |  | 122,8                 | 0,0              | 5,53 |
| 67           | 15,05            |  | 139,5                 | 0,0              | 4,76 |
| 68           | 14,96            |  | 121,0                 | 0,0              | 4,92 |
| 72           | 15,00            |  | 127,9                 | 0,0              | 5,20 |

**Tabela 54:** Resultados de pH obtidos nos ensaios controle sem aplicação de CM.

| Ensaio | pH   |      |      |
|--------|------|------|------|
|        | 24 h | 48 h | 72 h |
| 1      | 4,57 | 4,71 | 5,29 |
| 2      | 4,43 | 4,66 | 5,63 |
| 3      | 4,42 | 4,62 | 5,04 |

**Tabela 55:** Resultados de pH e concentração de GSH (mg/L) obtidos nos ensaios do delineamento fatorial completo com aplicação de campos magnéticos (DCM).

| Ensaio | pH   |      |      | Glutaciona (mg/L) |       |       |
|--------|------|------|------|-------------------|-------|-------|
|        | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h              | 48 h  | 72 h  |
| 1DCM   | 4,39 | 4,96 | 7,15 | 51,1              | 199,1 | 298,0 |
| 2DCM   | 4,81 | 5,20 | 6,16 | 33,8              | 153,3 | 242,4 |
| 3DCM   | 4,64 | 5,22 | 6,93 | 66,1              | 222,1 | 340,0 |
| 4DCM   | 4,96 | 5,14 | 5,58 | 68,8              | 203,6 | 270,8 |
| 5DCM   | 4,62 | 4,85 | 5,09 | 51,7              | 179,5 | 233,1 |
| 6DCM   | 4,71 | 4,84 | 5,03 | 67,6              | 164,1 | 236,2 |
| 7DCM   | 5,01 | 4,95 | 5,16 | 64,9              | 165,3 | 231,7 |

**Tabela 56:** Resultados do ensaio controle no fermentador de bancada sem aplicação de CM.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutathiona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|
| 0                    | 0,12                                      | 4,4                           | 52,1                     | 5,24      |
| 2                    | 0,12                                      | 3,9                           | 49,0                     | 5,25      |
| 4                    | 0,13                                      | 3,8                           | 48,4                     | 5,19      |
| 6                    | 0,16                                      | 4,0                           | 47,1                     | 5,20      |
| 20                   | 4,78                                      | 21,1                          | 13,1                     | 4,66      |
| 22                   | 6,81                                      | 32,2                          | 0,4                      | 4,50      |
| 24                   | 7,47                                      | 36,0                          | 0,1                      | 4,51      |
| 26                   | 7,87                                      | 38,3                          | 0                        | 4,63      |
| 28                   | 8,56                                      | 45,1                          | 0                        | 4,82      |
| 30                   | 8,34                                      | 48,4                          | 0                        | 4,44      |
| 44                   | 16,54                                     | 90,4                          | 0                        | 4,88      |
| 46                   | 17,26                                     | 113,9                         | 0                        | 4,85      |
| 48                   | 17,16                                     | 129,4                         | 0                        | 4,81      |
| 50                   | 17,75                                     | 147,4                         | 0                        | 4,79      |
| 52                   | 18,48                                     | -                             | 0                        | 5,41      |
| 54                   | 18,82                                     | -                             | 0                        | 5,76      |
| 68                   | 18,49                                     | 205,8                         | 0                        | 6,52      |
| 70                   | 18,52                                     | 197,9                         | 0                        | 6,47      |
| 72                   | 19,00                                     | 189,7                         | 0                        | 6,52      |

**Tabela 57:** Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 24 h de CM.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutaciona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------|
| 0                    | 0,15                                      | 3,6                          | 51,5                     | 4,98      |
| 2                    | 0,15                                      | 3,9                          | 49,6                     | 4,81      |
| 4                    | 0,17                                      | 3,7                          | 49,6                     | 4,74      |
| 6                    | 0,22                                      | 5,1                          | 49,3                     | 4,91      |
| 21                   | 7,39                                      | 34,6                         | 4,1                      | 4,22      |
| 22                   | 7,76                                      | 38,3                         | 0,1                      | 4,36      |
| 24                   | 8,29                                      | 48,0                         | 0,0                      | 4,44      |
| 26                   | 8,85                                      | 59,5                         | 0,0                      | 4,61      |
| 28                   | 9,82                                      | 60,2                         | 0,0                      | 4,69      |
| 30                   | 9,47                                      | 65,8                         | 0,0                      | 4,36      |
| 45                   | 16,52                                     | 124,7                        | 0,0                      | 5,11      |
| 46                   | 16,83                                     | 132,4                        | 0,0                      | 5,15      |
| 48                   | 16,90                                     | 162,6                        | 0,0                      | 5,17      |
| 50                   | 17,04                                     | 186,9                        | 0,0                      | 4,97      |
| 52                   | 16,43                                     | 198,2                        | 0,0                      | 4,83      |
| 54                   | 16,93                                     | 195,6                        | 0,0                      | 4,75      |
| 69                   | 18,45                                     | 223,3                        | 0,0                      | 5,66      |
| 70                   | 18,59                                     | -                            | 0,0                      | 5,59      |
| 72                   | 18,14                                     | 245,7                        | 0,0                      | 5,44      |

**Tabela 58:** Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 48 h de CM.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutaciona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------|
| 0                    | 0,12                                      | 3,2                          | 51,9                     | 5,01      |
| 2                    | 0,12                                      | 2,4                          | 50,4                     | 5,02      |
| 4                    | 0,15                                      | 2,7                          | 49,7                     | 4,94      |
| 6                    | 0,20                                      | 3,2                          | 47,6                     | 4,95      |
| 7                    | 0,22                                      | 3,5                          | 46,3                     | 4,90      |
| 21                   | 7,49                                      | 27,4                         | 0,2                      | 4,38      |
| 22                   | 7,56                                      | 33,4                         | 0                        | 4,39      |
| 24                   | 7,96                                      | 39,9                         | 0                        | 4,45      |
| 26                   | 8,47                                      | 48,1                         | 0                        | 4,62      |
| 28                   | 9,43                                      | 59,3                         | 0                        | 4,75      |
| 30                   | 9,39                                      | 60,3                         | 0                        | 4,40      |
| 45                   | 16,33                                     | 108,9                        | 0                        | 4,72      |
| 46                   | 16,63                                     | 119,7                        | 0                        | 4,66      |
| 48                   | 17,18                                     | 146,3                        | 0                        | 4,62      |
| 50                   | 17,23                                     | 144,8                        | 0                        | 4,65      |
| 52                   | 17,66                                     | 160,9                        | 0                        | 5,07      |
| 54                   | 17,91                                     | 158,2                        | 0                        | 5,33      |
| 69                   | 18,76                                     | 188,9                        | 0                        | 5,59      |
| 70                   | 18,79                                     | 234,6                        | 0                        | 5,57      |
| 72                   | 18,45                                     | 259,9                        | 0                        | 5,59      |

**Tabela 59:** Resultados do ensaio no fermentador de bancada com aplicação de 72 h de CM.

| <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Concentração<br/>Celular<br/>(g/L)</b> | <b>Glutaciona<br/>(mg/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>pH</b> |
|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------|
| 0                    | 0,14                                      | 3,8                          | 53,08                    | 4,96      |
| 2                    | 0,14                                      | 3,7                          | 50,79                    | 4,93      |
| 4                    | 0,16                                      | 3,7                          | 48,50                    | 4,95      |
| 6                    | 0,21                                      | 3,8                          | 48,18                    | 4,92      |
| 7                    | 0,26                                      | 4,9                          | 47,97                    | 4,83      |
| 21                   | 7,43                                      | 31,9                         | 2,54                     | 4,35      |
| 22                   | 7,49                                      | 34,2                         | 0,15                     | 4,33      |
| 24                   | 7,90                                      | 42,8                         | 0,03                     | 4,35      |
| 26                   | 8,50                                      | 48,2                         | 0,02                     | 4,50      |
| 28                   | 9,63                                      | 52,0                         | 0,0                      | 4,66      |
| 30                   | 9,28                                      | 68,2                         | 0,0                      | 4,33      |
| 31                   | 9,62                                      | 68,7                         | 0                        | 4,50      |
| 46                   | 17,05                                     | 165,5                        | 0                        | 4,62      |
| 48                   | 17,37                                     | 171,5                        | 0                        | 4,56      |
| 50                   | 17,88                                     | 174,2                        | 0                        | 5,12      |
| 52                   | 17,88                                     | -                            | 0                        | 5,40      |
| 54                   | 17,81                                     | 208,6                        | 0                        | 5,66      |
| 69                   | 18,79                                     | 231,3                        | 0                        | 6,00      |
| 70                   | 19,35                                     | 271,9                        | 0                        | 6,02      |
| 72                   | 19,50                                     | 267,5                        | 0                        | 6,02      |