

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ALUMÍNIO: AÇÃO TÓXICA SOBRE A LEVEDURA
***Saccharomyces cerevisiae* PE-2 E O EFEITO PROTETOR**
DO ÁCIDO CÍTRICO E MAGNÉSIO

Francys Pimenta de Faria

Biólogo

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Junho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ALUMÍNIO: AÇÃO TÓXICA SOBRE A LEVEDURA
***Saccharomyces cerevisiae* PE-2 E O EFEITO PROTETOR**
DO ÁCIDO CÍTRICO E MAGNÉSIO

Francys Pimenta de Faria

Orientador: Prof. Dr. Samuel Mariano-da-Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Junho de 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

BSCAJ/UFG

F224a

Faria, Francys Pimenta.

Alumínio: ação tóxica sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o efeito protetor do ácido cítrico e magnésio [manuscrito] / Francys Pimenta de Faria. - 2010.

76 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

Apêndices.

1. Alumínio – Toxicidade
 2. *Saccharomyces cerevisiae*
 3. Efeito protetor
 4. Ácido cítrico - Magnésio
- I. Título.

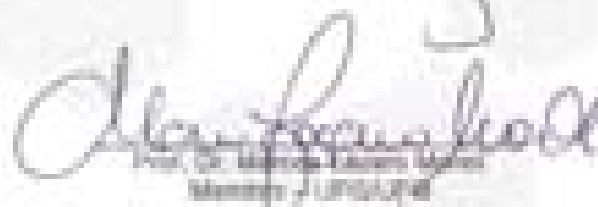
CDU: 631/635

FRANCYS PEREIRA DE FARIA

TÍTULO: "ALUMÍNIO: AÇÃO TÓXICA SOBRE A
LIVEDIORA *Saccharomyces cerevisiae* PE-3 E O EFEITO PROTETOR DO
ÁCIDO CÍTRICO E MAGNÉSIO"

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 29 de junho de 2010, pela
Banco Examinador constituído pelos seguintes:


Prof. Dr. Renato Martins Costa de Sá
Presidente - UFPA


Prof. Dr. Maria Helena de Sá
Membro - UFPA


Prof. Dr. Carlos Luiz Soares
Membro - UFPA/Campus Pás de Verde

Linha - Green
Brasil

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCYS PIMENTA DE FARIA - filho de Cláudio Pimenta de Faria e Cinária Maria de Jesus, nascido em Goiânia – GO, no dia 15 de dezembro de 1984. Graduiu-se em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Jataí, em dezembro de 2007, com colação de grau em março de 2008. Iniciou o Mestrado em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa em Fitotecnia em março de 2008, na UFG, Campus Jataí, obtendo o título de “Mestre” em junho de 2010.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela aprovação deste projeto de pesquisa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela disponibilização da bolsa de estudo e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto.

À Empresa LNF (Latino Americana) por gentilmente ter cedido às leveduras utilizadas neste estudo.

Ao Professor Dr. Samuel Mariano-da-Silva, meu “pai científico”, por quase seis anos de orientação ao longo de minha graduação e mestrado. Orientador este que acreditou no meu potencial e o qual serei eternamente grato pelos seus ensinamentos tanto na esfera profissional quanto pessoal.

A todos os membros do mestrado: Eleuzzy Moni (secretária da Pós-graduação) pela atenção e colaboração, professor Edésio Fialho dos Reis pela valiosa cooperação nas análises estatísticas e aos colegas de mestrado por compartilharem essa fase estressante, mas compensadora.

À Lázara Cristhiane pelos bons momentos e pela contribuição na finalização deste trabalho.

Às colegas de laboratório Kelly Anny e Emiliane Belo pela boa convivência e indispensável ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Aos técnicos de laboratório Sueli Maria (Laboratório de Bioquímica), Cleumar Tristão e Marcos Humberto (Laboratório de Solos) por permitirem que este fosse um anexo ao Laboratório de Bioquímica e por sempre estarem dispostos a colaborar.

Às amigas Carol e Mariane Junqueira pela boa convivência. Meu agradecimento especial à Hellen Fernanda, amiga de graduação e mestrado, a qual devo muito por sempre estar pronta a colaborar e conviver com todas as pressões e anseios de um pós-graduando.

Aos moradores do “Barcelona II” pela boa convivência e pelos momentos de descontração.

Às amigas da época da graduação, Renata Prado e Letícia Zenóbia, pois mesmo longe estiveram presentes nas várias resenhas via MSN.

Aos professores da banca de qualificação (Dr. Alexandre Braoios, Dr. Marcos

Lázaro Moreli e Dr. Samuel Mariano-da-Silva), pelas valiosas contribuições na estruturação das linhas de pesquisa deste estudo.

À banca examinadora de defesa (Dr. Edson Luiz Souchie, Dr. Samuel Mariano-da-Silva e Dr. Marcos Lázaro Moreli) por participarem da avaliação deste trabalho em plena tarde de jogo do Brasil na Copa do Mundo. Pelas sugestões que muito contribuíram para a confecção e melhoria desta pesquisa, que possivelmente terá continuidade nos próximos anos.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que descreditaram em meu potencial e capacidade, pois foram fundamentais para que eu sempre buscasse mostrar o contrário.

Finalmente ao senhor Deus por me propiciar sabedoria e permitir a obtenção de mais uma conquista.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xviii
SUMMARY	xix
1 – INTRODUÇÃO	20
2 - OBJETIVOS	22
2.1- Geral	22
2.1.1- Específicos	22
3 – REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 - Produção de etanol através de cana-de-açúcar e expansão nacional.....	23
3.2 - Alumínio em compartimentos ambientais	24
3.3 - Toxicidade do alumínio em leveduras	25
3.4 - Características e aplicações industriais das leveduras	28
3.5 - Efeito protetor do ácido cítrico	28
3.6 - Efeito protetor do magnésio.....	29
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 - Preparo da vidraria	31
4.2 - Levedura utilizada.....	31
4.3 - Reagentes utilizados.....	31
4.4 - Preparo do meio	31
4.5 - Reativação das leveduras.....	32
4.6 - Ensaio de crescimento	32
4.7 - Análise dos parâmetros estabelecidos	33
4.8 - Determinação de CO ₂	33
4.9 - Análise turbidimétrica da biomassa de leveduras.....	33
4.10 - Viabilidade e brotamento	34
4.11 - Análise estatística	34
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 - Índice de CO ₂	35
5.1.1 – Ensaio com Alumínio	35
5.1.2 – Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico.....	36
5.1.3 – Ensaio com alumínio X doses de magnésio.....	38

5.2 - Índices de crescimento de biomassa	40
5.2.1 - Ensaio com alumínio	40
5.2.2 - Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico.....	41
5.2.3 - Ensaio com alumínio X doses de magnésio	44
5.3 - Análise de regressão	46
5.3.1 – Viabilidade	46
5.3.2 – Brotamento	51
6 – CONCLUSÃO	56
7 – REFERÊNCIAS.....	57
8 - APÊNDICES	65
Apêndice A.....	65
Apêndice B.....	66
Apêndice C.....	73
Apêndice D.....	74
Apêndice E.....	75
Apêndice F	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.36
- Figura 2: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.37
- Figura 3: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico37
- Figura 4: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.38
- Figura 5: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg^{2+}39
- Figura 6: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg^{2+}40
- Figura 7: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.41
- Figura 8: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.42
- Figura 9: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico43
- Figura 10: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.44

- Figura 11: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L Mg^{2+} 45
- Figura 12: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L Mg^{2+} 46
- Figura 13: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.47
- Figura 14: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.48
- Figura 15: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico.49
- Figura 16: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.49
- Figura 17: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg^{2+} 50
- Figura 18: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg^{2+} 51
- Figura 19: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED. ...52
- Figura 20: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.53
- Figura 21: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico.53

- Figura 22: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.....54
- Figura 23: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg^{2+}55
- Figura 24: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg^{2+}55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Ensaio contendo doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) em função de diferentes concentrações de ácido cítrico (AC) (100, 200, 300 e 400 mg/L) e magnésio (Mg^{2+}) (50 e 100 mg/L) em meio YED.....32
- Tabela 2: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.....66
- Tabela 3: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.....66
- Tabela 4: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.....66
- Tabela 5: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.....66
- Tabela 6: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.66
- Tabela 7: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.66
- Tabela 8: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 9: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 10: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67

- Tabela 11: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 12: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 13: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 14: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 15: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.67
- Tabela 16: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.68
- Tabela 17: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED68
- Tabela 18: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.68
- Tabela 19: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.68
- Tabela 20: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.68

Tabela 21: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	68
Tabela 22: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	68
Tabela 23: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 24: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} , na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 25: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al^{3+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 26: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al^{3+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 27: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al^{3+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 28: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	69
Tabela 29: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 30: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70

Tabela 31: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 32: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 33: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 34: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 35: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	70
Tabela 36: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 37: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/L Al^{3+} e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 38: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 39: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 40: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 50 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71

Tabela 41: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 42: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	71
Tabela 43: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 cultivada em meio YED.	72
Tabela 44: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2, enriquecido com diferentes doses (100 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L) de ácido cítrico, cultivada em meio YED.	73
Tabela 45: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2, enriquecido com diferentes doses (50 mg/L e 100 mg/L) de Mg^{2+} , cultivada em meio YED.	74
Tabela 46: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2, enriquecido com diferentes doses (100 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L) de ácido cítrico, cultivada em meio YED.	75
Tabela 47: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2, enriquecido com diferentes doses (50 mg/L e 100 mg/L) de Mg^{2+} , cultivada em meio YED.	76

ALUMÍNIO: AÇÃO TÓXICA SOBRE A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 E O EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO CÍTRICO E MAGNÉSIO

RESUMO - O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos deletérios de diferentes concentrações de alumínio na taxa de produção de CO₂, crescimento de biomassa, viabilidade e brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o efeito protetor de diferentes concentrações de ácido cítrico e magnésio. Foram realizados seis diferentes ensaios, utilizando-se meio sintético YED (1,0% de extrato de levedura e 2,0% de sacarose). Cada ensaio foi constituído de quatro tratamentos de alumínio na forma de AlCl₃.6H₂O, nas seguintes proporções: 0, 50, 100 e 150 mg/L. O 1º ensaio foi considerando o controle, apresentando apenas doses de alumínio. O 2º, 3º e 4º apresentaram meios com diferentes doses de alumínio em função de diferentes doses de ácido cítrico (100, 200 e 400 mg/L respectivamente). O 5º e 6º ensaio foram enriquecidos com magnésio (50 e 100 mg/L respectivamente), frente a diferentes doses de alumínio. Foram utilizadas 3 repetições para cada tratamento. O pH do meio foi padronizado a 4,0, sendo que os parâmetros estabelecidos foram avaliados a cada 2 horas, nos seguintes intervalos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas após a inoculação da levedura em meio sintético. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, quando significativo ao nível de 5% à regressão. Concluiu-se que o alumínio apresentou citotoxicidade no desenvolvimento da levedura em dose igual ou superior a 50 mg/L. O ácido cítrico e magnésio promoveram efeito protetor da *S. cerevisiae* PE-2 em relação ao efeito deletério do alumínio. A utilização de ácido cítrico e magnésio, mesmo promovendo uma pequena queda da viabilidade das leveduras, demonstraram claramente sua eficácia e utilização como mecanismos de proteção, minimizando os efeitos deletérios do alumínio.

Palavras-chave: fungo, toxicidade, crescimento, proteção.

ALUMINUM: TOXIC ACTION ON THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 AND THE PROTECTIVE EFFECT OF CITRIC ACID AND MAGNESIUM

SUMMARY - The current work aimed to study the deleterious effects of different aluminum concentrations in the production rate of CO₂, growing of biomass, viability and germination of *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 yeast and the protector effect of citric acid and magnesium. Six different experiments were conducted, using a synthetic YED medium (1.0% of extract of yeast strains and 2.0% of sucrose). Each experiment consisted of four treatments of aluminum in the form of AlCl₃.6H₂O, in the following proportion: 0, 50, 100, 150 mg/L. The first experiment meant to consider the control, pointing out only doses of aluminum. The 2nd, 3rd and 4th experiments pointed out different doses of aluminum in function of different doses of citric acid (100, 200 e 400 mg/L respectively). The 5th and 6th ones were enriched with magnesium (50 and 100 mg/L, respectively) with different doses of aluminum. Three repetitions were used for each treatment, the medium pH was standardized to 4.0. Whereas the established standards were tested every 2 hours, in the following breaks: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 hours after the inoculation of the yeast in the synthetic medium. The obtained results were taken to the analyses of variance, when meaningful to the point of 5% to regression. It is concluded that the aluminum showed cytotoxicity in the development of yeast in equal or superior doses of 50 mg/L. The citric acid and the magnesium promoted protector effect of *S. cerevisiae* PE-2 in relation to the deleterious effect of aluminum. The use of citric acid and magnesium, even promoting a little drop of viability of the yeast, they clearly demonstrated their efficiency and use as a protection mechanism, minimizing the deleterious effect of aluminum.

Key-words: yeast, toxicity, growth, protection.

1 – INTRODUÇÃO

Os estados do Centro-Oeste brasileiro, áreas de pastagens e grandes culturas, estão cedendo espaço à matéria-prima energética mais valorizada do momento. O avanço da cana-de-açúcar em Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul revela uma mudança radical na fisionomia agrícola e econômica da região. Em nenhum outro lugar do país há tanta terra fértil, barata e de relevo suavemente ondulado disponível.

A região Centro-Oeste desponta como sucessor natural de São Paulo na liderança do mercado sucroalcooleiro, deixando para trás inclusive zonas nobres no Triângulo Mineiro, Paraná, Tocantins, Maranhão, Pará e Bahia, consideradas fronteiras agrícolas emergentes. Segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento - Conab (2010), o Brasil colherá em 2010 a maior safra de cana-de-açúcar da história. Em média 664 milhões de toneladas, sendo que desse volume total, a região Centro-Oeste participará com 98 milhões de toneladas.

A velocidade com que a área de plantio da gramínea aumenta, aliada à instalação de novas usinas nesta região, comprova que a aposta feita por grandes grupos não foi em vão. Apesar da crescente expansão canavieira pesquisas na área de fermentação alcoólica praticamente inexistem na região Centro-Oeste.

Tal região apresenta predominância de solos típicos do Cerrado, os quais possuem alumínio. Este metal é encontrado naturalmente em grande maioria dos solos brasileiros, apresentando maior disponibilidade nas plantas cultivadas em solos ácidos (característica dos solos do Cerrado) por apresentar-se na forma livre (Al^{3+}). A cana-de-açúcar quando cultivada neste tipo de solo pode absorvê-lo, sendo o mesmo transferido para o colmo das plantas. Caso este material seja utilizado como substrato no processo fermentativo para a produção de etanol, o alumínio pode ser facilmente encontrado nas dornas de fermentação.

O processo de fermentação mais comumente utilizado nas destilarias do Brasil é o Melle-Boinot, cuja característica principal é a recuperação da levedura através da centrifugação do vinho. Desta forma, leveduras que crescem em um meio de fermentação com concentrações mesmo subtóxicas de metais podem apresentar,

devido aos ciclos fermentativos e ao fenômeno de bioacumulação, concentrações celulares desses elementos maiores que aquelas normalmente encontradas no mosto, tornando as leveduras inviáveis ao longo dos ciclos.

As leveduras são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos como panificação, vinificação, produção de biomassa, cervejaria e produção de álcool carburante (Aranha, 2002). Um exame na literatura mostra que pesquisas envolvendo toxicidade do alumínio com leveduras são justificadas principalmente pela facilidade de manipulação em laboratório, por ser um microrganismo eucarioto simples, e o fato de seu genoma já estar mapeado (Angeloni, 2009). Sendo as leveduras bastante sensíveis ao estresse provocado por fatores externos, são encontrados trabalhos científicos acerca da possível proteção conferida à *Saccharomyces cerevisiae* pelo magnésio (Angeloni, 2009; Monaco, 2007). Por outro lado, dados sobre a utilização de ácido cítrico como efeito protetor são raros.

Apesar do Brasil ser o país mais avançado no que se refere às tecnologias aplicadas no cultivo da cana-de-açúcar e na produção de álcool carburante, ser o maior produtor mundial de etanol proveniente dessa gramínea, da considerável expansão agrícola canavieira nos últimos anos em solos do Cerrado e da levedura ser amplamente utilizada em processos biotecnológicos, existem poucos trabalhos nacionais publicados com relação à toxicidade do alumínio em condições fisiológicas de um processo biotecnológico. Já na região Centro-Oeste, importante pólo na produção de etanol, essas pesquisas praticamente são inexistentes.

Em relação às considerações expostas, fica patente a necessidade de estudo dos efeitos do alumínio dentro do contexto fisiológico da levedura em um processo biotecnológico, buscando condições para sua atenuação ou proteção sobre os efeitos deletérios provocados por esse metal.

2 - OBJETIVOS

2.1- Geral

Determinar a toxicidade do alumínio e o possível efeito protetor do ácido cítrico e magnésio durante o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

2.1.1- Específicos

- Estudar os efeitos do alumínio durante o crescimento da levedura;
- Determinar as doses de alumínio prejudiciais ao crescimento, viabilidade e brotamento de leveduras fermentadoras em meio sintético;
- Determinar as doses de ácido cítrico e magnésio que conferem alguma proteção às leveduras contaminadas com alumínio em meio sintético;
- Determinar a relação entre crescimento, viabilidade, brotamento e o estresse causado pelo alumínio à levedura.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 - Produção de etanol através de cana-de-açúcar e expansão nacional

Muitos países consideram o uso da biomassa na produção de energia e biocombustíveis como um dos caminhos promissores deste século para a combinação harmoniosa entre desenvolvimento e conservação ambiental, principalmente em países em vias de desenvolvimento. Nas últimas décadas, as fontes renováveis de energia elétrica e biocombustíveis ocupam atualmente um total de 1/5 de toda energia mundial gerada a partir de recursos naturais renováveis, sendo: 13% a 14% da biomassa e 6% a partir dos recursos hídricos. Em alguns países em desenvolvimento a biomassa é responsável pelo fornecimento de 90% ou mais da energia total (Hall, 2005).

O Brasil é o país mais avançado no que se refere as tecnologias aplicadas no cultivo da cana-de-açúcar com a utilização de biomassa na produção e uso do etanol como combustível, seguido pelos Estados Unidos, com produção de etanol a partir de milho. A produção mundial do álcool em 2007 foi de 54 bilhões de litros. O país produziu na mesma safra 21,5 bilhões de litros, sendo utilizado em mistura com a gasolina no próprio país. Desse total, pouco mais de 3 bilhões foram exportados (Veja, 2008). Nos Estados Unidos, México, Índia, Argentina, Colômbia e, recentemente, no Japão é utilizado exclusivamente como combustível concentrado (Gazzoni, 2008).

O etanol pode ser obtido a partir de diversas fontes de biomassa, sendo a cana-de-açúcar a forma mais econômica, atualmente, tendo ocorrido nos últimos anos uma expansão da área de produção dessa matéria-prima (Balsadi, 2007). Expansão esta que foi impulsionada por mercados nacionais e internacionais do açúcar e do álcool combustível, o que favoreceu positivamente o desempenho dessa cultura.

Recentemente, inovações tecnológicas vêm sendo alcançadas pelo aumento de investimento em pesquisas, as quais possibilitam parcerias entre indústrias e universidades, gerando um grande avanço nas fronteiras agrícolas, em especial na região Centro-Oeste brasileira, ampliando assim a participação na produção

brasileira.

O Brasil desde a implantação do Programa Nacional do Álcool, no ano de 1975, vem se modernizando com a introdução de novas tecnologias nos diversos campos da indústria sucroalcooleira, as quais proporcionam rendimento e eficiência e, incentiva parcerias com instituições públicas e privadas (Amorim, 2005).

3.2 - Alumínio em compartimentos ambientais

O alumínio é o elemento mais abundante, constituindo cerca de 8% do peso total na crosta exterior da Terra. Em solos neutros ou levemente ácidos, é encontrado nas formas insolúveis e atóxicas. Porém, em solos mais ácidos, a biodisponibilidade e toxidez do alumínio são potencializadas (Kochian, 1995).

Segundo Zel (1993), a citotoxicidade do alumínio já foi demonstrada em diversos sistemas biológicos, sendo considerado um fator limitante na produtividade de diversas cultivares (aveia, trigo, milho) especialmente nos trópicos. Estima-se que na América tropical cerca de 70% dos solos apresentem toxidez por alumínio (Haug & Vitorello, 1997). Segundo Kochian (1995), o alumínio merece atenção especial por estar presente na maior parte dos solos brasileiros. Em áreas agricultáveis, geralmente, as atividades industriais e o uso incorreto de fertilizantes têm contribuído para o aumento da quantidade de alumínio solúvel Al^{3+} , (forma mais tóxica do metal) acarretando problemas ambientais.

A correção do pH e adubação desses solos são imprescindíveis para a obtenção de elevada produtividade das culturas (Santos, 2002). É importante destacar que a calagem é a prática mais efetiva e barata para a correção da acidez dos solos.

Em sua maioria, as plantas respondem ao aumento na concentração de metais no solo com a absorção desses elementos (Gouvêa, 1995). A natureza dessas respostas dependerá da sensibilidade individual, da intensidade (concentração e duração) da exposição, do metal propriamente dito e da forma como esse se encontra (Adriano, 1986).

Existem alguns possíveis mecanismos de tolerância ao íon Al^{3+} em plantas,

porém, sua efetividade se encontra em fase de especulações por parte dos pesquisadores. Entre os mecanismos de exclusão do alumínio são considerados possíveis exsudatos orgânicos quelantes do íon Al^{3+} ainda não descobertos, formação de barreiras via componentes que alteram o pH da rizosfera, complexação do Al^{3+} por mucilagens secretadas pelas raízes e exclusão do acumulado por algum transportador específico. Entre os mecanismos de desintoxicação interna do íon Al^{3+} , é especulada a fixação deste na parede celular e a complexação no simplasto via diferentes compostos orgânicos (Hartwig et al., 2007).

Esse elemento, em concentrações tóxicas na solução do solo, inibe o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas é reduzido.

Quando a cana-de-açúcar é cultivada em solos ácidos com disponibilidade de alumínio na sua forma livre, espera-se que ocorra a absorção e o acúmulo de metais nas plantas, sendo possível encontrar, quantidades consideráveis de alumínio nos colmos dos vegetais. Assim quantias apreciáveis do elemento podem ser transferidas ao processo industrial de produção de álcool carburante (Silva, 1995; Aranha, 2002). Quando esse fato acontece, pode interferir de forma negativa no rendimento da fermentação alcoólica gerando estresse ou mesmo inviabilidade das leveduras fermentadoras.

3.3 - Toxicidade do alumínio em leveduras

A toxidez do alumínio é considerada um importante fator limitante da produtividade de muitas culturas com conseqüentes reflexos econômicos, razão pela qual uma considerável quantidade de informações está disponível na literatura (Haug, 1984). Apesar disso, informações sobre toxicidade de alumínio em leveduras são pouco documentadas e mais escassas ainda em processos biotecnológicos industriais. Recentemente, níveis potencialmente tóxicos de alumínio foram encontrados em mostos industriais de produção de álcool combustível, gerando acúmulo desse metal nas células de leveduras submetidas à ciclos fermentativos (Aranha, 2002; Angeloni, 2009).

Basso (2006) demonstrou que mostos industriais, empregados em várias destilarias do estado de São Paulo, apresentaram teores de alumínio oscilando entre 8 e 40 mg L⁻¹, mas atingindo até 130 mg L⁻¹ quando são normalmente associados à queda da viabilidade celular da levedura. Amorim & Basso (1988) e Amorim & Basso (1990), relatam que concentrações acima de 10 mg L⁻¹ já exercem ação depressiva sobre a fermentação alcoólica. Aranha (2002) em análises conduzidas pelo Centro Tecnológico da Copersucar detectou teores médios de alumínio de 156 mg L⁻¹ em caldos destinados à fermentação.

A constatação da presença de alumínio em níveis potencialmente tóxicos em mostos industriais levou a crer que, o processo biotecnológico de produção de etanol combustível conduzido no país, denominado Melle-Boinot (no qual células de levedura são recuperadas por centrifugação e reaproveitadas) impõe a levedura uma condição fisiológica peculiar, que pode proporcionar o acúmulo do metal. Devia-se assim, abordar a possibilidade do alumínio ser um agente comprometedor da eficiência do processo industrial.

A fermentação alcoólica é antes de tudo um processo biológico conduzido pela levedura, cuja fisiologia e bioquímica tem sido negligenciada em favor de uma visão físico-química e mecânica do processo. Deveria ser considerada de uma forma mais holística especialmente por depender de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta às alterações no meio, com grande impacto do rendimento do processo.

Devido ao estresse gerado pelo alumínio sobre o rendimento máximo da levedura, devia-se abordar a possibilidade do metal em questão ser um agente comprometedor da eficiência do processo industrial, impondo a *Saccharomyces cerevisiae* a uma condição fisiológica peculiar que pode proporcionar o acúmulo do desse elemento. A avaliação (em condições fisiológicas semelhantes as da indústria) do desempenho da levedura em função de teores de alumínio no meio é o primeiro passo para que seja sugerido o controle do metal na atividade industrial.

Estudos com a técnica de espectroscopia de ressonância demonstraram que o alumínio penetra nas células de levedura após 15 minutos de exposição, atingindo um equilíbrio após 4 horas (Rao & Easwaran, 1997).

Os efeitos negativos proporcionados pelo alumínio, embora em alguns casos

sejam discretos, são caracterizados pela redução da produção de biomassa e da viabilidade celular, possivelmente pela redução dos teores de trealose e glicogênio celular (Angeloni, 2009). Outrossim, ocorre uma diminuição no processo fermentativo (Basso, 1990; Aranha, 2002).

O acúmulo de alumínio, assim como demais outros metais por leveduras é influenciado por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal, fisiologia da célula e as condições do ambiente, como o pH (Mariano-da-Silva, 2009). Além disso, a internalização depende de metabolismo dos íons metálicos e pode ser influenciada pela presença de cátions de metais competidores ou pela falta de fonte energética (Stoll e Duncan, 1996).

As leveduras industriais estão sujeitas a uma variedade de injúrias físicas, químicas e/ou biológicas, referidas como estresse (Walker, 1998), que podem causar uma diminuição na taxa de crescimento e na atividade metabólica das células. Esses microrganismos geralmente, respondem às injúrias sub-letais através do desenvolvimento de respostas adaptativas. Essa resposta é uma propriedade geral de todos os organismos vivos (Craig, 1985; Lindquist & Craig, 1988) e representa uma reprogramação transitória das atividades celulares para garantir a sobrevivência durante o estresse, protegendo componentes celulares essenciais e permitindo que a célula reassuma rapidamente suas atividades normais durante o período de recuperação (Watson, 1990; Piper, 1993; Parsell & Lindquist, 1994; Mager & Dekruiff, 1995; Ruis & Schüller, 1995).

Ao sofrer algum tipo de estresse, as leveduras podem responder de diferentes maneiras: aumento do nível de trealose intracelular (Wiemken, 1990; Neves & François, 1992) e glicerol (Omori et al., 1996), alterações na composição lipídica da membrana (Mishra & Prasad, 1989) e modulação do processo da troca de íons (Petrov & Okorokov, 1990). A combinação desses fatores confere tolerância ao estresse, sendo a importância relativa de cada fator variável de acordo com o tipo de estresse e o estado fisiológico das culturas de levedura (Birch & Walker, 2000). A levedura é o organismo eucariótico mais estudado quanto aos aspectos fundamentais da biologia e, igualmente, foi e continua sendo intensamente pesquisada em relação aos processos biotecnológicos relacionados. Tais processos impõem a levedura às situações fisiológicas peculiares, de modo que grande parte

das informações é limitada à extrapolação para a situação industrial nacional, onde diversos fatores podem gerar o estresse das mesmas e torná-las inviáveis.

3.4 - Características e aplicações industriais das leveduras

As leveduras mais comumente usadas na indústria, são classificadas como fungos pertencentes ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, sub-divisão *Ascomycotina*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Endomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Saccharomyces* e espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Esses microrganismos apresentam grande importância industrial, pois constituem um grupo de fungos com ampla utilização em processos biotecnológicos, como: panificação, produção de cervejas, vinhos, destilados em geral, produção de biomassa e etanol. Outrossim, estão sendo empregados por indústrias alimentícias que confeccionam suplementos animais e humanos, por ser grande fonte de proteínas (50 a 70%), possuir composição balanceada de aminoácidos e apresentar elevada riqueza em vitaminas do complexo B. Os carboidratos representam cerca de 20 a 30% da matéria seca das células e, em menor proporção, carboidratos de reserva energética glicogênio e trealose. (Evangelista, 2001; Carvalho, 2001; Bekatorou, 2006). Atualmente esta prática de suplementação proveniente destes microrganismos vem crescendo consideravelmente, sendo denominada como alimentos advindos de “single cell protein” (Angeloni, 2009).

3.5 - Efeito protetor do ácido cítrico

O ácido cítrico é um ácido orgânico fraco, presente principalmente nas frutas cítricas e pode atuar como agente quelante (Wiley, 1994). Jones & Kochian (1997) relataram que o referido ácido bloqueia a entrada do alumínio em plantas. Como esse metal apresenta afinidade com o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (componente de membrana celular envolvido com transdução de sinal) o mecanismo de ação tóxica do alumínio se deve a sua ligação com componentes lipídicos específicos da

membrana. Outros autores explicam a observação anterior, de que a excreção de ácidos orgânicos pelas raízes de plantas conferiam tolerância ao alumínio (Miyasaka, 1991; Piñeros et al., 2002).

Macdiarmid & Gardner (1996), demonstraram que a presença de citrato em meio semisintético poderia complexar o Al^{3+} , reduzindo a sua ação tóxica em *Saccharomyces cerevisiae*.

Outros autores afirmaram que o efeito protetor do ácido cítrico pode advir pelo fato deste elemento ser eficazmente transportado fora da mitocôndria, através de proteínas transportadoras de ácidos tricarbóxicos, sendo o excesso de citrato no citoplasma geralmente liberado para fora das células para prevenir acidose citoplasmática (Barbier-Brygoo et al., 2000; Massonneau et al., 2001). Faria et al. (2009), observou que doses de 50 mg/L de ácido cítrico promoveu um efeito de proteção em tratamentos contendo diferentes doses de alumínio em relação ao crescimento da biomassa de leveduras.

Kosow & Rose (1971) consideraram a possibilidade da ativação por citrato e outras substâncias ser secundária à contaminação em sistemas de metais inibitórios. Eles testaram uma série de metais divalentes e descobriram que nenhum deles inibiu a enzima de maneira suficiente para explicar o efeito observado de citrato.

3.6 - Efeito protetor do magnésio

Os íons metálicos são substâncias de extrema importância para a fermentação alcoólica e apresentam grande influência na fisiologia das células de leveduras.

O magnésio é um cátion bi-valente metálico, intracelularmente encontrado em alta concentração, podendo apresentar-se em duas formas: livre e ligado a outros componentes. O último predomina em ligações intracelulares de alta afinidade (Campbell, 1983), podendo formar diferentes ligações, tais como protéicas e aniônicas (Elin, 1987). O magnésio ligado é indisponível para processos fisiológicos e bioquímicos, sendo a forma livre mais ativa e representa uma fração muito

pequena (1 a 10%) do magnésio intracelular total. Isto representa aproximadamente 1 a 10 mM em células procariontes e eucariontes de microrganismos e 0,2 a 1 mM em células animais não musculares.

Rees e Stewart (1997) demonstraram que o magnésio atua principalmente intracelularmente, sendo requerido como cofator de mais de 300 enzimas e como regulador metabólico do piruvato (Birch, Ciani & Walker, 2003).

Como um íon inorgânico essencial, o magnésio participa de muitas funções fisiológicas, sendo que a suplementação da levedura com esse íon apresentou resultados importantes na atenuação dos efeitos nocivos de estresse, tais como: térmico e etanólico (Walker, 1998; Monaco, 2007), estimulação da fermentação (Walker, 1996; Rees & Stewart, 1997), elevação da produção de etanol (Chun-Keng; Feng-Wu & Li-Jia, 2003), estímulo as enzimas glicolíticas e maior estabilidade da membrana celular (Birch, Ciani & Walker, 2003). Além disso, é indispensável para a estabilidade de estruturas subcelulares e organelas, principalmente nos ribossomos (Meers & Tempest, 1969) e nas mitocôndrias (Walker et al., 1982).

Observações do efeito protetor do magnésio em resposta aos níveis tóxicos de etanol têm sugerido que o mesmo desempenha um importante papel na elevação da produção de etanol (pois proporciona uma diminuição do tempo requerido para conversão de glicose em etanol em cerca de 1/3 comparada a um meio não suplementado), na proteção da célula ao efeito nocivo do mesmo e no restabelecimento celular após o estresse (Dombek & Ingram, 1986b; Birch & Walker, 2000; Chun-Keng; Feng-Wu & Li-Jia, 2003).

Walker & Maynard (1997) concluíram que a absorção de magnésio e a subsequente utilização deste íon por células de leveduras parecem ser pré-requisitos para a ocorrência de máxima atividade fermentativa.

MacDiarmid & Gardner (1998), identificaram que os genes *Alr1* e *Alr2* possuem a capacidade de aumentar a tolerância ao alumínio quando superexpressos e estão envolvidos com o transporte de magnésio. Além disso, a toxidez do alumínio para a levedura seria consequência da redução do influxo de magnésio por tal transportador. Graschopf et al. (2001) demonstraram que a proteína *Alr1* está localizada na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, e que sua expressão pode ser controlada por diferentes concentrações de magnésio.

Corroborando esta hipótese, Kern et al. (2005), demonstraram que em células de *S. cerevisiae*, a proteína Alr1 está envolvida com a desintoxicação de Cd^{2+} devido à sua capacidade de executar o efluxo para o meio extracelular. Tais resultados embasam as observações que o magnésio alivia a toxidez do alumínio (Jongbloed & Borst-Pauwels, 1992).

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Preparo da vidraria

Toda a vidraria foi previamente imersa, por quatro horas, em uma solução de lavagem (ácido clorídrico, ácido nítrico e água destilada na proporção de 1:2:9) sendo enxaguada, em seguida, com água destilada e secada em estufa a 80 °C (Mcdaniel, 1992).

4.2 - Levedura utilizada

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 liofilizada, amplamente empregada pelo parque industrial sucroalcooleiro brasileiro. Esses microrganismos foram gentilmente doados pela empresa Latino Americana (LNF), situada na cidade de Bento Gonçalves – RS.

4.3 - Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados para as análises tinham especificações de pureza “P.A.”.

4.4 - Preparo do meio

Para os ensaios de crescimento foi utilizado o meio YED (1,0% de extrato de levedura e 2,0% de sacarose) e água destilada como solvente. O pH foi padronizado em 4,0 usando H_2SO_4 50% ou NaOH 50%.

4.5 - Reativação das leveduras

A levedura foi reativada (solução 5%) em água destilada (33 - 35°C) por 30 minutos em estufa B.O.D.

4.6 - Ensaios de crescimento

Foram realizados 6 diferentes ensaios de crescimento, com 4 tratamentos cada. Frascos erlenmeyers de 125 mL, tapados com folha de alumínio receberam 60 mL de meio YED acrescidos com cloreto de alumínio (Al^{3+}) na forma de ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico (AC) na forma de ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) e cloreto de magnésio (Mg^{2+}) na forma de ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (Tabela 1).

Tabela 1: Ensaios contendo doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) em função de diferentes concentrações de ácido cítrico (AC) (100, 200, 300 e 400 mg/L) e magnésio (Mg^{2+}) (50 e 100 mg/L) em meio YED.

Trat. Al^{3+}	1°	2°	3°	4°	5°	6°
0,0 mg/L Al^{3+}	Controle	100 mg/L AC	200 mg/L AC	400 mg/L AC	50 mg/L Mg^{2+}	100 mg/L Mg^{2+}
50 mg/L Al^{3+}	Controle	100 mg/L AC	200 mg/L AC	400 mg/L AC	50 mg/L Mg^{2+}	100 mg/L Mg^{2+}
100 mg/L Al^{3+}	Controle	100 mg/L AC	200 mg/L AC	400 mg/L AC	50 mg/L Mg^{2+}	100 mg/L Mg^{2+}
150 mg/L Al^{3+}	Controle	100 mg/L AC	200 mg/L AC	400 mg/L AC	50 mg/L Mg^{2+}	100 mg/L Mg^{2+}

Todos os tratamentos foram realizados com três repetições. Posteriormente, o meio preparado foi esterelizado em autoclave 120°C a 1 atm por 20 minutos. Os frascos contendo meio foram inoculados em condições assépticas, com 1 mL da suspensão a 5% da levedura e incubados a 32°C em estufa B.O.D.

4.7 - Análise dos parâmetros estabelecidos

Em tempos determinados durante o crescimento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas), 1 mL da suspensão de células foi retirado e transferido para tubos de ensaio com 19 mL de água destilada, cuja a solução foi homogeneizada em agitador Phoenix-AP56. Logo em seguida, retirou-se alíquotas da suspensão de cada tubo, sendo estimados o crescimento da biomassa, a viabilidade e o brotamento. Um ensaio paralelo foi realizado para a aferição do CO₂ liberado.

4.8 - Determinação de CO₂

Para mensurar o índice de CO₂ produzido pelas leveduras, utilizou-se o método da diferença de pesos, aferindo o peso inicial de cada erlenmeyer com o peso do mesmo na próxima avaliação (Mariano-da-Silva, 2001).

4.9 - Análise turbidimétrica da biomassa de leveduras

A concentração de células foi determinada por leitura turbidimétrica, a 570 nm, em espectrofotômetro marca Micronal, modelo B572. Os valores das leituras de absorbância e transmitância foram convertidos em valores de concentrações de biomassa (g 100 mL⁻¹ de meio) através da reta padrão estabelecida com a levedura testada *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (Apêndice A). A reta padrão foi confeccionada com os valores de absorbância, tornando passível a identificação da concentração. Calculada com a fórmula: Absorbância = 2 – log Transmitância (Mariano-da-Silva, 2007).

4.10 - Viabilidade e brotamento

Uma gota da suspensão (meio sintético e água destilada, na proporção de 1:19) de cada tubo foi transferida para câmara de Neubauer e corada com eritrosina para análise da viabilidade em microscópio óptico (Olympus-CX40). Foram contadas uma amostra de leveduras viáveis, uma de leveduras viáveis com brotos e uma de leveduras inviáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Total} = \left(100 \cdot \frac{((V_1 + V_2 + V_3)/3) + ((B_1 + B_2 + B_3)/3)}{((V_1 + V_2 + V_3)/3) + ((M_1 + M_2 + M_3)/3) + ((B_1 + B_2 + B_3)/3)} \right)$$

Onde:

V= repetição de cada tratamento para leveduras viáveis;

B= repetição de cada tratamento para leveduras viáveis com brotos;

M = repetição de cada tratamento para leveduras inviáveis.

A viabilidade representa a relação entre células viáveis e totais de células. O brotamento corresponde à relação entre brotos viáveis e totais de células de levedura (Amorim et al., 1989).

4.11 - Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativo ao nível de 5%, à regressão, utilizando o pacote estatístico SAEG – versão 9.0 (Júnior, 2001). Os resultados da análise estatística podem ser observados no apêndice B.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Índice de CO₂

5.1.1 – Ensaio com Alumínio

A dinâmica do processo fermentativo pode ser determinada mediante o índice de CO₂ liberado pelas leveduras, uma vez que esse gás é um dos subprodutos formados a partir da conversão de carboidrato em energia pelas mesmas. Estes microrganismos utilizam a glicose e frutose oriundas de uma molécula de sacarose, presentes no meio, para obter suas fontes energéticas. Dessa forma, menores produções de gás carbônico podem indicar que algum fator está inibindo a fermentação alcoólica.

O ensaio controle (Figura 1) apresenta os índices de CO₂ liberados em um meio contendo apenas diferentes doses de alumínio (0, 50, 100 e 150 mg/L). Pode-se observar um aumento ascendente e constante na liberação de gás carbônico e também que o aumento da concentração de alumínio inibiu de forma mais eficiente a produção desse gás. Já nos demais ensaios enriquecidos com ácido cítrico (Figuras 2, 3 e 4) e magnésio (Figuras 5 e 6) a levedura necessitou de um maior tempo de adaptação, pois a liberação de CO₂ ocorreu de forma mais expressiva no início da sexta hora.

Avaliando o tratamento com 50 mg/L Al³⁺, nota-se uma maior liberação de gás carbônico quando comparado aos demais tratamentos do mesmo ensaio. Em segundo momento, o alumínio gerou um efeito benéfico à levedura e posteriormente, houve uma queda da sua viabilidade e da eficiência na conversão de sacarose em etanol. Com exceção deste tratamento, observa-se a redução na produção de CO₂ em função do aumento da dose de Al³⁺. Os valores variaram entre 0,999 g para o tratamento 50 mg/L de Al³⁺ e 0,692 g para o tratamento com 150 mg/L de Al³⁺.

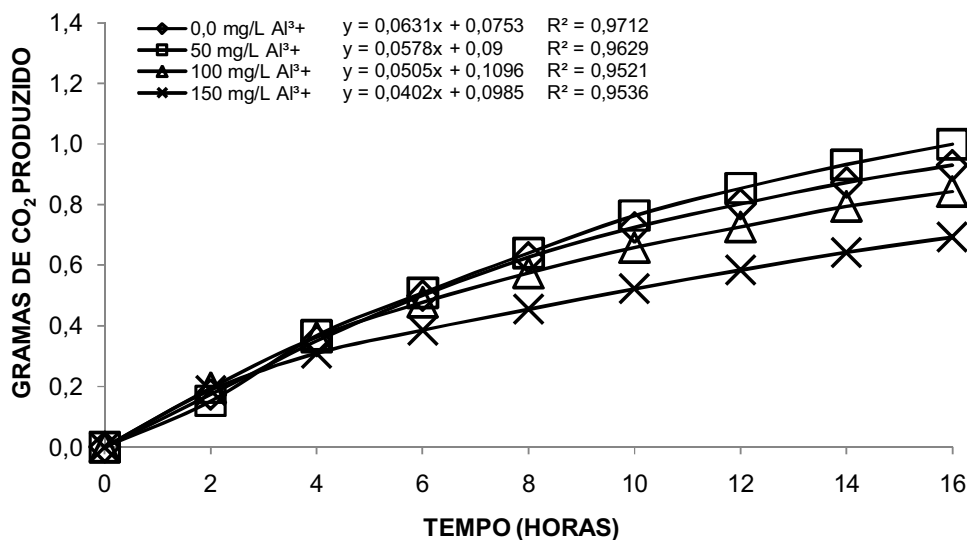


Figura 1: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO₂ da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

5.1.2 – Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

Exceto no tratamento com 150 mg/L de Al³⁺ (Figura 4) em que onde ocorreu maior liberação de CO₂, nos demais ensaios enriquecidos com ácido cítrico (Figuras 2 e 3) pode se observar o mesmo fato ocorrido no tratamento com 50 mg/L de Al³⁺ (Figura 1): índice de liberação de gás carbônico maior do que o tratamento com 0,0 mg/L de Al³⁺.

No ensaio enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico (Figura 2), nota-se que a quantidade de CO₂ liberada em todos os tratamentos foi maior quando comparada ao ensaio controle (Figura 1) e ao de 200 mg/L de ácido cítrico (Figura 3). Os valores variaram de 1,029 e 0,729 gramas para os tratamentos com 0,0 mg/L de Al³⁺ e com 150 mg/L de Al³⁺, respectivamente.

No ensaio enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico (Figura 3), nota-se que as médias de liberação de CO₂ para as doses com 0,0, 50 e 100 mg/L de Al³⁺ foi bastante próxima ao longo das horas, indicando que essa concentração atuou com uma possível proteção.

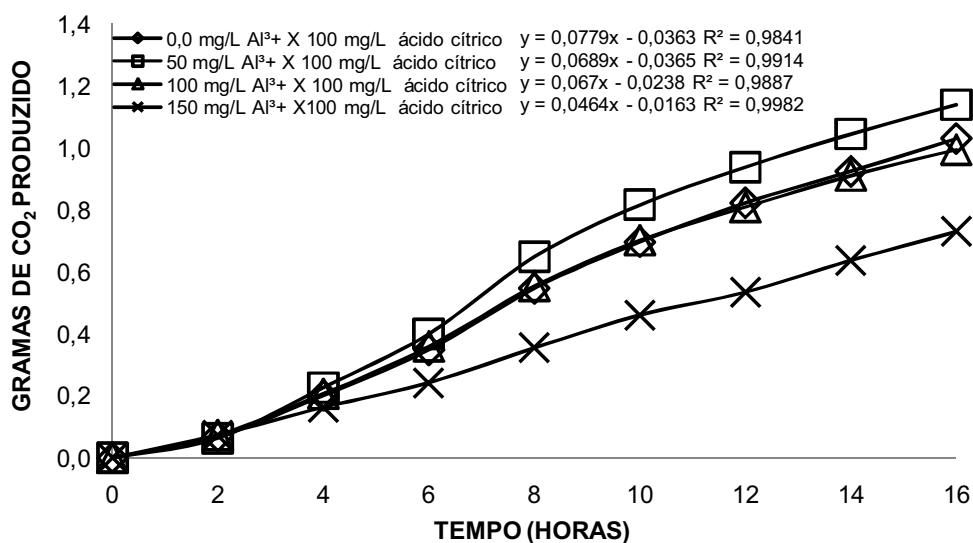


Figura 2: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO₂ da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.

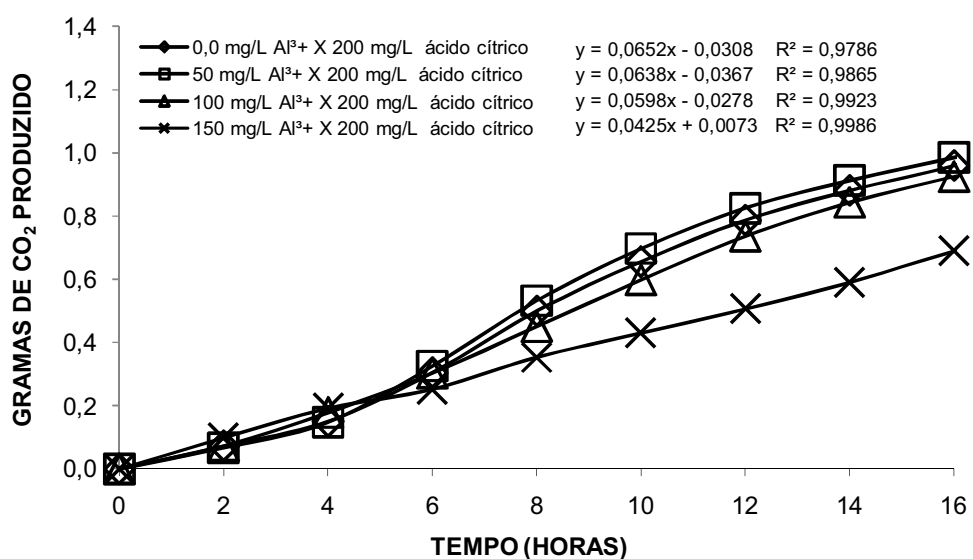


Figura 3: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO₂ da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico

No ensaio enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico (Figura 4), foram liberados 1,140 e 1,206 gramas para os tratamentos com 0,0 mg/L Al³⁺ e com 150

mg/L Al^{3+} , respectivamente. A média de CO_2 desprendido ao longo das horas foi maior comparando ao ensaio controle (Figura 1) e aos demais contendo ácido cítrico (Figuras 2 e 3). Outrossim, os gramas liberados de CO_2 entre os tratamentos do ensaio em questão foram mais próximos em relação aos ensaios anteriores. Isto sugere que o ácido cítrico minimizou o efeito estressante do Al^{3+} ao se complexar com o mesmo.

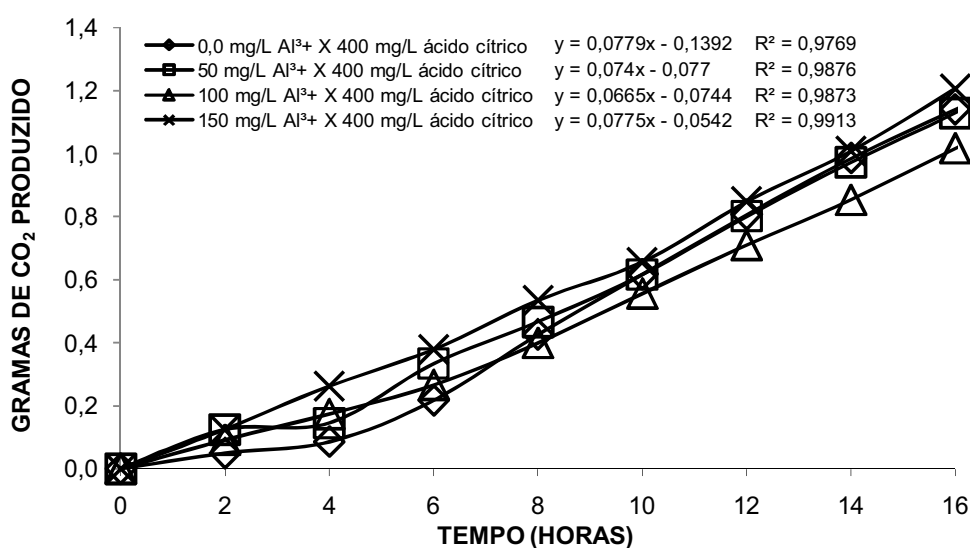


Figura 4: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.

5.1.3 – Ensaio com alumínio X doses de magnésio

Os ensaios enriquecidos com 50 e 100 mg/L de Mg^{2+} (Figuras 5 e 6) evidenciaram o efeito protetor desse elemento sobre a taxa de liberação de CO_2 da levedura, ao se comparar com ensaio controle (Figura 1). A adição de magnésio demonstra que, mesmo em situação de estresse, houve o crescimento da produção de CO_2 em praticamente todos os tratamentos (exceto o de 50 mg/L Al^{3+}).

Walker et al. (2003), Chun-Keng, Feng-Wu & Li-Jia (2003) relataram que uma maior quantidade de magnésio acessível às células de levedura promoveram

aumento da conversão de carboidratos em álcool e proporcionam, também, a redução do tempo dessa transformação.

Os resultados obtidos também concordaram com Mantelli (2009), que utilizou magnésio em meio contaminado com Al^{3+} e observou o efeito protetor desse íon, ou seja, sua atuação na manutenção do crescimento da biomassa, na diminuição da perda de carboidrato de reserva (trealose) e no aumento da liberação de CO_2 em tratamentos submetidos a diferentes doses de Al^{3+} .

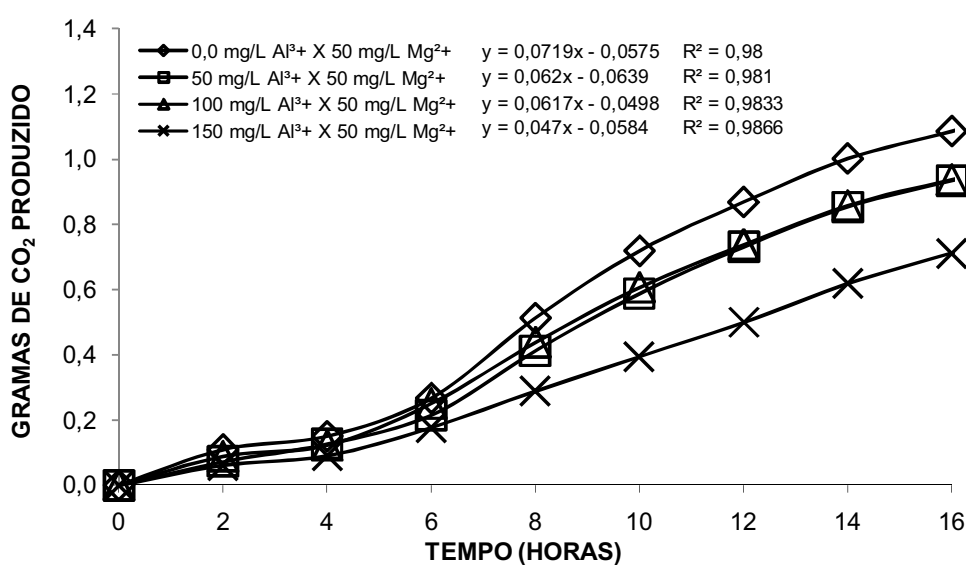


Figura 5: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg^{2+} .

Fazendo uma comparação entre os ensaios com 50 e 100 mg/L de Mg^{2+} (Figuras 5 e 6), observa-se que os tratamentos com 0,0 e 50 mg/L de Al^{3+} (Figura 6) apresentaram menores índices de liberação de CO_2 . Em contrapartida, os tratamentos com 100 e 150 mg/L de Al^{3+} da referida figura apresentaram índices de liberação maiores do que o ensaio com 50 mg/L de Mg^{2+} .

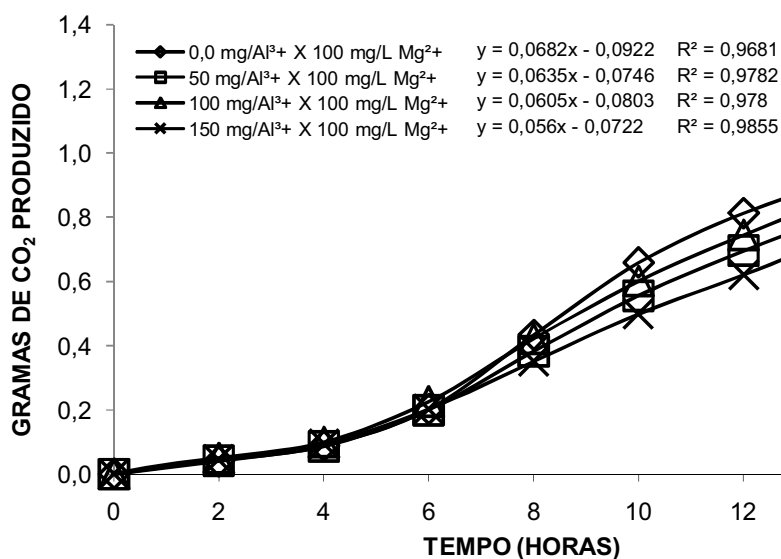


Figura 6: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na produção de CO_2 da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg^{2+} .

5.2 - Índices de crescimento de biomassa

5.2.1 - Ensaio com alumínio

De acordo com Rettori (2000), é necessário um determinado período para haver produção de biomassa, uma vez que o crescimento de microrganismos pode ser dividido em quatro fases distintas. A primeira é a fase “lag” que corresponde o período de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual foram introduzidas. Nesta, o metabolismo das células está ativo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas possam se dividir. Posteriormente, há a fase exponencial, cujo crescimento do número de células aumenta exponencialmente com o tempo. A próxima fase é a estacionária, na qual o número de células viáveis se mantém constante, isto é, a quantidade de células que nascem e morrem é igual. A última fase é a de morte, pois as condições do meio tornam-se cada vez mais impróprias para as células sobreviverem, sendo o número de células inviáveis maiores que as viáveis.

No ensaio controle, onde se analisou o crescimento de biomassa (Figura 7),

verificou-se que à medida que as concentrações de Al^{3+} aumentaram houve uma diminuição no crescimento da biomassa microbiana. Esses resultados condizem com os relatados por Aranha (2002), que sugere a possibilidade de redução do crescimento da biomassa estar relacionada à inibição causada pelo íon Al^{3+} em etapas da glicólise. Da mesma forma, os índices encontrados concordam com Basso (2006), o qual alega que concentrações de Al^{3+} acima de 130 mg L^{-1} normalmente são associadas à baixa viabilidade celular da levedura. Assim, o índice de crescimento de biomassa para os tratamentos com 0,0 e 150 mg/L de Al^{3+} foi de 1,488 e 0,096 gramas, respectivamente.

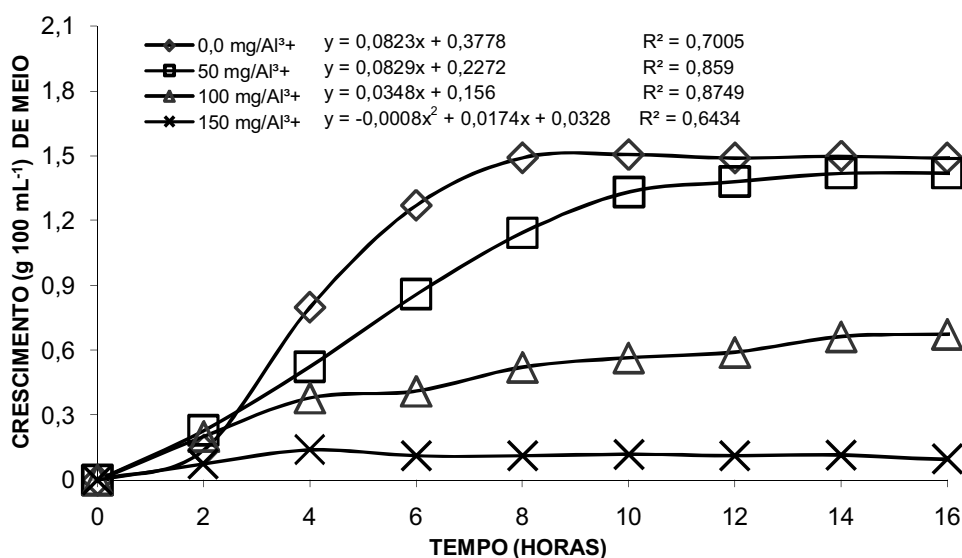


Figura 7: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

5.2.2 - Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

No ensaio enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico (Figura 8), em sua fase exponencial de crescimento (segunda hora), observou-se que o tratamento com 50 mg/L de Al^{3+} possibilitou um crescimento momentâneo da biomassa em relação aos

demais tratamentos, uma vez que o Al^{3+} nessa concentração gerou um estímulo às leveduras.

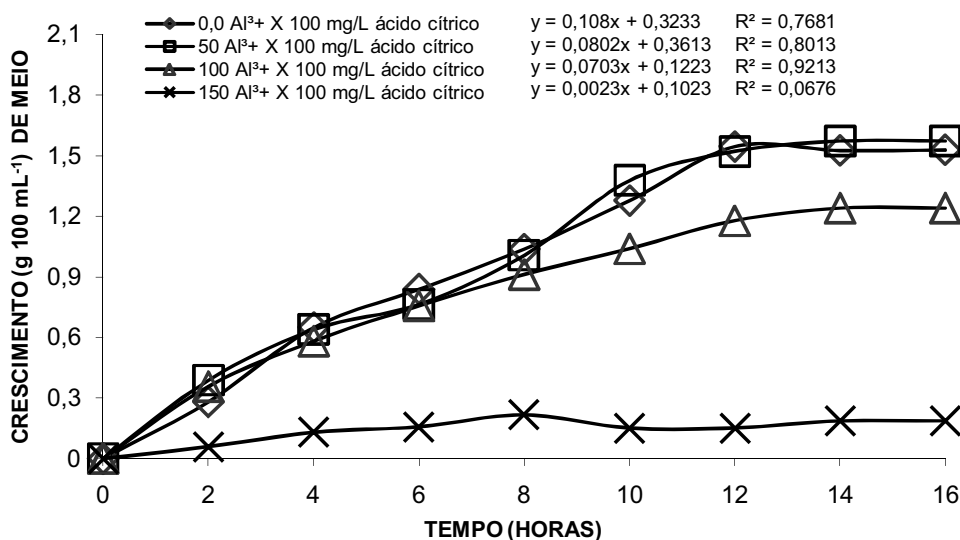


Figura 8: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.

Já no ensaio acrescido com 200 mg/L de ácido cítrico (Figura 9) todos os tratamentos, exceto o controle, responderam ao aumento da dose desse elemento com crescimento de biomassa. A diminuição da distância de crescimento da biomassa entre os tratamentos (50 e 100 mg/L Al^{3+}) ao longo das horas foi bastante evidente, indicando o efeito protetor do ácido cítrico. Vale ressaltar que nessa dose a fase de crescimento exponencial durou mais tempo, saltando de 8 horas para 10 horas.

Finalmente no ensaio com maior concentração de ácido cítrico (Figura 10), os tratamentos responderam de forma positiva ao aumento da dose do elemento protetor, com exceção do tratamento com 50 mg/L Al^{3+} .

MacDiarmid & Gardner (1996) demonstraram o efeito dos ácidos orgânicos cítrico e málico sobre a toxicidade do alumínio em raízes de plantas, e descobriram que o complexo Al-ácido é prejudicial as células. Além disso, a secreção de ácidos orgânicos pelas raízes aponta a possibilidade de um mecanismo de exclusão do Al^{3+} .

nos vegetais.

Realizando uma comparação entre o tratamento com 150 mg/l Al^{3+} do ensaio controle e 400 mg/L de ácido cítrico (Figura 7 e 10), observou-se que o crescimento da biomassa de levedura foi considerável: 0,096 e 0,619 gramas respectivamente, demonstrando assim, o efeito protetor do ácido cítrico.

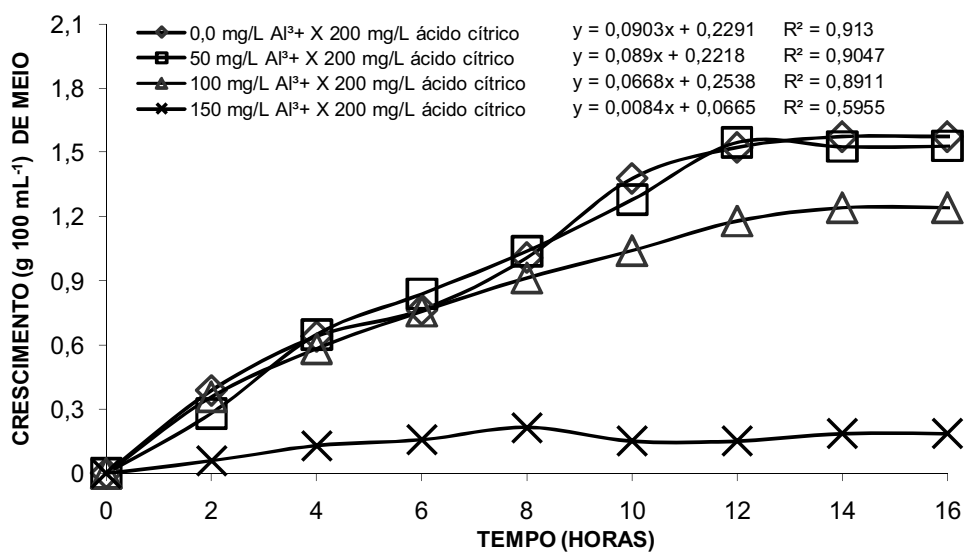


Figura 9: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico

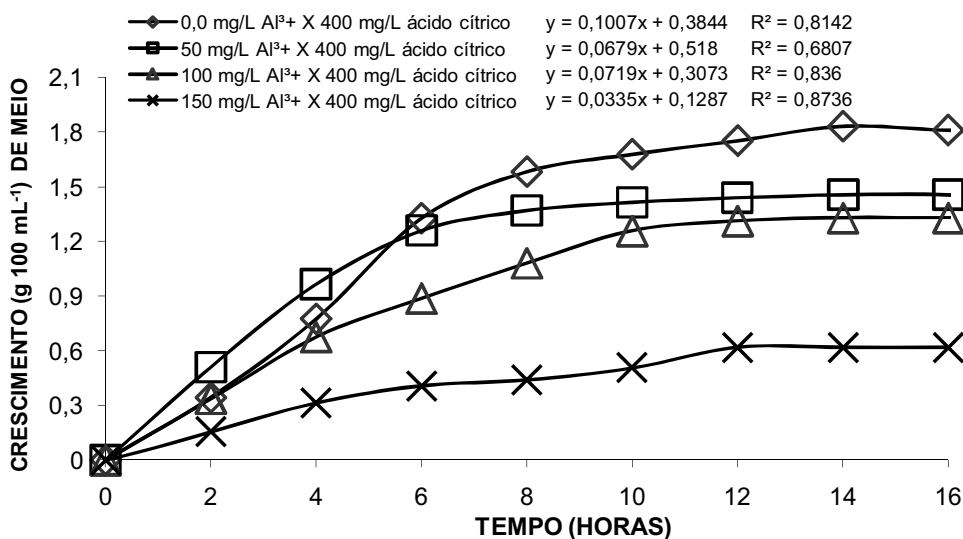


Figura 10: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.

5.2.3 - Ensaio com alumínio X doses de magnésio

Na Figura 11 é possível observar como se comportou a biomassa quanto ao crescimento de leveduras nas diferentes concentrações de alumínio em relação a 50 mg/L de Mg²⁺. Essa indica que o aumento da concentração do meio com magnésio promoveu proteção às leveduras mediante o efeito tóxico do alumínio. Todos os tratamentos permitiram um crescimento de biomassa bastante considerável quando se comparado com o ensaio controle (Figura 7).

Esses resultados corroboram aos de Chun-Keng, Feng-Wu & Li-Jia (2003), os quais relataram que a suplementação da levedura com magnésio promoveu elevação da produção de etanol, ampliação da tolerância ao efeito nocivo ao etanol e aumento da biomassa. Outra consequência foi o prolongamento do crescimento exponencial da biomassa de leveduras, fato esse relatado por Walker et al., (2003).

A Figura 12 apresenta doses de alumínio em função de 100 mg/L de Mg²⁺. Comparando aos tratamentos com 0,0 e 50 mg/L de Al³⁺ (Figura 11) nota-se um crescimento de biomassa menor, exceto o tratamento com 100 mg/L de Al³⁺ que apresentou produção maior. Já a análise do ensaio controle (Figura 7) com todos os

tratamentos (Figura 12) observou-se aumento no desenvolvimento de biomassa, ficando mais evidente na dose com 150 mg/L de Al^{3+} quando comparado ao mesmo tratamento do ensaio controle, apresentando 0,687 e 0,096 gramas respectivamente.

Angeloni (2009), trabalhando com ciclos fermentativos em diferentes cepas de leveduras, observou que a linhagem CAT-1 obteve menor acúmulo de alumínio possivelmente por conter teores significativos de magnésio (180 ppm). Birch & Walker (2000), demonstraram que o magnésio atua como protetor contra estresse em leveduras, tais como os causados por etanol ou elevada temperatura, podendo ainda influenciar diretamente no desempenho fermentativo das cepas. Em consideração ao catabolismo de carboidratos e a fermentação, íons de magnésio são requeridos como cofatores essenciais para as atividades glicolítica e síntese de enzimas alcoogênicas (Walker & Maynard, 1997).

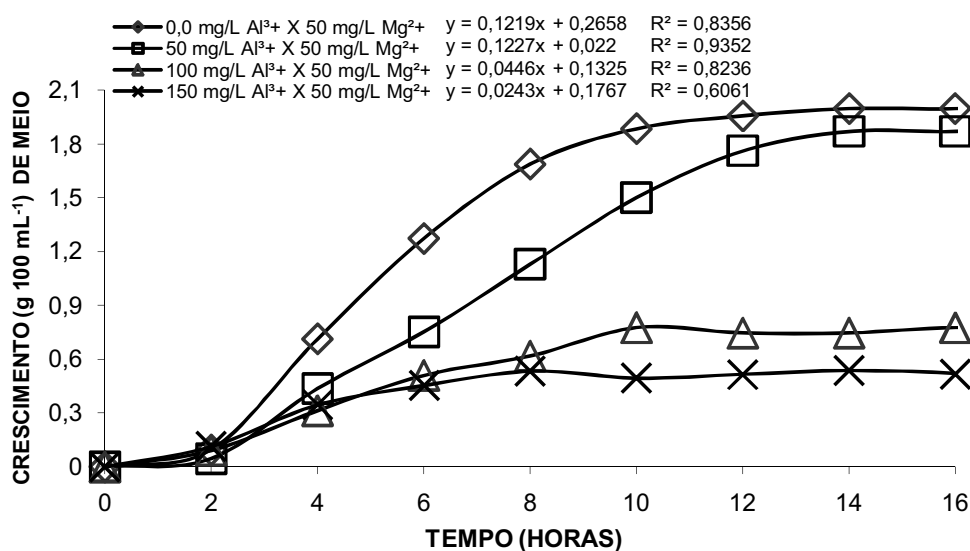


Figura 11: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L Mg^{2+} .

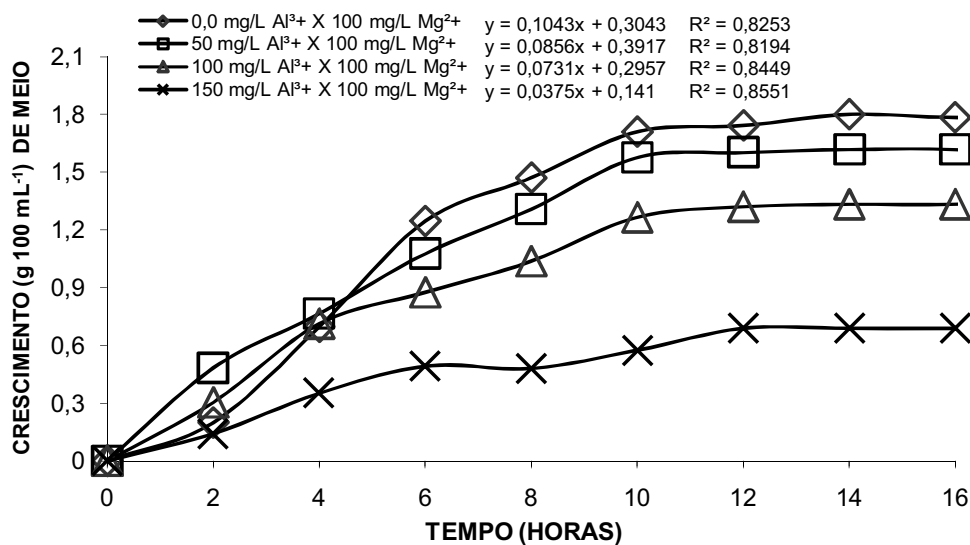


Figura 12: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L Mg²⁺.

Walker et al. (1996), avaliando a influência do cálcio (Ca) e a do magnésio na fermentação alcoólica constataram que ao aumentar a quantidade de magnésio nos meios de fermentação houve um melhor desempenho na produção de álcool pelas leveduras. O magnésio está envolvido na manutenção e preservação da permeabilidade celular e apresenta maior envolvimento na estabilidade dos lipopolissacarídeos presentes no exterior da membrana plasmática microbiana (Brock, 1962). Assim, de acordo com Petrov & Okorokov (1990), como os íons Mg⁺² diminuem a permeabilidade da membrana celular aos cátions, o efeito tóxico do alumínio é amenizado com a introdução de magnésio no meio de crescimento das leveduras.

5.3 - Análise de regressão

5.3.1 – Viabilidade

5.3.1.1 - Ensaio com alumínio

Nas Figuras 13 a 18 é possível observar índices de viabilidade apresentados pelas leveduras frente às diferentes interações alumínio X ácido cítrico e alumínio X magnésio. Praticamente em todos os tratamentos pode se observar os elevados valores do coeficiente de determinação (R^2) que demonstram o perfeito ajuste das variáveis estudadas ao modelo matemático empregado. No ensaio controle (Figura 13), estão apresentadas as equações de regressão e os valores de R^2 para diferentes tratamentos, sendo possível observar que houve uma correlação negativa entre os índices de alumínio e viabilidade, indicando que quanto maior a dose do metal, menor a viabilidade da cepa.

No Apêndice C encontram-se os valores que originaram as Figuras de 13 a 16.

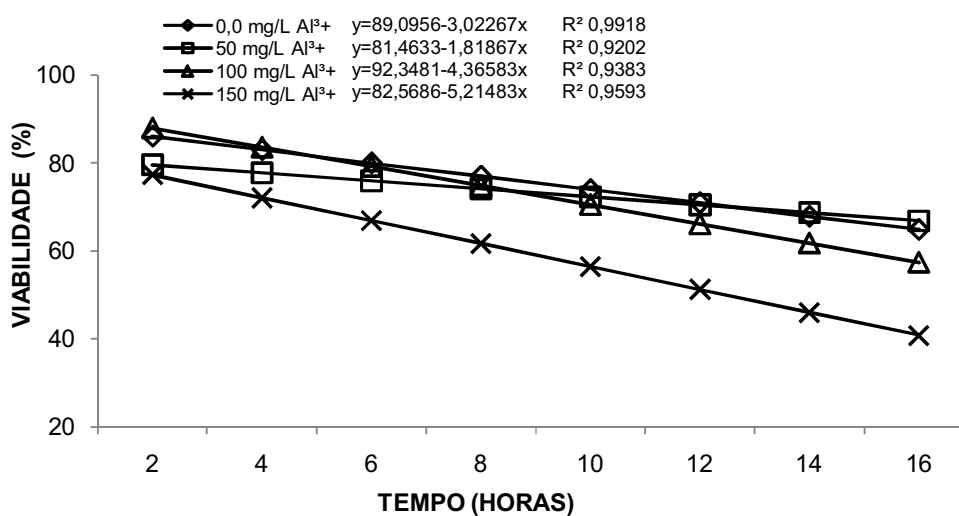


Figura 13: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

5.3.1.2 - Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

Os valores de R^2 oscilaram entre 0,71 e 0,95 indicando que as equações obtiveram um bom ajuste em relação às variáveis estudadas, com exceção apenas

da dose com 150 mg/L Al^{3+} X 400 mg/L de ácido cítrico (Figura 15), na qual nenhum modelo matemático proposto conseguiu explicar os dados obtidos.

Relacionando os diferentes tratamentos de Al^{3+} X ácido cítrico (Figuras 14,15 e 16) com o ensaio controle (Figura 13) foi possível observar que a viabilidade inicial foi menor em todos ensaios. Por outro lado, a porcentagem de leveduras viáveis ao longo do tempo foi maior, destacando principalmente o tratamento com 150 mg/L Al^{3+} (Figura 13) que possibilitou uma taxa entre 77 e 40%. Por sua vez a mesma dose de Al^{3+} acrescida com 400 mg/L de ácido cítrico (Figura 16) alcançou índices de 65 a 55%, indicando o efeito protetor desse composto orgânico, sobre a ação tóxica do alumínio.

Uma comparação entre as diferentes doses de ácido cítrico (Figuras 14,15 e 16) demonstrou que de 400 mg/L é mais eficiente na manutenção da viabilidade das leveduras ao longo do tempo.

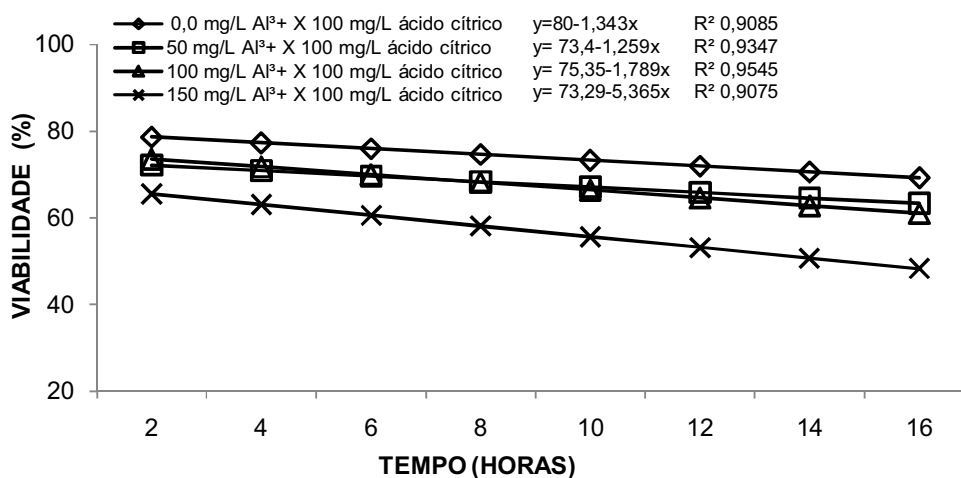


Figura 14: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.

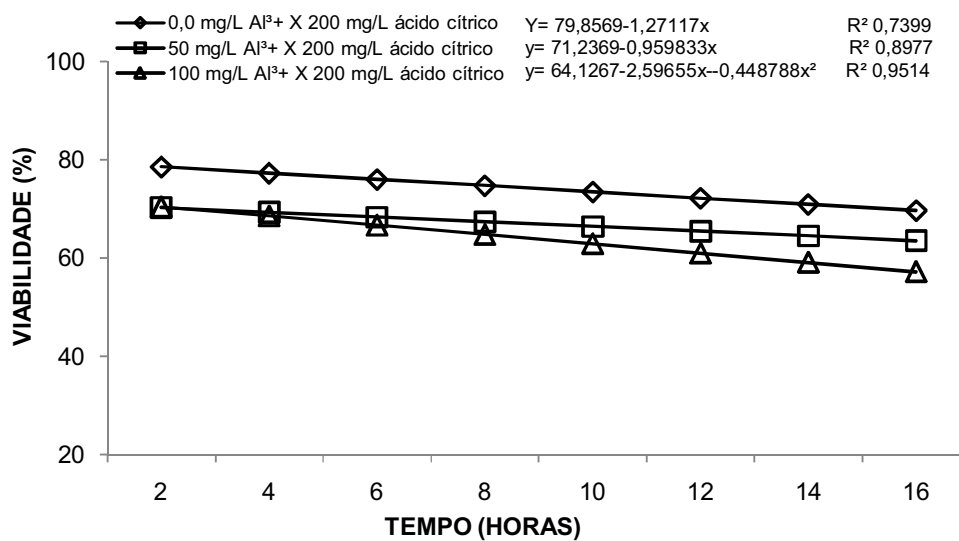


Figura 15: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico.

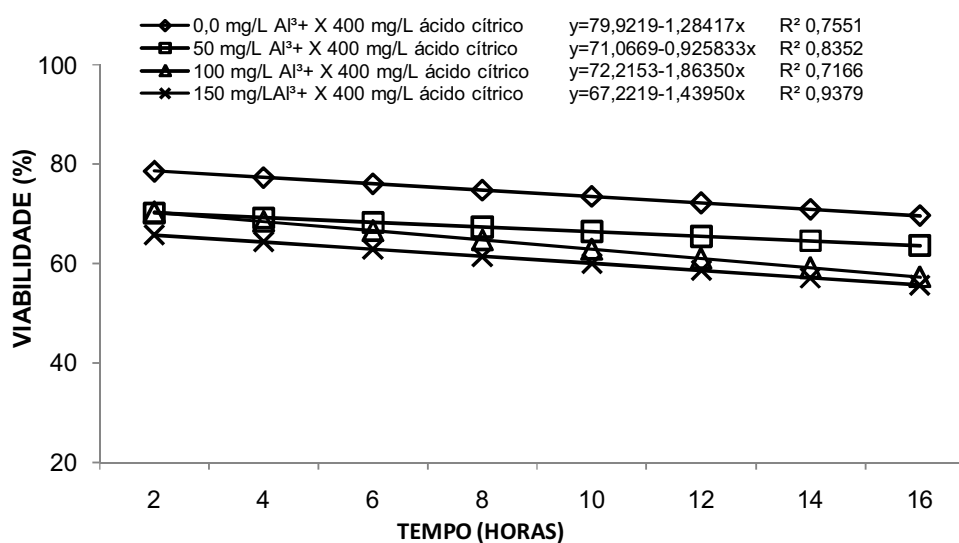


Figura 16: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.

5.3.1.3 - Ensaio com alumínio X doses de magnésio

Os valores de R^2 oscilaram entre 0,81 e 0,97, indicando que as equações apresentaram um bom ajuste em relação às variáveis estudadas. Comparando os tratamentos com 50 e 100 mg/L de Mg^{2+} (Figuras 17 e 18) com o ensaio controle (Figura 13), observou-se o mesmo fato ocorrido nos ensaios com diferentes doses de citrato: a viabilidade inicial ficou abaixo do ensaio controle, porém, a viabilidade final, em grande parte dos tratamentos foi superior. É possível verificar este fato ao analisar as doses com 150 mg/L Al^{3+} acrescida de 50 e 100 mg/L de Mg^{2+} , cujas viabilidades finais foram 57 e 55%, respectivamente.

No apêndice D encontram-se os valores que originaram as Figuras de 17 e 18.

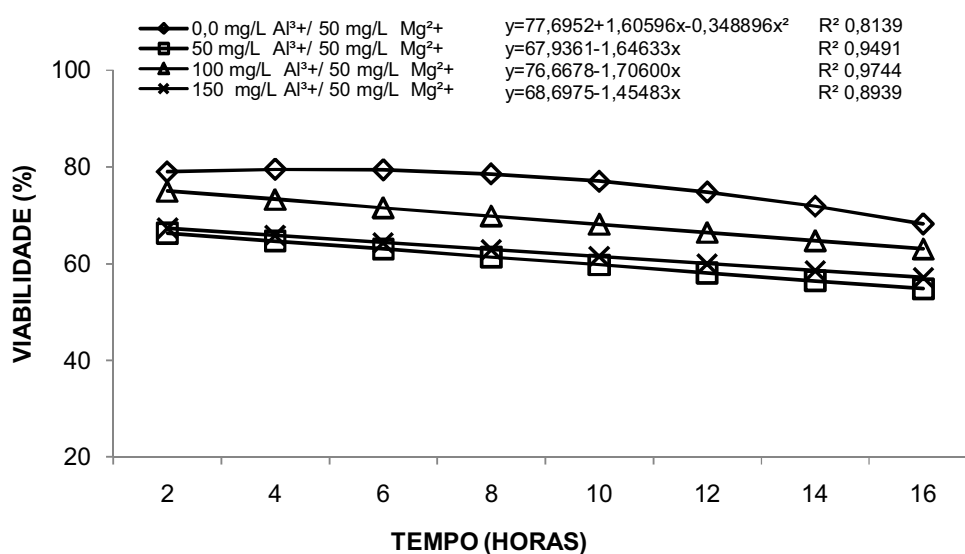


Figura 17: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg^{2+} .

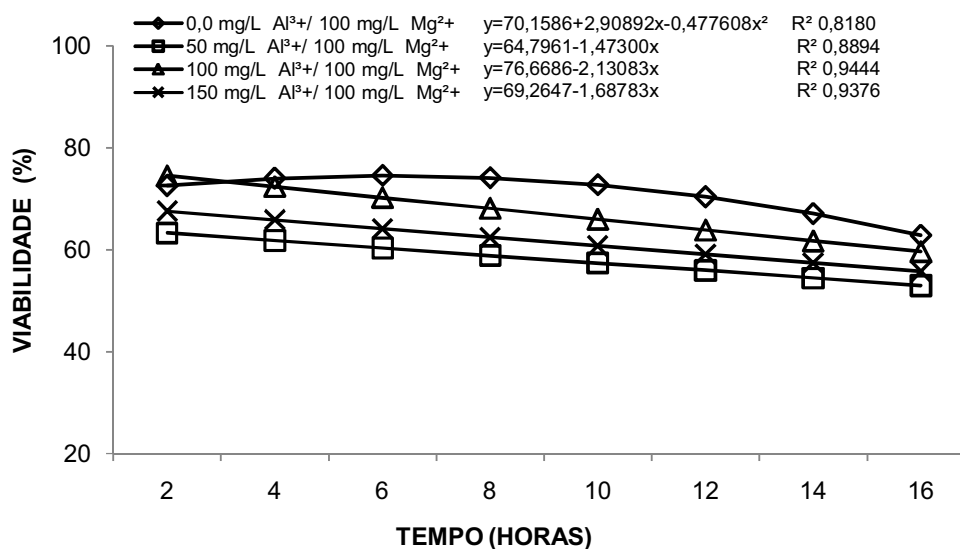


Figura 18: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg²⁺.

5.3.2 – Brotamento

5.3.2.1 - Ensaio com alumínio

Nas Figuras de número 19 a 24 é possível observar índices de brotamento apresentado pelas leveduras frente às diferentes interações alumínio X ácido cítrico e alumínio X magnésio.

No apêndice E encontram-se os valores que originaram as Figuras de 19 a 22.

No ensaio controle (Figura 19), observa-se que a dose com 100 mg/L Al³⁺ possibilitou, inicialmente, um brotamento superior ao da concentração com 150 mg/L Al³⁺, porém, a partir da décima hora, esse índice decaiu, apresentando as menores taxas para desse ensaio. Nenhum modelo matemático fornecido pelo pacote estatístico conseguiu explicar os dados obtidos em laboratório, para o tratamento 150 mg/L de Al³⁺.

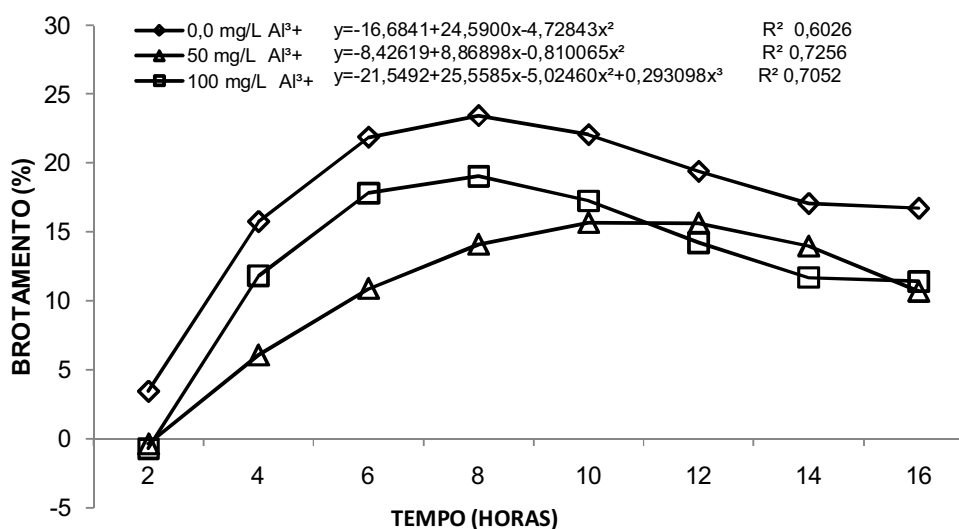


Figura 19: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

5.3.2.2 - Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

Na avaliação da influência do alumínio no brotamento da levedura, com exceção da dose com 150 mg/L Al³⁺ acrescida de 400 mg/L de ácido cítrico (Figura 22), nenhum modelo matemático fornecido pelo pacote estatístico conseguiu explicar os dados obtidos para esta variável. Os valores de R² oscilaram entre 0,65 e 0,92, indicando que as equações apresentaram um bom ajuste em relação às variáveis estudadas.

Em todos os ensaios com diferentes doses de ácido cítrico (100, 200 e 400 mg/L) em função de variadas concentrações de alumínio (0,0, 50, 100 e 150 mg/L), as porcentagens de brotamento foram superiores quando comparadas ao ensaio controle, demonstrando o efeito protetor desse ácido.

Uma comparação entre as distintas doses de ácido cítrico revela que o tratamento com 200 mg/L de ácido cítrico apresentou o melhor índice de brotamento (Figura 21).

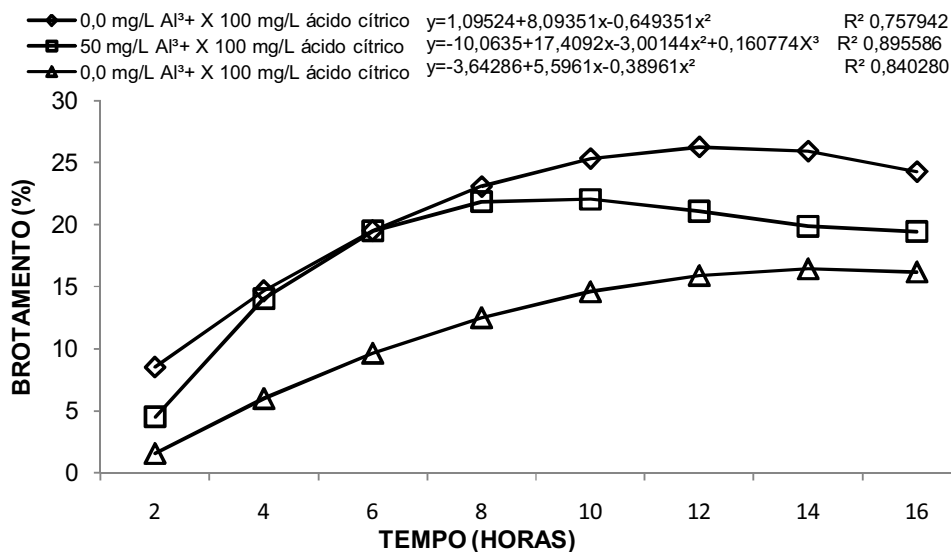


Figura 20: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de ácido cítrico.

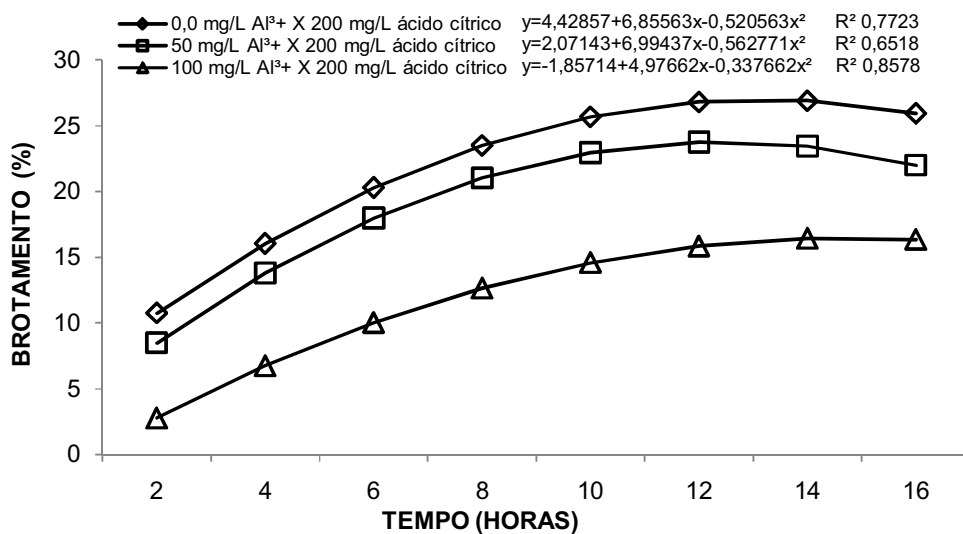


Figura 21: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 200 mg/L de ácido cítrico.

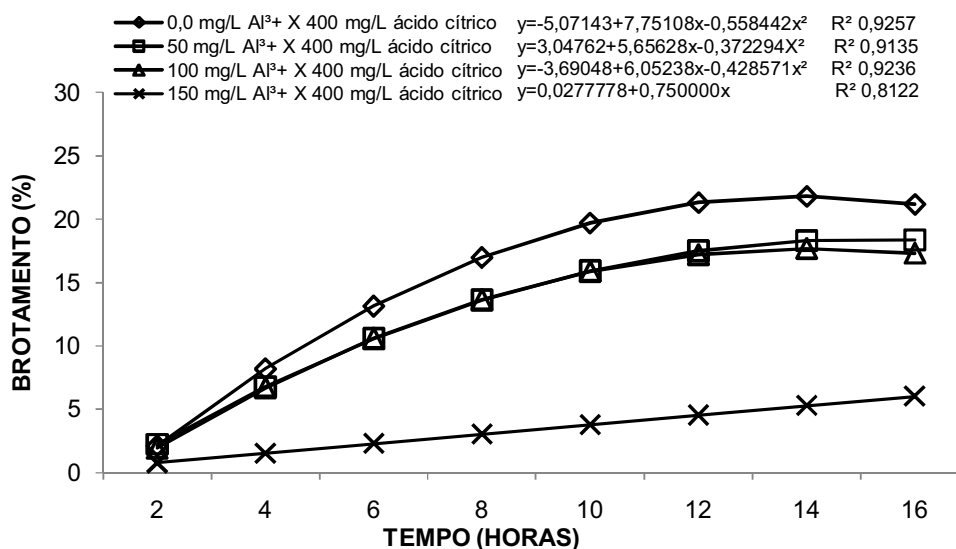


Figura 22: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 400 mg/L de ácido cítrico.

5.3.2.3 - Ensaio com alumínio X doses de magnésio

A avaliação da influência do Al³⁺ no brotamento da levedura, acrescida de 50 e 100 mg/L de Mg²⁺, para o tratamento 150 mg/L Al³⁺ (Figura 23 e 24), nenhum modelo matemático conseguiu explicar os dados obtidos para esta variável.

Os valores de R², por sua vez, oscilaram entre 0,72 e 0,92, indicando que as equações apresentaram um bom ajuste em relação às variáveis estudadas. No apêndice F encontram-se os valores que originaram as Figuras 23 e 24.

Para os ensaios com diferentes doses de magnésio (50 e 100 mg/L) em função de diferentes doses de Al³⁺ (0,0, 50, 100 e 150 mg/L), as porcentagens de brotamento foram superiores quando comparadas ao ensaio controle, demonstrando assim, o efeito protetor desse elemento.

Uma comparação entre as diferentes doses de magnésio revela que a concentração com 50 mg/L Mg²⁺ apresentou o melhor índice de brotamento (Figura 23).

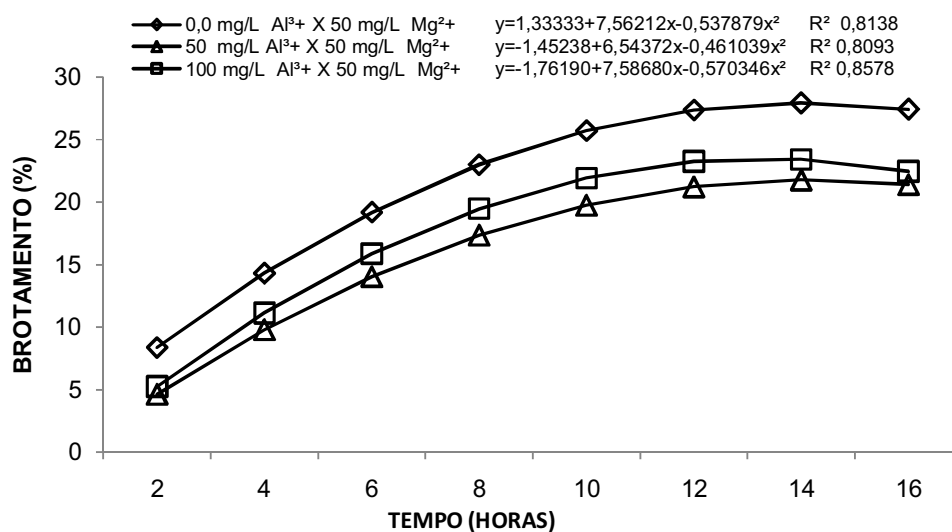


Figura 23: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 50 mg/L de Mg²⁺.

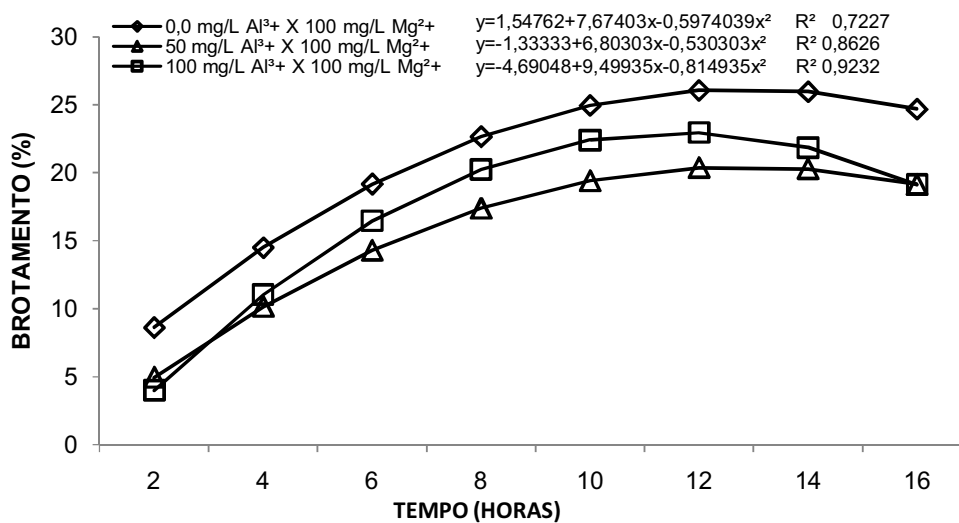


Figura 24: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED, enriquecido com 100 mg/L de Mg²⁺.

6 – CONCLUSÃO

- O alumínio afetou o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 notadamente nas fases log e estacionária;

- Em concentração igual ou superior a 50 mg/L o alumínio apresentou toxicidade no crescimento, viabilidade e brotamento das leveduras fermentadoras em meio sintético;

- O ácido cítrico e o magnésio promoveram efeito protetor sobre a levedura *S. cerevisiae* PE-2 em meio YED em relação ao efeito deletério do alumínio, sendo as doses de 400 mg/L de ácido cítrico e 100 mg/L de magnésio as que mostraram maior eficiência. A levedura sofreu um aumento de estresse proporcionalmente à elevação na concentração de alumínio, refletindo de forma negativa no crescimento, brotamento e viabilidade.

- O ácido cítrico e o magnésio apresentaram uma discreta toxicidade sobre a levedura, ocasionado pela redução de viabilidade no início dos ensaios. Apesar disso, quando observados os tratamentos contaminados com alumínio, foi notado claramente seu efeito protetor, minimizando os efeitos deletérios do metal.

7 – REFERÊNCIAS

ADRIANO, D.C. Cadmium. In: ADRIANO, C.C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: **Springer-Verlag**, 1986. cap.4, p.105-155.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Efeitos tóxicos do alumínio na fermentação do caldo com fermento TA. In: **Fermentec: Relatório de pesquisa**. Fermentec: Piracicaba, 1990, p. 38-44.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Estudos sobre a toxidez do alumínio. In: **Fermentec: Relatório de pesquisa em fisiologia e bioquímica de leveduras**. Fermentec: Piracicaba, 1988, p. 20-35.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO, E. A.; BASSO, L. C.; GALLO, C. R. **Processos de fermentação alcoólica**: seu controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC, 1989. 145 p.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005, 448 p.

ANGELONI, L.H.P. **Bioacúmulo de alumínio e seus efeitos tóxicos na fermentação alcoólica em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 125 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

ARANHA, D.A.D. **Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

BALSADI, O.V. Mercado de trabalho assalariado na cultura da cana-de-açúcar no Brasil no período 1992- 2004. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 2, fev. 2007, p.38-54.

BARBIER-BRYGOO, H.; VINAUGER, M.; COLCOMBET, J.; EPHRITIKHINE, G., FRACHISSE, J. M., MAUREL, C. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. **Biochimica et Biophysica Acta**, France, v. 1565, p. 199–218. 2000.

BASSO, L. C. **Efeitos do alumínio no crescimento do fermento**. Piracicaba: Fermentec, 1990. 56 p.

BASSO, L.C. Fisiologia e Ecologia Microbiana. In: WORKSHOP – PRODUÇÃO DE ETANOL, I., 2006, Lorena. **Anais...** Lorena: PE, 2006. P. 7.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology Biotechnology**, Greece, v. 44, n. 3, p. 407-415, march. 2006.

BIRCH, R. M.; CIANI, M.; WALKER, G. M. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeast. **Journal of Wine Research**, London, v. 14, n. 1, p. 3- 15, apr. 2003.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and Ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, jun. 2000.

BROCK, T.D. Effects of magnesium ion deficiency on *Escherichia coli* and possible relation to the mode of action of Novobicion. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 679-682, oct. 1962.

CAMPBELL, A. K. **Intracellular calcium, its universal role as regulator**. New York: EdWiley, 1983, 556 p.

CARVALHO, R.S. **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 74 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

CHUN-KENG, H.; FENG-WU, B.; LI-JIA, A. Enhancing ethanol tolerance of a Selfflocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 25, n. 14, p. 1191-1194, july 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **1º Levantamento da safra 2010/11 de cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_cana_10.pdf. Acesso em: 5 maio 2010.

CRAIG, E. A. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 18, n. 3, p. 239-280, 1985.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Magnesium limitation and its role in the apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Applied and Environmental**

Microbiology, Baltimore, v. 52, n. 5, p. 975- 981, nov. 1986b.

ELIN, R.J. Overview of problems in the assessment of magnesium status. In: ALTURA, B.M.; DURLACH, J.; SEELIG, M.S. **Magnesium in cellular processes and medicine**. New York: EdKarger, 1987. p. 67-76.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: EdAtheneu, 2001, 562 p.

FARIA, F.P.; CARMO, K.A.A.; BELO, E. S.; JUNIOR, N.G.A.; MARIANO-da-SILVA, S. Influencia do Alumínio sobre o Crescimento da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o possível efeito protetor do ácido cítrico. In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 6.; 2009, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG, 2009. p. 6723-6727.

GAZZONI, D.L. **Álcool:** etanol brasileiro. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm>. Acesso em: 26 maio 2008.

GOUVÊA, L. C. **Estudo da compostabilidade do lodo de esgoto e avaliação da distribuição química de metais pesados no decorrer do processo**. 1995. 255 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

GRASCHOPF, A.; STADLER, J. A.; HOELLERER, M.K.; EDER, S.; SIEGHARDTI, M.; KOHLWEIN, S.D. & SCHWEYEN, R.J. The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg²⁺ homeostasis and is subject to Mg²⁺-dependent control of its synthesis and degradation. **Journal of Biology**. Chemistry, v. 276, n. 19, p. 16216–16222, 2001.

HALL, D.O.; HOUSE, J.I.; SCRASE, I. **Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira**. Campinas, São Paulo: Ed. UNICAMP, 2005, 28 p.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C. ; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, abr/jun. 2007.

HAUG, A. R. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Critical Reviews Plant Science**, v. 1, n. 3, p. 345-373, 1984.

HAUG, A.R.; VITORELLO, V. Cellular aspects of aluminum toxicity in plants. In: YAFUI, M.; STRONG, M.J.; OTA, K.; VERITY, M.A. **Mineral and metal neurotoxicology**. New York: CRC Press, 1997. cap. 4, p. 35-41.

HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. **Metals and microorganisms**. New York: EdChapman and Hall, 1989. 424 p.

JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. **Febs Letters**, v. 400, n. 1, p. 51-57, 1997.

JONGBLOED, R. H.; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Effects of aluminum and pH on growth and potassium uptake by 3 ectomycorrhizal fungi in liquid culture. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 140, n. 2, p. 157-165, nov. 1992.

JÚNIOR, J.I.R. *Análises Estatísticas no SAEG*. Viçosa: Ed. UFV, 2001, 301 p.

KERN, A. L.; BONATTO, D.; DIAS, J. F.; YONEMA, M. L. BRENDEL, M.; & HENRIQUES J. A. P. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particule-induced X-ray emission. **Biometals**, v. 18, p. 31-41, 2005.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, New York, v. 46, n. 9, p. 237-260, 1995.

KOSOW, D. P., ROSE, I. A. Activators of Yeast Hexokinase. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 246, p. 2618-2625, 1971.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-77, dec. 1988.

MACDIARMID, C. W.; GARDNER, R. C. Al toxicity in yeast: a role of Mg? **Plant Physiology**, New Zealand, v. 112, p. 1101-1109. 1996.

MACDIARMID, C. W.; GARDNER, R.C. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. **Journal of Biological Chemistry**, New Zealand, v. 273, n. 3, p. 1727-1732, jan. 1998.

MAGER, W. H.; DEKRUIJFF, A. J. J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 506-531, sept. 1995.

MANTELLI, M.; FARIA, F.P.;Mariano-da-Silva, S. Influência do alumínio sobre o crescimento e fisiologia da levedura *saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o possível efeito protetor do magnésio. In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E

EXTENSÃO, 6.; 2009, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG, 2009. p. 980-989.

MARIANO-da-SILVA, S. **Efeitos do cádmio sobre a fermentação alcoólica e o uso da vinhaça para atenuar a sua ação tóxica**. 2001. 156 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

MARIANO-DA-SILVA, S. **Roteiro de aulas práticas**. Universidade Federal de Goiás, Campus Jatobá. Jataí, Goiás, p. 52, 2007.

MARIANO-da-SILVA, S.; OLIVEIRA, S. L.; LEITE, C. A. O.; PRADO, R. S.; FARIA, F. P.; OLIVEIRA, C. N.; MARIANO-da-SILVA, F. M. S.; Effect of pH, dextrose and yeast extract on cadmium toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 295-299, abr.-jun. 2009.

MASSONNEAU, A., LANGLADE, N., LEON, S., SMUTNY, J., VOGT, E., NEUMANN, G., MARTINOIA, E. Metabolic changes associated with cluster Root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. **Planta**, Switzerland, v. 213, n. 4, p. 534–542, aug. 2001.

McDANIEL, W. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. In: SMOLEY, C. K. **Methods for the determination of metals in environmental samples**. ed. CRC Press: Boca Raton, 1992. cap. 3, p. 25-32.

MEERS, J.L.; TEMPEST, D.W. The influence of extracellular products on the behavior of mixed microbial populations in magnesium-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 52, p. 309-317, 1969.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 294-298, mar. 1989.

MIYASAKA, S. C., BUTA, J. G., HOWELL, R. K., FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, Hawaii, v. 96, p. 737–743, Jan. 1991.

MONACO, M.A.S.L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 67 f. – Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

NEVES, M. J.; FRANCOIS, J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 288, n. 3, p. 859-864, dec.1992.

OMORI, T.; KIYOSHI, O.; UMEMOTO, Y.; YUKI, K.; KAJIHARA, Y.; SHIMODA, M.; WADA, H. Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 187-190, 1996.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. Heat shock proteins and molecular chaperones. In: MORIMOTO, R. I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOS, C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. p. 457-489.

PETROV, V. V.; OKOROKOV, L. A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its deenergization. **Yeast**, Chichester, v. 6, n. 4, p. 311-318, july.-aug. 1990.

PIÑEROS, M. A.; MAGALHÃES, J. V.; CARVALHO-ALVES, V. M.; KOCHIAN, L. V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, United States, v. 129, p. 1194-1206, 2002.

PIPER, P. W. Molecular events associated with the acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-355, aug. 1993.

RAO, K. S. J.; EASWARAN, K. R. K. Al-27-NMR studies of aluminum transport across yeast cell membranes. In: **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 175, n. 1-2. Biomedical and Life Sciences, 1997. p. 59-63.

REES, E. M. R.; STEWART, G. G. The effects of increased magnesium and Calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 103, p. 287-291, 1997.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*, **Química Nova**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 257-261, 2000.

RUIS, H.; SCHÜLLER, C. Stress signaling in yeast. **BioEssays**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 959-965, nov. 1995.

SANTOS, A. B.; Fageria, N. K.; Zimmermann, F. J. P. Atributos químicos do solo afetado pelo manejo da água e do fertilizante potássico na cultura de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p.12-16, marc. 2002.

SILVA, F. C. Uso agrônômico do lodo de esgoto: efeitos em fertilidade do solo e qualidade da cana-de-açúcar. 1995. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 1995.

STOLL, A.; DUNCAN, J. R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnology Letters**, South Africa, v. 18, n. 10, p. 1209-1212, 1996.

VEJA. São Paulo: Ed. Abril, ed. 2052, 19 mar. 2008.

WALKER, G. M.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HAMBURGER, K.; KRAMHOFT, B. Magnesium - induced mitochondrial polymorphism and changes in respiratory metabolism in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 47, n. 4, p. 205-214, 1982.

WALKER, G. M.; MAYNARD, A. I. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, n. 1, p. 1-3, jan. 1997.

WALKER, G. M.; SMITH, G.; HALL, N. The importance of metal ions in ethanolic fermentations. In: Bryce, J.; Stewart, G. G. **Proceedings of the 1st Worldwide Conference on Distilled Spirits**. London: Institute of Brewing, 2003. cap. 16, p.13 - 119.

WALKER, G.M. The role of magnesium in the yeast stress response. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YEAST, 9.; 1996, Sydney. **Abstracts...** Sydney: Abstract Book, 1996. p. 62.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: EdJohn Wiley & Sons, 1998. 362 p.

WATSON, K. Microbial stress proteins. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 31, p. 83-223, 1990.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast. Stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 209-217, oct. 1990.

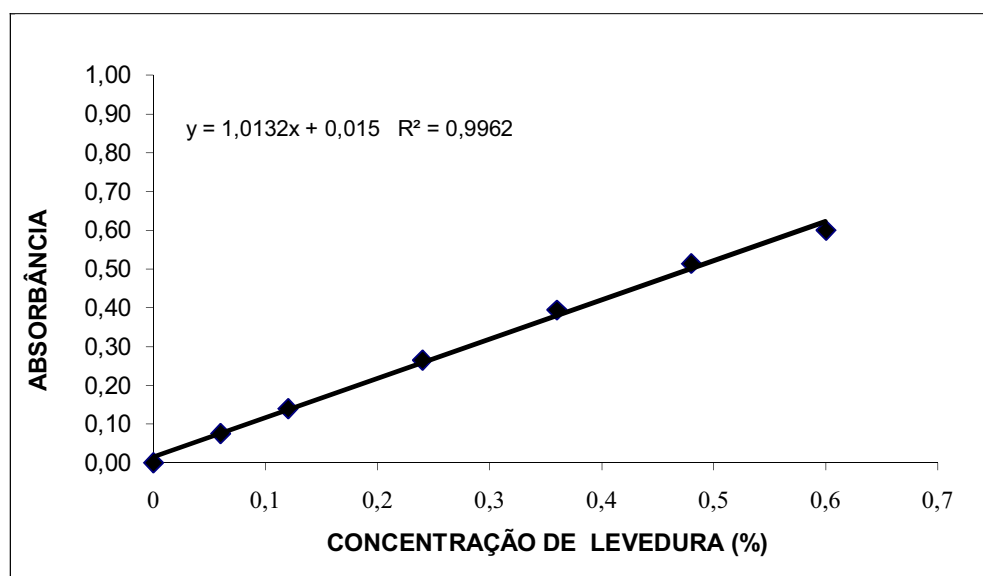
WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: EdChapman & Hall, 1994. 368 p.

ZEL, J.; SVETEK, J.; CRNE, H. *et al.* Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Physiology Plantarum**, Slovenia, v. 89, n. 3, p.172-176, 1993.

8 - APÊNDICES

Apêndice A

Reta padrão



Valores das leituras de absorbância e transmitância convertidos em valores de concentrações de biomassa ($\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de meio) através da reta padrão estabelecida com *S. cerevisiae* PE-2.

Apêndice B

Análises de variância – Viabilidade

Ensaio com alumínio

Tabela 2: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	548.1908	548.1908	853.97	0.0000
Independente	7	4.493529	0.6419327		

Tabela 3: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	198.4529	198.4529	80.73	0.0000
Independente	7	17.20789	2.458270		

Tabela 4: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	1143.630	1143.630	106.37	0.0000
Independente	7	75.25985	10.75141		

Tabela 5: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al³⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	1631.669	1631.669	165.07	0.0000
Independente	7	69.19222	9.884603		

Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

Tabela 6: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	108.1921	108.1921	69.54	0.0001
Independente	7	10.89094	1.555849		

Tabela 7: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	95.05451	95.05451	100.29	0.0000
Independente	7	6.634493	0.9477848		

Tabela 8: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	192.1386	192.1386	146.85	0.0000
Independente	7	9.158585	1.308369		

Tabela 9: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	364.6228	364.6228	38.86	0.0004
Independente	7	65.67255	9.381793		

Tabela 10: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	96.95188	96.95188	19.92	0.0029
Independente	7	34.07241	4.867487		

Tabela 11: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	55.27680	55.27680	61.47	0.0001
Independente	7	6.294554	0.8992220		

Tabela 12: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	214.6285	214.6285	19.73	0.0030
Independente	7	76.14405	10.87772		

Tabela 13: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	98.94504	98.94504	21.59	0.0024
Independente	7	32.07925	4.582750		

Tabela 14: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	51.43004	51.43004	35.50	0.0006
Independente	7	10.14131	1.448759		

Tabela 15: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	208.3579	208.3579	17.70	0.0040
Independente	7	82.41462	11.77352		

Tabela 16: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	124.3296	124.3296	105.74	0.0000
Independente	7	8.230807	1.175830		

Ensaio com alumínio X doses de magnésio

Tabela 17: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	250.2337	125.1169	13.12	0.0064
Independente	6	57.23328	9.538881		

Tabela 18: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	162.6248	162.6248	130.41	0.0000
Independente	7	8.729416	1.247059		

Tabela 19: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	174.6262	174.6262	266.00	0.0000
Independente	7	4.595396	0.6564851		

Tabela 20: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	126.9924	126.9924	58.98	0.0001
Independente	7	15.07160	2.153085		

Tabela 21: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	279.4364	139.7182	13.49	0.0060
Independente	6	62.16445	10.36074		

Tabela 22: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	130.1837	130.1837	56.32	0.0001
Independente	7	16.18115	2.311593		

Tabela 23: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	272.4270	272.4270	118.90	0.0000
Independente	7	16.03918	2.291312		

Tabela 24: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/l Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺, na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	170.9269	170.9269	105.35	0.0000
Independente	7	11.35714	1.622449		

Análise de variância - Brotamento

Ensaio com alumínio

Tabela 25: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/l Al³⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	3	285.4758	95.15860	2.53	0.1713
Independente	5	188.2264	37.64529		

Tabela 26: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/l Al³⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	3	253.3514	84.45046	14.30	0.0069
Independente	5	29.53752	5.907504		

Tabela 27: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/l Al³⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	220.1532	110.0766	15.78	0.0041
Independente	6	41.84675	6.974459		

Ensaio com alumínio X doses de ácido cítrico

Tabela 28: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	283.4701	141.7351	9.39	0.0142
Independente	6	90.52987	15.08831		

Tabela 29: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	3	253.3514	84.45046	14.30	0.0069
Independente	5	29.53752	5.907504		

Tabela 30: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al³⁺ e 100 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	220.1532	110.0766	15.78	0.0041
Independente	6	41.84675	6.974459		

Tabela 31: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	246.8136	123.4068	10.18	0.0118
Independente	6	72.74199	12.12367		

Tabela 32: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	209.6136	104.8068	5.62	0.0422
Independente	6	111.9420	18.65700		

Tabela 33: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al³⁺ e 200 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	188.7169	94.35844	18.10	0.0029
Independente	6	31.28312	5.213853		

Tabela 34: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	377.7186	188.8593	37.42	0.0004
Independente	6	30.28139	5.046898		

Tabela 35: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	266.9564	133.4782	31.70	0.0006
Independente	6	25.26580	4.210967		

Tabela 36: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	243.8381	121.9190	36.28	0.0004
Independente	6	20.16190	3.360317		

Tabela 37: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 150 mg/L Al³⁺ e 400 mg/L de ácido cítrico no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	1	33.75000	33.75000	30.27	0.0009
Independente	7	7.805556	1.115079		

Ensaio com alumínio X doses de magnésio

Tabela 38: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	375.1253	187.5626	12.00	0.0080
Independente	6	93.76364	15.62727		

Tabela 39: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	289.7342	144.8671	12.73	0.0069
Independente	6	68.26580	11.37763		

Tabela 40: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al³⁺ e 50 mg/L de Mg²⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	313.0075	156.5038	18.10	0.0029
Independente	6	51.88139	8.646898		

Tabela 41: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 0,0 mg/L Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	283.3221	141.6610	7.82	0.0213
Independente	6	108.6779	18.11299		

Tabela 42: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 50 mg/L Al³⁺ e 100 mg/L de Mg²⁺ no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	221.6162	110.8081	18.85	0.0026
Independente	6	35.27273	5.878788		

Tabela 43: Análise de variância do efeito tempo sobre o tratamento com 100 mg/L Al^{3+} e 100 mg/L de Mg^{2+} no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 cultivada em meio YED.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Probab.
Devido a Regressão	2	313.8987	156.9494	36.08	0.0005
Independente	6	26.10130	4.350216		

Apêndice C

Tabela 44: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2, enriquecido com diferentes doses (100 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L) de ácido cítrico, cultivada em meio YED.

Tratamentos / Horas	2	4	6	8	10	12	14	16	R ²
0,0 mg/L Al^{3+}	86,07	83,05	80,03	77,00	73,98	70,96	67,94	64,91	0,99
50 mg/L Al^{3+}	79,64	77,83	76,01	74,19	72,37	70,55	68,73	66,91	0,92
100 mg/L Al^{3+}	87,98	83,62	79,25	74,88	70,52	66,15	61,79	57,42	0,93
150 mg/L Al^{3+}	77,35	72,14	66,92	61,71	56,49	51,28	46,06	40,85	0,95
0,0 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L ácido cítrico	78,67	77,32	75,98	74,64	73,29	71,95	70,61	69,27	0,9
50 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L ácido cítrico	72,15	70,89	69,63	68,37	67,11	65,85	64,60	63,34	0,93
100 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L ácido cítrico	73,57	71,78	69,99	68,20	66,41	64,62	62,83	61,04	0,95
150 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L ácido cítrico	65,51	63,05	60,58	58,12	55,65	53,19	50,72	48,26	0,9
0,0 mg/L Al^{3+} X 200 mg/L ácido cítrico	78,59	77,31	76,04	74,77	73,50	72,23	70,96	69,69	0,73
50 mg/L Al^{3+} X 200 mg/L ácido cítrico	70,28	69,32	68,36	67,40	66,44	65,48	64,52	63,56	0,89
100 mg/L Al^{3+} X 200 mg/L ácido cítrico	70,46	68,57	66,68	64,79	62,90	61,01	59,12	57,22	0,95
150 mg/L Al^{3+} X 200 mg/L ácido cítrico	65,22	62,83	60,44	58,04	55,65	53,26	50,87	48,47	ND
0,0 mg/L Al^{3+} X 400 mg/L ácido cítrico	78,64	77,35	76,07	74,79	73,50	72,22	70,93	69,65	0,77
50 mg/L Al^{3+} X 400 mg/L ácido cítrico	70,14	69,22	68,29	67,36	66,44	65,51	64,59	63,66	0,83
100 mg/L Al^{3+} X 400 mg/L ácido cítrico	70,35	68,49	66,62	64,76	62,90	61,03	59,17	57,31	0,71
150 mg/L Al^{3+} X 400 mg/L ácido cítrico	65,78	64,34	62,90	61,46	60,02	58,58	57,15	55,71	0,93

Apêndice D

Tabela 45: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2, enriquecido com diferentes doses (50 mg/L e 100 mg/L) de Mg^{2+} , cultivada em meio YED.

Treatamentos / Horas	2	4	6	8	10	12	14	16	R^2
0,0 mg/L Al^{3+} X 50 mg/L Mg^{2+}	78,95	79,51	79,37	78,54	77,00	74,77	71,84	68,21	0,81
50 mg/L Al^{3+} X 50 mg/L Mg^{2+}	66,29	64,64	63,00	61,35	59,70	58,06	56,41	54,77	0,94
100 mg/L Al^{3+} X 50 mg/L Mg^{2+}	74,96	73,26	71,55	69,84	68,14	66,43	64,73	63,02	0,97
150 mg/L Al^{3+} X 50 mg/L Mg^{2+}	67,24	65,79	64,33	62,88	61,42	59,97	58,51	57,06	0,89
0,0 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L Mg^{2+}	72,59	74,07	74,59	74,15	72,76	70,42	67,12	62,86	0,81
50 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L Mg^{2+}	63,32	61,85	60,38	58,90	57,43	55,96	54,49	53,01	0,88
100 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L Mg^{2+}	74,54	72,41	70,28	68,15	66,01	63,88	61,75	59,62	0,94
150 mg/L Al^{3+} X 100 mg/L Mg^{2+}	67,58	65,89	64,20	62,51	60,83	59,14	57,45	55,76	0,93

Apêndice E

Tabela 46: Efeito de doses crescentes de Al³⁺ (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2, enriquecido com diferentes doses (100 mg/L, 200 mg/L e 400 mg/L) de ácido cítrico, cultivada em meio YED.

Treatments / Horas	2	4	6	8	10	12	14	16	R ²
0,0 mg/L Al ³⁺	3,45	15,76	21,88	23,43	22,06	19,40	17,07	16,71	0,60
50 mg/L Al ³⁺	-0,37	6,07	10,89	14,09	15,67	15,63	13,96	10,68	0,72
100 mg/L Al ³⁺	-0,72	11,81	17,82	19,05	17,27	14,23	11,69	11,41	0,70
0,0 mg/L Al ³⁺ X 100 mg/L ácido cítrico	8,54	14,68	19,53	23,08	25,33	26,28	25,93	24,28	0,75
50 mg/L Al ³⁺ X 100 mg/L ácido cítrico	4,51	14,04	19,49	21,84	22,04	21,07	19,88	19,43	0,89
100 mg/L Al ³⁺ X 100 mg/L ácido cítrico	1,56	5,99	9,64	12,51	14,60	15,91	16,44	16,19	0,84
0,0 mg/L Al ³⁺ X 200 mg/L ácido cítrico	10,76	16,06	20,31	23,52	25,69	26,82	26,91	25,96	0,77
50 mg/L Al ³⁺ X 200 mg/L ácido cítrico	8,50	13,81	17,99	21,04	22,97	23,78	23,46	22,01	0,65
100 mg/L Al ³⁺ X 200 mg/L ácido cítrico	2,78	6,75	10,03	12,65	14,58	15,85	16,43	16,35	0,85
0,0 mg/L Al ³⁺ X 400 mg/L ácido cítrico	2,12	8,20	13,16	17,00	19,72	21,33	21,82	21,20	0,92
50 mg/L Al ³⁺ X 400 mg/L ácido cítrico	2,24	6,78	10,57	13,62	15,93	17,49	18,30	18,38	0,91
100 mg/L Al ³⁺ X 400 mg/L ácido cítrico	1,93	6,70	10,61	13,66	15,86	17,20	17,68	17,30	0,92
150 mg/L Al ³⁺ X 400 mg/L ácido cítrico	0,78	1,53	2,28	3,03	3,78	4,53	5,28	6,03	0,81

Apêndice F

Tabela 47: Efeito de doses crescentes de Al^{3+} (0, 50, 100 e 150 mg/L) no brotamento da levedura *S. cerevisiae* PE-2, enriquecido com diferentes doses (50 mg/L e 100 mg/L) de Mg^{2+} , cultivada em meio YED.

Tratamentos / Horas	2	4	6	8	10	12	14	16	R^2
0,0 mg/L ³⁺ X 50 mg/L Mg ²⁺	8,36	14,31	19,18	22,98	25,70	27,34	27,91	27,41	0,81
50 mg/L ³⁺ X 50 mg/L Mg ²⁺	4,63	9,79	14,03	17,35	19,74	21,21	21,76	21,39	0,80
100 mg/L ³⁺ X 50 mg/L Mg ²⁺	5,25	11,13	15,87	19,46	21,91	23,23	23,40	22,43	0,85
0,0 mg/L ³⁺ X 100 mg/L Mg ²⁺	8,62	14,51	19,19	22,69	24,98	26,09	25,99	24,71	0,72
50 mg/L ³⁺ X 100 mg/L Mg ²⁺	4,94	10,15	14,30	17,39	19,42	20,39	20,30	19,15	0,86
100 mg/L ³⁺ X 100 mg/L Mg ²⁺	3,99	11,05	16,47	20,27	22,43	22,97	21,87	19,15	0,92

