

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Millena da Silva

**Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo
e do processo em estado sólido**

Florianópolis

2007

Millena da Silva

Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Universidade Federal de Santa Catarina.
Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Dr. Agenor Furigo Junior.
Co-orientador: Dr. Ozair Souza

Florianópolis

2007

TERMO DE APROVAÇÃO

Millena da Silva

Título do trabalho: Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido.

Apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Universidade Federal de Santa Catarina,

Área de concentração: Engenharia Química.

Data da Aprovação: 05 de outubro de 2007.

Componentes da Banca Examinadora

Orientador: Dr. Agenor Furigo Junior Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC Assinatura: _____
Prof ^o Dr. Maurício Moura da Silveira Instituição: Universidade de Caxias do Sul - UCS Assinatura: _____
Prof ^o Dr. Hugo Moreira Soares Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Deus

Cada lágrima, permissão de Deus
Cada sorriso, permissão de Deus
Cada perda é permissão de Deus
Cada conquista é permissão de Deus
Cada luta, permissão de Deus
Cada vitória, permissão de Deus

Rafael

Meu amor maior. Obrigada pela compreensão e pelo carinho em todos os momentos me dando forças para chegar até aqui.

José, Rosina e Deisi

Perdão pelos momentos que passaram, pela filha e irmã ausente que fui neste período...E obrigada pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Prof Dr. Ozair Souza

Obrigado pelo apoio em todos os momentos, pela amizade e principalmente pelo exemplo de vida.

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior,

Pela orientação e conselhos na construção deste trabalho.

Andrea, Bea, Giannini, Micheli, Leslie e Adelini,

Obrigado por estarem sempre por perto e não medirem esforços para me ajudar nos momentos mais críticos deste trabalho. Divido com vocês agora a vitória da finalização deste trabalho.

Carolina Krüger Nunes Lopes

Pela grande amizade, companheirismo e também pelas várias noites que foi meu ombro amigo nos momentos de dificuldades da vida.

Camila, Sabrina, Kelly, Kika e Maiara

Pela amizade e paciência, auxiliando-me com muitos dos resultados e experimentos utilizados neste trabalho.

Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto

Pelo companheirismo estabelecido por compartilhar seu conhecimento. Por ter concedido as larvas e ovos de mosquitos que tanto contribuíram para finalizar este trabalho.

Rogério dos Passos

Pelo apoio e compreensão, permitindo que eu muitas vezes me ausentasse para concluir este trabalho.

Prof. Dr^a Elisabeth Wisbeck

Pelo apoio e ajuda com a elaboração dos gráficos e por compartilhar seu conhecimento.

À todos que comigo trabalham nos Laboratórios de Biotecnologia e nos demais Laboratórios de Ensino,

Pela amizade e compreensão nos momentos em que não pude dar a atenção que esperavam de mim.

Aos membros da banca,

Por aceitarem avaliar este trabalho, contribuindo com suas sugestões.

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), utilizada no controle biológico de várias espécies de mosquitos, vêm sendo empregada na região de Joinville para controlar os mosquitos do gênero *Simulium pertinax* (borrachudos). Estes mosquitos possuem grande incidência na região e causam inúmeros transtornos à população ribeirinha e a economia local, que possui grande potencial turístico. Para potencializar a produção de Bti, faz-se necessário o desenvolvimento de novos processos de produção e tratamentos finais do produto a um custo mais baixo e com impacto ambiental reduzido. Atualmente, os métodos utilizados no processo de produção do bioinseticida envolvem o uso de processo fermentativo submerso em regime descontínuo e, recentemente, foi proposto o uso de fermentação em estado sólido. Neste contexto, este trabalho vem propor um processo alternativo para a produção de esporos e, conseqüentemente do bioinseticida, com fermentação submersa em regime semicontínuo e integração dos processos submerso e sólido. Testaram-se quatro tipos de processo em regime semicontínuo denominados de FSC80, FSC60, FSC40 e FSC20, onde os números representam a porcentagem de corte em cada experimento. Os experimentos foram conduzidos a 30°C em reator Biostat B. Posteriormente ao corte, foram acondicionados em um segundo reator para maturação dos esporos e testou-se a influência de oxigênio. Nos experimentos em estado sólido foram utilizados como substratos cascas de banana e bagaço de cana-de-açúcar e como reatores sacos de polipropileno. O inóculo puro e concentrado duas e quatro vezes foi proveniente de fermentação submersa descontínua. Observou-se que a maior produção de esporos foi encontrada no experimento FSC60 ($2,17 \times 10^9$ UFC/mL). A partir deste experimento foi avaliada a influência da aeração na produção de esporos e observou-se que o oxigênio é fundamental para a produção de esporos, porém não se pode ter certeza da influência deste nutriente na produção de biotoxina. Os experimentos com aeração produziram $5,16 \times 10^9$ UFC/mL de esporos e no bioensaio uma CL_{50} de 0,74mg/L. Nos experimentos em estado sólido, o inóculo proveniente do processo fermentativo descontínuo e concentrado duas vezes apresentou melhores resultados de produção de esporos ($7,8 \times 10^{12}$ UFC/kg) que o concentrado quatro vezes e puro. Ensaio futuros serão realizados para verificar a toxicidade do produto obtido.

Palavras-chaves: *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, processos fermentativos, esporos.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), used in the biological control of several species of mosquitoes, has been employed in the region of Joinville to control the mosquitoes of the genus *Simulium pertinax* (gnats). These mosquitoes have great impact on the region and cause inconvenience to the riverside population and the local economy, which has great potential for tourism. To enhance the production of Bti is necessary to develop new production processes and a final treatment of the product at lower cost and with reduced environmental impact. Currently, the methods used in the production process of bio pesticides involve the use of discontinuous submerged fermentation processes and, recently, the use of solid state fermentation has been proposed. In this context, this work proposes an alternative process for the production of spores, and therefore the bio pesticides, with submerged semicontinuous fermentation and an integration of the submerged and solid processes. MRSA are four types of semicontinuous proceedings named FSC80, FSC60, FSC40 and FSC20, in wich the numbers represent the percentage of cut in each experiment. The experiments were conducted at 30°C in a Biostat B reactor. After the cut, they were packed in a second reactor for the maturation of spores and tested for the influence of oxygen. For solid state experiments, banana peels and sugar cane bagasse were used as substrates and polypropylene bags as reactors. The pure inoculum, the twice concentrated and four times concentrated inocula came from discontinuous submerged fermentation. It was observed that the increased production of spores was found in the experiment FSC60 ($2,2 \times 10^9$ CFU/mL). In this experiment the influence of aeration in the production of spores was assessed and it was noticed that oxygen is essential for the production of spores, but one cannot be sure about the influence of this nutrient in the production of biotoxin. The experiments with aeration produced $5,2 \times 10^9$ CFU/mL of spores and the bioassay produced an LC_{50} of 0,74 mg/L. In solid state experiments, the inocula from the discontinuous fermentation process and twice concentrated presented better results for the production of spores ($7,8 \times 10^{12}$ CFU/kg) than those from the four times concentrated and pure. Future tests will be performed to check the toxicity of the product.

Keywords: *Bacillus thuriniensis var. israelensis*, fermentative processes, spores.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	19
CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1 INSETICIDAS.....	21
1.2 BIOINSETICIDAS.....	25
1.3 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	27
1.3.1 Modo de ação das toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
1.3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> - Bti.....	33
1.3.3 Riscos Ambientais do uso do Bti.....	38
1.4 SIMULÍDEOS.....	39
1.5 PROCESSOS DE CULTIVO DO BTI.....	45
1.5.1 Efeito do oxigênio dissolvido sobre o crescimento de Bti e produção de delta-endotoxina.....	48
CAPITULO II – MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 MICRORGANISMO.....	51

2.1.1 Manutenção e conservação da cepa	51
2.2 MEIOS DE CULTIVO	51
2.2.1 Meio LB (em g/L), para ativação da cepa.....	51
2.2.2 Meio de cultivo para o preparo dos inóculos e ensaios em biorreatores em cultivo submerso	52
2.2.3 Meio de cultivo para ensaios de fermentação em estado sólido	52
2.2.4 Esterilização dos meios de cultivo	52
2.3 ENSAIOS EM BIORREATORES	53
2.3.1 Fermentação submersa em processo descontínuo (DESC) e semicontínuo (FSC)	53
2.3.1.1 Preparo do pré-inóculo	53
2.3.1.2 Preparo do inóculo.....	53
2.3.1.3 Condições gerais de fermentação no processo FSC e DESC.	54
2.3.1.4 Esterilização do biorreator	57
2.3.1.5 Calibração do eletrodo de pH	58
2.3.1.6 Calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido.....	58
2.3.2 Processo de fermentação em estado sólido (FES)	59
2.3.2.1 Preparo do inóculo.....	59
2.3.2.2 Preparo dos biorreatores no processo FES.....	59
2.3.2.3 Atividade de água (A_w).....	60
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	60
2.4.1 Amostragem e preparo das amostras em cultivo submerso.....	60

2.4.2 Amostragem e preparo das amostras em cultivo sólido	61
2.4.3 Determinação da concentração de açúcares redutores	61
2.4.4 Determinação da concentração de esporos	62
2.4.5 Determinação da massa seca do meio de cultivo no processo FES	64
2.4.6 Determinação da atividade larvicida.....	64
CAPITULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1 PRODUÇÃO DE ESPOROS POR PROCESSO DE CULTIVO DESCONTÍNUO E SEMICONTÍNUO.....	66
3.1.1 Cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em processo descontínuo (DESC)	67
3.1.2 Cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em processo semicontínuo (FSC)	71
3.2 INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPOROS E TOXICIDADE	81
3.2.1 Experimentos com e sem fornecimento de oxigênio na fase de esporulação.....	81
3.3 INTEGRAÇÃO DOS PROCESSOS DE CULTIVO EM ESTADO LÍQUIDO E SÓLIDO.....	86
3.3.1 Cultivo em estado sólido utilizando caldo fermentado como inóculo	86

3.4 ENSAIOS FERMENTATIVOS EM PROCESSO DESCONTÍNUO (DESC) COM MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA HIDROLISADO	90
CONCLUSÃO, SUGESTÕES E PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXO 1.....	111
ANEXO 2.....	113
ANEXO 3.....	115
ANEXO 4.....	117
ANEXO 5.....	124
ANEXO 6.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A_w	Atividade de água
AR	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais
B1	Biorreator 1
B2	Biorreator 2
BHC	1, 2, 3, 4, 5, 6 Hexaclorociclohexano
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
<i>Bs</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>
<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>azawai</i>
CL ₅₀	Concentração de uma substância química que provoca a morte de 50% de um grupo de animais expostos, em um tempo definido.
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
CGB	Câmara de Germinação Biológica
CPI	Cultivo em Processos Integrados
CSB	Cabine de Segurança Biológica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DESC	Cultivo submerso em processo descontínuo
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FES	Fermentação em estado sólido
FPI	Fermentação em processos integrados (submerso e sólido)
FSC	Fermentação submersa em processo semicontínuo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
IPS	Cepa proveniente do Instituto Pasteur em Paris
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde

pH	Potencial Hidrogeniônico
PMJ	Prefeitura Municipal de Joinville
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
UA	Umidade absoluta
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTI	Unidades Tóxicas Internacionais
var.	Variedade

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1.1: Fórmulas estruturais do BHC e DDT.....	22
Figura 1.2: Fórmulas estruturais de carbamatos e organofosforados, respectivamente.....	23
Figura 1.3: Colônia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
Figura 1.4: Esporo (a) e cristal (b) de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
Figura 1.5: Cristais de delta-endotoxina formados no momento da esporulação.....	30
Figura 1.6: Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais (setas) de <i>Bacillus thuringiensis</i> . a) cristais com formato bipiramidal e b) cristais com formato esférico. Barras: 1 μ m.....	31
Figura 1.7: Modo de ação da toxina de Bt.....	32
Figura 1.8: Proteína Cry.....	36
Figura 1.9: Rio Cubatão - Estrada Rio da Prata em Joinville (SC), rio onde é feito controle de <i>Simulium pertinax</i>	41
Figura 1.10: Larva de <i>Simulium pertinax</i>	42
Figura 1.11: Pupa de <i>Simulium pertinax</i>	43
Figura 1.12: <i>Simulium pertinax</i> adulto.....	44
Figura 1.13: Ciclo biológico do borrachudo.....	45

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 2.1: Diagrama esquemático da produção de esporos em regime semicontínuo e posterior maturação de esporos em regime descontínuo simples	56
Figura 2.2: Redução do ácido 3,5 – dinitrosalicílico pelo açúcar redutor (AR), em meio alcalino.....	62

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 3.1: Concentração de ART(g/L) e logaritmo da concentração de esporos (log Xe) em função do tempo em processo de cultivo descontínuo simples	68
--	----

DESC.....	
Figura 3.2: Variação do pH e da concentração de oxigênio dissolvido (OD%) com o tempo em processo de cultivo descontínuo simples.....	70
Figura 3.3: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC60.....	72
Figura 3.4: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC60.....	73
Figura 3.5: Concentração média de esporos Xe (UFC/mL) dos cortes realizados nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e DESC.....	75
Figura 3.6: Produtividade média de esporos Pxe (UFC/mL.h) dos cortes realizados nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e DESC.....	76
Figura 3.7: Concentração de esporos (UFC/mL) na fase de maturação (biorreator B2), até o final da fonte de carbono (aproximadamente 30 horas) nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e no experimento DESC.....	77
Figura 3.8: Concentração de esporos (UFC/mL) nos tempos de corte efetuados e na fase de maturação nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40 e FSC20.....	80
Figura 3.9: Concentração de esporos (UFC/mL) no final da fase de maturação no experimento FSC60, nas condição de cultivo com e sem aeração.....	82
Figura 3.10: Produtividade de esporos (UFC/mL.h) no final da fase de maturação no experimento FSC60, nas condição de cultivo com e sem aeração.....	83
Figura 3.11: Concentração de esporos (UFC/kg) no tempo de cultivo de nove horas, nos experimentos N, N2 e N4.....	88
Figura 3.12: Variação do pH e da concentração de oxigênio dissolvido (OD%) com o tempo em processo de cultivo descontínuo nos experimentos T1 e T2.....	92
Figura 3.13: Consumo de substrato (S) e concentração celular (Xt) em função do tempo no experimento T2.....	93

ANEXO

Figura A1: Foto área da região de Joinville, localizada a nordeste do estado de Santa Catarina e onde há presença de <i>Simulium pertinax</i>	112
Figura A2: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no	118

início e em cada corte efetuado no experimento FSC80.....	
Figura A3: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC80.....	119
Figura A4: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC40.....	120
Figura A5: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC40.....	121
Figura A6: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC20.....	122
Figura A7: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC20.....	123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1.1: Relação entre a nova nomenclatura de genes Cry (CRICKMORE <i>et al.</i> , 1998) e a antiga classificação proposta por HÖFTE & WHITELEY (1989).....	37
--	----

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2.1: Dados gerais dos ensaios experimentados.....	55
--	----

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3.1: Velocidade de consumo de substrato (v_s) nos diversos cortes efetuados no experimento FSC60.....	74
Tabela 3.2: Concentração letal (mg/L) que causou a morte de 50% dos indivíduos de um grupo de 10 larvas nos processos com e sem aeração.....	83
Tabela 3.3: Resultados obtidos com análises de pH e atividade de água (A_w), obtidos do cultivo de Bti durante nove dias empregando como substrato cascas de banana “in natura” e bagaço de cana-de-açúcar.....	87
Tabela 3.4: Condições de tratamento por hidrólise do farelo de soja utilizados como meio de cultivo em fermentações no processo descontínuo (DESC), temperatura (°C), tempo (min), H ₂ SO ₄ (%m/m) e pH.....	91

INTRODUÇÃO

Preparados de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* têm sido usados há sessenta anos para o controle de insetos nocivos às plantas cultivadas e às florestas e, também, para o controle de insetos vetores de doenças. A intensa utilização do bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* se deve a inúmeras vantagens fornecidas por esses produtos tais como: métodos de produção em biorreatores, utilização dos mesmos equipamentos usados para aplicação de inseticidas químicos, inocuidade a mamíferos e outros vertebrados e amplo espectro de ação com alta especificidade e reduzida seleção de resistência a insetos (AZEVEDO *et al*, 2002). A única limitação importante a se considerar é o elevado custo de programas de controle, e este encarecimento se deve ao fato de tratar-se de produtos importados e caros, na maioria das vezes, e devido à necessidade de serem aplicados com frequência para que produzam um controle eficiente.

Dentre os principais insetos vetores de doenças humanas, destacam-se os mosquitos das famílias Culicidae e Simuliidae, responsáveis pela transmissão de uma série de moléstias. Gêneros como *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, que se desenvolvem em águas paradas, veiculam doenças como a malária, dengue, encefalites, elefantíase, entre outras. O gênero *Simulium*, que habita rios e riachos de água límpida e de correnteza, é o responsável pela transmissão do nematóide *Onchocerca vulvulus*, agente etiológico da oncocercose ou cegueira noturna.

Em relação a esse último gênero, na região nordeste de Santa Catarina, especificamente na região de Joinville (Anexo 1), há, predominantemente, a espécie *Simulium pertinax*, popularmente conhecida como borrachudo (SETTI *et al*, 2005). Mesmo não sendo transmissor da oncocercose, têm tornado a vida das populações ribeirinha bastante desconfortável. Quando não controlado, seus ataques podem causar hemorragias localizadas, edemas e estado febril, além de prejudicar o desenvolvimento sócio-econômico da região que possui grande potencial para o turismo rural.

Atualmente, a Prefeitura Municipal de Joinville, por meio da Fundação Municipal de Desenvolvimento Rural 25 de Julho, têm realizado o controle populacional destes borrachudos através de aplicações periódicas de bioinseticida. No entanto, o alto custo de aquisição do produto e a grande mão de obra necessária

para a sua aplicação nos rios da região têm dificultado a expansão das áreas atendidas, que hoje, apresentam-se como uma necessidade.

No Brasil, existem quatorze formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* disponíveis no mercado. As principais limitações são o elevado custo de produção, a concorrência com os produtos químicos e a falta de investimento dos setores público e privado no desenvolvimento e formulações do produto. Salienta-se também que o mercado brasileiro ainda carece de competitividade, pois todos os produtos são importados. Espera-se que com o lançamento de produtos brasileiros tão efetivos quanto os importados, os custos globais sejam reduzidos, favorecendo a ampliação do mercado (POLANCZYK, 2004).

O desenvolvimento de novos processos produtivos visando à obtenção desse produto a baixo custo de produção mostra-se bastante atrativo.

Diante deste contexto o presente trabalho foi desenvolvido. O principal objetivo foi avaliar a produção do bioinseticida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) em cultivo submerso, em especial em processo semicontínuo. A integração deste processo com o processo em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais produzidos na região nordeste de Santa Catarina como substrato de cultivo, também foi avaliado.

Especificamente, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

- estudar o cultivo de Bti por processo submerso descontínuo em meio de cultivo composto por nutrientes de baixo custo de aquisição: farelo de soja e milhocina;
- avaliar a produção do bioinseticida Bti por processo semicontínuo;
- estudar a influência da aeração sobre a produção de esporos bacterianos e sobre a potencialidade do produto no controle biológico de mosquitos;
- avaliar a obtenção do produto em cultivo em estado sólido utilizando como substrato cascas de banana e bagaço de cana-de-açúcar e como inóculo uma fração do cultivo submerso (processos integrados) em diferentes concentrações microbianas;
- avaliar um meio alternativo para determinação de biomassa no cultivo submerso de Bti utilizando farelo de soja e milhocina como substratos.

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INSETICIDAS

A utilização pelo homem de pesticidas não sintéticos remonta à civilização grega, romana e chinesa, que já conheciam suas propriedades inseticidas. Mas, foi por volta do século XIX, na Europa e nos Estados Unidos, que começaram a ser utilizados produtos químicos tais como o “verde de Paris” (arsênico + acetato de cobre) e a “calda bordaleza” (sulfato de cobre + hidróxido de cálcio) para o controle de pragas agrícolas (GARCIA, 1996).

Conforme Repetto & Baliga (1996), a partir da década de 50, esses produtos passaram a ser utilizados mais intensamente nas campanhas de saúde pública. Oportunamente em decorrência da síntese do dicloro-difenil-tricloroetano, DDT (Figura 1.1) em 1939, deu-se o início de uma “nova” era para o combate de mosquitos vetores de doenças. Esses produtos foram então amplamente empregados sem nenhuma preocupação de ordem ambiental ou de saúde.

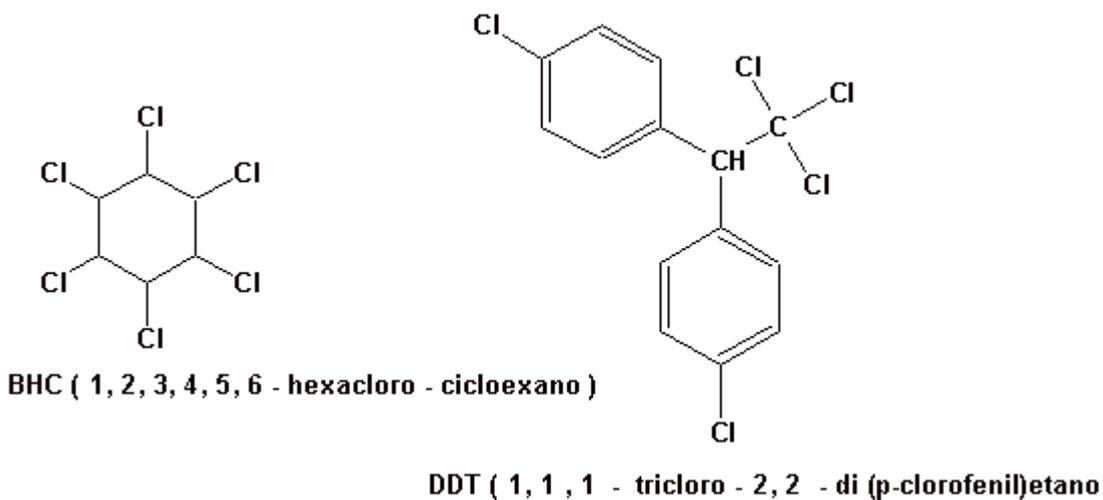


Figura 1.1: Fórmulas estruturais do BHC e DDT.

Fonte: www.unb.br/fs

De acordo com Henao & Corey (1986) além dos inseticidas organoclorados, como o DDT, outros produtos como organofosforados, carbamatos (Figura 1.2) e piretróides passam a ser utilizados em várias regiões do mundo para o controle de mosquitos. Conforme os autores, estudos realizados por vários pesquisadores confirmam que baixos níveis de exposição a esses compostos podem causar sérias doenças e desordens na saúde, incluindo câncer, dano ao sistema nervoso, sistema reprodutivo e outros órgãos, anormalidades no desenvolvimento e comportamento, disfunção hormonal e disfunção do sistema imunológico.

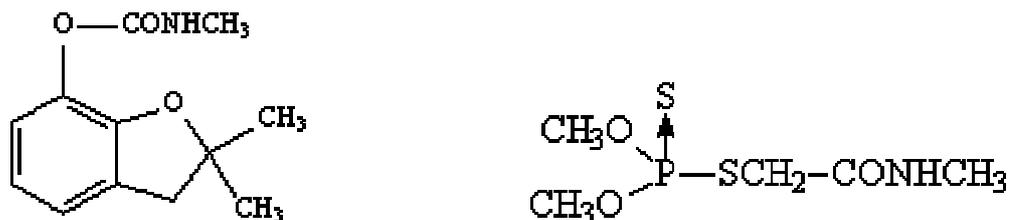


Figura 1.2: Fórmulas estruturais de carbamatos e organofosforados, respectivamente.

Fonte: www.unb.br/fs

Nos ecossistemas, os efeitos residuais desses produtos são devastadores, pois atuam nos extratos inferiores da cadeia alimentar chegando, por vezes, a eliminá-los, comprometendo, dessa forma, toda a população local. São conhecidos vários efeitos ambientais relacionados à utilização de inseticidas. São eles (RIBEIRO *et al.*, 2001 apud SOUZA SILVA & FAY, 2004):

- supressão da fotossíntese no nível de fitoplâncton;
- aumento da mortalidade e malformações em peixes jovens;
- embriões mortos e deformados em tartarugas de água doce;
- diminuição da espessura dos ovos e malformações embrionárias de várias espécies de aves;
- feminização e conseqüente infertilidade em águias de cabeça branca, habitantes dos Grandes Lagos (América do Norte);
- tumores e lesões em baleias;
- disfunção do sistema imune em gaivotas.

Mesmo com esse alto grau de toxidez, o uso seguido de inseticidas químicos pode conduzir a um outro problema: o surgimento de insetos resistentes ao produto. Segundo Ferrari (1996) a capacidade de um inseto resistir a um determinado inseticida é uma característica genética que, normalmente, ocorre numa frequência média nas populações. Populações de insetos resistentes surgem através da seleção exercida pela pressão do uso de inseticidas, os quais matam os insetos suscetíveis, favorecendo o aumento da frequência de genes dos que conferem resistência.

A resistência de mosquitos ao DDT foi observada pela primeira vez em 1949, na Flórida e na Califórnia. Depois da diminuição do uso do DDT em função de sua toxicidade, no fim dos anos 70, o organofosforado Malathion passou a ser progressivamente o principal inseticida no controle de vetores, até que os piretróides foram introduzidos no país entre os anos de 1995 e 1997. O uso extensivo de Malathion contribuiu para a seleção de resistência aos compostos organofosforados em algumas populações de vetores. Também no início da década de 80, se observou haver populações pertencentes a 84 espécies de culicíneos catalogados como resistentes a inseticidas. Em estudo com o *Culex quinquefasciatus* (mosquito urbano), foi observado um grande nível de resistência a Malathion (78% de sobrevivência na dose discriminada pela Organização Mundial de Saúde (OMS)) (KARUNARATNE; HEMINGWAY, 2001).

Outro organofosforado, o Temephos, teve seu primeiro registro de resistência, no Brasil, em 1984, no estado do Rio Grande do Sul. Foi relatada uma “ineficiência do produto” no controle de *Culex pertinax* (borrachudo) e *Thyrsopelma orbitale*, depois de doze anos de iniciado o programa oficial em 1972 (RUAS NETO *et al*, 1989).

Apesar de muitos produtos altamente efetivos já estarem disponíveis no mercado, ainda há necessidade de novas moléculas, devido, em parte, ao desenvolvimento de resistência, particularmente em espécies que produzem muitas gerações em rápida sucessão e têm altas taxas de multiplicação (SOUZA SILVA & FAY, 2004).

A evolução da resistência de pragas e vetores a inseticidas tem se tornado um dos grandes entraves em programas de controle de pragas envolvendo o uso de produtos químicos. A adoção de uma estratégia anti-resistência deve ser realizada antes que ocorra o problema, pois uma vez que a população do patógeno tornou-se resistente, a única possibilidade reside na aplicação de um outro composto com diferente mecanismo de ação, ou um método não químico de controle (GHINI & KIMATI, 2000).

A racionalização do emprego de inseticidas, sua utilização rotativa e o seu uso integrado com medidas de controle físico e biológico, têm sido recomendados para diminuir os riscos de aparecimento ou agravamento de resistência em populações de vetores (BROWN, 1986). Em decorrência desses problemas

relacionados ao controle químico, principalmente em função do surgimento de resistência, vem sendo ampliado o interesse pelo uso de bioinseticidas no controle populacional de insetos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991).

1.2 BIOINSETICIDAS

Organismos capazes de parasitar ou preda mosquitos em suas várias fases evolutivas vêm sendo estudados há muito tempo. Os cuidados com o meio ambiente e a preocupação crescente com a segurança alimentar podem ser o incentivo perfeito para aumentar o mercado de biopesticidas. No passado, muitos produtos biológicos não se mostraram efetivos além de serem mais caros que os químicos. Porém, mais recentemente, esses produtos melhoram seu desempenho e estão bem mais baratos, o que promoveu o crescimento do mercado. Exemplo disso é o bioinseticida bacteriano da espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt), o qual, devido à eficácia e especificidade de suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceu a formulação de biopesticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de cem formulações foram colocados no mercado mundial, sendo atualmente responsáveis por mais de 90% do faturamento de biopesticidas (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Entre as décadas de 60 e 70 o mercado de biopesticidas se baseou exclusivamente em Bt para controle de insetos da ordem Lepidoptera. A partir dos anos 80, muitas variedades de Bt foram descobertas e determinou-se sua atividade contra Diptera (mosquitos e moscas) e Coleoptera (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984).

Produtos comerciais à base de Bt com boa atividade larvicida contra larvas de *Aedes*, passaram a ser empregados em larga escala. Um modelo de sucesso foi administrado na Alemanha por mais de 15 anos. Formulações baseadas nestas cepas também foram usadas em programas de controle na França, na Espanha, na Hungria, na Suíça, na Rússia, na Itália, na Eslovênia e na Iugoslávia. Nos Estados Unidos a espécie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* tornou-se um dos larvicidas mais usados no controle de mosquitos. Além da ampliação do espectro de atuação do Bt, investiu-se em abertura de novos mercados, tecnologia de produção, inovação de produtos e preços competitivos (BECKER, 2000).

De acordo com Polanczyk & Alves (2003), América Latina, Cuba e México lideram a utilização dos bioinseticidas a base de Bt, especialmente para o controle de pragas nas culturas de algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens. O uso de pesticidas biológicos na América Latina pode chegar a 9% do total mundial em 2008, com um valor de US\$ 100 milhões, assinalaram especialistas internacionais durante um simpósio realizado no Centro Agrônomo Tropical de Pesquisa e Ensino (Catie), na Costa Rica. As razões deste aumento é a crescente quantidade de produtos orgânicos no mercado internacional e a resistência das pragas e enfermidades aos venenos químicos. No mundo são gastos atualmente US\$ 28 bilhões em instrumentos para controle de pragas, dos quais US\$ 1 bilhão são destinados aos pesticidas biológicos. (<http://www.tierramerica.net/2003/1110/pecobreves.html>, Título: Costa Rica: Aumenta o uso de biopesticidas. Acesso em 12 de setembro de 2006).

No Brasil, cerca de 30 pragas de importância agrícola e mosquitos vetores de doenças são controlados por Bt, porém a área total em que estes produtos são aplicados é apenas a terça parte do México e semelhante a Cuba, ou seja, cerca de 150000 hectares (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Há estimativas não oficiais de que o uso de biopesticidas à base da bactéria Bt cubra um milhão de hectares por ano. Estima-se que no mundo, os biopesticidas respondam por 1,3% do mercado de defensivos. "No Brasil, o percentual deve se situar nesse nível", diz Marcos Faria, pesquisador da Embrapa e conselheiro do Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB). Segundo ele, são usados no país cerca de 3,8 milhões de hectares, movimentando R\$ 12,5 milhões/ano. Dados de 2006 (<http://agenciact.mct.gov.br/index.php/content/view/24203.html>, Título: Embrapa faz pesticida a partir de casca de arroz. Cibelle Bouças. acesso em 12 setembro de 2006)

Para Arriaga (1998), o controle biológico de mosquitos é mais sustentável e a Saúde Pública poderia melhor desenvolvê-lo. No entanto, apesar dessas possibilidades, o método mais empregado para combater mosquitos ainda é o químico, que até hoje não proporciona resultados satisfatórios, que são cada vez mais difíceis de serem alcançados e cada vez mais caros, tornando-se um modelo insustentável que deve ser radicalmente substituído. Hoje se fala em mudança de paradigma, com os produtos biológicos tendo seu papel definido e devendo ser analisado segundo características específicas para ganhar mercado. A preocupação

ambiental gerará um número crescente de nichos de mercado para os quais os biopesticidas se mostram apropriados (CAPALBO & MORAES, 2001).

Os fatores de mercado que favorecem os biopesticidas incluem:

- preferência crescente do consumidor por produtos sem pesticidas químicos, aumento de mercado para os produtos de cultivo orgânico;
- desenvolvimento de um sistema agrícola mais sustentável usando programas de manejo integrado;
- estabilização e harmonização de regulamentação governamental para registro de biopesticidas contendo microrganismos de ocorrência natural ou engenheirados;
- presença de muitas companhias de grande porte no mercado de biopesticidas.

Deve-se lembrar que a inocuidade absoluta não pode ser garantida em todos os sistemas vivos em todo o tempo. Toxidez ou patogenicidade podem ser geralmente demonstradas se não impuserem restrições à dosagem ou tipo de sistema vertebrado. Uma decisão sobre o campo de uso de um entomopatógeno deve ser baseada em uma prudente consideração dos benefícios a serem obtidos em contraposição ao potencial de riscos de uso (CAPALBO & MORAES, 2001).

1.3 BACILLUS THURINGIENSIS

A microflora bacteriana confinada no intestino dos insetos é rica, diversa, e compreende em bactérias Gram positivas e negativas. Muitas delas auxiliam na digestão dos alimentos, porém algumas são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao seu magnífico potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas (PRIEST, 2000). Entre estes patógenos destaca-se o *Bacillus thuringiensis*, que ganhou notoriedade nos meios científico e industrial, uma vez que suas linhagens puderam ser empregadas como princípios ativos de preparações industrializadas, como inseticidas de pragas florestais e agrícolas, ou de vetores para o homem e animais (RABINOVITCH, 1998).

Segundo Stahly *et al* (1990) apud Berbert-Molina (1998) a história do *Bacillus thuringiensis* e seu emprego como base para inseticidas microbianos começa no

início do século passado, quando Ishiwata isolou, no Japão, um bacilo de lagarta do bicho da seda (*Bombix mori*). Segundo Ishiwata, a bactéria seria o agente etiológico da doença observada nesses insetos. Foi, também, Ishiwata o primeiro cientista a descrever a relação entre culturas “velhas” e entomopatogenicidade. De acordo com suas observações, culturas “jovens” do “*Bacillus* da doença do sotto”, como descreveu o isolado, não levava à morte do inseto, ao contrário da ação tóxica ocasionada por células em estágio de desenvolvimento avançado.

De acordo com esses autores, foi Berliner que, em 1911, uma década depois da descoberta de Ishiwata, sugeriu o emprego de *Bacillus thuringiensis* para o controle de insetos-praga ao isolar o microrganismo de lagartas mortas de *Anagasta kuehniella*, a traça do trigo, e descrever a existência de uma inclusão cristalina no interior das células esporuladas do bacilo. Berliner atribuiu a esta espécie o nome de *B. thuringiensis*, em homenagem à província germânica da Thuringia.

Conforme Rabinovich (1997) *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, mesófila e quimioheterotrófica. Possui forma de bastonete com dimensões que se aproximam de 1,1 μ m de largura e 4,0 μ m de comprimento sendo capaz de se movimentar devido à presença de flagelos peritríqueos. A Figura 1.3 apresenta uma colônia típica da cultura de Bt.

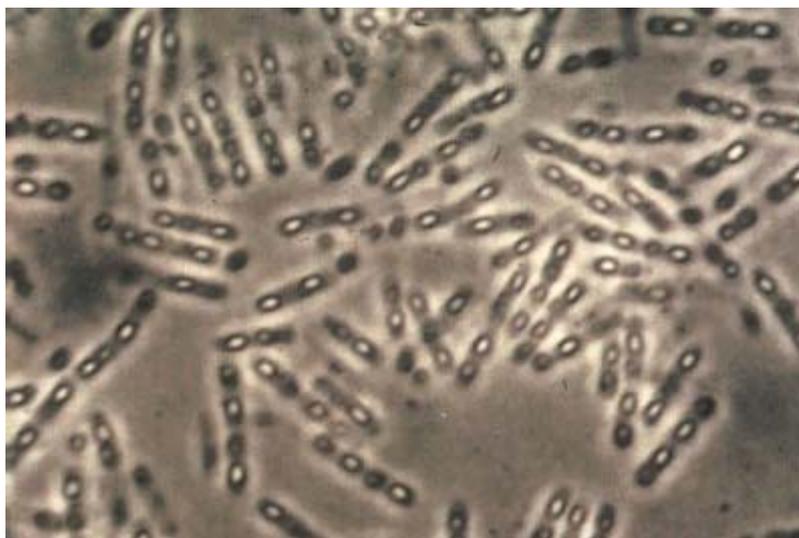


Figura 1.3: Colônia de *Bacillus thuringiensis*.

Fonte: www.elbaixllobregat.net/mosquits/graf/tev21g.jpg

Stahly *et al* (1990) apud Berbert-Molina (1998), descrevem que esses bacilos são encontrados na natureza vivendo como saprófitas de solo, que funciona como reservatório de esporos destes microrganismos, depositados por cadáveres de insetos infectados ou por folhas de vegetais que acumulam os esporos carregados pelo vento; ou como invasores de larvas de insetos das espécies susceptíveis. Como membro do gênero *Bacillus* estes microrganismos dividem com outros membros de sua taxonomia a habilidade de formar endosporos que são resistentes à inativação por calor, dissecação, solventes orgânicos, ácidos e radiações.

Bechtel & Bulla (1976) fizeram um estudo minucioso sobre as mudanças citológicas ocorridas em *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), durante a esporulação e demonstraram que o mecanismo geral do processo é similar ao de outros bacilos, apresentando os sete estágios de desenvolvimento descritos por Murrel em 1967: formação de um filamento axial de DNA em toda a extensão da célula vegetativa (Fase I); invaginação da membrana citoplasmática, próxima a um dos pólos da célula, englobando o material genético (Fase II); formação do septo do pré-esporo (Fase III); formação do córtex, polímero glicopeptídico que se deposita entre as membranas interna e externa do pré-esporo (Fase IV); formação da capa do esporo (Fase V), formação do exoesporo (Fase VI); lise celular com liberação do esporo maduro (Fase VII). Em trabalho semelhante ao de Bechtel & Bulla (1976), Abdell-Hameed *et al* (1990) verificaram a mesma similaridade no processo global de esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

A esporulação bacteriana normalmente ocorre quando as condições ideais para a divisão celular deixam de existir. Durante o processo de esporulação são gerados esporos elipsoidais, localizado na região central ou paracentral da célula (Figura 1.4a). Tais esporos são ricos em ácido dipicolínico, componente que na forma de sal de cálcio desempenha papel na termorresistência e que não é encontrado na forma vegetativa (ABDELL-HAMEED *et al*, 1991). Simultaneamente ao processo de esporulação, ocorre produção de uma inclusão cristalina (Figura 04b) (característica de cada variante de Bt) a qual é tóxica a larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e ainda nematóides e ácaros (FEITELSON *et al*, 1992; FEITELSON, 1994).

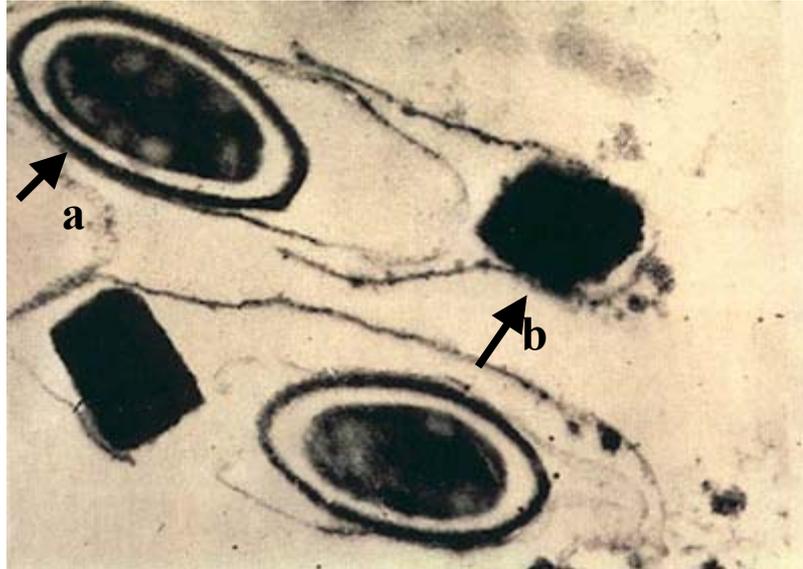


Figura 1.4: Esporo (a) e cristal (b) de *Bacillus thuringiensis*.

Fonte: www.elbaixlobregat.net/mosquits/graf/tev21g.jpg

Essa inclusão cristalina formada denominada de delta-endotoxina, (DEAN, 1984 e HANNAY & FITZ-JAMES, 1995) é liberada com o esporo no momento da lise celular. A Figura 1.5 mostra em detalhes os cristais de delta-endotoxina livres no meio, após formação do esporo e lise celular. E, a Figura 1.6, a microscopia eletrônica de varredura de duas formas dos cristais.

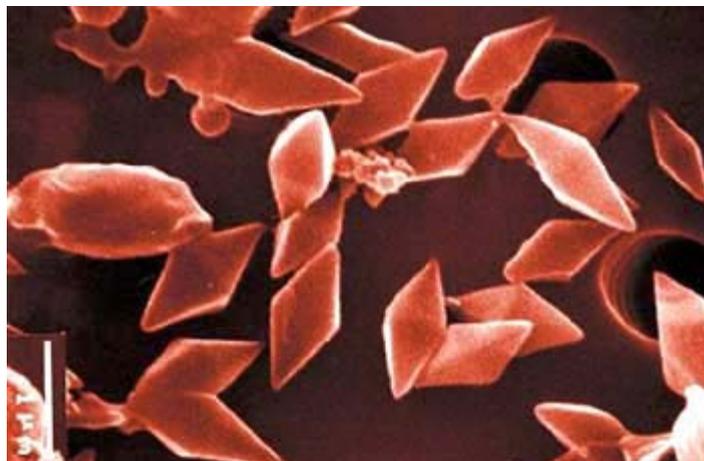


Figura 1.5: Cristais de delta-endotoxina formados no momento da esporulação.

Fonte: www.learner.org/.../archive/images/1006.html

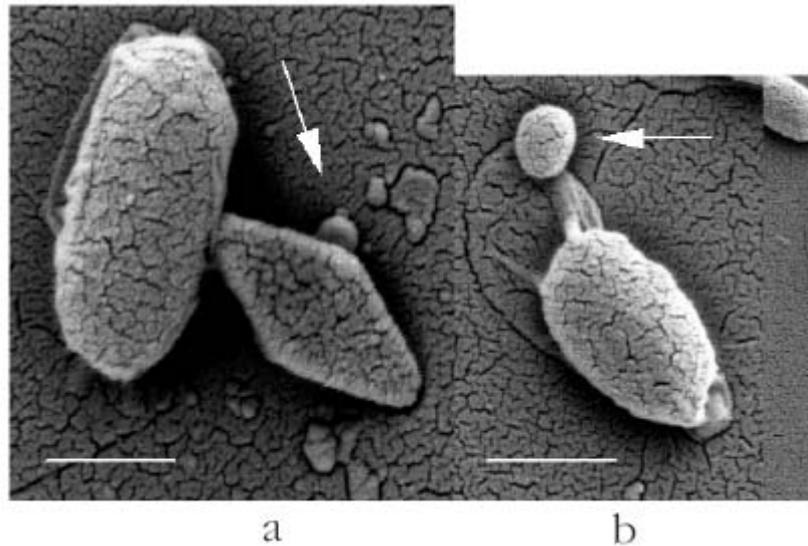


Figura 1.6: Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais (setas) de *Bacillus thuringiensis*. a) cristais com formato bipiramidal e b) cristais com formato esférico. Barras: 1 μ m.

Fonte: Marise T. Suzuki (CNPMA/EMBRAPA).

1.3.1 Modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis*

De acordo com Du & Nickerson (1996) a infecção se inicia quando um inseto suscetível ingere cristais de *B. thuringiensis*. Esses cristais são compreendidos por protoxinas que, após a ingestão, são solubilizadas pelo pH alcalino do trato intestinal do inseto. Supõe-se que as condições alcalinas do intestino médio do inseto promovam a solubilização das protoxinas pela destruição das ligações iônicas entre as subunidades, e que as condições redutoras, existentes no intestino médio de muitos insetos susceptíveis, poderiam promover o rompimento das pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína, contribuindo para a solubilidade. Após a solubilização, a maioria das protoxinas conhecidas atualmente precisa ser clivada por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos, os fragmentos das protoxinas se ligam em receptores específicos encontrados nas vilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino e como consequência disso, ocorre a deformação das células epiteliais do intestino médio e a consequente desintegração da membrana microvilar e destruição do órgão. Uma vez que o

funcionamento do intestino médio é interrompido, ocorre uma redução do pH do fluido intestinal conjuntamente com uma liberação de nutrientes, os quais criam condições para a germinação dos esporos de *B. thuringiensis* e para a multiplicação de suas células vegetativas. O *B. thuringiensis* então invade os tecidos larvais do inseto que eventualmente interrompe sua alimentação e morre. A Figura 1.7 apresenta um esquema do modo de ação da delta-endotoxina produzida por Bt ao ser ingerida por um inseto na forma larval.

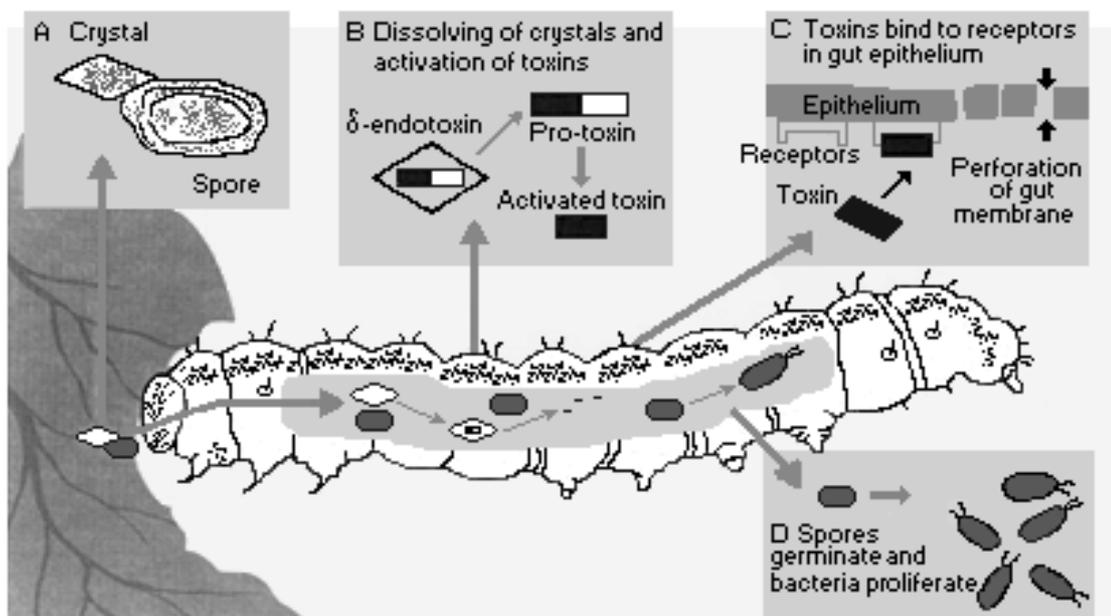


Figura 1.7: Modo de ação da toxina de Bt.

Fonte: www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm

Num estudo realizado por LACEY (1986), foi verificado que ao ocorrer a lise das células intestinais de larvas de mosquitos a morte pode ocorrer em seis minutos, quando concentrações elevadas da toxina são empregadas, ou em até vinte e quatro horas, no caso de emprego de baixas concentrações. O ciclo infeccioso é concluído quando o cadáver é consumido e o *B. thuringiensis* garante sua perpetuação no ambiente na forma de esporo (LAMBERT & PEFEROEN, 1992).

1.3.2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti

A descoberta de uma nova linhagem, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), inócua para Lepidopteros, mas altamente tóxica para Dipteros, inaugurou uma nova etapa na história do controle biológico de insetos. Goldberg & Margalit (1977) citados por Melo & Azevedo (2000) anunciaram uma bactéria esporulada que demonstrou atividade tóxica contra *Anopheles sergentii* Theobald, *Uranotaenia unguiculata* Edwards, *Culex univitattus* Theobald, *Aedes aegypti* Linnaeus e *Culex pipiens* Linnaeus.

O isolamento da bactéria deu-se em agosto de 1976, quando Margalit colheu a água poluída de um charco localizado no Deserto de Negev, nas proximidades do Kibutz Zeelim, água esta que continha exclusivamente larvas moribundas de *Culex pipiens* e adultos emergindo de pupas, "uma verdadeira situação de epizootia", Desse material, a partir da colônia ONR-60A derivaram todas as culturas de *B. thuringiensis* "variedade" *israelensis* conforme Margalit & Dean, 1985 citados por Melo & Azevedo (2000).

Ainda segundo Melo & Azevedo (2000), a atividade biológica da bactéria matadora de mosquitos era de 30 a 100 vezes superior à do *Bacillus sphaericus* cepa SSII-1, conhecido larvicida da época. Cópias da nova linhagem entomopatogênica foram remetidas para Huguette de Barjac do Instituto Pasteur de Paris, através da Organização Mundial da Saúde, em cujo laboratório a linhagem foi identificada como *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-14 e onde recebeu ainda o nome de "subespécie" *israelensis*.

Já em 1982, cerca de 240 toneladas de preparações inseticidas à base desta "subespécie" foram utilizadas no Oeste da África, sem causar um único efeito adverso, assim como nenhum efeito tóxico para o homem foi observado em mais de vinte e três anos de uso operacional. Outro exemplo da sua aplicação em larga escala em nível de campo, conforme Margalit & Dean (1985) foi a campanha de controle de mosquitos realizada ao longo do Rio Reno, em 1980, onde 750kg de preparações inseticida bacteriana em pó foram aplicadas em 1200ha e, também, 2250L de inseticida bacteriano líquido concentrado foram usados em 2200ha, com excelentes resultados.

Em 1983, os primeiros estudos conduzidos no Brasil avaliaram a eficiência de agentes biológicos no controle de simúlideos. Em 1986, devido aos resultados promissores iniciou-se a substituição dos organofosforados por produtos à base de Bti. Desde então se tornou a única tática de controle de simúlideos. O estado do Rio Grande do Sul foi o pioneiro no uso de Bti. O programa de controle de simúlideos foi iniciado em 1983, com o objetivo de controlar populações resistentes de *Simulium pertinax* (borrachudo) à Temephos (RUAS NETO, 1984).

Segundo Araujo-Coutinho (1995), desde 1990, a Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo vem utilizando produtos à base de Bti no programa de controle de simúlideos realizado na Serra do Mar também em substituição ao Temephos. Em maio de 2001 foi iniciada a utilização de inseticidas à base de Bti nos municípios de Santos, São Vicente, Cubatão, Guarujá e Praia Grande. De acordo com Vilarinhos *et al* (1998), os dois principais produtos à base de Bti que estão disponíveis no mercado brasileiro são: Aquabac® XT 1200 UTI(s)/mg, Teknar® 3000AAU(s)/mg, Vectobac® AS 1200 UTI(s)/mg, formulados líquidos, e os sólidos Vectobac® WDG 3000 UTI(s)/mg, Vectobac® T 2200 UTI(s)/mg. Instituições como a Fundação Oswaldo Cruz, Cia. Brasileira de Antibióticos, Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual Paulista e escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” têm produzido Bti em biorreatores com capacidade de 14 a 3000 litros. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que vem trabalhando em conjunto com uma empresa privada, introduziram um novo produto à base de Bti, lançado no mercado em 2002.

As proteínas inseticidas são codificadas por diferentes genes, sendo possível se encontrar até cinco diferentes tipos de proteína numa mesma célula bacteriana, como em *B. thuringiensis var. israelensis*, todas com atividade inseticida contra larvas de mosquitos (RABINOVITCH *et al*, 1998). Os cristais de proteínas têm sido classificados de acordo com seu espectro de atividade e na homologia de suas seqüências de aminoácidos. Assim sendo, a classificação proposta por Höfte & Whiteley (1989) coloca os cristais de proteínas inseticidas conhecidos em cinco grandes classes. A primeira classe representada pela endotoxina CryI, codifica para proteínas de peso molecular de 130 a 140kDa, que se acumulam na célula mãe na forma de cristais bipiramidais, durante a fase de esporulação. Após a solubilização destes cristais em pH alcalino, ocorre a liberação da protoxina, que é ativada por

proteases presentes no intestino médio das larvas, liberando o fragmento tóxico com tamanho visível de 60 a 70kDa (HÖFTE & WHITELEY,1989). Estas proteínas são ativas contra os insetos da ordem Lepidoptera. A endotoxina codificada pelos genes *CryII*, tem peso molecular de 71kDa e forma cristais cubóides. A proteína *CryIIA* possui duplo espectro de ação, (Lepidoptera e Diptera) enquanto as demais proteínas desta classe têm apresentado toxicidade somente para insetos da ordem Lepidoptera (HÖFTE & WHITELEY,1989).

As cepas de *B. thuringiensis* que contêm a classe *CryIII* apresentam atividade contra insetos da ordem Coleoptera. Seus cristais possuem forma romboidal e são compostos por uma única proteína de 72kDa, exceto a proteína *CryIIIC*, cuja massa molecular é de 130kDa (LAMBERT *et al.*,1992). A classe *CryIV* foi isolada a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e apresenta cristais de forma composta esférica e retangular, com atividade contra larvas de Diptera. Esta classe compreende quatro genes (*CryIVA*, *B*, *C*, *D*), que codificam para proteínas de peso molecular de 135, 128, 74, e 72kDa, respectivamente. *B. thuringiensis* var. *israelensis* também produz uma proteína de 27kDa com atividade citolítica, que por não apresentar homologia com as delta-endotoxinas, foi classificada como *Cyt*. Esta proteína também está presente no cristal e, é necessária para que esta apresente toxicidade (LERECLUS, *et al.* 1993).

Em 1992, Taylor e colaboradores identificaram um cristal de proteína inseticida de 81kDa, com atividade contra *Ostrinia nubilalis* (ordem Lepidoptera) e *Leptinotarsa decemlineata* (ordem Coleoptera) e, por isso, sugeriram que as proteínas ativas contra essas duas ordens fossem colocadas em uma nova classe, a das proteínas *CryV*.

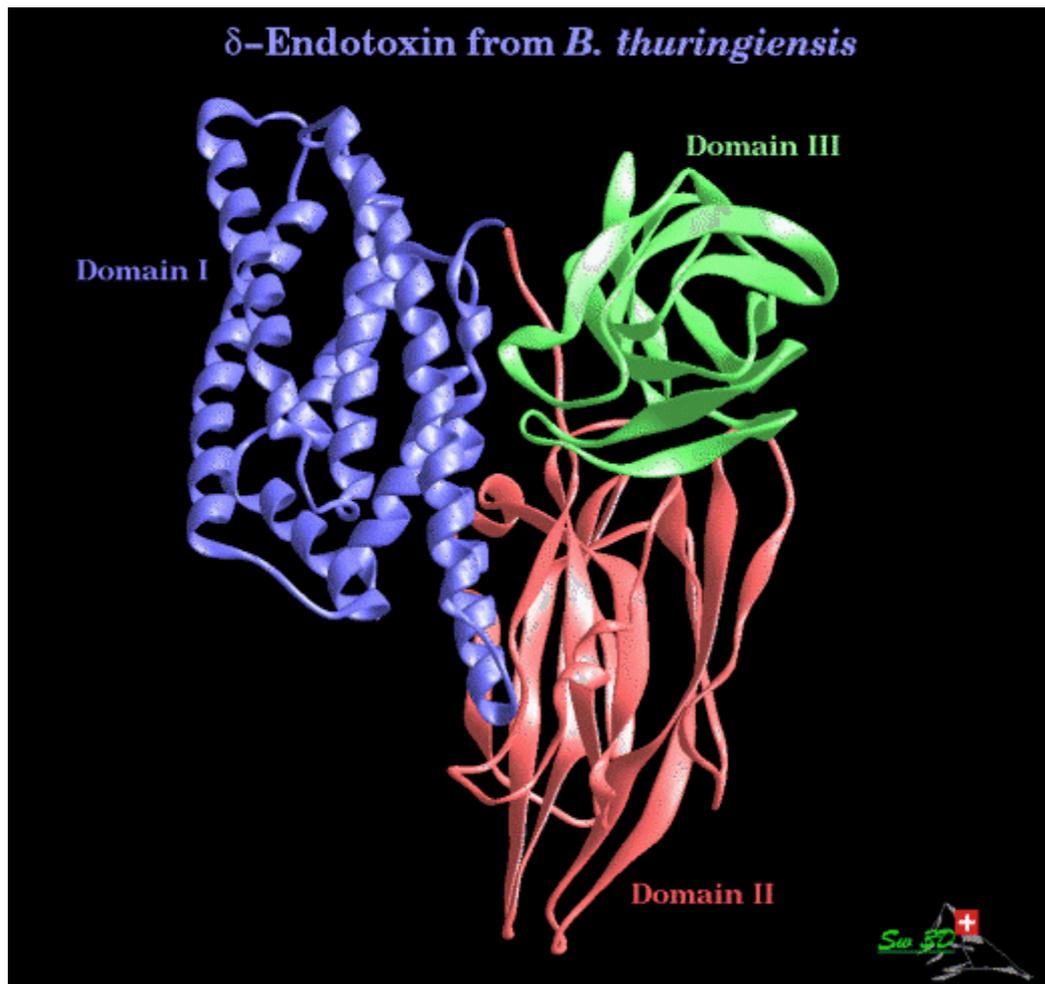


Figura 1.8: Proteína *Cry*

Fonte: www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/bttoxim.htm

O isolamento de novas cepas de *B. thuringiensis* e identificação de genes *Cry* que codificam para delta-endotoxinas com diferentes espectros de ação, que não se enquadravam no sistema de classificação proposto por Höfte & Whiteley (1989), levou a criação de uma nova nomenclatura baseada somente na identidade dos aminoácidos das proteínas *Cry*, proposta por Crickmore *et al.* (1995). Nesta nova classificação, 96 seqüências gênicas da delta-endotoxina foram agrupadas em 17 grupos (PEFEROEN, 1997) e os números romanos foram substituídos por números arábicos (Tabela 1.1), como é o caso dos genes *CryIA(a)*, *CryIB* e *CryIIIA* que foram classificados como *Cry1Aa*, *Cry1Ba* e *Cry3A*, respectivamente. Entretanto alguns

genes tiveram seus números alterados, como ocorreu com os genes *CryIH* e *CryIIIC*, que foram classificados como *Cry9Ca* e *Cry7Aa*.

Tabela 1.1: Relação entre a nova nomenclatura de genes Cry (CRICKMORE *et al.*, 1998) e a antiga classificação proposta por HÖFTE & WHITELEY (1989).

Nova classificação	Classificação antiga	Inseto alvo
Cry 1 Aa 1	CryIA(a)	Lepidoptera
Cry 1 Ab 1	CryIA(b)	Lepidoptera
Cry 1 Ac 1	CryIA(c)	Lepidoptera
Cry 1 Ad 1	CryIA(d)	Lepidoptera
Cry 1 Ba 1	CryIB	Lepidoptera/Coleoptera
Cry 1 Ca 1	CryIC	Lepidoptera
Cry 1 Ea 1	CryIE	Lepidoptera
Cry 1 Ia 1	CryV	Lepidoptera/Coleoptera
Cry 2 Aa 1	CryIIA	Lepidoptera/Diptera
Cry 2 Ac 1	CryIIC	Lepidoptera
Cry 3 Aa 1	CryIIIA	Coleoptera
Cry 3 Ca 1	CryIIID	Coleoptera
Cry 4 Ba 1	CryIVB	Coleoptera
Cry 7 Aa 1	CryIIIC	Coleoptera
Cry 8 Aa 1	CryIIIE	Coleoptera
Cry 9 aa 1	CryIG	Lepidoptera
Cry 10 Aa 1	CryIVC	Diptera

Cry 11 Aa 1	CryIVD	Diptera
Cry 12 Aa 1	CryVB	Nematoda
Cry 13 Aa 1	CryVC	Nematoda

Cry 14 Aa 1	CryVD	Coleoptera
-------------	-------	------------

As toxinas *Cry* de *Bt* possuem uma estrutura tridimensional e, quando ativadas, podem ser divididas em três regiões estruturais: uma região N-terminal, onde reside o domínio tóxico da molécula, uma região conservada C-terminal e uma região variável entre estas duas regiões, na qual se encontra a maioria das diferenças entre aminoácidos (PORTER *et al*, 1993).

1.3.3 Riscos Ambientais do uso do Bti

Organismos não-alvo podem ser expostos ao Bti diretamente pelo contato com o ambiente (ex.: ingestão de folhas, detritos, ou camadas superiores de solo), ou indiretamente pela ingestão de lagartas ou larvas que tenham sido infectadas pelo bacilo. De qualquer forma, o Bti tem uma meia-vida no ambiente de 12-32 horas e tem uma atividade inseticida de uma semana ou mais. Diversos testes com invertebrados, peixes e mamíferos tem apresentado muito pouco ou nenhum efeito do bacilo sobre estes organismos, mostrando-se um agente de grande segurança ambiental.

Segundo Joung & Côtê (2000), o *Bacillus thuringiensis* pode entrar na água (córregos, rios, lagos, mares) através da aplicação direta na superfície da água, carregamento de outros locais pela chuva ou fezes de animais que ingeriram a bactéria. A qualidade da água não é diretamente afetada pela bactéria e é improvável que a maior parte dos outros organismos aquáticos sejam afetados. Apesar da cloração dos reservatórios de água tratada não ser suficiente para matar o bacilo os autores afirmam que a presença do *Bacillus thuringiensis* na água não é

considerada causa de efeitos adversos à saúde humana e que o bacilo não é um patógeno humano.

Com relação aos invertebrados, Purcell (1981) apud Glare & O'Callaghan (1998), acompanhou o desenvolvimento de 39 espécies de invertebrados no estado da Florida, EUA, e apenas *Notonecta indica* demonstrou decréscimo na sua população quando houve o emprego de Bti para o controle biológico de *Aedes taeniorhynchus* (mosquito preto do pântano). Contudo, de acordo com o autor, este decréscimo pode ter ocorrido devido à falta de alimento ao *Aedes taeniorhynchus* e não ao efeito direto do bioinseticida. Antes do seu uso em larga escala contra mosquitos, como no Vale do Rio Reno, no início dos anos 80, numerosos testes de segurança em invertebrados aquáticos foram feitos. Nenhum organismo testado pareceu ser afetado quando exposto em água que continha quantias grandes do bacilo (JOUNG & CÔTÊ, 2000). Com as abelhas não foi diferente, muitos estudos foram realizados e nenhum efeito adverso na colônia foi observado quando Bti foi aspergido sobre a colméia ou abelhas expostas ao bacilo sob condições de campo, simuladas ou não (VANDERBERG, 1990 apud JOUNG & CÔTÊ, 2000). A Organização Mundial de Saúde em 1992 revisou vários laboratórios e estudos de campo que examinaram o impacto do Bti em rãs, salamandras e sapos nas quais nenhum efeito adverso foi registrado (GLARE & O'CALLAGHAN, 1998).

Glare & O'Callaghan (2000), afirmaram que os casos de Bt causando doenças em humanos são extremamente raros, apesar de sua utilização por mais de sessenta anos. Green *et al* (1990) apud Joung & Côtê (2000), encontraram baixos níveis de acumulação das formulações de Bt em trabalhadores que utilizaram equipamento adequado para aplicação e, estes níveis eram apenas um pouco maiores do que aqueles encontrados na população geral.

1.4 SIMULÍDEOS

Os simulídeos são insetos de hábitos diurnos, que habitam rios e riachos de águas límpidas e de correnteza. São sugadores de sangue e por isso podem transmitir doenças para o Homem e animais. Algumas espécies, como *Simulium pertinax*, internacionalmente conhecido como “blackfly”, servem de veiculadores da

oncocercose, doença causada por um verme delgado que se desenvolve no sangue do homem e que produz grandes tumores sob a pele. Quando o verme se localiza nos olhos, causa cegueira parcial ou total. Essa doença ocorre em países da África Central e da América Central, além do Brasil na região Amazônica e no estado de Roraima. As picadas do borrachudo podem causar outra doença que ficou conhecida como “Síndrome de Altamira” (nome da cidade onde foi feito o primeiro registro). A doença se manifesta pelo aparecimento de inúmeras hemorragias pequeninas, sob a pele ou sob as mucosas, cobrindo toda a superfície do corpo, ou restrita às faces ou às extremidades, e ainda, na mucosa bucal (PAIVA, 2002).

Os insetos do gênero *Simulium* são encontrados no território brasileiro nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, tanto no interior como no litoral (NEVES, 1991).

Outra espécie do gênero, *Simulium*, é encontrada em altas densidades na região da Serra do Mar, no estado de São Paulo, em várias localidades do estado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Programas de controle desta espécie, com o emprego de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, são realizados, atualmente, nos dois estados, sob orientação das respectivas Secretarias Estaduais de Saúde. O programa efetuado no litoral norte paulista tem apresentado excelentes resultados nos dez anos de sua implantação. Por ser uma região turística, a economia fica seriamente afetada devido ao excesso de picadas de simulídeos na temporada de verão (VILARINHOS *et al*, 1998).

Na região de Joinville, no estado de Santa Catarina, há, predominantemente, a espécie *Simulium pertinax*, popularmente conhecida como borrachudo, conforme constatado recentemente por Setti *et al* (2005). Mesmo não sendo transmissor da oncocercose, esses mosquitos têm tornado a vida das populações ribeirinha bastante desconfortável. A sua maior incidência estende-se ao longo da Serra do Mar, abrangendo o Município de Joinville e outras cidades vizinhas. Nessa região o relevo apresenta-se bastante acidentado, com inúmeros mananciais de água corrente e condições propícias à proliferação desses insetos, conforme pode ser visto na Figura 1.9. Se não controlado, o aumento da frequência e intensidade de seus ataques pode causar hemorragias localizadas, edemas e

estado febril, refletindo negativamente no desenvolvimento sócio-econômico da região que possuiu grande potencial para exploração do turismo rural.



Figura 1.9: Rio Cubatão - Estrada Rio da Prata em Joinville (SC), rio onde é feito controle de *Simulium pertinax*.

Fonte: Autor.

De acordo com Colbo (1981) durante a sua existência o borrachudo, como outros insetos, apresenta formas de vida distintas. Três delas são fases jovens e aquáticas. Iniciam com o ovo do qual nasce a larva e esta evolui para pupa. Desta pupa nasce a última forma de vida que é o adulto. Tão logo do revestimento da pupa o adulto imediatamente sai da água e inicia a fase de vida livre. Desde a fase de ovo já se observa a adaptação dos borrachudos às águas em movimento. Os ovos do borrachudo são, em geral, de formato oval a quase triangulares. Dependendo da espécie de borrachudo são depositados em grupos sobre as plantas, paus e pedras dentro da água ou, em pontos levemente abaixo da superfície da água ou dos respingos. Estes ovos são recobertos por uma fina camada de substância gelatinosa e aderente ao substrato evitando assim, que sejam arrastados pelas correntezas. Cada fêmea coloca em média por postura

200 a 300 ovos, amadurecendo em torno de 4 a 6 dias dependendo da temperatura da água.

As larvas de borrachudo (Figura 1.10) ocorrem em águas correntes e se fixam em pedras e outros entulhos, por meio de uma ventosa de fixação situada na extremidade posterior do corpo (BORROR, 1988). Elas se locomovem como a lagarta mede-palmos e às vezes são extremamente abundantes podendo ser encontradas em número de mais de 1500 larvas por cem centímetros quadrados. Para se alimentar as larvas possuem um par de leques na cabeça que movimentam rapidamente formando uma corrente de água que direciona o alimento para a abertura da boca (CARLSON, 1967; apud PAIVA, 2002). Esta fase larval dura aproximadamente 21 dias formando um casulo quando pronta para empupar, originando a pupa.

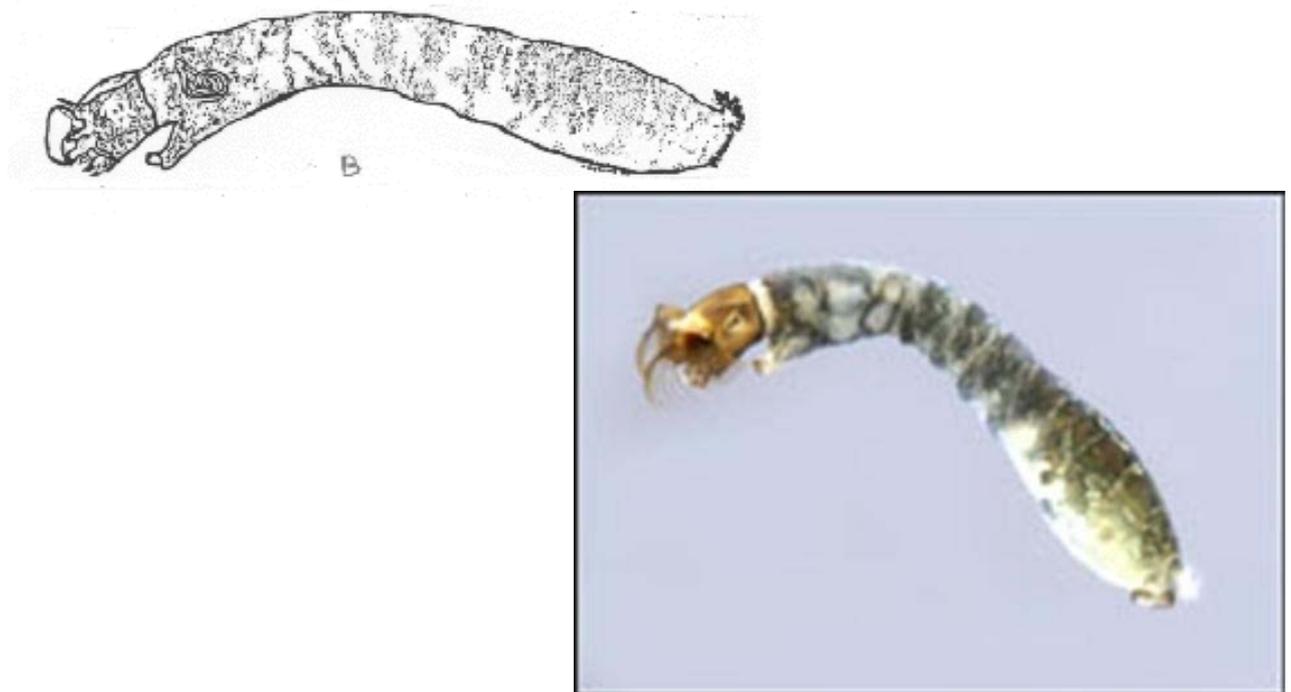


Figura 1.10: Larva de *Simulium pertinax*.

Fonte: www.sucen.sp.gov.br/doencas/simulideos.htm

A pupa (Figura 1.11) é formada com uma secreção gelatinosa da boca que é fixada firmemente, pelas larvas, ao local onde a larva se criou dentro da água. A forma do pupário varia de acordo com a espécie do borrachudo e serve, inclusive,

para a identificação da espécie (WOOD, 1985 apud PAIVA, 2002). A cor das pupas, quando os adultos estão prontos para emergir (nascer) é mais escura do que as pupas recém formadas (CARLSON, 1967 apud PAIVA, 2002).

A emergência do adulto tem a duração de cerca de um minuto. Os segmentos do abdome iniciam movimentos em ondas e tornam-se prateados pela liberação de gás entre a cutícula do adulto e a parede do pupário. Logo em seguida o tórax rompe o pupário deixando uma abertura em forma de T pela qual o tórax do adulto emerge, seguido da cabeça e do abdome. Assim que as pernas são liberadas, elas se esticam para o lado e a água corrente remove o borrachudo da pele da pupa abandonada no pupário (CROSSKEY, 1990). O inseto não se molha, mas alcança a superfície da água dentro de uma bolha de gás e está pronto para voar, este processo dura aproximadamente quatro dias, e em geral, ocorre nas primeiras horas do dia (COSCARON, 1981).

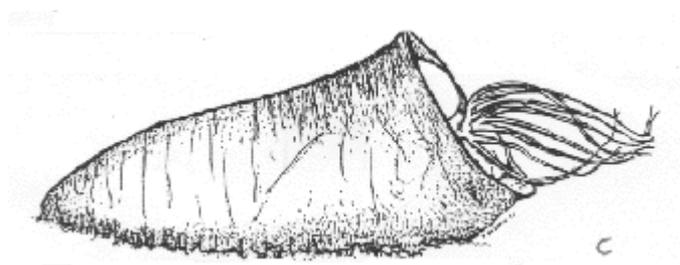


Figura 1.11: Pupa de *Simulium pertinax*.

Fonte: www.sucen.sp.gov.br/doencas/simulideos.htm

Os adultos (Figura 1.12) possuem as pernas curtas e as asas longas, com corpo encurvado e de cor geralmente frisado a negro ou tons castanhos amarelados (BORROR, 1988). Os adultos podem viver na natureza de três a quatro semanas (BABA & TAKAOKA, 1991). O comportamento de orientação do adulto é inverso à da postura dos ovos, ou seja, eles voam em sentido contrário ao rio nesse período. Somente as fêmeas se alimentam de sangue e procuram localizar um animal ou humano voando do local do nascimento em busca de uma vítima para fornecer o seu alimento. Após este processo, ela voa novamente em sentido ao rio, buscando um local para depositar seus ovos e, assim, reiniciar o ciclo (WENK, 1981 apud PAIVA, 2002).



Figura 1.12: *Simulium pertinax* adulto.

Fonte: www.sucen.sp.gov.br/doencas/simulideos.htm

A Figura 1.13 mostra um esquema do ciclo evolutivo do borrachudo.

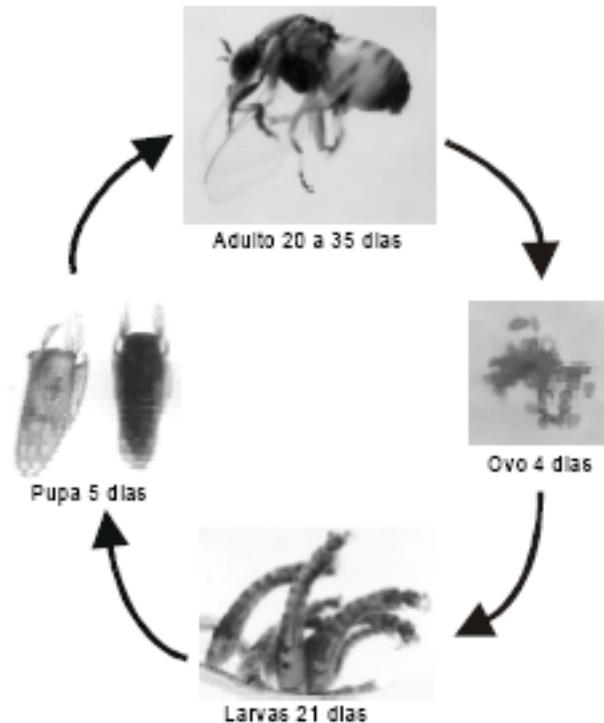


Figura 1.13: Ciclo biológico do borrachudo.

Fonte: PAIVA, 2002.

1.5 PROCESSOS DE CULTIVO DO BTI

Bti cresce em muitos meios de laboratório. Com a produção industrial em massa, altas densidades celulares foram produzidas com taxas de esporulação de mais de 90% (BERNHARD & UTZ, 1993). Segundo Dulmage (1989), é devido a mudanças nos nutrientes do meio e nas condições de cultivo que se obtém o incremento na quantidade de delta-endotoxina no meio. É importante entender que a quantidade de delta-endotoxina é independente do número de esporos. Contagens

de esporos apenas indicam o crescimento do bacilo. A única maneira de quantificar a delta-endotoxina é através de bioensaios (DULMAGE, 1989).

Já é de conhecimento geral que os microrganismos necessitam de minerais para seu crescimento e para a formação de produtos metabólicos. Existem muitos exemplos de supressão ou estimulação da formação e/ou diferenciação de metabólitos secundários pelas concentrações traço de metais que não tem efeito no crescimento vegetativo. Proteínas tóxicas das bactérias possuem muitos atributos de metabólitos secundários e suas produtividades são conhecidas por serem favoravelmente afetada por traços desses metais (ROSE, 1979). De acordo com Içgen *et al* (2002), manganês (Mn) é a chave mais importante para a co-regulação dos metabólitos secundários.

Sendo administrado em certo teor de concentração, o Mn promove a formação do cristal protéico; porém, se adicionado em altas concentrações (maiores que 10^{-3} M) promove a formação do esporo mas não da proteína. Ainda de acordo com Içgen *et al* (2002), cálcio (Ca) tem sua importância tanto na termoestabilidade dos esporos quanto no favorecimento da produção do cristal; enquanto zinco (Zn) promove um decréscimo na esporulação, porém sem nenhum efeito significativo na formação do cristal protéico. Crescimento, esporulação e síntese do cristal protéico são ambos muito efetivos quando magnésio (Mg) é adicionado ao meio e; severamente afetados na sua ausência (IÇGEN *et al*, 2002). Estes resultados são suportados também por Özkan *et al* (2002). Foda *et al* (1985), comprovou ainda a importância de sais de potássio (K) para a formação do cristal e tamponamento do meio.

Nos cultivos com Bti há a necessidade de altos níveis de carbono, nitrogênio e oxigênio. Com o aumento da concentração de carbono aumenta a biomassa e a quantidade de cristal, mas não interfere nas atividades biológicas. Já a mudança da fonte de carbono propicia alterações nas velocidades de formação de toxinas e mudanças nas principais características bioativas do Bti (LIMA, 2001). Para a produção de Bti fatores como viabilidade e preço são importantes para a seleção de um meio de produção em massa. Por isso, substratos como farelo de soja, água de maceração de milho (milhocina), melão, farelo de semente de algodão, farelo de feijão, caseína, farinha de peixe e água de esgoto são utilizados (BERNHARD & UTZ, 1993). Segundo Bernhard (1993), o *Bacillus thuringiensis* tem seu crescimento ocorrendo na faixa de pH entre 5,5 a

8,5, sendo a faixa ótima entre 6,5 e 7,5. A temperatura ideal para o crescimento de Bti é entre 26°C e 37°C (LIMA, 2001), tendo a capacidade de crescer numa faixa de 15°C até 45°C .

Existem relatos de processos de cultivo em batelada e contínuo, que obtiveram altas concentrações celulares, porém nem tão altas concentrações de esporos (KANG, 1992). Uma maneira razoável de incrementar a produção de esporos é encontrar altas concentrações celulares. Culturas em batelada alimentada têm se mostrado efetivas para os processos nos quais é necessário evitar efeitos pela inibição do substrato e repressão catabólica. Também são adequados para os processos em que a produção celular exige alta demanda de oxigênio (MIGNONE & ROSSA, 1992). Além disso, possibilitam a operação do fermentado por longos períodos (às vezes, alguns meses) sem que seja necessária preparação de novo inóculo; o aumento da produtividade do reator apenas modificando-se o cronograma de trabalho, e ainda, uma vez conhecidas as melhores condições de operação, conseguir produtividade significativamente maior do que a obtida em processo descontínuo (BORZANI, 2001).

Um outro processo que vêm sendo bastante explorado é o processo de cultivo em estado sólido (CES), que é o processo de cultivo no qual o microrganismo cresce na ausência de água livre no meio de cultura. Água livre é a água não absorvida pelo substrato sólido devido à sua saturação, sendo, portanto, mais uma função do poder de absorção deste do que do conteúdo de umidade contido no meio. Para a maioria dos substratos, a presença de água livre é evidente quando alcançado um teor de 80% de umidade (HESSELTINE, 1972; LONSANE *et al*, 1985).

Conforme Cannel & Moo-Young (1980), o processo CES apresenta uma série de características extremamente interessantes e vantajosas, quando comparado com o clássico processo de cultivo submerso (CS): redução do volume de meio por massa de substratos sem perda no rendimento do produto, com conseqüente redução do espaço ocupado pelo equipamento, composições dos meios de fermentação normalmente simples, baixo consumo de energia, baixo custo das instalações e tratamentos finais simplificados. Contudo, há a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo, pouca disponibilidade de dados de

engenharia para ampliação de escala e difícil acompanhamento e controle do processo de cultivo devido à heterogeneidade da massa sólida.

Alguns aspectos devem ser observados no CES, como a atividade de água, pH e o número de esporos para um bom andamento do processo em biorreatores. Segundo Schmidell (2001), as bactérias se desenvolvem em valores para atividade de água de 0,9. A atividade de água (A_w) consiste na quantidade de água não ligada que está disponível ao microrganismo. A atividade de água influencia diretamente no desenvolvimento microbiano e em processos bioquímicos.

Segundo Arruda & Moraes (2002), todos os processos de cultivo em estado sólido compreendem, essencialmente, as mesmas operações unitárias. Em todos os casos, se requer uma seleção cuidadosa das matérias-primas a utilizar, um ou vários tratamentos prévios do substrato, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita, o controle da mesma, a separação e, em alguns casos, a purificação dos produtos que se deseja.

1.5.1 Efeito do oxigênio dissolvido sobre o crescimento de Bti e produção de delta-endotoxina

Segundo Ignatenko *et al* (1983), a taxa de aeração exerce uma considerável influência no crescimento e desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. O aumento da taxa de aeração é acompanhado por um incremento na quantidade de biomassa e de esporos. Porém, um excesso desta taxa leva a uma baixa viabilidade de esporos e a um desenvolvimento prematuro da lise celular. Por isso, grandes prejuízos na produção e comercialização do produto podem ocorrer se este parâmetro não for adequadamente monitorado.

Para Avignone-Rosa *et al*, em seu artigo sobre crescimento e esporulação do *Bacillus thuringiensis* e produção de delta-endotoxina em culturas de oxigênio limitado e não limitado, de 1992, no estudo de culturas sem limitação de oxigênio, a produção de toxinas e a contagem de esporos foram constantes para toda a taxa de transferência de oxigênio. Em contrapartida, na limitação deste nutriente, tanto a concentração de delta-endotoxina como a contagem de esporos foram menores,

portanto, foi sugerido que o mecanismo de síntese de toxina pode ter sido afetado com o emprego deste método com conseqüente decréscimo do rendimento em delta-endotoxina.

De acordo com Sarrafzadeh & Navarro (2005), em seu trabalho sobre o efeito do oxigênio na esporulação, síntese de delta-endotoxina e toxicidade do *Bacillus thuringiensis* H14, cultivado em processo de batelada alimentada onde foram avaliados quatro diferentes taxas de transferência de oxigênio (0, 20, 100 e 250mmol/L⁻¹h⁻¹) sendo que o total de células que formaram esporos nestas taxas foi de 100, 93, 84 e 48%, respectivamente. A maior taxa de esporulação foi observada na ausência de oxigênio e os esporos maduros foram a única população presente nestas condições no final da cultura. Durante oxigenação saturada, a esporulação falhou em uma grande porção de células e também estavam presentes no final da cultura esporos maduros ou células vegetativas. Em condições intermediárias, podiam ser observadas no final da cultura, células em diferentes estágios fisiológicos. Foi descoberto que as condições ótimas para rendimento de esporos e delta-endotoxinas não eram os mesmos, mesmo que esporulação e formação de delta-endotoxina ocorram simultaneamente durante o processo de cultivo. A delta-endotoxina 130-kDa parece ser a mais sensível nas condições de aeração. A maior toxicidade contra *Culex pipiens* (mosquito) foi obtida durante condições de saturação.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

Ao longo deste capítulo faz-se uma abordagem sintética sobre a metodologia utilizada para a obtenção dos dados experimentais apresentados nesta dissertação de mestrado. Foram realizados dez experimentos de cultivo microbiano. Desses, dois foram conduzidos em processo descontínuo submerso, cinco foram conduzidos em processo semicontínuo submerso e três em processos integrados (combinação de cultivo submerso e em estado sólido). Neste trabalho, todos os experimentos constituiram-se de processos fermentativos, ou seja, fermentação descontínua (DESC), fermentação semicontínua (FSC) e fermentação com processos integrados (FPI), respectivamente a cada um dos cultivos mencionados anteriormente. As condições gerais e as especificações destes processos estão descritas a seguir.

2.1 MICRORGANISMO

Em todos os experimentos, foi utilizada a cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82, sorotipo H-14, mundialmente utilizada para a produção de bioinseticidas. Esta cepa foi gentilmente cedida pela Universidade de Caxias do Sul - RS.

2.1.1 Manutenção e conservação da cepa

A cepa foi recebida em tudo de ensaio (cultivo de profundidade em meio sólido – agar nutriente) e ativada em meio líquido de cultivo (meio LB), em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica (B.BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT U) na temperatura de 30°C durante 15h. Após este período, a suspensão bacteriana foi empregada para inocular novos tubos de ensaio contendo meio NYSM em agar inclinado (cultivo de superfície, 30°C/48h). Em seguida, os tubos foram conduzidos ao refrigerador (temperatura 4-6°C) onde permaneciam por um período máximo de estocagem de 30 dias. Periodicamente, novos procedimentos de ativação e cultivo foram realizados para a manutenção do microrganismo, conforme descrito anteriormente. Durante o período de estocagem, o microrganismo foi utilizado como pré-inóculo a partir de sua reativação no meio LB.

2.2 MEIOS DE CULTIVO

2.2.1 Meio LB (em g/L), para ativação da cepa

NaCl, 10,0; peptona de carne, 10,0; extrato de levedura, 5,0. O mesmo meio, acrescido de 20,0g/L de agar-agar, foi utilizado para a determinação da concentração de esporos durante os ensaios em biorreatores.

2.2.2 Meio de cultivo para o preparo dos inóculos e ensaios em biorreatores em cultivo submerso

Foi utilizado o meio de cultura proposto por Saar *et al* (1996) constituído de (em g/L): glicose, 20,0; farelo de soja moído, 40,0; água de maceração de milho, 20,0; KH_2PO_4 , 3,0; K_2HPO_4 , 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,40; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,03. A glicose foi esterilizada separadamente e após resfriamento foi misturada aos demais constituintes do meio de cultivo. Este procedimento foi realizado visando evitar a reação de Maillard (Anexo 2) com conseqüente alteração química da mistura presente no meio.

2.2.3 Meio de cultivo para ensaios de fermentação em estado sólido

Foi utilizado o meio de cultura contendo 160 gramas de cascas de banana “*in natura*”, 25 gramas de bagaço de cana-de-açúcar (sem fibra) e 0,2 gramas de NaOH (para correção do pH), conforme definido por Jesus (2006).

2.2.4 Esterilização dos meios de cultivo

Os meios de cultivo descritos nos itens 2.2.1 e 2.2.2 foram esterilizados em autoclave elétrica (QUIMIS, Q-190-22) a 121°C, durante 20 minutos. O meio de cultivo descrito em 2.2.3 foi esterilizado em autoclave a gás (PHOENIX, modelo AV 137) a 121°C em duas sessões de 1 hora, com intervalo de 24 horas entre elas (JESUS, 2006).

2.3 ENSAIOS EM BIORREATORES

Conforme citado anteriormente, os ensaios de fermentação foram realizados em três tipos de processos: processo descontínuo submerso (DESC), processo semicontínuo submerso (FSC) e processo integrado (FPI) envolvendo os processos (DESC) e fermentação em estado sólido (FES).

2.3.1 Fermentação submersa em processo (DESC) e (FSC)

2.3.1.1 Preparo do pré-inóculo

O preparo do pré-inóculo foi feito a partir da cepa conservada em refrigerador conforme descrito em 2.1.1. O microrganismo foi reativado por transferência direta com alça de platina em frascos de Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio LB. Os frascos foram vedados com rodilhão de algodão com gaze e incubados em estufa bacteriológica (B.BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT U) à temperatura de 30°C, durante 15 horas sem agitação.

2.3.1.2 Preparo do Inóculo

Frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL de meio de cultivo proposto por SAAR *et al* (1996), definido no item 2.2.3, e vedados com rodilhão de algodão com gaze, foram inoculados com 5% (v/v) da suspensão microbiana obtida na etapa anterior (pré-inóculo). A incubação foi feita em estufa bacteriológica (B.BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT U) com frequência de agitação de movimento recíproco de 110min⁻¹ e com temperatura de incubação de 30°C durante 7 horas.

O volume do inóculo empregado nos processos DESC e FSC correspondeu a 5% do volume de trabalho do biorreator, conforme proposto por Berbert-Molina (1998) e Passos (2000).

2.3.1.3 Condições gerais de fermentação no processo FSC e DESC

Os ensaios em processo de cultivo FSC foram realizados em dois biorreatores B. BRAUN BIOTECH modelo BIostat B. Um biorreator (B1) com dorna de volume útil de 2,0L, onde foram desenvolvidos os cultivos até o momento dos cortes, e outro biorreator (B2) com dorna de volume útil de 0,250L onde foram complementados os processos de esporulação do microrganismo em cultivo. Os ensaios em processo de cultivo DESC foram realizados no mesmo equipamento e nas mesmas condições descritas neste item utilizando o biorreator B1, durante 30 horas de processo.

O biorreator B1 constitui-se de uma dorna de vidro de parede dupla (camisa) e tampa em aço inoxidável. O sistema incluía as instalações necessárias para o controle e monitoramento de pH, temperatura, agitação, vazão e concentração de gases, nível de espuma e volume de base adicionada. O monitoramento de alguns destes parâmetros foi auxiliado pela utilização de eletrodos específicos. A dispersão do ar dentro da dorna foi feita por um anel perfurado, instalado abaixo da extremidade do eixo central do agitador, a 20mm do fundo da cuba. Ao longo deste eixo foram instaladas três turbinas Rushton, de 50mm de diâmetro, com seis pás planas, separadas por uma distância de 2cm entre si. Na tampa da dorna, através de entradas especiais, foram fixados os eletrodos de pH, temperatura e oxigênio dissolvido. Tanto a sonda de pH como o eletrodo de oxigênio dissolvido foram previamente calibrados antes do início dos ensaios de fermentação (inoculação do meio de cultivo).

O biorreator B2 constitui-se de uma dorna de vidro de parede dupla (camisa) e tampa em aço inoxidável. O sistema incluía as instalações necessárias para o controle e monitoramento temperatura, vazão e concentração de gases. O monitoramento de alguns destes parâmetros foi auxiliado pela utilização de eletrodos específicos. A dispersão do ar dentro da dorna foi feita por um filtro de aço sinterizado, instalado abaixo da extremidade do eixo central do agitador, a 20mm do fundo da cuba. Ao longo deste eixo situava-se uma turbina composta de quatro lâminas em ângulos de 45°. Na tampa da dorna, através de entradas especiais,

fixavam-se os eletrodos de temperatura e oxigênio dissolvido. Antes de cada ensaio foi calibrada a sonda de oxigênio dissolvido.

Os cortes dos ensaios foram de 80, 60, 40 e 20% do volume de trabalho do biorreator, identificados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Dados gerais dos ensaios experimentados.

Nome do Ensaio	Volume de trabalho (mL)	Volume cortado	Tempo médio de corte (h)	Número de cortes em cada experimento
FSC80	1500	1200mL (80%)	10	4
FSC60	1500	900mL (60%)	8	4
FSC40	1500	600mL (40%)	6	4
FSC20	1500	300mL (20%)	4	4

Os primeiros cortes foram realizados sempre que a concentração de açúcares redutores totais no meio atingia a concentração aproximada de 5g/L (aproximadamente 14 horas de fermentação). Os cortes seguintes também seguiram esse padrão de concentração, porém com tempos diferentes de acordo com o corte realizado. Uma bomba peristáltica retirava o volume correspondente ao corte em cada ensaio e então, após esta retirada adicionou-se novo meio de cultivo com concentração de nutrientes referente ao volume de meio retirado. Uma parte do volume de meio retirado era colocado no biorreator B2 para maturação dos esporos.

A Figura 2.1 mostra o diagrama esquemático do experimento para produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, em processo de cultivo semicontínuo com posterior maturação de esporos em processo descontínuo simples.

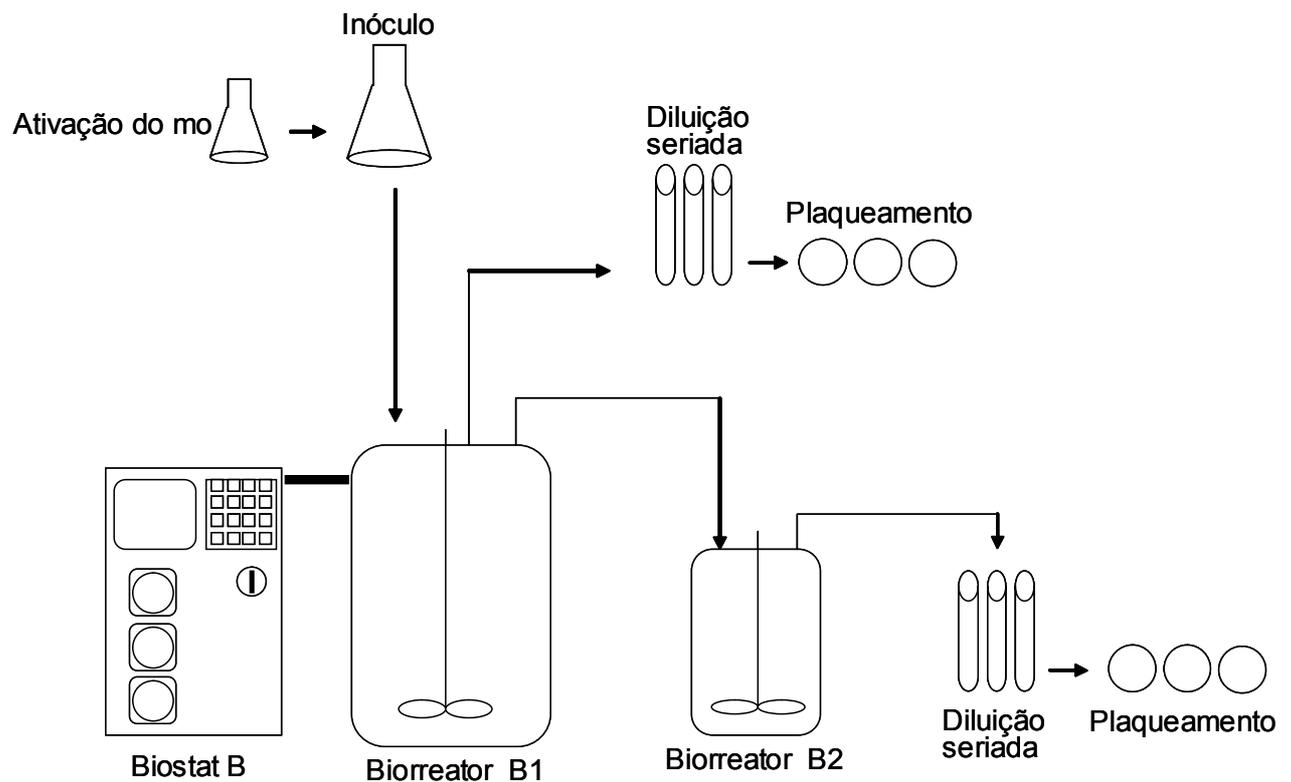


Figura 2.1: Diagrama esquemático da produção de esporos em regime semicontínuo e posterior maturação de esporos em regime descontínuo simples.

As condições gerais de fermentação são resumidas a seguir:

- a) pH: o pH foi controlado em 7,0 (set-point) apenas no biorreator B1 através da unidade controladora (CPU) do equipamento pela adição de solução alcalina KOH 5M. Durante esta etapa de cultivo (crescimento microbiano com disponibilidade de glicose no meio de cultivo) não foi necessário o emprego de ácido para o controle.
- b) Uso do antiespumante: o controle da espuma produzida durante o processo fermentativo foi realizado com a adição do antiespumante Polipropilenoglicol 2000 (PEG 2000). Esta adição foi feita manualmente através de uma seringa estéril, fixada em um septo em uma das entradas da tampa do biorreator. Este componente evita a perda do experimento pelo excesso da formação de espuma, o que é comum em um meio contendo alta quantidade de proteínas. Assim como o pH, esse controle só foi empregado no biorreator B1.

- c) Temperatura: a temperatura nos dois biorreatores (B1 e B2) foi fixada em 30°C e controlada automaticamente com o auxílio de uma unidade de banho termostático (MGW LAUDA modelo RC20) em B1 e B.BRAUN Thermomix Me em B2 que circulavam água pela camisa dos respectivos biorreatores.
- d) Aeração: a aeração tanto em B1 como em B2 foi fixada em 0,5vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Em B1, a frequência inicial do agitador foi de 450min⁻¹. Essa frequência foi ajustada a valores superiores pela CPU do biorreator toda vez que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo atingisse valores inferiores a 10% da saturação, de forma a manter os níveis de oxigênio dissolvido acima deste limite de concentração, a fim de impedir que o crescimento fosse interrompido pela falta deste nutriente. Em B2, a agitação foi realizada com o auxílio de uma chapa de agitação (IKA Labortechnik modelo IKAMAG RET) que garantia a frequência do agitador em 600min⁻¹. Assim como em B1 essa frequência também foi ajustada a valores superiores (de forma manual) toda vez que a concentração de oxigênio atingisse valores inferiores a 10% da saturação.

2.3.1.4 Esterilização do biorreator

Apenas os cultivos realizados no biorreator B1 foram precedidos de esterilização do equipamento.

O processo de esterilização do biorreator B1 foi feito sempre no dia de início do experimento. A cuba do biorreator foi untada com 500µL de antiespumante, em seguida foi adicionado o meio de cultivo até um volume de 1,175L, visto que o volume restante para completar o volume de trabalho de 1,5L provinha da glicose (0,250L) que era esterilizada em separado e do inóculo (0,075L). A tampa com condensador, filtro de ar, sondas para controle de pH, temperatura e oxigênio dissolvido e as tubulações de silicone para entrada/retirada de meio, entrada de inóculo, entrada de base e entrada/retirada de amostras foram colocadas sobre a cuba e vedadas com pinos de aço fixa. Os orifícios da tampa não utilizados foram selados com pinos e com parafusos de aço. A esterilização do biorreator foi feita em autoclave a gás (PHOENIX modelo AV 137) a 121°C durante 20 minutos.

2.3.1.5 Calibração do eletrodo de pH

A calibração do eletrodo de pH (METLER-TOLEDO modelo A25998), para uso no biorreator B1, foi feita antes da esterilização e refeita a cada novo experimento. Os valores padrões de referência (6,86 e 4,01) foram fixados na unidade controladora. No biorreator B2 a calibração da sonda de pH (METLER-TOLEDO modelo K8S/120) foi feita sempre antes da primeira introdução de meio retirado do biorreator B1.

2.3.1.6 Calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido

Para a medição do oxigênio dissolvido no biorreator B1 foi empregado um eletrodo polarográfico (METLER-TOLEDO) calibrado antes e após a esterilização do biorreator. Antes da esterilização, o eletrodo foi calibrado com água e após a esterilização, o eletrodo foi calibrado com o meio de cultivo completo (com a glicose) e com frequência do agitador, temperatura e pH iniciais já ajustados. A vazão de trabalho inicial de 0,5 vvm foi controlada manualmente através de um botão de ajuste na CPU. Para a calibração, primeiramente introduziu-se nitrogênio no biorreator e monitorou-se o sistema até que o valor de oxigênio dissolvido alcançasse o zero da escala em porcentagem da concentração de saturação. Então, na CPU foi registrado que o valor medido pelo eletrodo no momento correspondia a 0% de oxigênio dissolvido. Em seguida, foi introduzido ar comprimido no biorreator até a leitura na CPU estabilizar. Neste ponto foi registrado na CPU este novo valor de referência como 100% de oxigênio dissolvido. No biorreator B2, o mesmo procedimento foi adotado.

2.3.2 Processo de fermentação em estado sólido (FES)

2.3.2.1 Preparo do Inóculo

Foi testado inóculo proveniente de suspensão microbiana no cultivo descontínuo em processo submerso no tempo de fermentação de aproximadamente 16 horas, correspondente a uma concentração de glicose de 5g/L no meio de cultivo: (N) suspensão microbiana diretamente retirada da dorna de fermentação, (N2) suspensão microbiana concentrada duas vezes e por último a (N4) suspensão microbiana concentrada quatro vezes. Para a concentração dos inóculos foi utilizada uma centrífuga da marca SIGMA modelo 4K10. Todos os biorreatores do processo FES foram inoculados com 10mL do inóculo independentemente do tipo de inóculo testado N, N2 ou N4.

2.3.2.2 Preparo dos biorreatores no processo FES

Foram empregados como reatores pacotes de polipropileno, autoclaváveis, com 22,5cm de largura e 26,0cm de comprimento, com capacidade volumétrica de 1 litro. Como substratos foram empregados 160 gramas de cascas de banana “in natura” picadas, 25 gramas de bagaço de cana-de-açúcar (sem fibra) e 0,2 gramas de NaOH (para correção pH), conforme definido por Jesus (2006). Após acondicionamento do substrato, os biorreatores foram fechados com fita adesiva e conduzidos ao tratamento térmico (pasteurização) por 1 hora. Posteriormente foram conduzidos a esterilização que foi realizada em autoclave a gás (PHOENIX modelo AV 137) a 121°C por duas sessões de 1 hora com intervalo de 24 horas entre elas. Os biorreatores esterilizados foram acondicionados em cabine de fluxo laminar e, após atingirem temperatura ambiente, foram inoculados de acordo com o tipo de inóculo a ser testado (item 2.3.2.1). Após a inoculação e homogeneização manual dos reatores, estes foram incubados em uma Câmara de Germinação Biológica (CGB) com temperatura controlada em 30°C por nove dias. O pH final das amostras,

após as correções necessárias, fica entre 6,0 a 7,5, e a atividade de água (A_w) de 0,980 a 0,995.

2.3.2.3 Atividade de água (A_w)

A atividade de água foi determinada no equipamento NOVASINA RTD – 400, no qual cinco gramas do resíduo foram colocadas em um recipiente de polipropileno especial para o medidor de atividade de água, sendo em seguida acondicionado dentro do equipamento, fechado e após o tempo de medição (que varia de acordo com o material), foi anotado o valor correspondente à atividade de água do material analisado. Este equipamento foi previamente calibrado com diferentes padrões com atividade de água conhecidas.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Amostragem e preparo das amostras em cultivo submerso

A amostragem no biorreator B1 (FSC e DESC) consistiu na retirada de uma alíquota do meio em fermentação de um septo de silicone conectado a um sistema de recirculação do meio. Este sistema foi constituído de um tubo e aço inoxidável localizado na tampa da dorna, cujo ponto de sucção foi fixado próximo do fundo da dorna. A este tubo foi conectada uma mangueira de silicone por onde recirculava o meio, comandado por uma bomba peristáltica. Antes da retirada da amostra, o meio de fermentação recirculava por esta via por cerca de um minuto a fim de eliminar possíveis resíduos de amostras anteriores. A amostra foi sempre de 4mL e foi retirada por meio de uma agulha e seringa estéreis. As amostragens foram feitas no tempo de cultivo zero (isto é, logo após a inoculação) e a partir deste momento de duas em duas horas. Cinquenta por cento do volume amostrado foi utilizado para a

determinação da concentração de açúcares redutores totais (item 2.4.3) e o restante para a determinação da concentração de esporos (item 2.4.4).

No biorreator B2 a amostra foi retirada da mesma maneira que em B1 exceto que para a determinação da concentração de esporos foi retirada amostra somente após o esgotamento da fonte de carbono (concentração de açúcares redutores totais aproximadamente igual a zero). O volume retirado foi de 2mL.

As variações morfológicas das células, como tamanho, agrupamento aos pares ou em cadeias curtas, formação de grumos, presença de inclusões e formação de esporos ocorridas ao longo do processo de cultivo, foram observadas a cada retirada de amostra, através de lâminas a fresco do material coletado. Essas observações foram feitas em microscópio óptico, modelo NIKON YS2-T, com ampliação de 1000 vezes. A presença de microrganismos contaminantes também foi observada.

2.4.2 Amostragem e preparo das amostras em cultivo sólido

De cada ensaio de fermentação retirou-se uma amostra inicial e uma amostra final, para a determinação do pH e contagem de esporos. Cada biorreator constituiu uma amostra. Após a homogeneização manual do biorreator toda a sua massa foi transferida para um Becker de 1000mL onde foram adicionados 500mL de água esterilizada para solubilização. A mistura foi mantida sob agitação constante (em agitadores magnéticos), à temperatura ambiente, durante 30 minutos, sendo então retiradas alíquotas para determinação da concentração de esporos (2mL de amostra) e de pH (10mL de amostra). Todas as retiradas de alíquotas foram realizadas dentro da Câmara de Segurança Biológica (CSB). A leitura de pH foi realizada em pHmetro de bancada modelo Quimis Q-400M2. A determinação da concentração de esporos foi realizada a partir do método da contagem do número de unidades formadoras de colônias, conforme descrito no item 2.4.4.

2.4.3 Determinação da concentração de açúcares redutores

Dois mililitros de amostra foram centrifugados a 18000g, durante 10 minutos, em centrífuga BLB EPPENDORF 5415C. A partir do sobrenadante foi determinada a concentração de açúcares redutores totais (ART) pelo método DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico – (MILLER, 1959). Neste método, os açúcares redutores podem ser detectados ou determinados quantitativamente com base em sua oxidação. Os grupos aldeído são oxidados a grupos carboxílicos, em presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. O ácido 3,5 dinitrosalicílico (agente oxidante) é, por sua vez, reduzido à ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, que apresenta coloração amarelada. A intensidade da coloração, medida a 540nm, é proporcional à concentração de açúcar redutor na amostra. A reação que descreve o princípio do método é a seguinte:

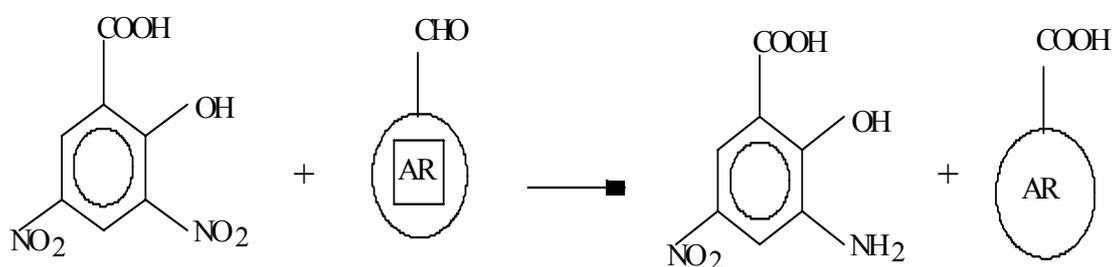


Figura 2.2: Redução do ácido 3,5 – dinitrosalicílico pelo açúcar redutor (AR), em meio alcalino

A seqüência analítica empregada foi aquela indicada por Miller (1959): 0,5mL do reagente DNS foram adicionados a 0,5mL de amostra em um tubo de ensaio de 20mL e mantidas em banho-maria a 100° C durante 5 minutos. Imediatamente após este período a reação foi interrompida através de choque térmico resfriando-se a mistura em água com gelo. Em seguida, foram adicionados 5mL de água destilada e, após homogeneização procedeu-se a leitura da absorbância da solução a 540nm, em espectrofotômetro LKB modelo Novaspec II. Esta análise foi sempre realizada

com, no mínimo, dez tubos de ensaios por lote. Para cada lote, uma curva de calibração foi construída, conforme exemplificado no Anexo 6. Como padrão dessas curvas foram empregadas soluções de glicose com concentração variando de 0,1 a 1,0g.L⁻¹.

2.4.4 Determinação da concentração de esporos

A determinação do número mais provável de esporos foi feita segundo metodologia descrita por Passos (2000).

Uma alíquota de 2mL de amostra do meio de cultivo (previamente tratada para o caso do processo FES conforme descrito no item 2.4.2) foi colocada em um tubo de Eppendorf contendo 10 “pérolas” de vidro, com diâmetro médio de 1mm; seguido de agitação recíproca de 200min⁻¹ por 10 minutos em um moinho de pérolas (Retsch MM2), para dissolução de grumos e homogeneização da amostra. A amostra homogeneizada foi então submetida a um choque térmico a 80°C por 10 minutos e, logo após, colocada em um banho de gelo por 1 minuto, a fim de eliminar eventuais células vegetativas. Dessa amostra tratada, foi retirado para cada análise da concentração de esporos (repetições) 1mL da mistura sob constante agitação para homogeneização.

O volume amostrado foi adicionado a tubos de ensaio de 25mL contendo 9mL de uma solução salina (NaCl) a 0,9% m/m (previamente esterilizados) e, após homogeneização em agitador Vortex, retirou-se 1mL da mistura resultante e novo procedimento de diluição foi realizado nas mesmas condições da anterior. Essa diluição seriada foi realizada até atingir um número provável de esporos de no máximo 300 unidades por placa.

Frações de 100µL das diluições seriadas selecionadas foram inoculadas em placas de Petri, adicionando-se a seguir o meio LB para plaqueamento. As placas foram cuidadosamente agitadas a fim de homogeneizar a amostra com o meio de cultivo. As placas inoculadas foram então seladas com papel filme, invertidas e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Todas as contagens foram realizadas no mínimo em triplicata. Uma primeira contagem das colônias formadas nas três placas

foi realizada após 12 horas de incubação. Após 24 horas de incubação, foi realizada uma segunda contagem para confirmação.

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro de meio (UFC/mL) para o caso do processo FSC e DESC ou por quilograma de massa seca de meio (UFC/kg) para o processo FES. As determinações de UFC/mL para o caso dos processos FSC foram obtidas multiplicando-se o número médio de colônias encontrado na triplicata pelo fator de diluição respectivo no todo de onde foram retirados os 100 μ L para o plaqueamento e dividindo-se o resultado obtido pelo volume de amostra original (1mL). Os valores do número mais provável de esporos para o processo FES foram obtidos, multiplicando-se o número médio de colônias encontradas com as três placas por (a) fator de diluição correspondente, na diluição seriada, (b) 500 (volume de água em mL com a qual a massa de meio sólido do biorreator foi diluído) e dividindo-se o resultado obtido pelo valor correspondente à quantidade de massa seca em quilograma contida no biorreator (determinação através de método gravimétrico descrito no item 2.4.5). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias comparadas através do teste de Tukey com α : 0,05.

2.4.5 Determinação da massa seca do meio de cultivo no processo FES

Em cadinhos de porcelana de massas conhecidas, previamente secos em estufa, foram acrescentadas porções conhecidas de massa úmida das amostras e depois foram conduzidos para estufa a 100°C até massa constante, aproximadamente 24 horas. Após resfriamento do material à temperatura ambiente em dessecadores, determinaram-se os valores de massa seca das amostras.

2.4.6 Determinação da atividade larvicida

As determinações da atividade larvicida dos produtos finais obtidos nos processos fermentativos experimentados foram feitas através de testes biológicos

denominados bioensaios. Os bioensaios foram realizados com larvas de 4º instar inicial do organismo *Aedes albopictus*. Os ovos desse organismo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da UFSC – Professor Carlos Pinto.

O método utilizado para os bioensaios foi baseado no método proposto por Draft (1999) descrito em Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Os ovos recebidos da UFSC foram acondicionados em bandejas contendo água desclorada e ração para peixe, e mantidos em sala climatizada em 28°C com fotoperíodo de 12 horas até a eclosão. Em seguida, as larvas recém eclodidas foram transferidas para outra bandeja até atingirem o estágio de crescimento de 4º instar inicial.

As larvas de 4º instar foram coletadas com auxílio de micropeneira com malha de 1mm, e transferidas para copos de polietileno circular transparente de 11cm de diâmetro e 7cm de profundidade, abastecidos com 100mL de água destilada. Cada copo recebeu 25 larvas. Em cada um destes copos foram adicionados os bioinseticidas e serem testados em cinco diferentes concentrações, além da testemunha. Para cada produto analisado foram montados três repetições da série de diluições a serem testadas, totalizando cinco repetições por cada concentração de produto em dias diferentes para análise.

A leitura da atividade larvicida do bioinseticida em questão foi realizada 24 horas após a adição do produto no respectivo copo quantificando-se as larvas vivas, e determinando-se número de imaturos mortos. As pupas que eventualmente se formassem nesse período foram descontadas da análise. A análise empregada foi a de Probit (internacionalmente recomendada para bioensaio) baseada na resposta binária com o seguinte modelo matemático: $P_i = F(\alpha + \beta x_i)$, onde P_i significa probabilidade da resposta; $x_i = \log$ dose, α e β = parâmetros e F = função de distribuição acumulada (Haddad, 1998). Através do Probit determinou-se a concentração letal de 50% da população em análise (LC_{50}) para comparar a eficácia dos produtos nas diversas formas de condução de processo.

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE ESPOROS POR PROCESSO DE CULTIVO DESCONTÍNUO E SEMICONTÍNUO

Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* são os mais comumente usados e mais extensamente estudados em processo submerso descontínuo (DESC). Buscando tornar estes materiais mais competitivos e, desta forma, com aplicabilidade mais ampla na sociedade, foram realizados estudos de produção deste bioinseticida em processo de cultivo semicontínuo (FSC).

Tendo em vista este último tipo de processo, o objetivo principal deste capítulo foi incrementar a densidade celular e o amadurecimento dos esporos bem como atingir altos índices de biotoxina, o qual foi comparado com o processo de

cultivo DESC proposto por vários autores. Para tanto, foram realizados os cultivos DESC e FSC com a bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14 em biorreator para obtenção de altas densidades celulares e posterior amadurecimento dos esporos em um segundo biorreator, para o caso do processo FSC. Foi testada também a influência do inóculo proveniente de um cultivo no processo descontínuo na concentração de esporos de um cultivo sólido.

3.1.1 Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em processo descontínuo (DESC)

Foram realizados ensaios de cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em processo batelada a fim de verificar estudos obtidos por outros autores utilizando meios sintéticos e complexos. O cultivo foi realizado no biorreator Biostat B da B.Braun com volume de trabalho de 1,5L. Foi utilizado meio complexo proposto por Passos (2000), constituído de farelo de soja e milhocina, acrescidos de 20g/L de glicose, além de sais inorgânicos. A temperatura de trabalho manteve-se em 30°C. Durante o cultivo de 30 horas foram feitas amostragens a cada 3 horas onde pôde-se observar o consumo de substrato e concentração de esporos, bem como o comportamento de aeração e a variação do pH. A Figura 3.1 apresenta os valores de açúcares redutores totais (ART) e logaritmo da concentração de esporos ($\log X_e$) obtidos do cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em processo descontínuo simples denominado de DESC.

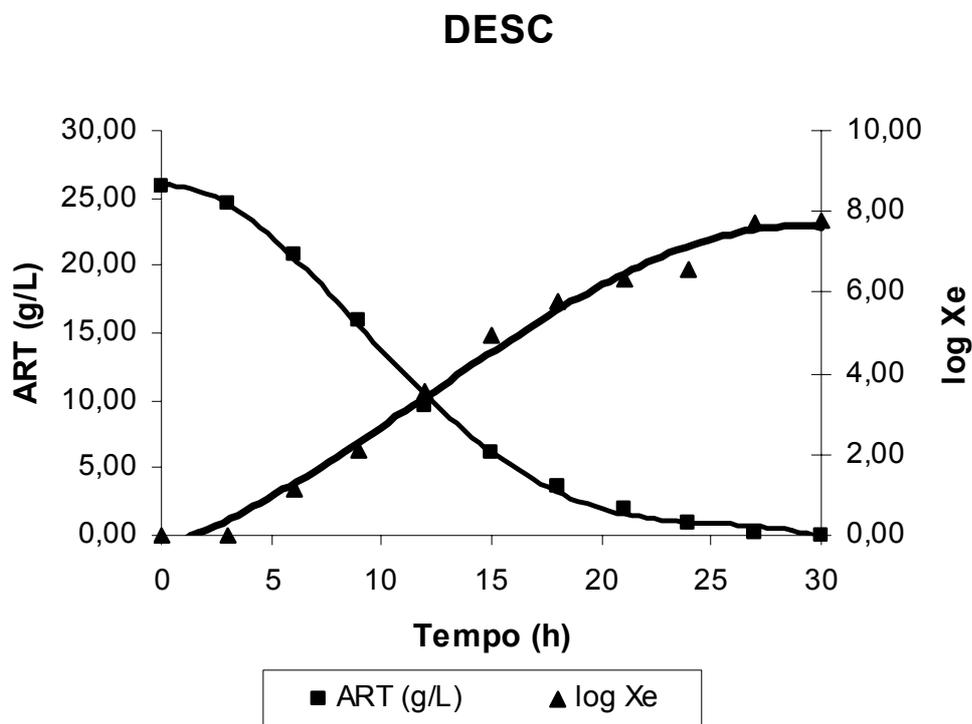


Figura 3.1: Concentração de ART (g/L) e logaritmo da concentração de esporos (log Xe) em função do tempo em processo de cultivo descontínuo simples DESC.

Conforme pode ser observado na Figura 3.1, a concentração de açúcar redutor (25,84g/L) no início do cultivo foi maior que a concentração inicial de glicose pretendida (20,00g/L). Esta diferença foi devida à existência desse substrato nos nutrientes milhocina e farelo de soja, posteriormente identificado e determinado em 5,84g/L a contribuição no meio. O microorganismo consumiu todo o açúcar redutor durante o processo de cultivo. A velocidade média de consumo de substrato durante as 30 horas de cultivo foi de 0,86g/L/h. Porém, verificando-se as primeiras 15 horas de cultivo a velocidade média de consumo de substrato foi de 1,31g/L/h, sugerindo um intenso consumo de açúcares pelo microorganismo que estava em plena fase de crescimento. Contudo nas 15 horas finais, o valor desta média decaiu para 0,41g/L/h, indicando que o microorganismo entrou em outra fase do ciclo celular (fase de esporulação).

Durante o consumo de açúcares houve formação de esporos de maneira exponencial entre nove ($1,25 \times 10^1$ UFC/mL) e vinte e sete ($3,56 \times 10^6$ UFC/mL) horas de cultivo. Ocorreu produção de esporos neste período a partir do momento em que a concentração de açúcares redutores presente no meio estava em 20g/L. Não foi possível verificar dentro do tempo de cultivo o consumo de açúcares vindo do material amiláceo.

Comportamento semelhante foi descrito por Berbert-Molina (1998) que desenvolveu estudos de cinética de crescimento celular realizados com *B. thuringiensis israelensis* em meio sintético com concentração inicial de glicose 30,8g/L e temperatura de cultivo 30°C. A autora observou que a fase compreendida entre 1-3 horas é aquela de crescimento vegetativo onde existe alta motilidade celular, de 5-13 horas ocorre diminuição da velocidade de crescimento. A formação dos esporos ocorre por volta de 13-18 horas e nas horas finais (18-24 horas) acontece a completa maturação (fase em que os esporos estão bem formados e que 90% das células estão em forma de esporos) dos esporos. Neste estudo, o início da formação dos esporos ocorreu em cerca de nove horas de cultivo, quatro horas antes do tempo observado por Berbert-Molina (1998) e uma completa maturação dos esporos por volta de vinte e sete horas; três horas depois do tempo observado pela autora. Estes resultados revelaram que neste trabalho um tempo maior foi gasto desde o início da formação dos esporos até a completa maturação dos mesmos. Uma das razões para tal acontecimento pode estar relacionada ao meio de cultivo utilizado no presente estudo composto de resíduos agroindustriais, ocasionando um possível desaceleramento de alguma rota metabólica do ciclo celular, ou ainda a mutação da cepa utilizada nos experimentos. Ainda assim, esta variação é aceitável visto que é no final da fase exponencial de crescimento vegetativo que se inicia a formação dos esporos.

O perfil das curvas apresentadas na Figura 3.1 é confirmado com os trabalhos realizados por Passos (2000) que utilizou o microorganismo Bti em processo de cultivo batelada, uma concentração inicial de glicose de 20,4g/L; meio composto por farelo de soja e milhocina; e temperatura de 30°C. No presente estudo, a concentração final de esporos atingida foi de $5,8 \pm 0,3 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto que Passos (2000) obteve $2,7 \times 10^7$ UFC/mL e Berbert-Molina (1998), $1,2 \times 10^6$ UFC/mL. O valor de concentração final de esporos encontrado pelo presente trabalho foi 2,1 vezes superior ao obtido por Passos (2000), o qual utilizou o mesmo meio de cultivo,

e 48,3 vezes maior ao obtido por Berbert-Molina (1998), que empregou meio sintético.

Vidyarthi *et al* (2002) em estudos com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), em meio de cultivo contendo hidrolisado de lodo de estação de tratamento atingiu valores semelhantes na contagem de esporos, na ordem de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL. Montiel (2001) alcançou valores superiores de concentração de esporos ($5,1 \times 10^8$ UFC/mL), utilizando meio de cultivo composto por 15g/L de farinha de soja e 5g/L de glicose, também com o *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Os valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) do processo descontínuo simples, também foram avaliados e estão apresentados na Figura 3.2.

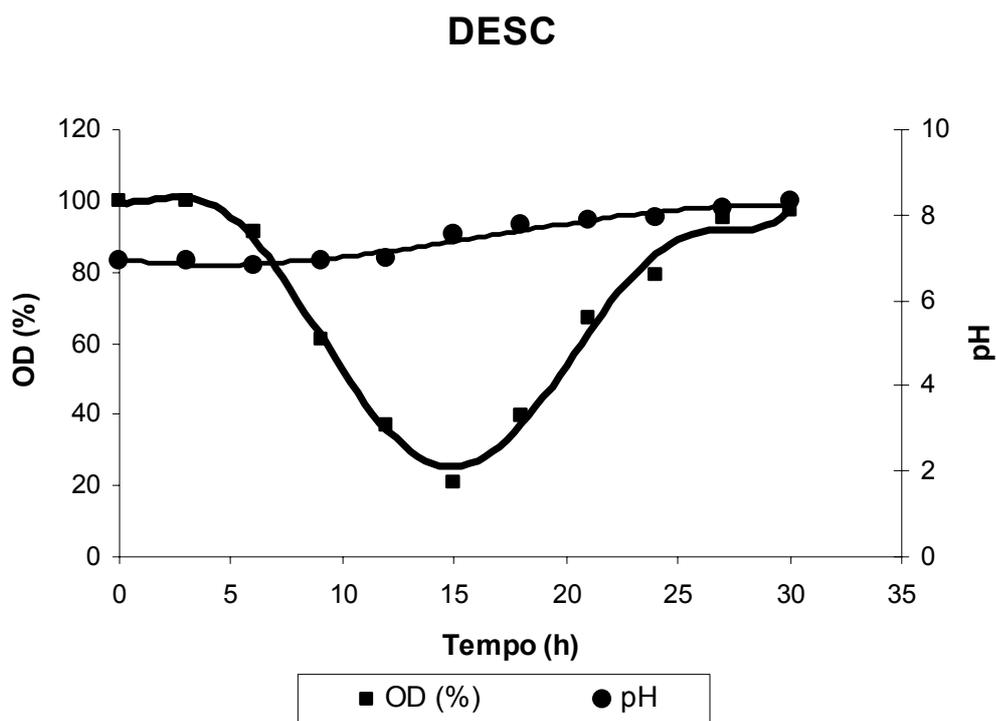


Figura 3.2: Variação do pH e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) com o tempo em processo de cultivo descontínuo simples.

O pH foi controlado automaticamente com base para permanecer em 7,0. Nas primeiras 12 horas houve uma tendência de diminuição do pH devido à formação de ácido acético que é o principal produto do metabolismo de glicose durante o

crescimento vegetativo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* verificado por Kraemer-Schafhalter *et al* (1996). Esta tendência não foi observada neste experimento, pois, foi controlada com adição de base KOH na concentração 5M. A partir deste ponto houve uma tendência de aumento do pH até 8,3 que não foi controlado.

O comportamento da curva de OD foi característico deste tipo de cultivo, de 3-15 horas houve uma forte queda na concentração de oxigênio dissolvido indicando um alto consumo de oxigênio utilizado para o crescimento celular. Neste período há também uma alta velocidade de consumo de ART (Figura 3.1) e uma tendência de abaixamento do pH (Figura 3.2) que é controlado em 7,0. A partir do tempo de 15 horas, com a concentração de substrato (ART) inferior a 7g/L, a concentração de oxigênio no meio fermentado começa a aumentar indicando uma diminuição do consumo de oxigênio. Essa diminuição do consumo de oxigênio é acompanhada de diminuição da velocidade de consumo de substrato (ART), do aumento da concentração de esporos e da inversão da tendência do pH que começa a aumentar. Berbert-Molina (1998) relacionou o aumento da concentração de oxigênio dissolvido e conseqüente queda da demanda de oxigênio ao fato das células estarem iniciando o processo de esporulação e deste modo já não necessitarem mais de uma grande demanda de oxigênio, bem como de substrato. Estas observações são suportadas ainda por Flores *et al* (1997) em estudo com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em meio sintético.

3.1.2 Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em processo semicontínuo (FSC)

Neste trabalho também foi explorada outra proposta como o uso de um processo de cultivo em regime semicontínuo, visto que existe uma carência de material literário frente a este tipo de processo. Conforme descrito no item 2.3.1.3 o processo foi conduzido com dois biorreatores onde, em B1 o objetivo foi o do crescimento microbiano e produção de células e, em B2, a síntese e maturação dos esporos. No biorreator B1, as células foram cultivadas por tempos diferentes, situação típica do processo semicontínuo em função de diferentes concentrações de substrato e de células no início de cada um dos volumes de cortes efetuados.

A discussão dos resultados obtidos foi realizada apenas para o experimento FSC60, pois, entre todos os experimentos testados (FSC80, FSC60, FSC40, FSC20) este foi o que apresentou melhores resultados de produção de esporos como pode ser comprovado adiante. O perfil das curvas de concentração de oxigênio dissolvido (OD%) e de consumo de substrato (ART) dos experimentos testados pode ser observada nas Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente. Os gráficos de concentração de oxigênio dissolvido (OD%) e consumo de substrato (ART) dos experimentos FSC80, FSC40 e FSC20 podem ser observados no Anexo 4.

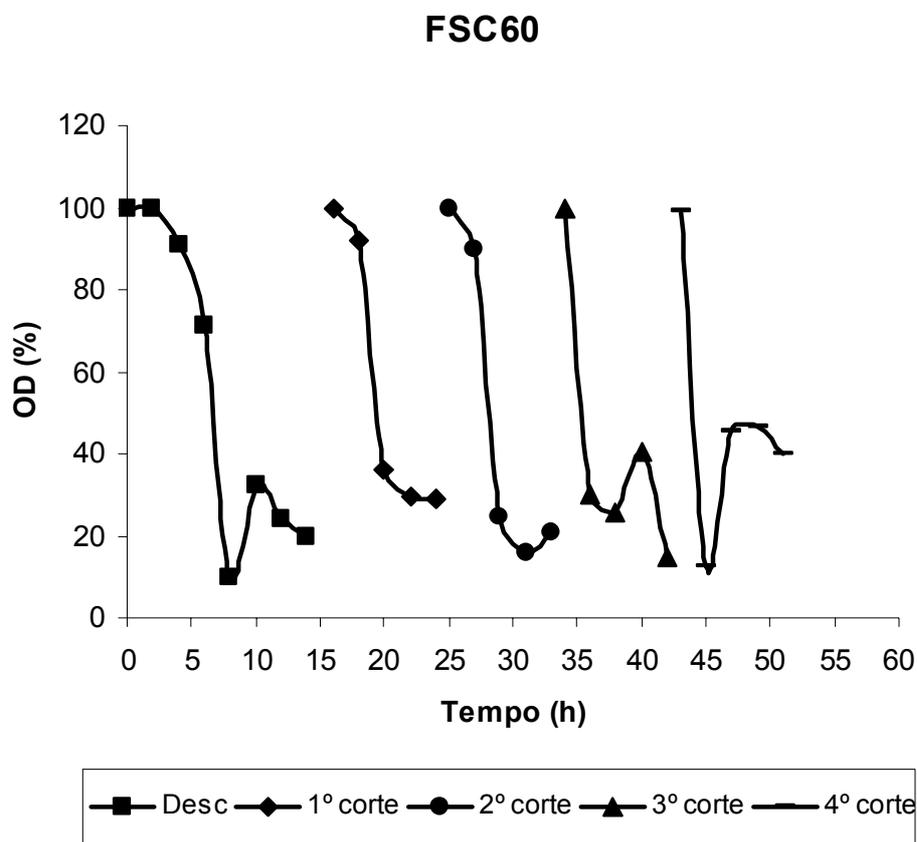


Figura 3.3: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC60.

Na curva de OD% pode-se observar que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo caiu para valores inferiores a 10%, da concentração de saturação

e, conseqüentemente foi aumentada a freqüência de agitação fazendo com que o seu valor aumentasse. Assim, aparentemente, não houve limitação do crescimento microbiano pelo oxigênio. A agitação sempre iniciava em 450min^{-1} e em todos os experimentos testados não ultrapassou valores superiores a 750min^{-1} . Durante todo o tempo decorrente de processo a vazão de ar permaneceu fixa em $0,5\text{vvm}$. Os valores de K_La para cada rotação estão apresentados no Anexo 5. Cada descontinuidade da curva que representa a concentração de OD no meio de cultivo significa a realização de um corte. A curva de consumo de substrato é mostrada na Figura 3.4, nela são visualizados os pontos em que foram realizadas as alimentações com meio fresco. Os cortes em cada experimento foram efetuados sempre que a concentração de ART (g/L) atingia valores próximos a 5g/L .

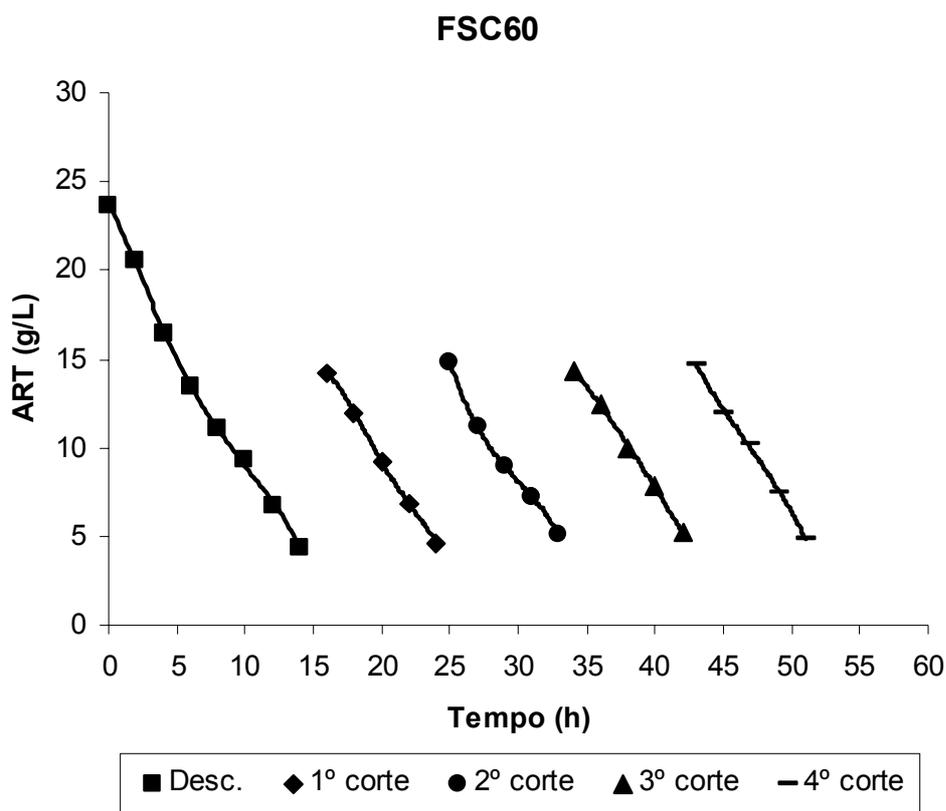


Figura 3.4: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC60.

Pode-se observar na Figura 3.4, assim como na figura anterior, uma boa repetibilidade dos resultados dos cortes. Após o segundo corte, já foi possível coletar os dados experimentais e realizar os cálculos dos parâmetros produtivos pretendidos. O mesmo fato ocorreu nos demais experimentos realizados. A velocidade de consumo de substrato manteve-se praticamente constante em todos os cortes efetuados no experimento FSC60 com média de 1,18g/L/h, como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.1: Velocidade de consumo de substrato (v_s) nos diversos cortes efetuados no experimento FSC60.

	1º corte	2º corte	3º corte	4º corte	Média
v_s (g/L/h)	1,19	1,20	1,14	1,22	1,18

As Figuras 3.5 e 3.6 exibem os resultados obtidos de concentração de esporos e produtividade nos quatro experimentos FSC realizados e no experimento descontínuo simples (DESC). Os resultados de concentração de esporos já estão expressos em razão da diferença de concentração de esporos no final e no início de cada corte efetuado nos experimentos realizados e, os parâmetros produtivos foram calculados de acordo com os tempos médios dos cortes também em cada experimento como mostrado na Tabela 3.1.

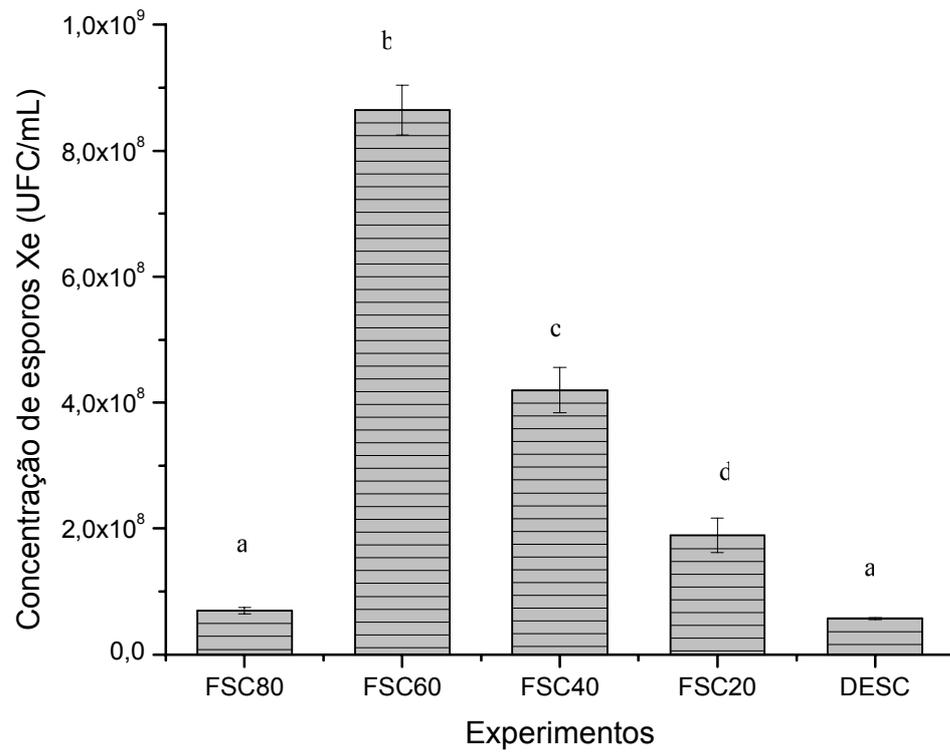


Figura 3.5: Concentração média de esporos Xe (UFC/mL) dos cortes realizados nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e DESC. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

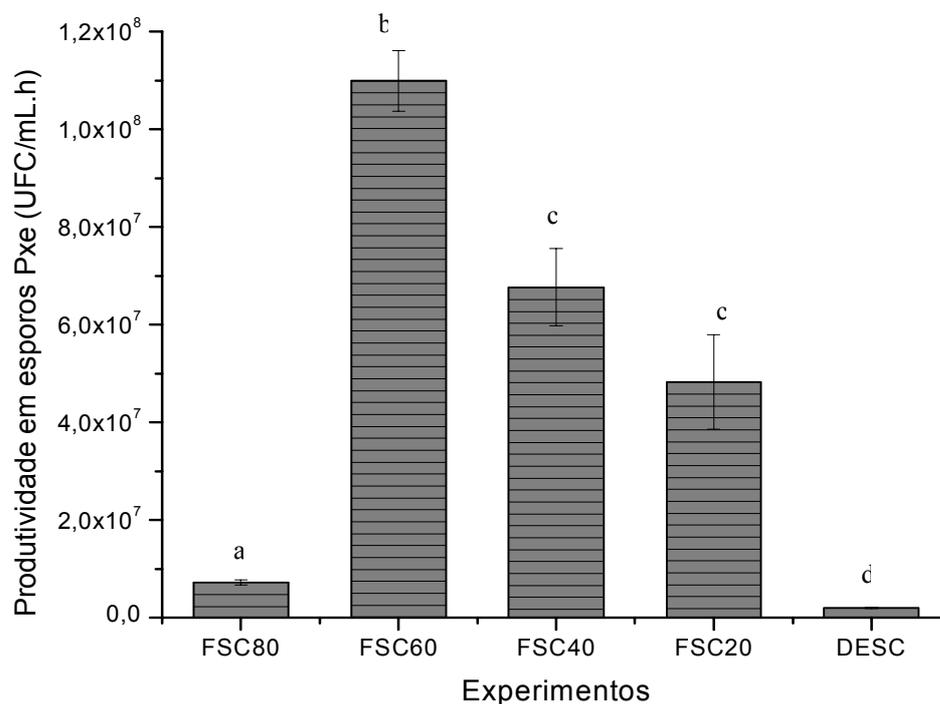


Figura 3.6: Produtividade média de esporos Pxe (UFC/mL.h) dos cortes realizados nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e DESC. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

Pode-se observar que no experimento FSC80, em que foi efetuado o maior volume de corte, a concentração de esporos encontrada $6,2 \pm 0,2 \times 10^7$ UFC/mL foi praticamente igual a encontrada no processo em regime descontínuo ($5,8 \pm 0,3 \times 10^7$ UFC/mL). Aparentemente, o emprego de suspensão microbiana com concentração de 20%v/v praticada em FSC80 não conduziu ao incremento da concentração final de esporos em comparação ao DESC onde este valor foi de 5%v/v. No entanto, levando-se em consideração os “tempos mortos” que normalmente ocorrem no processo DESC, pode-se verificar que comparado ao processo FSC80 é possível obter-se um aumento na produtividade do processo para longos períodos de produção como, por exemplo, numa produção mensal continuada.

Dentre os experimentos testados, o que apresentou maior concentração e produtividade, em esporos, durante o tempo em que foi realizado o corte (8 horas)

foi o de FSC60 ($8,9 \pm 0,8 \times 10^8$ UFC/mL). Este resultado foi, em termos de produção de esporos, 94% superior ao experimento FSC80; 37% superior ao experimento FSC40; 64% superior ao experimento FSC20 e 98% superior ao cultivo DESC.

A Figura 3.7 apresenta os resultados de concentração de esporos observados nos processos descontínuo simples (DESC) e semicontínuo (fase de maturação) nos experimentos de FSC80 a FSC20. Esta concentração é relacionada ao volume do corte que foi retirado em cada experimento e acondicionado no biorreator B2 para maturação dos esporos até o final da fonte de carbono (aproximadamente 30 horas).

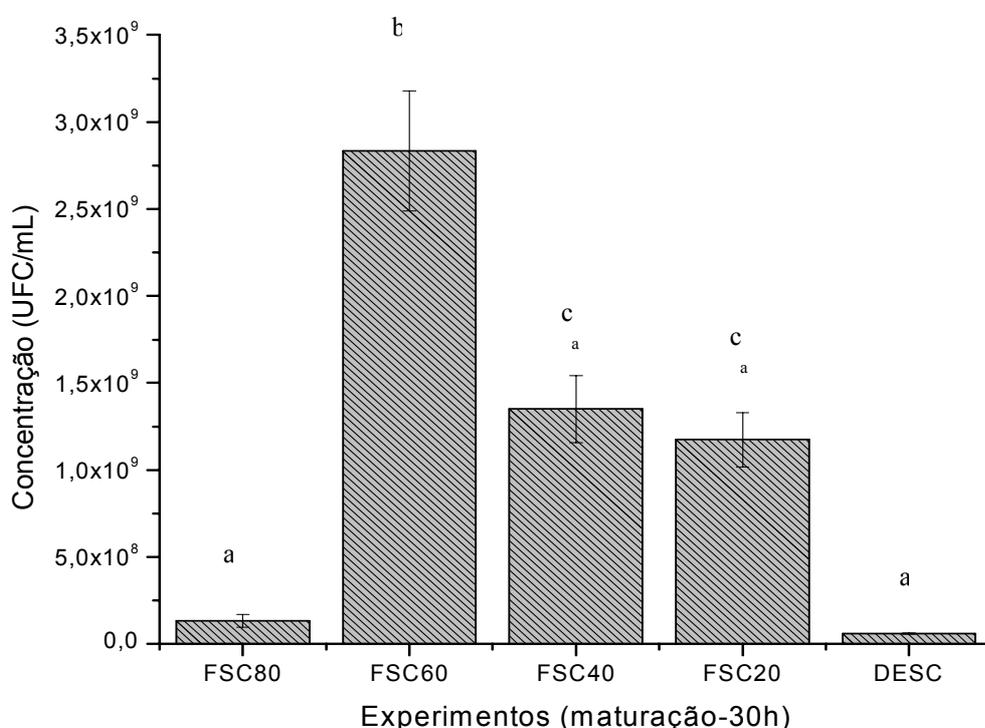


Figura 3.7: Concentração de esporos (UFC/mL) na fase de maturação (biorreator B2), até o final da fonte de carbono (aproximadamente 30 horas) nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40, FSC20 e no experimento DESC. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

Pode-se observar que na maioria dos experimentos realizados no processo semicontínuo resultou em aumento da concentração e conseqüentemente produtividade de esporos em comparação ao processo descontínuo. Os perfis das colunas continuaram praticamente os mesmos, com o experimento FSC60 ainda apresentando a maior concentração. Porém, no experimento FSC20, ocorreu um grande incremento da concentração de esporos na fase de maturação, chegando a ultrapassar a concentração de esporos produzida por FSC40 em alguns cortes na mesma fase. Este aumento pode ter sido ocasionado pelo pouco tempo de residência entre os cortes (4 horas) no experimento FSC20, não suficiente para formação de esporos maduros; quando, porém, foi colocado na fase de maturação, pode aumentar o número de esporos e maturá-los.

Resultado semelhante foi observado por Kang *et al* (1992) em processo de batelada alimentada seguido de cultivo em batelada. Empregando outra espécie de *B. thuringiensis*, os autores realizaram estudo com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, em cultura batelada por 5 horas, seguida de cultura em batelada alimentada por 12 horas e finalmente seguido de cultivo descontínuo por 23 horas. Foi utilizado meio sintético com uma concentração inicial de 5g/L de glicose. Os autores obtiveram valores máximos de concentração de esporos na ordem de $1,1 \times 10^9$ UFC/mL e, salientaram a importância da fase final em batelada para produção e maturação dos esporos. Os autores não determinaram a produtividade do processo e nem os valores de toxicidade. Não foi encontrada na literatura disponível produção de Bti no tipo de processo semicontínuo.

Em estudo realizado por Mignone *et al* (1993), também foi utilizado processo de batelada alimentada e, meio sintético com uma concentração inicial de 55g/L de glicose. Os autores alcançaram uma concentração máxima de esporos na ordem de $5,3 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os autores também relataram que um incremento na concentração de esporos foi encontrado com o uso do processo batelada alimentada, porém encontraram menores valores de toxicidade quando este processo foi utilizado.

Num estudo recente realizado por Jing-Wen *et al* (2006), foi analisado o incremento da produtividade utilizando processo fermentativo em batelada alimentada. Foi utilizado o microorganismo *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 032 e, meio sintético com uma concentração inicial de glicose de 25g/L. Os autores concluíram que utilizando a estratégia de cultivo em batelada alimentada com

adequado controle de pH e alimentação de glicose, aumentam grandemente a produção de células e de esporos. A concentração máxima obtida foi de 11,45g/L. Os autores não expressaram seus resultados em termos de UFC.

De acordo com a Figura 3.7, comparando os experimentos realizados, o FSC60 foi o que apresentou maior concentração de esporos e conseqüentemente maior produtividade. O experimento FSC60 ($2,17 \times 10^9$ UFC/mL) atingiu uma concentração de esporos 36% superior ao experimento FSC40 ($1,39 \times 10^9$ UFC/mL), 34% superior ao experimento FSC20 ($1,43 \times 10^9$ UFC/mL) e 94% superior ao experimento FSC80 ($1,24 \times 10^8$ UFC/mL). A discrepância observada entre os valores dos experimentos FSC60 e FSC80 era esperada, pois devido ao grande volume de meio no corte, este experimento (FSC80) se aproxima das condições do processo descontínuo, que também apresentou uma concentração de esporos muito inferior comparado aos demais experimentos. Comparado ao processo descontínuo (DESC), o processo semicontínuo (experimento FSC60) possibilitou o incremento de 97% na concentração de esporos. O experimento FSC60 então, foi definido como ideal e selecionado para continuidade dos trabalhos de pesquisa, inclusive para testes de bioensaio para comprovar a eficácia da biotoxina.

A Figura 3.8 compara os resultados obtidos da concentração de esporos (UFC/mL) durante os tempos de corte (que foram diferentes) em cada experimento testado e no final da fase de maturação.

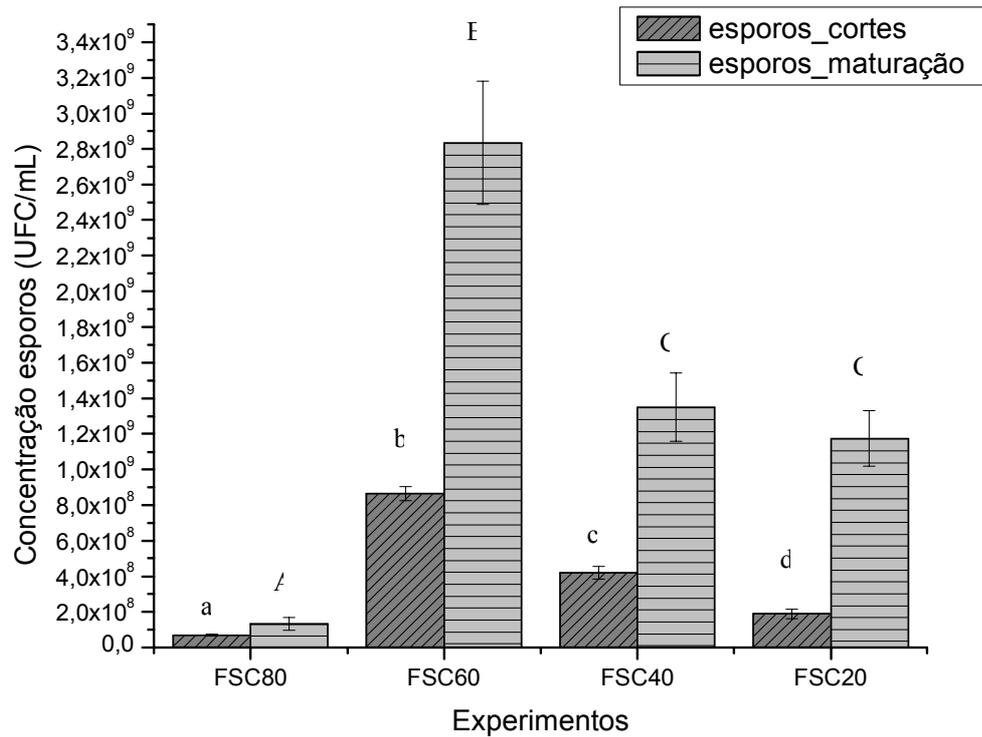


Figura 3.8: Concentração de esporos (UFC/mL) nos tempos de corte efetuados e na fase de maturação nos experimentos FSC80, FSC60, FSC40 e FSC20. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

Observa-se nesta figura que independentemente do tempo de corte efetuado, a fase de maturação em processo descontínuo promove um incremento na concentração de esporos em todos os experimentos testados. Kang *et al* (1992) e Mignone *et al* (1993), sustentam em seus trabalhos a importância da existência desta fase em processos contínuos ou de batelada alimentada.

3.2 INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPOROS E SOBRE A POTENCIALIDADE DO BIOINSETICIDA

De acordo com vários autores, nas várias etapas do processo de produção de Bti, o oxigênio, se destaca como um dos fatores essenciais para o crescimento celular, a maturação do esporo e a produção de toxinas contra larvas de Dipteros. Assim, neste capítulo, buscou-se verificar a influência do oxigênio dissolvido presente no cultivo de Bti em biorreator sobre a concentração de esporos e toxicidade do produto. Para tanto foram realizados ensaios com e sem controle de oxigênio.

Desta maneira, procurou-se acrescentar novas informações aos estudos sobre este tema, sob duas diferentes condições de fornecimento de oxigênio na fase de maturação dos esporos e formação da biotoxina.

3.2.1 Experimentos com e sem fornecimento de oxigênio na fase de esporulação

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as condições definidas no experimento FSC60. Nos processos com aeração, a concentração de oxigênio no meio foi mantida constante após atingir 10% da saturação procurando-se assim apresentar uma condição de não limitação de oxigênio nos cultivos. Nos processos sem aeração, este suprimento era cortado, permanecendo apenas a agitação que mantinha-se em torno de 600min^{-1} . Quando os ensaios atingiam uma concentração de 5g/L de glicose era feito o corte. A partir deste ponto o volume de meio retirado do biorreator (B1) foi passado a outro biorreaor (B2). Neste biorreator (B2) acontecia a maturação dos esporos e nesta fase foi realizada a verificação da influência de suprimento de oxigênio na produtividade de esporos e também na toxicidade do Bti.

A Figura 3.9, mostra o comportamento da concentração de esporos sem limitação e com limitação de oxigênio nos ensaios de cultivo submerso em regime semicontínuo, experimento FSC60.

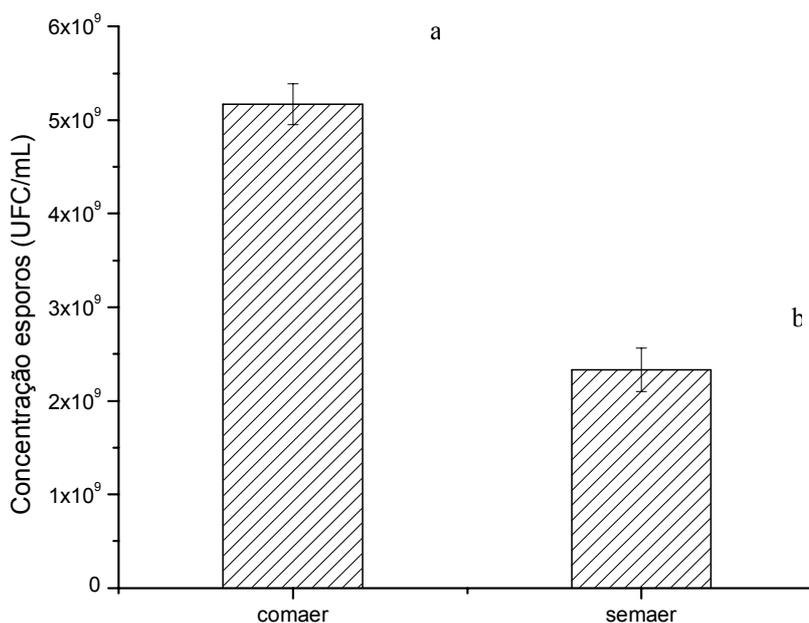


Figura 3.9: Concentração de esporos (UFC/mL) no final da fase de maturação no experimento FSC60, nas condições de cultivo com aeração (comaer) e sem aeração (semaer). Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

De acordo com a Figura 3.9, verifica-se claramente que a maior concentração de esporos foi obtida quando o processo, na fase de maturação, foi conduzido com aeração. A aeração representa um fator muito importante na produção de esporos obtendo-se um incremento de 52% na esporulação em comparação com os experimentos conduzidos sem aeração. A aeração proporciona um aumento da concentração de esporos e conseqüentemente na produção de esporos como demonstrado na Figura 3.10. A produção de esporos está ligada ao crescimento celular como obteve-se nos resultados anteriores. A dificuldade de crescimento pela falta de oxigênio de eventuais células vegetativas na fase de maturação proporcionou uma menor esporulação.

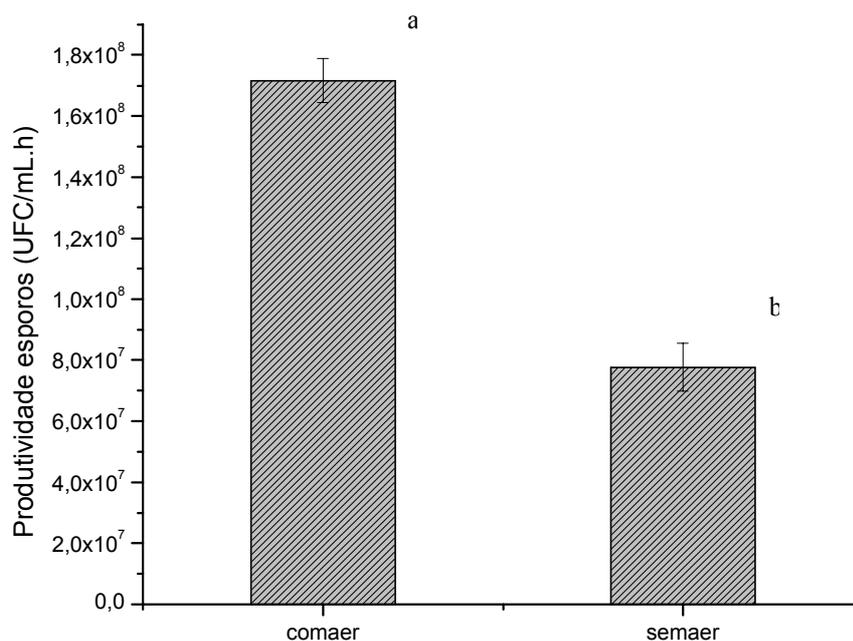


Figura 3.10: Produtividade de esporos (UFC/mL.h) no final da fase de maturação no experimento FSC60, nas condições de cultivo com aeração (comaer) e sem aeração (semaer). Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

Com relação à toxicidade, foi realizado um bioensaio com larvas da espécie *Aedes albopictus*. Os resultados obtidos da concentração letal (LC_{50}), tanto no processo com aeração como no processo sem aeração são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Concentração letal (mg/L) que causou morte de 50% dos indivíduos de um grupo de 10 larvas nos processos com e sem aeração.

Processo	LC_{50}^* (mg/L)
Com aeração	0,74
Sem aeração	0,83

* Concentração de meio fermentado para eliminar 50% da população de larvas nos bioensaios.

Estes resultados mostram que a concentração letal para o processo com aeração (0,74 mg/L) foi muito semelhante a concentração letal do processo sem aeração (0,83 mg/L), promovendo um incremento de apenas 11%. Assim, pode-se perceber que uma condição de aeração, aparentemente, proporcionou maiores valores de concentração de esporos, porém não se pode ter certeza da influência deste nutriente sobre a potencialidade da biotoxina. Estes resultados são importantes para a produção comercial onde se associa produção de biomassa com toxicidade e custo.

Mignone *et al* (1992), em um estudo sobre o crescimento, esporulação e produção de delta-endotoxina por *B. thuringiensis* var. *israelensis* sob condições de limitação e não limitação de oxigênio, observou que condições de não limitação de oxigênio são importantes quando se quer altas concentrações celulares e esporulação. Já com a limitação de oxigênio as taxas de crescimento celular e de esporos foram menores, porém em valores muito próximos àqueles encontrados sem limitação de oxigênio. Comparando os resultados obtidos com aqueles apresentados por Mignone *et al* (1992), pode-se observar concordância entre os valores de concentração de esporos sem limitação de oxigênio obtidos pelos autores ($9,1 \times 10^8$ UFC/mL) e obtido através destes experimentos ($5,6 \times 10^9$ UFC/mL). Nos experimentos com limitação de oxigênio os autores obtiveram um resultado de $4,5 \times 10^8$ UFC/mL enquanto que neste trabalho atingiu-se um valor de $2,70 \times 10^9$ UFC/mL. Com relação à produção de delta-endotoxina, os autores concluíram que sob condições de limitação de oxigênio a produção foi em torno de 50% menor a máxima produtividade obtida em condições de não limitação.

Segundo Berbert-Molina (1998), o suprimento de oxigênio é fundamental para o crescimento, a esporulação e a produção de delta-endotoxina por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Desde que o cultivo não seja submetido a limitação de oxigênio, o desenvolvimento celular, ao longo do processo, independe do valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio inicial ($K_L a$) ou da concentração de oxigênio dissolvido. Sob limitação de oxigênio, o crescimento e toda a evolução do ciclo celular, no sentido da formação de esporos pode ser interrompido. Porém, os resultados obtidos pela autora com relação à produção de delta-endotoxina ficam comprometidos, pois conclui-se que os resultados são imprecisos e que apenas a condição de não limitação de oxigênio é necessária.

Maldonado-Blanco *et al* (2003), utilizaram o microorganismo *B. thuringiensis israelensis* 225 para verificar a influência da vazão de oxigênio combinada com a frequência de agitação na produtividade e toxicidade do Bti. Os autores obtiveram melhores resultados quando uma combinação de vazão de ar e agitação alta eram aplicados, pois eles não permitiam que a concentração de oxigênio dissolvido no meio caíssem abaixo de 26%, não prejudicando assim a produção. Maiores produtividades e uma concentração letal (LC₅₀) de 0,2675mg/L foi atingida em condições de não limitação de oxigênio. Mesmo que sejam atingidas altas concentrações celulares ou de esporos, isso não é garantia de que altos valores de toxina serão atingidos, por isso os autores acreditam que a determinação da atividade biológica é o principal parâmetro para otimizar a produção de bioinseticida.

Outros autores também relacionaram a influência do suprimento de oxigênio sobre a produção de esporos e toxicidade do *Bacillus thuringiensis* obtendo resultados contraditórios. Sarrafzadeh *et al* (2005), em estudos com *Bacillus thuringiensis* H14 concluíram que os maiores valores de concentração de esporos foram atingidos com abstinência de oxigênio. Nessas condições encontrou-se esporos maiores e 100% maduros. Porém não foi observada atividade larvicida contra larvas de *Culex pipiens*. Em contrapartida, em processo aerado os autores obtiveram menores porcentagens de esporos maduros, mas uma elevada toxicidade contra as larvas anteriormente citadas, concluindo que as condições para a formação do esporo e produção da biotoxina não são os mesmos.

Juntamente com o suprimento de oxigênio, outros fatores também influenciam a produção de biotoxina, como fonte de carbono, nitrogênio, razão carbono nitrogênio, pH e temperatura. É necessário compreender a correlação da expressão do gene da biotoxina, fisiologia do microorganismo em questão e parâmetros fermentativos para encontrar altas concentrações de toxina.

3.3 INTEGRAÇÃO DOS PROCESSOS DE CULTIVO EM ESTADO LÍQUIDO E SÓLIDO

O processo de fermentação em estado sólido possui uma série de vantagens quando comparada com a clássica fermentação submersa; dentre elas, pode-se destacar a redução do volume de meio por massa de substratos sem perda no rendimento do produto, redução de espaço de trabalho, composição de meios flexíveis e relativamente simples, baixo consumo de energia e tratamentos finais simplificados.

Visando um aumento da produtividade do bioinseticida *Bti*, testou-se a utilização do caldo fermentado do processo de cultivo descontínuo (DESC) submerso como inóculo do processo de cultivo em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana-de-açúcar e casca de banana como substrato.

3.3.1 Cultivo em estado sólido utilizando caldo fermentado como inóculo

Foram utilizados como reatores, sacos plásticos de polietileno autoclaváveis contendo substrato de cascas de banana e bagaço de cana-de-açúcar nas condições determinadas por Jesus (2006). Depois de acondicionado o substrato foi submetido a tratamento térmico descrito no item 2.3.2.2. Os reatores foram inoculados com três concentrações do caldo fermentado proveniente do processo de cultivo submerso em regime descontínuo (30 horas de cultivo). Para inóculo foram usados o caldo fermentado in natura (N), caldo fermentado concentrado duas vezes (N2) e caldo fermentado concentrado quatro vezes (N4). O processo de concentração foi feito através de centrifugação. A Tabela 3.3 que segue apresenta os resultados obtidos com análises de pH e atividade de água (A_w), obtidos do cultivo de *Bti* durante nove dias empregando como substrato cascas de banana “in natura” e bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 3.3: Resultados obtidos com análises de pH e atividade de água (A_w), obtidos do cultivo de Bti durante nove dias empregando como substrato cascas de banana “in natura” e bagaço de cana-de-açúcar.

Tempo (dias)	Reator	pH	A_w^*
t ₀	N	5,6	0,989
t ₃	N	5,8	0,990
t ₆	N	6,4	0,986
t ₉	N	7,3	0,980
t ₀	N2	5,5	0,991
t ₃	N2	6,3	0,976
t ₆	N2	7,4	0,983
t ₉	N2	7,8	0,988
t ₀	N4	5,5	0,975
t ₃	N4	6,0	0,974
t ₆	N4	6,5	0,962
t ₉	N4	7,4	0,950

* determinado a uma temperatura de 27,0 a 27,4.

De acordo com a Tabela 3.3 pode-se verificar um aumento de pH durante o tempo de fermentação em todos os experimentos realizados, independentemente da concentração de inóculo que foi utilizada. Este aumento é característico do processo e manteve-se sempre em valores dentro da faixa de pH (pH= 5,5 a 8,5) indicada como viável para o crescimento de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), conforme Bernhard & Utz (1993). Com relação à atividade de água (A_w), observa-se que a maioria dos valores ficou dentro do encontrado na faixa de A_w indicada por Arruda (1999) como ideal para este tipo de cultivo (A_w = 0,955 a 0,975), ficando somente o último tempo (t₉) do experimento N4, abaixo desta faixa (0,950). A Figura 3.11 apresenta os resultados obtidos em concentração de esporos (UFC/kg), durante o tempo de cultivo (t₀ a t₉) nos experimentos N, N2 e N4.

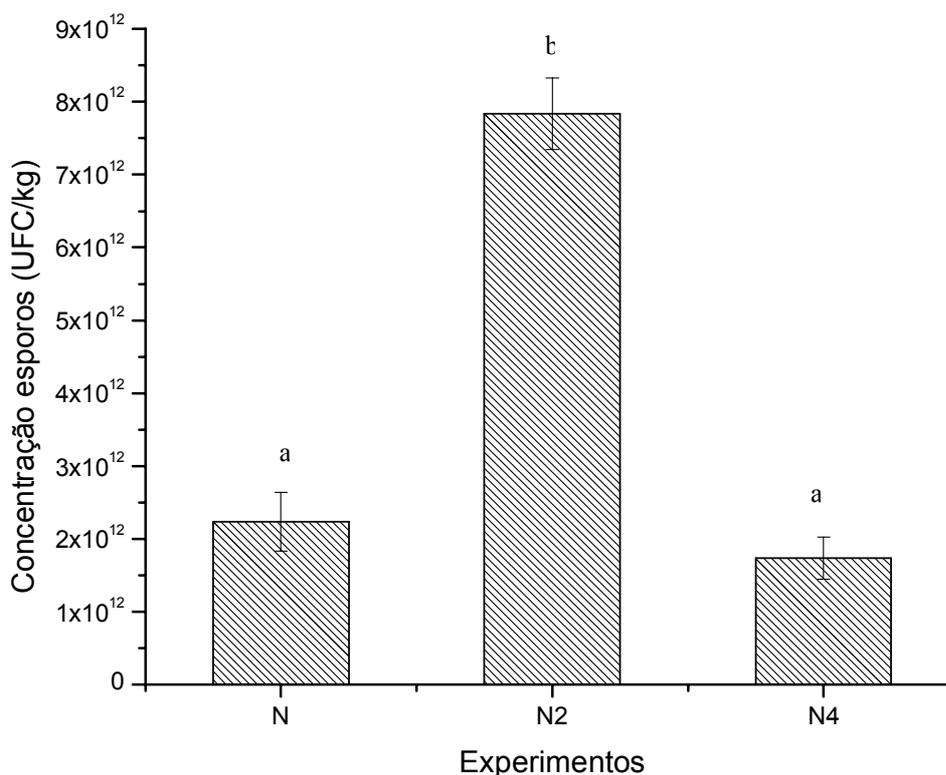


Figura 3.11: Concentração de esporos (UFC/kg) no tempo de cultivo de nove horas, nos experimentos N, N2 e N4. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$)

A concentração de esporos no caldo fermentado bruto (representado por N) foi de $5,6 \pm 0,4 \times 10^7$ UFC/mL. De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.11, pode-se verificar que a maior concentração de esporos (no tempo nove horas) obtida foi de $7,8 \pm 0,3 \times 10^{12}$ UFC/kg, no experimento N2. Este valor foi 70,5% superior ao experimento N e 77% superior ao experimento N4. Ao contrário do que foi imaginado, o reator com um inóculo duas vezes concentrado apresentou melhores resultados que aquele com uma concentração quatro vezes aumentada. Mesmo sem uma comprovação experimental, a hipótese mais provável é o esgotamento de algum nutriente necessário para que o processo de esporulação avançasse, visto que a concentração de inóculo neste reator foi quatro vezes maior.

Os valores de concentração de esporos encontrados nos três experimentos empregados (N, N2 e N4) são muito superiores àqueles obtidos por Franczak *et al*

(2004) Os autores utilizaram a quirera de arroz no cultivo de Bti e obtiveram após nove dias de cultivo, valores na ordem de $7,1 \pm 0,1 \times 10^9$ UFC/kg nas seguintes condições experimentais: 100 gramas de quirela de arroz cozido com solução de 100g/L de glicose por biorreator (sacos de polipropileno autoclaváveis com capacidade volumétrica de 1 litro), concentração inicial de microorganismos (ativados em meio LB) de $7,0 \pm 0,3 \times 10^5$ UFC/kg, atividade de água inicial de 0,98, pH inicial de 6,5 e temperatura de incubação 30°C.

Os valores encontrados por Arruda e Moraes (2005), que utilizaram o mesmo tipo de cultivo de Franczak *et al* (2004) foi de $2,5 \times 10^{11}$ UFC/kg após 4,6 dias de incubação. Infelizmente, os autores não citam o volume de inóculo e nem a concentração inicial de biomassa utilizados no processo, dados importantes para uma comparação mais significativa entre os resultados obtidos neste trabalho e os de Franczak *et al* (2004). Jesus (2006), em ensaios com bagaço de cana-de-açúcar e cascas de banana acrescido de 20 gramas de glicose por kilograma de substrato e uma concentração de esporos da suspensão microbiana utilizada como inóculo $1,4 \pm 0,4 \times 10^5$ UFC/kg; atingiu concentrações de $4,1 \pm 0,2 \times 10^{12}$ (UFC/kg) após nove dias de ensaio. Nenhum dos autores mencionados utilizou inóculo proveniente de processo fermentativo prévio em biorreator.

Os resultados obtidos de concentração de esporos nos reatores que utilizaram inóculo proveniente do processo fermentativo em batelada foram 47,4% superiores aos resultados obtidos por Jesus (2006) e 99,90% superior aos valores encontrados por Franczak *et al* (2004), ambos utilizando inóculos provenientes de meio LB sintético.

3.4 ENSAIOS FERMENTATIVOS EM PROCESSO DESCONTÍNUO (DESC) COM MEIO DE CULTIVO CONTENDO FARELO DE SOJA HIDROLISADO

A maior parte das pesquisas sobre a produção de bioinseticidas com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* foi realizada com meios de cultivo compostos de matérias-primas naturais, o que resultou numa escassez de dados sobre a cinética desta fermentação, em virtude da impossibilidade de medir-se a concentração celular. Vários autores tem salientado o uso de meios de cultura alternativos e compostos por resíduos agroindustriais tanto para a produção de bioinseticidas em processos submersos e sólidos, como para outros tipos de processos fermentativos (Arruda e Moraes, 2005; Prabakaran, 2005). Neste sentido, seguindo resultados obtidos por Passos (2000), neste trabalho, em todos os experimentos fermentativos submersos foi utilizado meio de cultivo composto por farelo de soja, como descrito no item 2.2.(c). Como o farelo de soja constitui-se de partículas sólidas, o meio de cultivo apresenta grande quantidade de sólidos em suspensão, dificultando assim as operações que visam determinar a concentração celular do meio. Uma alternativa encontrada para contornar este problema foi utilizada por Berbert-Molina (1999) e Passos (2000), que também utilizaram o meio de cultivo com farelo de soja. Esta alternativa consistia na determinação indireta, medindo-se a demanda de oxigênio pelo cultivo ($Q_{O_2.X}$), através do balanço gasoso dos gases efluentes do biorreator.

Este procedimento foi adotado para a quantificação de biomassa neste trabalho, utilizando para medição dos gases, o analisador de gases MAIHAK (método de calibração apresentado no Anexo 3), sendo este o mesmo aparelho utilizado pelos autores Berbert-Molina e Passos. Porém, nos experimentos realizados neste trabalho com a utilização do analisador de gases, os resultados não foram como esperado e nada satisfatórios. Nestes experimentos, o analisador paramagnético de oxigênio (OXIGOR 6N), mesmo depois de corretamente calibrado, não movimentou seu medidor em nenhum momento no decorrer do ensaio. Uma possível explicação para este fato é a grande amplitude de calibração realizada. Deste modo, a porcentagem de consumo de oxigênio pelo micorganismo não foi apresentada pois, era muito pequena comparada com a calibração do equipamento.

Já o analisador infravermelho de gás carbônico (UNOR 6N), também depois de corretamente calibrado, movimentou seu medidor durante o decorrer do ensaio, porém, essa medição foi imprecisa e incoerente com o perfil de consumo de oxigênio e produção de gás carbônico pelo microrganismo, conhecida através de outros estudos de cinética. Como Berbert-Molina (1999) e nem Passos (2000) apresentaram em seus trabalhos os resultados obtidos destas medições de oxigênio e gás carbônico pelo equipamento MAIHAK, não foi possível saber se os autores encontraram dificuldade semelhante e, se encontraram, como procederam para contornar este problema. Desta forma, tornou-se impossível trabalhar com estes dados, que foram abandonados.

Decidiu-se então, tentar modificar o meio de cultivo a fim de eliminar os sólidos em suspensão provenientes do farelo de soja. Foram então realizados novos experimentos com a mesma composição de meio descrita no item 2.2.(c), com excessão do farelo de soja que recebeu dois tipos de tratamento de hidrólise diferentes como mostrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Condições de tratamento por hidrólise do farelo de soja utilizados como meio de cultivo em fermentações no processo descontínuo (DESC). temperatura (°C), tempo (min), H₂SO₄ (%m/m) e pH.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H ₂ SO ₄ (%m/m)	pH
T1	90	60	0,5	2,5-3,0
T2	121	15	0,5	2,5-3,0

Para ambos os casos de tratamento (T1 ou T2), pesou-se a quantidade necessária de farelo de soja, diluiu-se em água destilada e procedeu-se ao tratamento adequado. Após, foi feito a filtração do tratado em pano de louça dobrado em quatro camadas, seguida de nova filtração em filtro de papel comum da marca Melitta. Feito este procedimento o filtrado foi autoclavado em separado e depois adicionado ao restante dos componentes do meio (também já esterilizados). O restante dos procedimentos foram seguidos como descritos no item 2.3.1. A Figura

3.12 apresenta os valores de concentração de oxigênio dissolvido (OD) e pH obtidos nos experimentos T1 e T2.

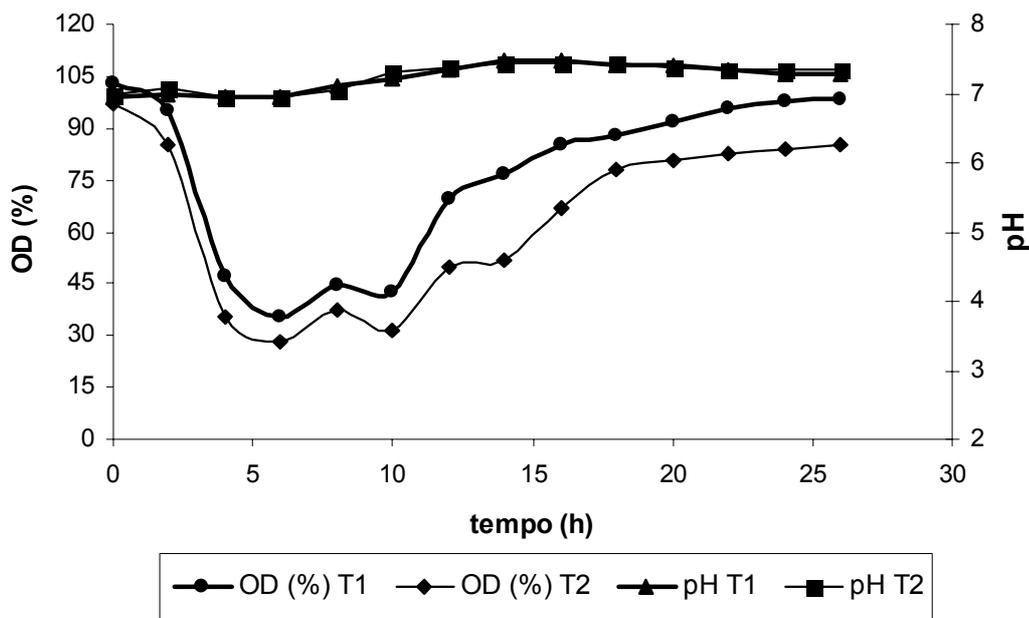


Figura 3.12: Variação do pH e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) com o tempo em processo de cultivo descontínuo nos experimentos T1 e T2.

O perfil das curvas de pH tanto em T1 quanto em T2 permaneceram praticamente iguais. Percebe-se que até o tempo de 10 horas houve uma tendência ao abaixamento do pH devido a produção de ácidos típica do processo, que foi controlada em 7,0 com adição de base. Depois de 10 horas de fermentação o pH começa a aumentar e atinge valores finais de 7,27 para T1 e 7,35 para T2. Comparando os resultados obtidos nestes experimentos (T1 e T2) com os experimentos DESC (nas mesmas condições de processo e concentrações de meio, porém com farelo de soja sólido) pode-se verificar que o comportamento foi o mesmo com uma pequena diferença no valor final do pH no processo DESC que foi maior (8,3).

Nos valores de OD o perfil das curvas em T1 e T2 também foi muito semelhante. Até aproximadamente 5 horas ocorreu uma intensa queda do valor de OD, indicando rápido consumo de oxigênio pelos microrganismos em plena fase de crescimento. Depois deste tempo a curva começa a subir até chegar em valores próximos a 100%, no final do ensaio. Este comportamento também foi verificado nas curvas de OD dos experimentos DESC, porém nestes experimentos a máxima velocidade de consumo foi observada em um intervalo de tempo de 3-15 horas. Portanto pode-se constatar que o consumo de oxigênio foi mais rápido nos experimentos T1 (5 horas) e T2 (5 horas) que em DESC (12 horas).

A Figura 3.13 apresenta os valores obtidos do consumo de substrato (ART) e concentração celular total (X_t) em função do tempo no experimento T2. O substrato corresponde a quantidade de açúcares redutores totais, determinados pelo método DNS. A concentração celular total (X_t) corresponde as células viáveis e células na forma de esporos, e , foi determinada por gravimetria (peso seco).

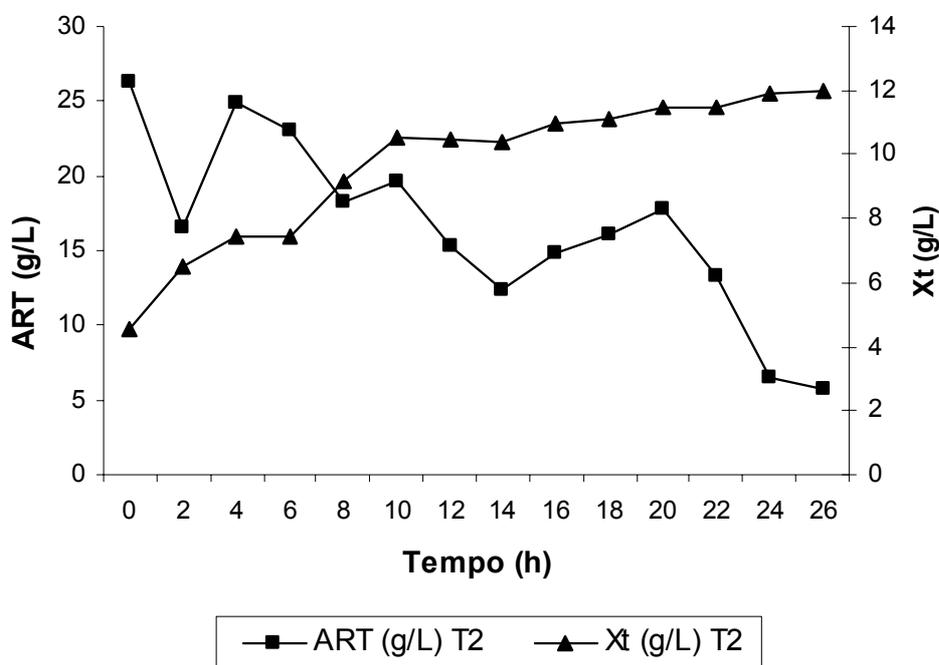


Figura 3.13: Consumo de substrato (ART) e concentração celular (X_t) em função do tempo no experimento T2.

Na concentração de substrato (ART) houve uma tendência de queda (consumo) em relação ao tempo que pode ser observada no experimento T2. Por volta de 26 horas de experimento ainda restou um residual de 5,78g/L de açúcares redutores totais (ART) em T2, indicando que este nutriente não foi totalmente consumido como observado em DESC (26 horas = 0,25g/L ART).

A concentração celular (X_t) em T2, a curva apresentou um perfil crescente durante todo o tempo de cultivo apesar de apresentar alguns patamares de crescimento estacionário. A concentração celular (X_t) final encontrada neste experimento foi de 11,98g/L.

Com relação à concentração de esporos no experimento T1 foi obtido um valor de $5,2 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/mL e no experimento T2 foi de $12,4 \pm 0,8 \times 10^8$ UFC/mL. Comparando os valores encontrados com o experimento DESC ($5,8 \pm 0,3 \times 10^7$ UFC/mL), tanto o experimento T1 (26 horas de cultivo) quanto o experimento T2 (26 horas de cultivo) produziram uma concentração de esporos maior que em DESC (30 horas de cultivo). O experimento T2 foi aquele que apresentou maior concentração celular, sendo 58% superior ao experimento T1 e 95% superior ao experimento DESC.

Apesar de os experimentos conduzidos com meio de cultivo composto por farelo de soja hidrolisado terem apresentado uma maior concentração de esporos que o experimento DESC, com farelo de soja moído, ainda é preciso submeter os experimentos a um ensaio biológico para certificação de que este incremento na concentração de esporos também seja observado com relação à produção do bioinseticida. Além disso, uma caracterização do hidrolisado de soja deve ser realizada para conhecimento das concentrações e composição dos nutrientes deste componente, além de um estudo cinético.

CONCLUSÕES

Neste capítulo são resumidas as principais conclusões obtidas neste trabalho.

- As repetições dos experimentos em regime descontínuo (DESC) mostraram resultados satisfatórios em relação à produção de esporos ($5,8 \pm 0,3 \times 10^7$ UFC/mL) e de acordo com aqueles resultados encontrados na literatura. O meio de cultivo proposto por Passos (2000) continua sendo uma boa alternativa frente à produção de esporos de Bti.
- Os ensaios conduzidos em processo semicontínuo, mostraram-se mais eficientes com relação à produção de esporos que os ensaios conduzidos em processo descontínuo. Dentre os experimentos em processo semicontínuo testados o que apresentou melhores resultados em produção de esporos foi o experimento FSC60 com $8,9 \pm 0,8 \times 10^8$ UFC/mL. Em comparação ao processo descontínuo simples este valor foi 98% maior.
- A fase de maturação (em regime descontínuo) mostrou-se importante para o aumento e desenvolvimento dos esporos produzidos na fase semicontínua, possibilitando o uso de sistema de crescimento sem assepsia na maturação e permitindo a disponibilização de maior tempo de processo para a etapa anterior (com assepsia) onde ocorre o período de crescimento de células vegetativas.
- O suprimento de oxigênio mostrou ser fundamental para o crescimento e esporulação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* cultivado em meio líquido (cultivo submerso). A LC_{50} para os experimentos conduzidos com aeração

foi de 0,74mg/L, porém em função da pequena diferença observada em relação aos experimentos sem aeração ($LC_{50} = 0,83\text{mg/L}$, com menos concentração de esporos) não foi possível obter certeza da influência deste nutriente sobre a potencialidade do produto no controle biológico de mosquitos.

- A integração dos processos em estado sólido (FES) e submerso (DESC), mostrou-se eficiente para a produção de esporos quando o inóculo proveniente da fermentação descontínua submersa foi concentrado duas vezes (experimento N2).
- O processo de hidrólise do farelo de soja utilizado no meio de cultivo em processo descontínuo apresentou resultados de produção de esporos superior aos experimentos conduzidos com mesmo meio, porém sem hidrólise do farelo de soja. O experimento T2 (hidrólise com H_2SO_4 0,5%*m/m*, 121°C e 15 minutos) foi o mais eficiente.

SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Durante o estudo para a realização deste trabalho, surgiram questionamentos e possibilidades que poderão ser abordados em futuros estudos.

- Realização de bioensaios para confirmação da produção de delta-endotoxina e toxicidade da mesma, nos experimentos de integração dos processos submerso e sólido.
- Realização de bioensaios para confirmação da produção de delta-endotoxina e toxicidade da mesma, nos experimentos com utilização de meio contendo hidrolisado de soja.

- Secagem dos produtos obtidos e sua influência na toxicidade do bioinseticida.
- Formulação e padronização do bioinseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMEED, A.; CALBERG, G.; LOUNATMAA, K.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – II. Ultrastructure Studies. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 6, p. 305-312, 1990.

ABDEL-HAMEED, A.; CALBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – V. Composition and Toxicity of the Mosquitocidal Parasporal Inclusions. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 7, p. 237-243, 1991.

ARAUJO- COUTINHO, C.J.P.C. Biological control program against simuliids in the state of São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 131-133, 1995.

ARRIAGA, J. T. Controle biológico de mosquitos, vetores importantes de enfermidades humanas. **La Voz Del Consumidor**, México, v. 6, n. 3, 1988.

ARRUDA, R.O.M. **Estudo da fermentação semi-sólida para produção de *Bacillus thuringiensis***. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – SP, Cidade Universitária, São Paulo, 1999.

ARRUDA, R.O.M., MORAES, R.O. Substratos para fermentação semi-sólida. **In: CD – ROOM. III Curso de Fermentação Semi-sólida na obtenção de bioprodutos**. Jaguariúna, SP: Embrapa, 2002.

ARRUDA, R.O.M.; MORAES, R.O. Fermentação semi-sólida. **In: CD-ROOM. Curso de fermentação semi-sólida na obtenção de bioprodutos**. Jaguariúna, SP: Embrapa, 2005.

AZEVEDO, J.L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

BABA, M.; H. TAKAOKA. Oviposition habitats of a univoltine black fly, *Prosimulium Kiotoense* (Diptera: Simuliidae), in Kyushu, Japan. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 5, p. 351-357, 1991.

BEBERT-MOLINA, M.A. **Estudo da Influencia do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis israelensis* IPS82 em regime descontínuo**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 1998.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; LeRoux, C.N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, p. 383-398, 2000.

BECHTEL, D.B.; BULLA JR., L.A. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1472-1481, 1976.

BERHARD, K., UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. John Wiley & Sons Ltd., 1993, p.255-267.

BORROR, D.J.; DeLONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Blücher, 1988.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Tecnologia das fermentações**. Sao Paulo: Edgard Blücher, 2001. 523 p.

BROBOWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. *Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 1, p. 843-850, 2003.

BROWN, A.W.A. Inseticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 2, p. 123-140, 1986.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, June/July, 2-7, 1980.

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O.; ARRUDA, R.O.M.; MORAES, R.O. **Aplicação da engenharia a processos biotecnológicos: o caso dos biopesticidas**. In: Cobenge, p. 34-38, 2001.

CAPALBO, D.M.F & MORAES I.O. **Obtenção de biopesticidas – controle da qualidade na produção de bactérias entomopatogênicas**; Trabalho elaborado e apresentado no VI Simpósio de Controle Biológico, Poços de Caldas/MG, julho de 2001.

CARLSON, G. Environmental factors influencing black fly populations. In: Paiva, D. P. **O borrachudo indicador biológico da qualidade da água**. Curso de Capacitação em Práticas Ambientais Sustentáveis. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 112p.

CRICKMORE, N.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A.; ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. **FEMS Microbiol Lett** v. 131, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; Van RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the literature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 62, p. 807-813, 1998.

COSCARON, S. **Insecta, Diptera, Simuliidae**. Fauna agua dulce de la República Argentina, v. 38, p. 1-105, 1981.

CROSSKEY, E.W. Observations on the bionomics of adult *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae) in northern Nigeria. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, n. 49, p. 142-153, 1955.

DEAN, D. H. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnol. Genet. Eng. Ver.** , v.2, p. 341-363, 1984.

DRAFT. Determination of the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* and *B. sphaericus* products, p. 29 – 33. In: WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2 **Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**. 33p. 1999.

DU, C.; NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface localized Cry1Ac toxins: physiological and pathogenesis consequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 3722-3726, 1996.

DULMAGE, H.T. Production and use of *Bacillus thuringiensis* – perspective from 1989. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 84, n. 3, p. 113-122, 1989.

ENVIROHEALTHACTION (Washington, Estados Unidos). **Toxics and health: pesticides**. Disponível em: <<http://www.envirohealthaction.org>>. Acesso em 18 ago. 2005.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **BioTechnology**, 10: 271–275. 1992.

FEITELSON, J. S. **Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis***. Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, p. 184, 1994.

FERRARI, J.A. Insecticide resistance. In: Marquardt, William C., Beaty, Barry J. **The biology of disease vectors**. University Press of Colorado, cap. 30, p. 512-529, 1996.

FLORES, E.R.; PÉREZ, F.; TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 561-64, 1997.

FODA, M.S.; SALAMA, H.S.; SELIM, M. Factors affecting the growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 22, p. 50-52, 1985.

FRANCZAK, P.F. **Produção de bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis* por processo fermentativo em estado sólido utilizando quirela de arroz como substrato**: Fase II: Início: 2005. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade da Região de Joinville, 2005.

GARCIA, E. **Segurança e saúde rural com agrotóxicos: contribuição para uma abordagem mais abrangente**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health**. 1-44, 1998.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, p. 350. 2000.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex*

univitattus, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

GREEN, M., HEUMANN, M., SOKOLOW, R., FOSTER, L.R., BRYANT, R., AND SKEELS, M. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-1986. In: Joung, K.-B.; Côté, J.-C. **A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis***. Horticultural Research and Development Centre. Technical Bulletin n. 29. Québec, Canada, 2000.

HANNAY, C. L.; FITZ-JAMES, P. C. The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*. **Can. J. Microbiol.**, v. 1, p. 694-710, 1995.

HENAO, H.S.; COREY, O.G. **Plaguicidas organofosforados y carbamicos**. Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 194 p. 1986.

HESELTIME, C.W. Biotechnology Report: solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 14:517-532, 1972.

HÖFTE, H.; WHITLEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v.53, n.2, p.242-255, 1989.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B. ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: effects of mineral elements and pH. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 599-604, 2002.

IGNATENKO, Y.N.; SAKHAROVA, Z.V.; KHOVRYCHEV, M.P.; SHEVTSO, V.V. Effect of temperature and aeration on grow and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, v. 52, p. 553-556, 1983.

JESUS, K.A. **Produção do bioinseticida *Bti* por processo fermentativo em estado sólido: emprego do bagaço de cana-de-açúcar como substrato de**

fermentação. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade da Região de Joinville, 2006.

JING-WEN, Z.; YA-FEI, C.; ZHENG-HONG, X.; ZI-NIU, Y.; SHOU-WEN, C. Production of thuringiensin by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subs. *darmstadiensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 52-6, 2006.

JOUNG, K.-B.; CÔTÉ, J.-C. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Horticultural Research and Development Centre**. Technical Bulletin n. 29. Québec, Canada, 2000.

KANG, B.C.; LEE, S.Y. CHANG, H.N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 8, p. 721-726, 1992.

KARUNARATNE, S.H.P.P.; HEMINGWAY, J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 79, n. 11, p. 1060-1064, 2001.

KRAEMER-SCHAFHALTER, A.; MOSER, A. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. **Bioprocess Engineering**., v.14, p. 139-144, 1996.

LACEY, L.A. UNDEEN, A. H. Microbial Control of black flies and mosquitoes. **Ann. Rev. Entomol.**, v.31 p. 265-296, 1986.

LAMBERT, B.; PFEROEN M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* - facts and mysteries about a successful biopesticide. **BioScience**, v.42, p.112-122, 1992.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins. in: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. John Wiley & Sons Ltd., 1993, p.255-267.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. & SCHMIDELL, W. 2001. ***Biotecnologia Industrial***. Vol. 3, São Paulo, Editora Edgard Blücher, 593 p.

LONSANE, B.K. *et al.* Review: engineering aspects of solid state fermentation. ***Enzyme Microbiology and Technology***, 7:258-265, 1985.

MALDONADO-BLANCO, M.G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALÁN-WONG, L.J. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. ***World Journal of Microbiology & Biotechnology***, v. 19, p. 671-74, 2003.

MARGALIT, J.; DEAN, D. H. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). ***Journal of the American Mosquito Control Association***, v. 1, p. 1-7, 1985.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. Controle Biológico. In: RABINOVITCH et al. ***Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando Bacillus entomopatogênicos***. Jaguariuna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. cap. 1, p. 17-90.

MIGNONE, C.F.; ROSSA, C.A. A simple method for designing fed-batch cultures with linear gradient feed of nutrients. ***Process Biochemistry***. England: Elsevier Science Publishers, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. ***Anal. Chem.***, v. 31, 1959. p. 426.

MONTIEL, M.L.T.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Water Research**, v. 35, p. 3807-16, 2001.

MURREL, W.G. The biochemistry of the bacterial endospore. **Adv. Microbial Physiol.**, v. 1, p. 133-251, 1967.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 501 p. Atheneu Editora: São Paulo, 1991.

OZKAN, M.; DILEK, F.B. YETIS, Ü.; ÖZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**. V. 154, p. 49-53, 2003.

PAIVA, D. P. **O borrachudo indicador biológico da qualidade da água**. Curso de Capacitação em Práticas Ambientais Sustentáveis. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 112p.

PASSOS, R.F. **Análise do cultivo descontínuo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio complexo em diferentes concentrações de glicose**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2000.

PEFEROEN, M. Insect control with transgenic plants expressing Bt crystal proteins. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., ed. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p.21-48.

PELCZAR Jr, Michael J. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. vol 1. 2 ed. São Paulo: Makron Books Ltda, 1996. 524 p.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda***. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PORTER, A.G.; DAVIDSON, E.W.; LIU, J.-W. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation of effective biological control of mosquitoes. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 838-861, 1993.

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. **Biological Control**, v. 36, p. 288-292, 2005.

PRIEST, F.G. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bactéria. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; LeRoux, C.N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, p. 383-398, 2000.

PURCELL, B.H. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Aedes taeniorhynchus* and some non target organisms in the salt marsh. In: Glare, T. R.; O’callaghan, M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health**. 1-44, 1998.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C.F.G.; LIMA, M.M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 6, p. 40-41, 1998.

RABINOVITCH, L. Controle biológico de vetores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p.45, 1997.

REPETTO, R.; BALIGA, S.S. **Los plaguicidas y el sistema inmunitario: riesgos para la salud publica**. 112 p. Washington, DC: WRI, 1996.

RIBEIRO, G.; ORVALHO, J.; ASSUMPÇÃO, S. **Os agrotóxicos como disruptores endócrinos**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2001. 6p.

ROSE, A.H. Production and industrial importance of secondary products of metabolism. In: **Economic Microbiology**, v. 3, Academic Press: London, 1979.

RUAS NETO, A.; SILVEIRA, S. M. **Uso de inseticidas bacterianos para o controle de culicídeos e simúlídeos no Rio Grande do Sul**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, Supl III, p. 39-45, 1989.

RUAS NETO, A.L. *Bacillus thuringiensis var. israelensis* como alternativa no controle de simúlídeos no rio Grande do Sul. Suscetibilidade a campo. **B. Saúde**, v. 11, p. 21-26, 1984.

SAAR, J.H.; SILVEIRA, M.M.; PASSOS, R.F.; BEBERT-MOLINA, M.; WUTHSTRACK, G.H.; JONAS, R. Formulação de um meio de produção de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* utilizando resíduos agroindustriais. In: **Anais do V SICONBIOL (Simpósio de Controle Biológico)**, 203p. Foz do Iguaçu, PR. 9 a 14/07/1996.

SALAMA, H.S.; MORRIS, O.N. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J. Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Willey, cap. 11, p. 237-253, 1993.

SARRAFZADEH, M.H.; NAVARRO, J.M. The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H-14. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 305-310, 2006.

SATO, G. Identificação de peixes predadores de larvas de simúlídeos da região de Joinville/SC. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 10, p. 962-966, 1987.

SCHIMIDELL, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial**. vol 2, Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SETTI, S.L.; MOUGA, D.M.D.S.; SOUZA, O. **Espécies de borrachudos (Diptera, Simuliidae) ocorrentes no município de Joinville, Santa Catarina**. Caderno de Iniciação à Pesquisa. v. 8. p. 146-9, 2006.

SOUZA SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. Agrotóxicos e Ambiente. In: **Agrotóxicos: aspectos gerais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap. 1, p. 17-73.

STAHLY, P.; ANDREWS, R.E. TOUSTEN, A.A. The Genus *Bacillus* – Insect Pathogens. In: **The Prokaryotes**. 2nd ed., 1990.

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v.6, p.1211-1217, 1992.

TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 398 p.

VANDENBERG, J.D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). In: Joung, K.-B.; Côté, J.-C. **A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis***. Horticultural Research and Development Centre. Technical Bulletin n. 29. Québec, Canada, 2000.

Van FRANKENHUYZEN, K. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; LeRoux, C.N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 371-381, 2000.

VIDYARTHI, A.S.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R.; SURUMPALLI, R.Y. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. **Water Research**, v. 36, p. 4850-4860, 2002.

VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S.; ARAUJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de estudos Agrários Luiz de Queiroz, p. 447-480, 1998.

WENK, P. Bionomics of adult black fly. In: Paiva, D. P. **O borrachudo indicador biológico da qualidade da água**. Curso de Capacitação em Práticas Ambientais Sustentáveis. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 112p.

WOOD, D.M. Biting flies attacking man and livestock in Canada. In: Paiva, D. P. **O borrachudo indicador biológico da qualidade da água**. Curso de Capacitação em Práticas Ambientais Sustentáveis. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 112p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pesticide application equipment for vector control. **Technical Reporter Series**, 791, 58p., 1991.

ANEXO 1

Foto aérea da região de Joinville/SC

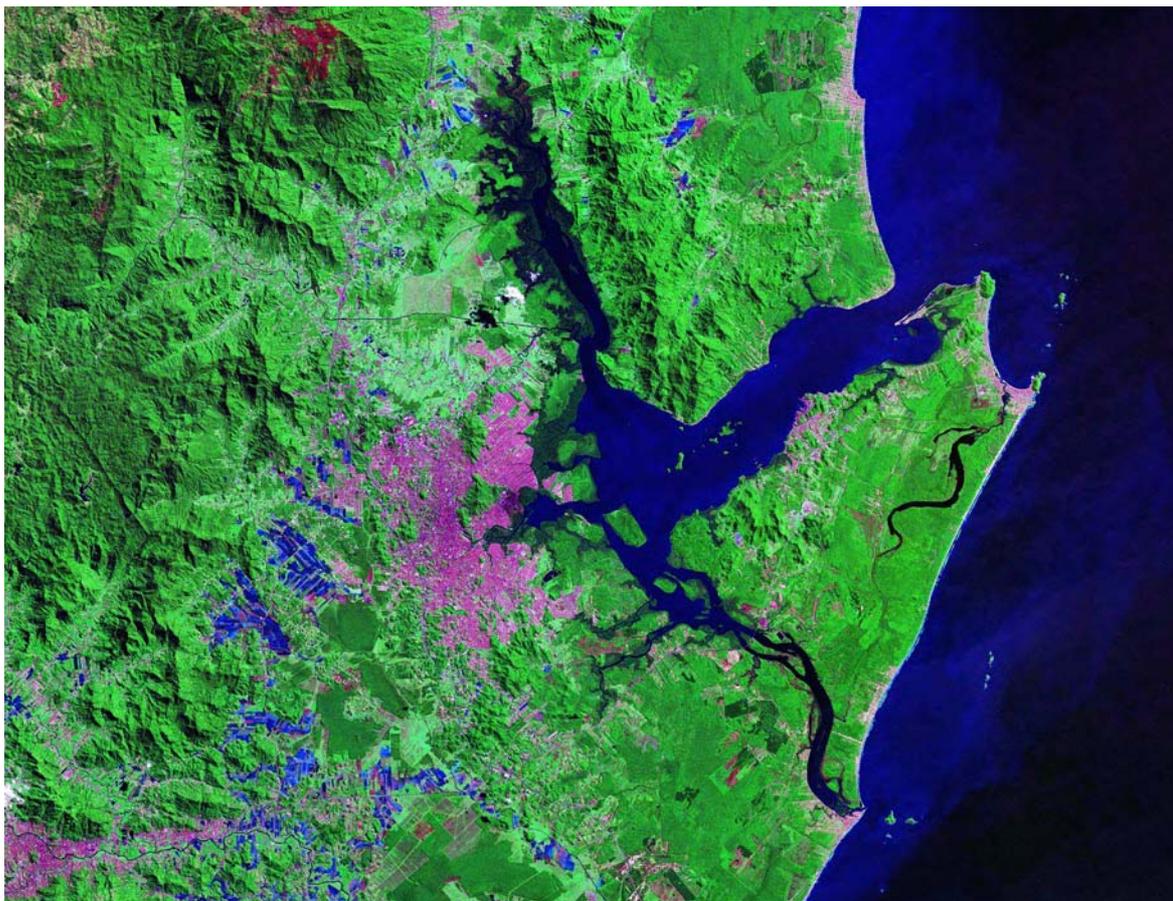


Figura A1: Foto área da região de Joinville, localizada a nordeste do estado de Santa Catarina e onde há presença de *Simulium pertinax*.

Fonte: Estação meteorológica da UNIVILLE, 2005.

ANEXO 2

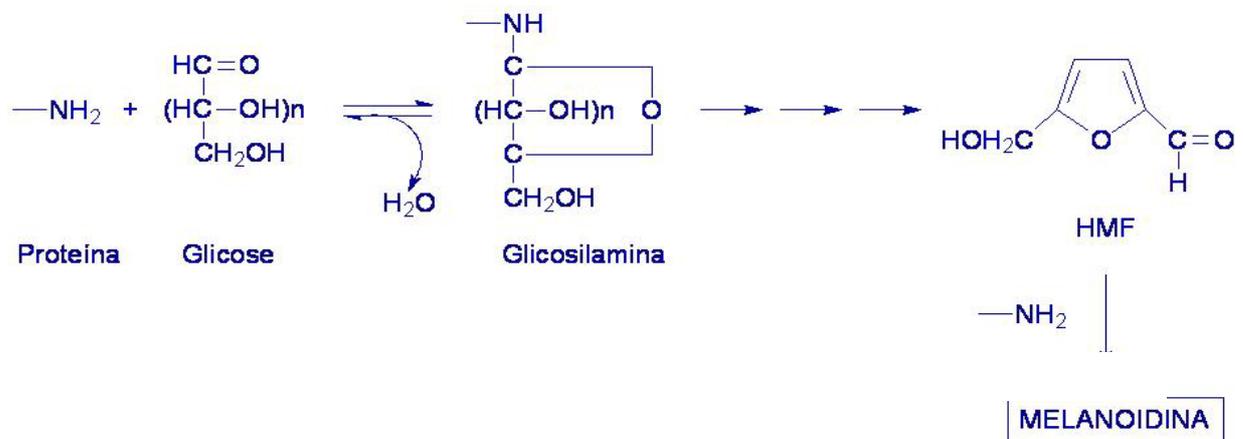
Reação de Maillard

Reação de Maillard

Reação envolvendo aldeído (açúcar redutor) e grupos amina de aminoácidos, peptídeos e proteínas, seguida de várias etapas e culminando com a formação de um pigmento escuro.

- é a principal causa do escurecimento desenvolvido durante o aquecimento e armazenamento prolongados do produto.
- reduz a digestibilidade da proteína.
- inibe a ação de enzimas digestivas.
- destrói nutrientes como aminoácidos essenciais e ácido ascórbico.
- interfere no metabolismo de minerais, mediante a complexação com metais.

Resumidamente, a reação de Maillard é uma reação caracterizada pela junção do grupo carbonila dos açúcares redutores com o grupo amínico das proteínas, de peptídios ou de aminoácidos. Ela se desenrola numa série de etapas onde ocorrem combinações; rearranjos, chamados arranjos de Armadori, que são a isomerização da aldossilamina; a formação da base de Schiff; a degradação de Strecker e algumas reações intermediárias, onde, de algumas delas surgem o furfural ou o hidroximetilfurfural, este é polimerizado, originando as melanoidinas. As alterações ocorridas durante a reação de Maillard, reduzem a solubilidade e o valor nutritivo das proteínas.



ANEXO 3

Calibração do analisador de gases

Calibração do analisador de gases

Os gases efluentes do biorreator B1 foram conduzidos para o analisador de gases MAIHAK, composto de um analisador paramagnético de oxigênio (OXIGOR 6N) e um analisador infravermelho de dióxido de carbono (UNOR 6N). O aparelho foi conectado ao biorreator através de uma mangueira de silicone, sendo o fluxo de gases admitido no sistema de análise controlado pelo próprio aparelho. A calibração do equipamento foi feita utilizando-se ar e uma mistura gasosa composta de 17% de oxigênio, 4% de dióxido de carbono e 79% de nitrogênio. Inicialmente, o ar comprimido foi introduzido no sistema para calibrar o valor 21% do analisador paramagnético OXIGOR 6N e o zero do analisador infravermelho UNOR 6N. Em seguida, com a mistura gasosa, foram estabelecidos os valores de 17% de oxigênio e 4% de dióxido de carbono nos dois módulos, respectivamente. Durante os ensaios de fermentação, a calibração era monitorada e, a cada três horas refeita a fim de corrigir eventuais imprecisões de medição.

ANEXO 4

Curvas de OD e ART nos ensaios FSC80, FSC40 e FSC20

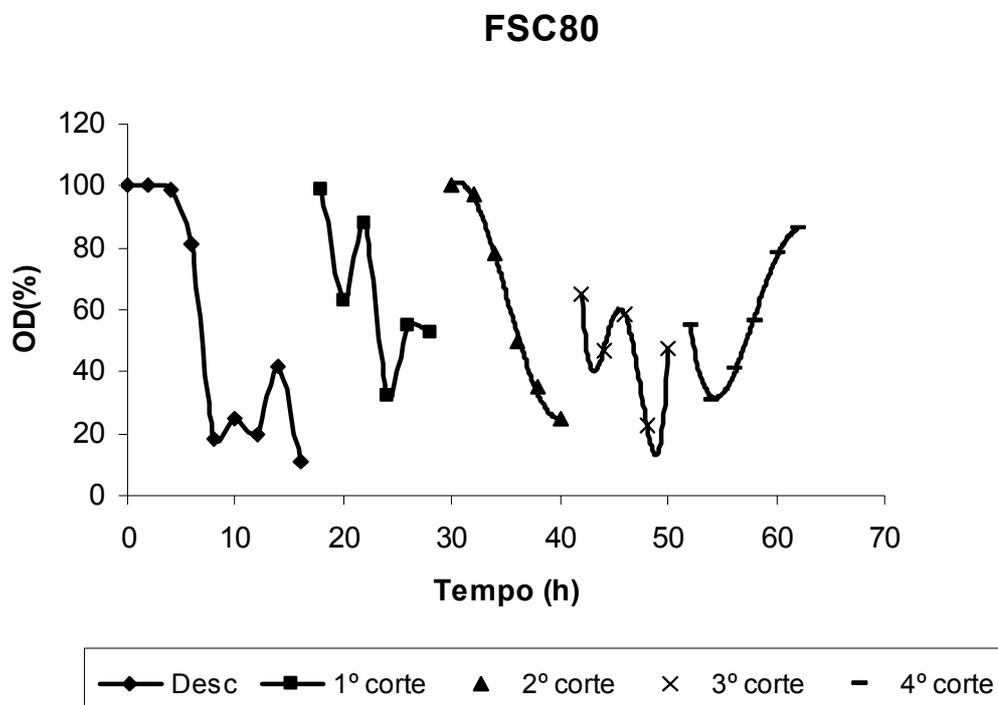


Figura A2: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC80.

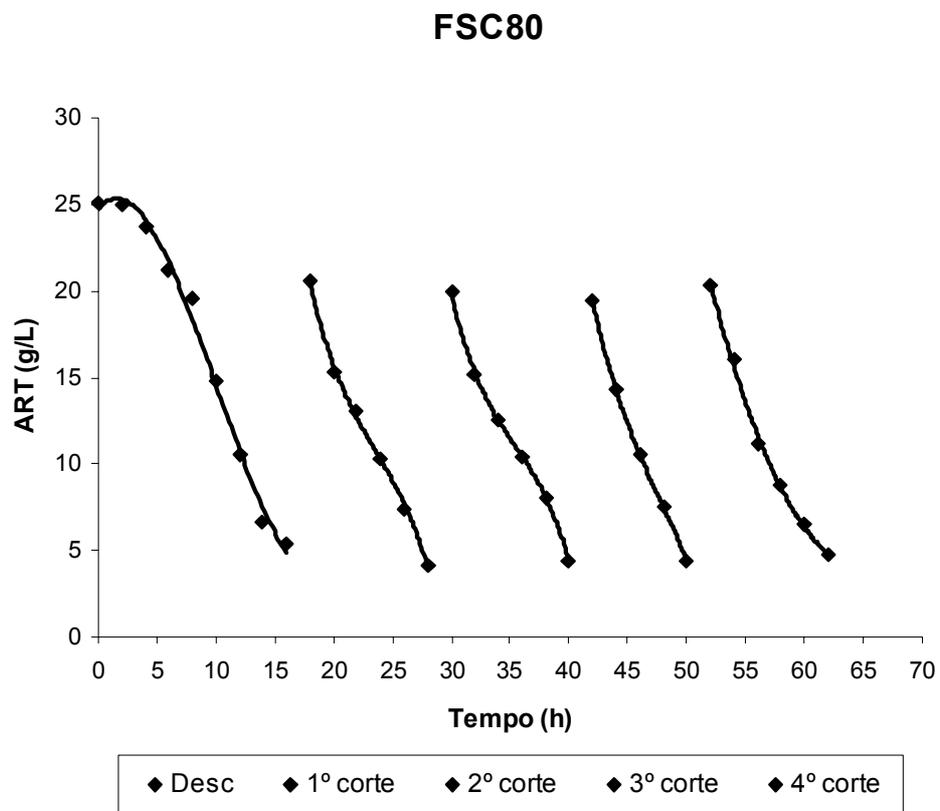


Figura A3: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC80.

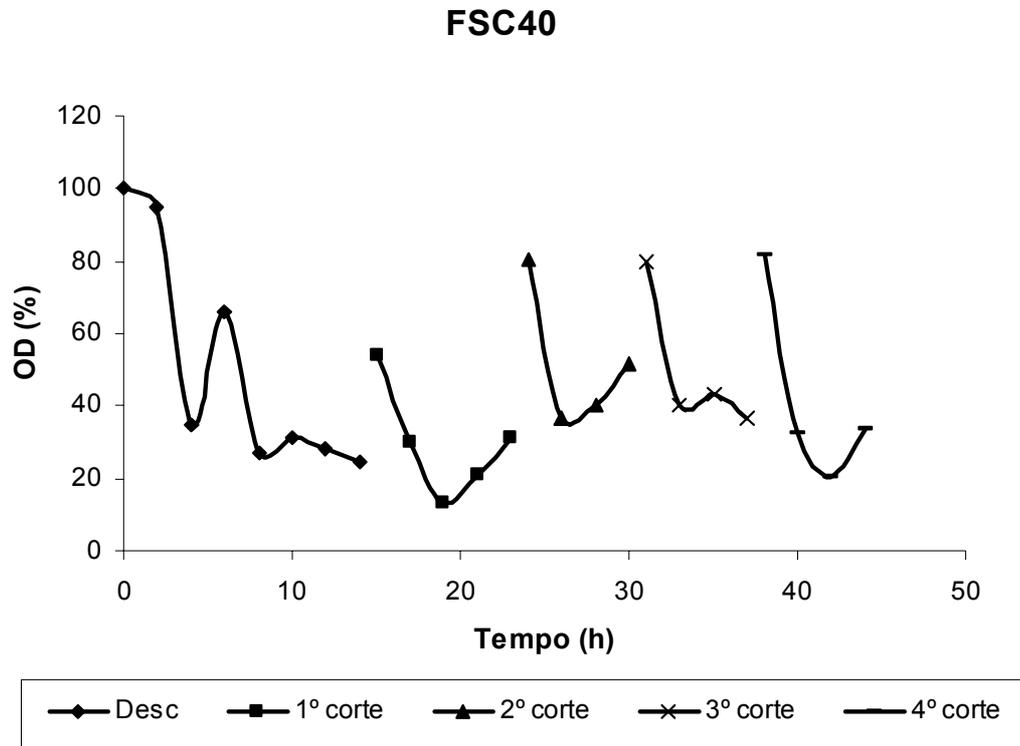


Figura A4: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC40.

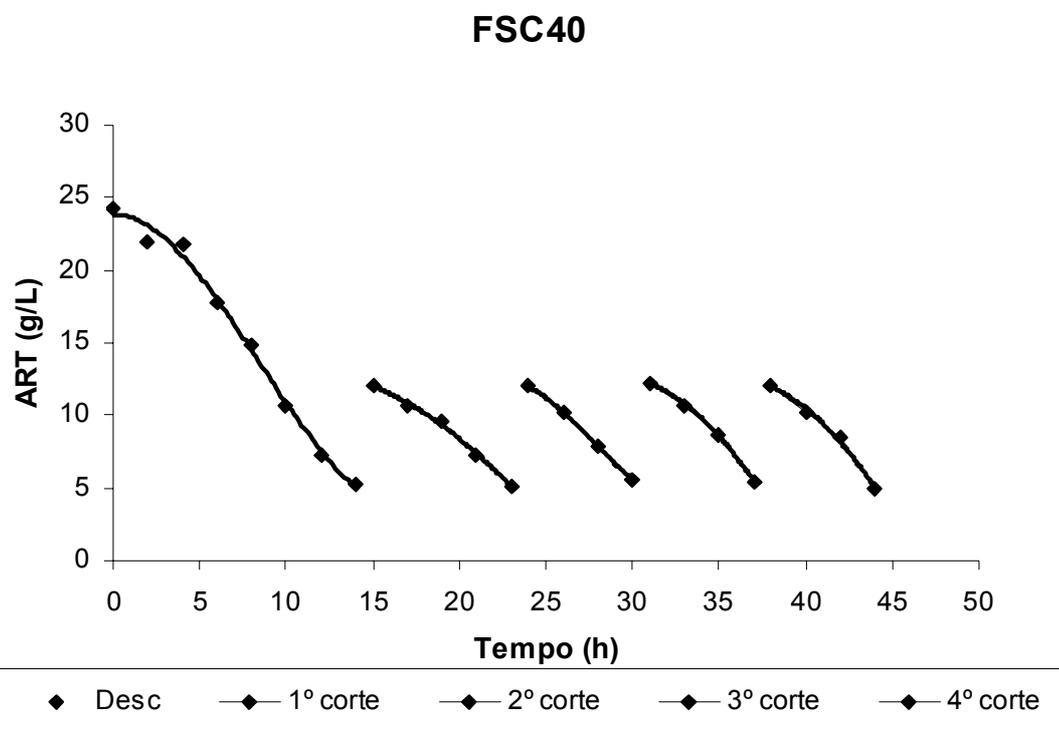


Figura A5: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC40.

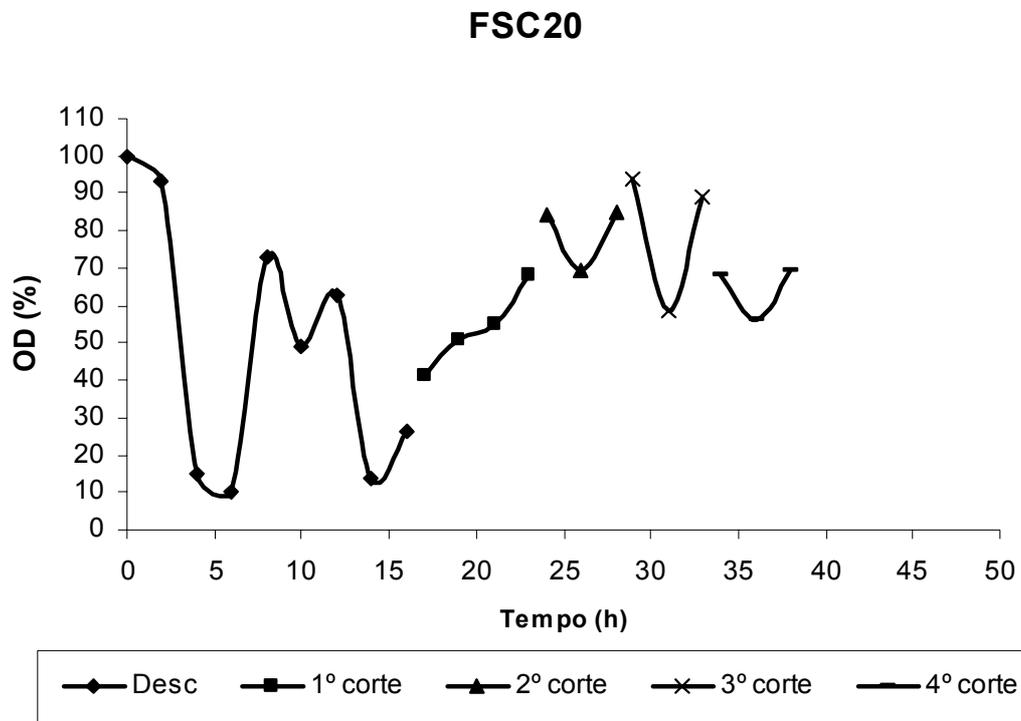


Figura A6: Concentração de oxigênio dissolvido (OD%) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC20.

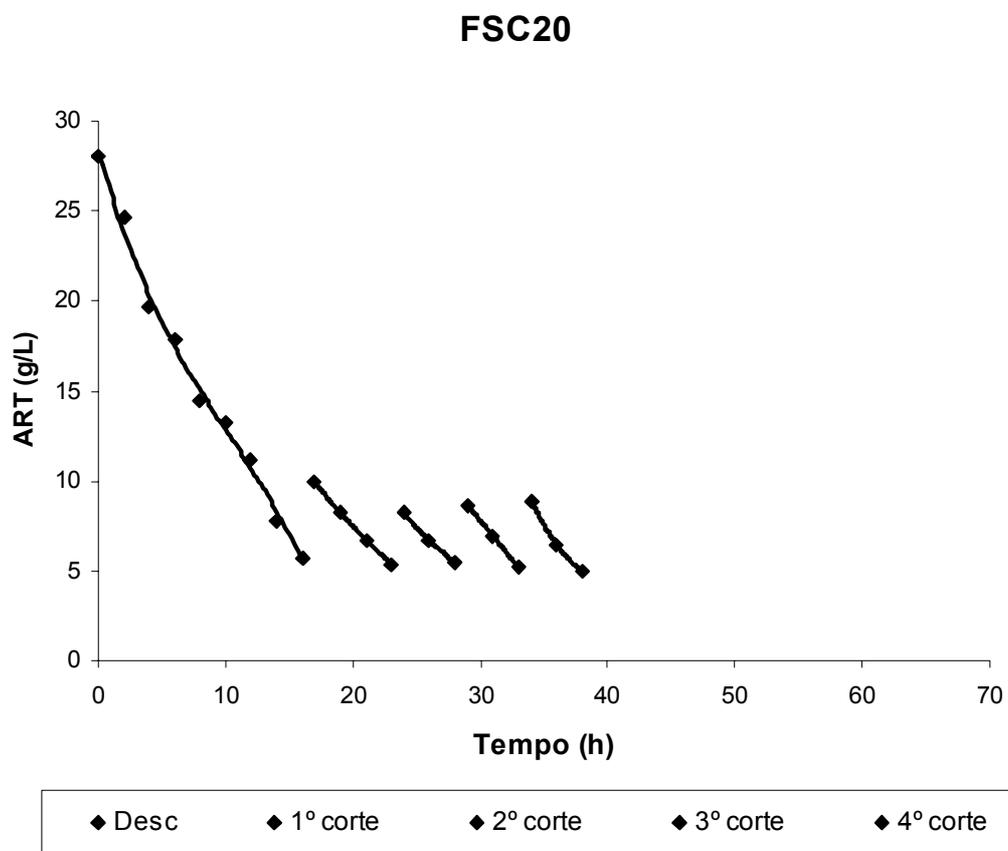
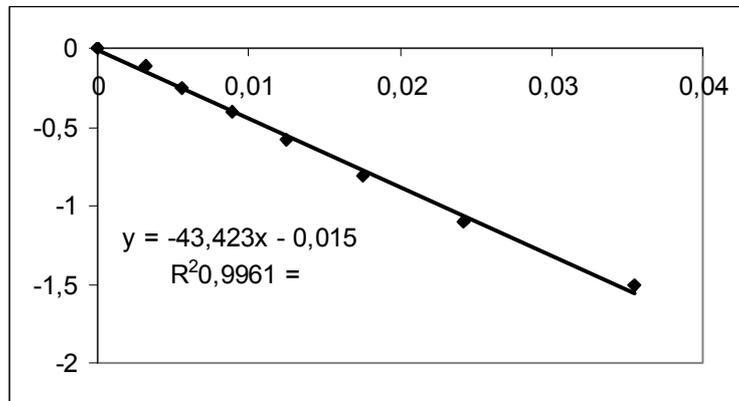


Figura A7: Consumo de substrato (ART) em função do tempo no início e em cada corte efetuado no experimento FSC20.

ANEXO 5

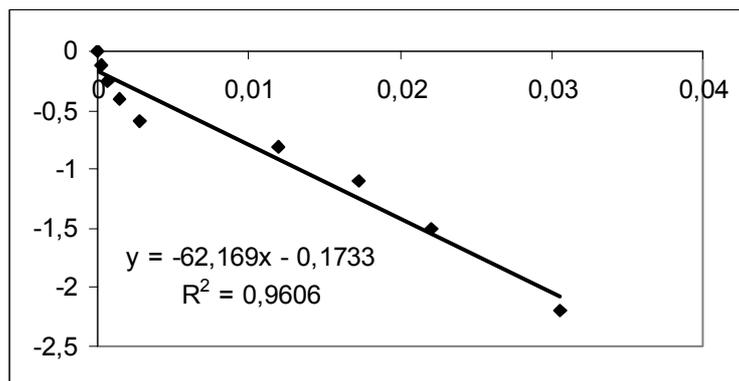
$K_L a$ nas diversas velocidades de rotação usadas nos experimentos sempre com vazão de ar de 0,5vvm.

Rotação: 450rpm



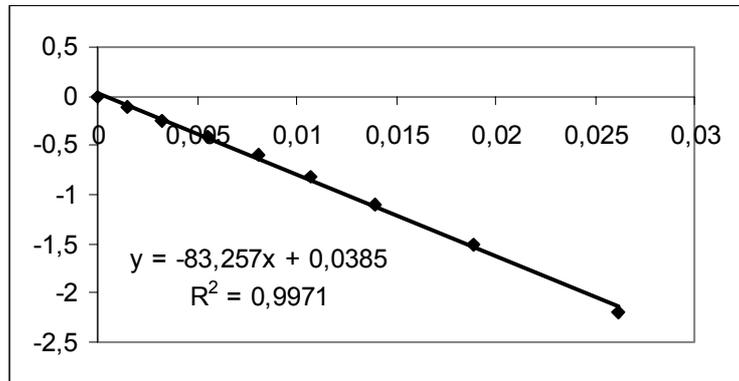
K_{La} : 43,42 h⁻¹

Rotação: 500rpm



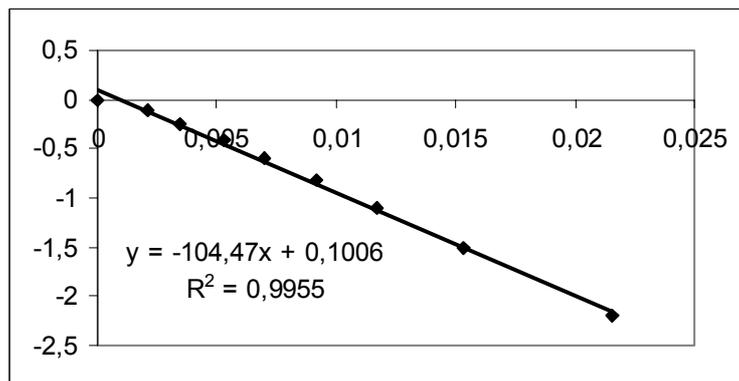
K_{La} : 62,17 h⁻¹

Rotação: 550rpm



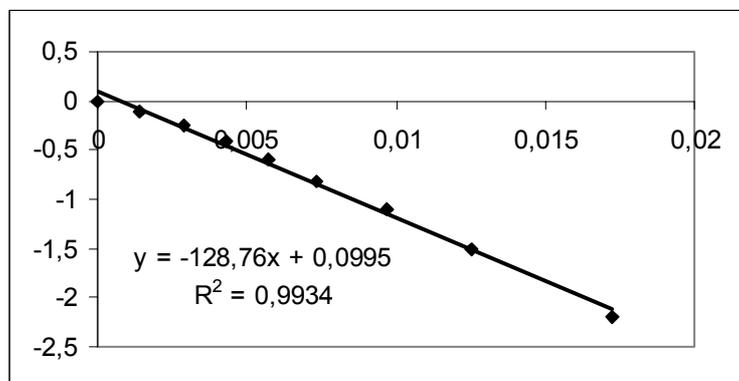
K_{La} : 83,26 h⁻¹

Rotação: 600rpm



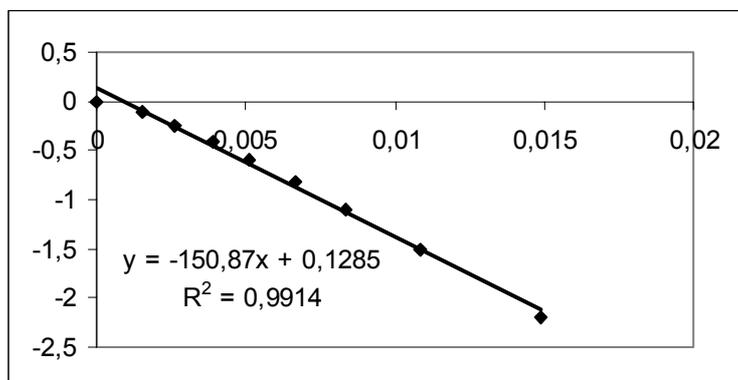
K_{La} : 104,5 h⁻¹

Rotação: 650rpm



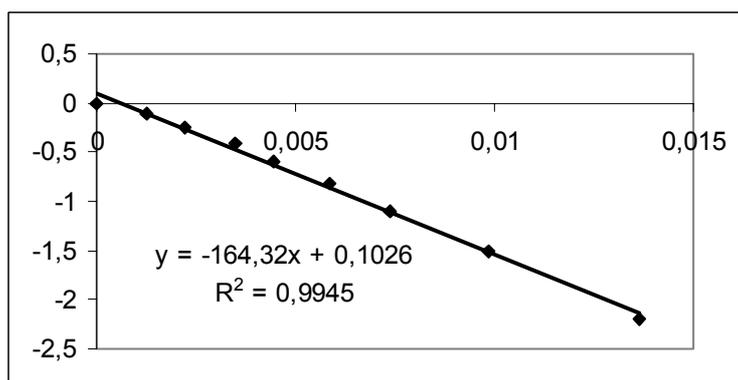
K_{La} : 128,8 h⁻¹

Rotação: 700rpm



K_{La} : 150,9 h⁻¹

Rotação: 750rpm



K_{La} : 164,3 h⁻¹

ANEXO 6

Curva de calibração dos padrões de glicose

DNS - Curva	
Conc. (g/L)	Abs
0	0
0,1	0,061
0,25	0,184
0,5	0,381
0,75	0,582
1	0,780

