UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – USP

CLÁUDIA RODRIGUES BARBOSA

Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Lorena
2009

CLÁUDIA RODRIGUES BARBOSA

Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Lorena
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Barbosa, Cláudia Rodrigues
Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* / Cláudia Rodrigues Barbosa ; orientador Arnaldo Márcio R. Prata. – Lorena: 2009.
133 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Bioinseticida 2. Glicerol de biodiesel 3. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 4. *Aedes aegypti* 5. Meio de cultura - formulação. I. Título.

661.164.2 - CDU

Dedico esta dissertação à minha mãe, Maria Helena, pelo carinho, amor e apoio de sempre, e a meus irmãos, Lucas, Aline e Vinícius, pela amizade e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar e me permitir alcançar meus objetivos.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, por tornar possível a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela orientação, aprendizado, confiança, paciência e principalmente pela grande amizade.

À Prof. Dra. Marília Berbert-Molina, pela imensa contribuição para realização deste trabalho, apoio, esclarecimentos de questionamentos técnicos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Walter de Carvalho, pelas contribuições científicas dadas a essa dissertação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro” (UENF), pelo fornecimento do microrganismo.

À amiga Adriana, pelo grande apoio, presença, carinho e amizade.

Ao Vinícius, pelo apoio, confiança e carinho de sempre.

Aos amigos Alan e Viviane, pela presença, colaboração e momentos de descontração no ambiente de trabalho.

Ao Juan, pelos esclarecimentos e apoio.

Aos colegas Ricardo, João Paulo, Lívia, Dani Cortez e Priscila, pela colaboração neste trabalho.

À Rita, Nicanor, José Carlos e Jussara, pelo auxílio técnico.

À amiga Lílian, que mesmo estando longe sempre me proporcionou estímulo, carinho e amizade.

Ao Fabrízio pela ajuda na realização dos bioensaios e esclarecimentos.

À minha família, em especial, à minha mãe Maria Helena e a meus irmãos Lucas, Aline e Vinícius pelo exemplo, apoio, carinho e confiança de sempre.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

BARBOSA, C. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

A utilização do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para a obtenção de produtos biotecnológicos é uma alternativa promissora como forma de disposição adequada deste subproduto. O bioinseticida formulado com toxinas de *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizado para o controle de insetos veiculadores de doenças, como a dengue, que atingem milhões de pessoas em todo o mundo. Para que este bioinseticida seja competitivo com os inseticidas químicos é necessário que o custo de sua produção seja diminuído, o que pode ser feito com a utilização de fontes de carbono alternativas, de forma a diminuir o custo do meio de fermentação. Neste trabalho, empregou-se o glicerol proveniente da fabricação do biodiesel de sebo bovino como componente do meio de fermentação para a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Foram avaliados diferentes tratamentos do resíduo contendo glicerol, baseados em acidificação, decantação e aquecimento, para remoção de impurezas. O ajuste do pH até 7 pela adição de ácido fosfórico, seguido de decantação, aquecimento para remoção de metanol e nova decantação, foi a forma de tratamento escolhida, uma vez que proporcionou a maior atividade tóxica do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti*. O meio de fermentação foi formulado determinando-se as concentrações de glicerol, extrato de levedura, sulfato de amônio e cloreto de cálcio que proporcionaram a maior atividade larvicida do meio fermentado, de acordo com planejamento fatorial 2^4. A toxicidade foi avaliada pela CL_{50} (concentração do complexo esporo-cristal necessária para matar 50% da população de larvas). O melhor valor de CL_{50} foi obtido com a utilização de glicerol a 10 g/L, extrato de levedura a 12 g/L, cloreto de cálcio a 0,24 g/L e sem adição de sulfato de amônio. A análise estatística dos dados confirmou a significância das variáveis glicerol, extrato de levedura e cloreto de cálcio sobre a atividade larvicida do meio fermentado. Cloreto de cálcio não influenciou significantemente a produção de esporos pela bactéria, e a taxa de esporulação não foi influenciada por cloreto de cálcio e sulfato de amônio nas concentrações estudadas. Para a otimização da produção de endotoxinas pela bactéria, foi realizado um planejamento fatorial 2^2, variando-se apenas as concentrações de extrato de levedura e de cloreto de cálcio, fixando-se a concentração de glicerol em 10 g/L e excluindo-se o sulfato de amônio do meio de fermentação. O melhor valor de CL_{50} (0,295 mg/mL) foi obtido no ensaio com 15 g/L de extrato de levedura e 0,4 g/L de cloreto de cálcio.

Palavras-chave: Bioinseticida. Glicerol de Biodiesel. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Aedes aegypti*. Meio de cultivo - Formulação.

ABSTRACT

BARBOSA, C.R. **Evaluation of glycerol derived from biodiesel production as substrate for endotoxins production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2008. 133 p. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

The use of glycerol derived from biodiesel production as a substrate for the acquisition of biotechnology products is a promising alternative as an adequate disposal mean of this by-product. The bioinsecticide formulated with toxins from *Bacillus thuringiensis* has been used to control vectors insects of diseases, such as dengue, which affect millions of people around the world. For this bioinsecticide be competitive with chemical insecticides is necessary a lower cost of its production, which can be achieved by the use of alternative carbon sources in order to reduce the fermentation medium cost. In this work, it was used glycerol from beef tallow biodiesel production as a component of the fermentation medium for the production of bioinsecticide by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Different treatments of the residue containing glycerol, based on acidification, sedimentation and heating, to remove impurities, were evaluated. The adjustment of pH to 7 by addition of phosphoric acid, followed by decantation, then heating for removal of methanol, and a new decantation, was the treatment selected, since it provided the highest toxic activity of the fermented broth against *Aedes aegypti* larvae. The fermentation medium was formulated by determining the concentration of glycerol, yeast extract, ammonium sulfate and calcium chloride that provided the greatest larvicidal activity of the fermented broth according to 2^4 factorial design. The toxicity was measured by the LC_{50} (concentration of the spore-crystal complex required to kill 50% of the larvae). The best value of LC_{50} was obtained using glycerol at 10 g/L, yeast extract at 12 g/L, calcium chloride at 0.24 g/L and without addition of ammonium sulfate. Statistical analysis confirmed the significance of the variables glycerol, yeast extract and calcium chloride on the larvicidal activity of fermented broth. Calcium chloride did not influence significantly the production of spores by the bacteria and the sporulation ratio was not affected by calcium chloride and ammonium sulfate at the studied concentrations. For the endotoxins production optimization, a 2^2 factorial design was carried out, varying only the concentrations of yeast extract and calcium chloride, maintaining the concentration of glycerol at 10 g/L and excluding ammonium sulfate of the fermentation medium. The best value of LC_{50} (0,295 mg/mL) was obtained in the assay with 15 g/L of yeast extract and 0.4 g/L of calcium chloride.

Keywords: Bioinsecticide. Glycerol from Biodiesel. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Aedes aegypti*. Culture Medium - Formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Aplicações do Glicerol na Indústria (NAE, 2005). 18

Figura 2.2 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto. 19

Figura 2.3 - Fluxograma do processo de produção de biodiesel, gerando glicerina como subproduto (KNOTHE; GERPEN, 2006). 20

Figura 2.4 - Sistemas de transporte de moléculas em células de bactérias (adaptado de: MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). 26

Figura 2.5 - Via metabólica de assimilação de glicerol por leveduras e bactérias (Adaptado de: LEHNINGER, 1977; YAZDANI; GONZALEZ, 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008). 28

Figura 2.6 - Esporulação de bactérias do gênero Bacillus (BROCK et al., 1994). 31

Figura 4.1 - (A) Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* e (B) fotografia da larva no 4º ínstar de desenvolvimento (O Aedes, 2008). 51

Figura 5.1 - Aspecto da mistura após a 1ª etapa de decantação (A); Aspecto da mistura após acidificação até pH 5,0 e decantação (B). 55

Figura 5.2 - Concentração de glicerol em função do tempo durante a fermentação em meio sintético (SI) e em meios com glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 57

Figura 5.3 - Concentração de células em função do tempo durante a fermentação em meios com glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 58

Figura 5.4 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$), considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 59

Figura 5.5 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 59

Figura 5.6 - Número total de células (CT) obtido nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis.* 60

Figura 5.7 - Número total de esporos (ET/mL) obtido nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 61

Figura 5.8 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtida nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 61

Figura 5.9 - Variação da concentração celular em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4. 68

Figura 5.10 – Microscopia óptica do cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerol (ensaio 11), com 21 horas de fermentação, mostrando floculação (grumos – seta larga) e células livres esporuladas (seta fina)..... 70

Figura 5.11 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*..... 72

Figura 5.12 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*..... 72

Figura 5.13 - Variação da concentração de glicerol em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4..... 74

Figura 5.14 - Variação de pH em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4. 76

Figura 5.15 - Número total de células (CT) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.* 78

Figura 5.16 - Número total de esporos (ET) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.* 79

Figura 5.17 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtida por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.* 79

Figura 5.18 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta toxicidade. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol 82

Figura 5.19 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta esporos totais. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol..... 82

Figura 5.20 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta taxa de esporulação. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol. 83

Figura 5.21 - Superfície de resposta para a taxa de esporulação obtida em fermentações com *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas (sulfato de amônio e cloreto de cálcio ambos fixados em 0 g/L). 94

Figura 5.22 - Variação da concentração celular em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2..... 96

Figura 5.23 - Variação da concentração de glicerol em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2..... 98

Figura 5.24 - Variação do pH em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2. 99

Figura 5.25 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.* 100

Figura 5.26 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.* 101

Figura 5.27 - Número total de células (CT) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.* 102

Figura 5.28 - Número total de esporos (ET) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.* 102

Figura 5.29 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.* 103

Figura 5.30 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos a 95% de confiança sobre a resposta toxicidade. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura..... 106

Figura 5.31 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos a 95% de confiança sobre a resposta esporos totais. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura. 107

Figura 5.32 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos a 95% de confiança sobre a resposta taxa de esporulação. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura... 107

Figura 5.33 - Superfície de resposta para a produção de esporos por *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas $CaCl_2$ (X_1) e extrato de levedura (X_3). 113

Figura 5.34 - Superfície de resposta para a taxa de esporulação obtida em fermentações com *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas $CaCl_2$ (X_1) e extrato de levedura (X_3). 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas do glicerol (MORRISON, 1994; APLEBY, 2006) 17

Tabela 2.2 - Produtos obtidos a partir do glicerol por via química e biotecnológica. 23

Tabela 2.3 - Composição da glicerina proveniente da produção de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas (THOMPSON; HE, 2006). 24

Tabela 4.1 - Composição do meio de cultivo GLYS. 44

Tabela 4.2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^4, para avaliação do efeito dos nutrientes sobre o crescimento de *B. thuringiensis* e toxicidade do meio fermentado (concentrações em g/L). 47

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento fatorial 2^4, apresentando as concentrações dos nutrientes (g/L) estudados na fermentação com *B.thuringiensis* 47

Tabela 5.1 - Características da glicerina proveniente da fabricação do biodiesel a partir de sebo bovino. 53

Tabela 5.2 - Características do resíduo de glicerol submetido a diferentes tratamentos, com base em acidificação, decantação e aquecimento. 54

Tabela 5.3 - Porcentagens de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas à suspensão esporo-cristal em diferentes concentrações, obtidas por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*. 63

Tabela 5.4 - Valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, esporos totais, taxa de esporulação e tempo final de fermentação obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 2^4. 81

Tabela 5.5 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4. 87

Tabela 5.6 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4... 87

Tabela 5.7- Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4. 88

Tabela 5.8 - Critérios para validação de modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996). 89

Tabela 5.9 - Análise de variância da regressão que representa a resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4. 90

Tabela 5.10 - Análise de variância da regressão que representa a resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4. 90

Tabela 5.11 - Análise de variância da regressão que representa a resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4. 90

Tabela 5.12 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta taxa de esporulação, desconsiderando curvatura. 92

Tabela 5.13 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a resposta taxa de esporulação, desconsiderando os efeitos não significativos..... 92

Tabela 5.14 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, visando à otimização da resposta toxicidade. 95

Tabela 5.15 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, visando à otimização da resposta toxicidade. 95

Tabela 5.16 - Valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, esporos totais e taxa de esporulação, obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 2^2. 103

Tabela 5.17 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2. 108

Tabela 5.18 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2. 108

Tabela 5.19 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2. ... 109

Tabela 5.20 - Análise de variância da regressão que representa a resposta toxicidade, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 110

Tabela 5.21 - Análise de variância da regressão que representa a resposta esporos totais, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 110

Tabela 5.22 - Análise de variância da regressão que representa a resposta taxa de esporulação, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 110

Tabela 5.23 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, desconsiderando curvatura. 111

Tabela 5.24 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, desconsiderando curvatura. 111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **14**

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **15**

2.1 Biodiesel 15

2.2 Glicerol 17

2.2.1 Características e aplicações 17

2.2.2 Obtenção e uso em bioprocessos 19

2.2.3 Assimilação e metabolismo por microrganismos 25

2.3 *Bacillus thuringiensis* 27

2.4 Uso de *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico de insetos 31

2.4.1 Atividade entomopatogênica de *Bacillus thuringiensis* 31

2.4.2 Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* 34

2.4.3 Formulações de meio para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* 38

3 OBJETIVOS **42**

4 MATERIAL E MÉTODOS **43**

4.1 Microrganismo 43

4.2 Meios de Cultivo 43

4.2.1 Substrato 43

4.2.2 Meio sintético 43

4.3 Condições de Cultivo 43

4.3.1 Preparo da cultura estoque de esporos 43

4.3.2 Preparo do inóculo 44

4.3.3 Ensaios de fermentação em frascos 45

4.4 Sequência Experimental 45

4.4.1 Tratamento da glicerina 45

4.4.2 Avaliação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meios contendo glicerol 46

4.4.3 Formulação do meio de fermentação com glicerol 46

4.5 Métodos Analíticos 48
4.5.1 Concentração celular 48
4.5.2 Número de células e de esporos 48
4.5.3 Morfologia celular 49
4.5.4 Concentração de glicerol 49
4.5.5 Obtenção do complexo esporo-cristal 49
4.5.6 Determinação da atividade larvicida dos meios 49
4.5.7 Estimativa do teor de sais de ácidos graxos 50
4.6 Forma de Análise dos Resultados 51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
5.1 Definição do Tratamento da Glicerina 53
5.1.1 Tratamento 53
5.1.2 Ensaios de fermentação com glicerina tratada 56
5.2 Avaliação da Suplementação do Glicerol com Nutrientes 64
5.2.1 Ensaios do planejamento fatorial 2^4 64
5.2.1.1 Ensaios de fermentação 64
5.2.1.2 Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2^4 80
5.2.2 Ensaios do planejamento fatorial 2^2 94
5.2.2.1 Ensaios de fermentação do planejamento fatorial 2^2 94
5.2.2.2 Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2^2 106
6 CONCLUSÕES 114
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 115
REFERÊNCIAS 116
APÊNDICE 131

1 INTRODUÇÃO

As fontes renováveis de energia assumem importante papel no mundo contemporâneo devido à possibilidade de escassez das reservas de petróleo, aos preços flutuantes dos combustíveis fósseis e à poluição ambiental gerada pelo emprego destes combustíveis. A busca por fontes de energia renováveis e que assegurem o desenvolvimento sustentável levou a implantação do biodiesel na matriz energética brasileira como combustível alternativo. De maneira geral, 10% do volume total do biodiesel produzido é constituído por glicerol, o qual é impuro e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007). No Brasil, o volume de glicerol produzido no ano de 2008 alcançou mais de 100 milhões de litros como consequência da produção de 1,2 bilhões de litros de biodiesel, necessário para cumprir a legislação que estabelece a obrigatoriedade de adição de 2% do biocombustível ao diesel comum (FREITAS; NACHILUK, 2009).

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado é uma alternativa promissora para o aproveitamento deste subproduto (PAPANIKOLAU et al., 2002; ZHAO; CHEN; YAO, 2006; PAPANIKOLAOU et al., 2008). Os inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* têm sido produzidos utilizando-se diversos substratos para a fermentação, mas, segundo Prabakaran e Balaraman (2006), a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em larga escala ainda é um processo caro devido ao alto custo do meio de fermentação.

A formulação de inseticidas com linhagens de *Bacillus thuringiensis* apresenta diversas vantagens sobre os inseticidas químicos, como diminuição do desenvolvimento de resistência pelos insetos, especificidade contra insetos-alvo, inocuidade aos animais e seres humanos e ausência de poluição ambiental

(CAPALBO; MORAES, 1987). Apesar da comprovada eficácia de *Bacillus thuringiensis* no combate a vetores de doenças e do aumento de seu uso em formulações comerciais, existe ainda uma grande demanda por informações a respeito dos aspectos fisiológicos gerais desta bactéria e, principalmente, dos processos industriais de produção de inseticidas com este microrganismo (YANG; WANG, 1998). Os trabalhos publicados sobre o processo fermentativo são escassos e relacionam-se às diferentes variedades da bactéria. Sachidanandham, Jenny e Fiechter (1997) sugerem que, em razão da variação de especificidade entre as diferentes variedades da bactéria, estas terão também um comportamento variável frente aos diferentes meios de cultivo e condições de fermentação empregadas. O aprimoramento das linhagens já descobertas, dos processos de produção e a formulação dos meios de cultivo são indispensáveis para o desenvolvimento futuro do mercado de inseticidas com *Bacillus thuringiensis (*LACEY; KAYA; VAIL, 2001).

Neste trabalho, empregou-se o glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como componente do meio de fermentação para a produção de bioinseticida com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Para isto, foi determinada uma forma adequada para o tratamento do glicerol, que permitiu a obtenção de toxicidade do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti* e também foi realizada a formulação do meio de fermentação, determinando-se as concentrações de nutrientes necessárias para a obtenção de um meio fermentado com maior toxicidade.

Destaca-se o caráter inovador deste trabalho, uma vez que não foi encontrada na literatura nenhuma referência relacionada à produção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* utilizando o glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para fermentação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém dos combustíveis fósseis. Como estas fontes são poluentes e não-renováveis, a busca por fontes alternativas de energia é de fundamental importância (MA; HANNA, 1999; PACHAURI; HE, 2006).

O biodiesel constitui um combustível alternativo que pode ser obtido pela reação de transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais com metanol ou etanol. As matérias-primas vegetais são derivadas de óleos vegetais como soja, mamona, canola, palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal são obtidas do sebo bovino, suíno e de aves (MA; HANNA, 1999; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2008).

O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais de grau alimentício não apresenta viabilidade econômica em relação ao diesel de petróleo, devido ao alto custo da matéria-prima lipídica, que constitui cerca de 70 a 85% do custo total de produção. Em geral, uma compensação financeira para os produtores ou a eliminação de impostos que incidem sobre os combustíveis são estratégias utilizadas por alguns países para estimular o uso de combustíveis renováveis como o biodiesel (KNOTHE; GERPEN, 2006; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2008). Gorduras animais são geralmente mais baratas que óleos vegetais, pois representam um subproduto da indústria animal e a demanda por estas é menor que pela maioria dos óleos vegetais mais comuns (KNOTHE; GERPEN, 2006).

A produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental e social e também trazem a perspectiva da redução das importações de óleo diesel. A produção

brasileira de biodiesel em 2008 foi de 1.164.332 m^3, o que resultou uma economia de mais de US$ 160 milhões em importações de diesel, além de reduzir a dependência externa, referente ao produto, de 7% para 5% (MME, 2004; FREITAS; NACHILUK, 2009).

Como o biodiesel é obtido a partir de fontes renováveis, sua utilização proporciona uma redução de cerca de 70% no ciclo de emissões de dióxido de carbono, comparado ao óleo diesel convencional (BOURNAY et al., 2005). No Brasil, de acordo com a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que começou a vigorar em 1º de janeiro de 2008, o óleo diesel comercializado em todo o país deve conter, obrigatoriamente, 2% de biodiesel e a previsão é que para 2013 seja obrigatória a adição de 5% ao diesel comum. Nos Estados Unidos, a produção de biodiesel aumentou de 500 mil galões em 1999 para 500 milhões de galões em 2007 (NATIONAL BIODIESEL BOARD, 2008), o que fez o preço da glicerina cair drasticamente. Entre 2004 e 2006, o preço da glicerina caiu dez vezes, levando as empresas Dow Chemicals e Procter & Gamble fecharem suas plantas de produção deste composto (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

A glicerina derivada da produção do biodiesel possui baixo valor agregado, pois contém resíduos de metanol, hidróxido de sódio, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais (THOMPSON; HE, 2006). A possibilidade de purificação depende da disponibilidade de métodos viáveis e, geralmente, plantas de pequenos e médios portes não são capazes de purificar, com baixo custo, a glicerina destinada a aplicações mais nobres, como nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (PACHAURI; HE, 2006).

2.2 Glicerol

2.2.1 Características e aplicações

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, é um álcool que se apresenta como um líquido viscoso, inodoro, incolor e com sabor doce. É solúvel em água e etanol, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano, e insolúvel em hidrocarbonetos (MORRISON, 1994). O nome glicerol é somente aplicado ao composto químico puro 1,2,3-propanotriol, enquanto que os produtos comerciais que contém glicerol com diferentes graus de pureza são denominados glicerina (APPLEBY, 2006). Algumas de suas características físico-químicas são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas do glicerol (MORRISON, 1994; APPLEBY, 2006).

Propriedade	**Valor**
Massa molar	92,09 g/mol
Densidade (20 ^{o}C)	1,26 kg/m^3
Viscosidade (20 ^{o}C)	1410 mPa
Ponto de fusão	18 ^{o}C
Ponto de ebulição (1013 hPa)	290 ^{o}C
Calor específico (25 ^{o}C)	2,435 J/g
Calor de evaporação (55 ºC)	88,12 J/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)
Calor de formação	667,8 kJ/mol
Tensão superficial (20 ^{o}C)	63,4 mN/m
pH (solução)	7,0

Devido às características como não toxicidade e ausência de cor e odor, o glicerol tem uma ampla aplicação na indústria, como apresentado na Figura 2.1. É atualmente um dos ingredientes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Na indústria alimentícia é utilizado

em preparações de molhos e sobremesas geladas e como umectante de alimentos (MORRINSON, 1994; NAE, 2005).

O glicerol é um importante agente crioprotetor, uma vez que não permite a formação de cristais de gelo em meio aquoso e o consequente rompimento de células, mantendo sua viabilidade durante os processos de congelamento (TSURUTA; ISHIMOTO; MASUOKA, 1998). Outras aplicações incluem o emprego como lubrificante de máquinas processadoras de alimentos, na fabricação de dinamite, no processamento de tabaco e como lubrificante na indústria têxtil (MORRISON, 1994; BRISSON et al., 2001; NAE, 2005). Um mercado importante que está se desenvolvendo com a maior oferta de glicerol é a aplicação deste para a síntese de moléculas de alto valor agregado por fermentação, como o propanodiol, empregado na fabricação de plásticos (WANG et al., 2001; MU et al., 2006; YAZDANI; GONZALEZ, 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008; REHMAN et al., 2008).

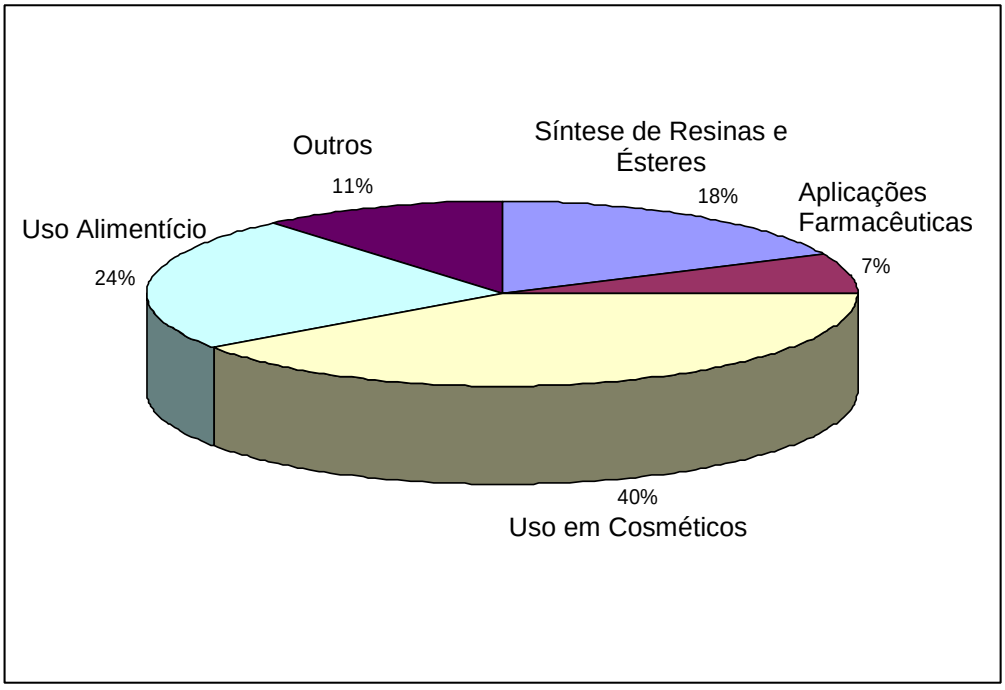

Figura 2.1 - Aplicações do Glicerol na Indústria (NAE, 2005).

2.2.2 Obtenção e uso em bioprocessos

A produção de glicerol por fermentação predominou até que a síntese química, a partir do propileno, foi estabelecida em 1950. Entretanto, em 2005, 90 % da produção global do glicerol foi proveniente de glicerídeos naturais, obtido como subproduto da reação de saponificação de óleos e gorduras, da reação de transesterificação para produção de biodiesel (Figura 2.2) e da reação para produção de ácidos graxos (TAHERZADEH; ADLER; LIDÉN, 2002; NAE, 2005; APPLEBY, 2006).

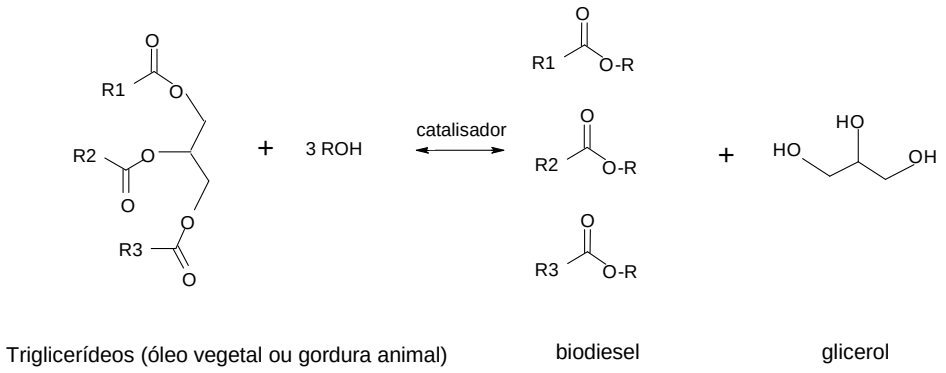

Figura 2.2 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto.

A Figura 2.3 apresenta o fluxograma do processo de produção de biodiesel. Após a reação de transesterificação, obtém-se uma massa constituída por duas fases, que são separáveis por decantação ou centrifugação. A fase mais densa é composta por glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria-prima, e geralmente contém 50% de glicerol (KNOTHE; GERPEN, 2006; NAE, 2005). A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool

originalmente empregado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas.

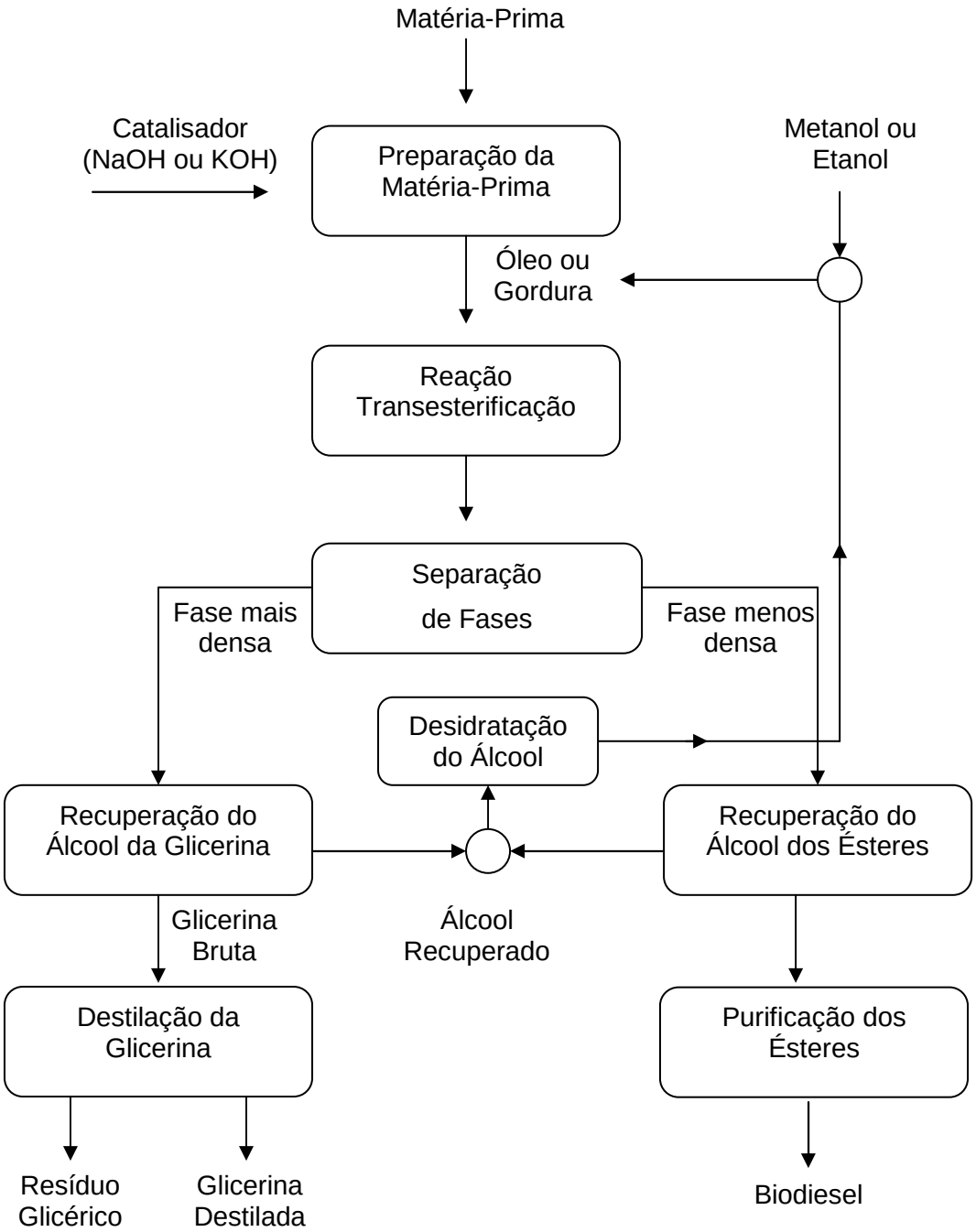

Figura 2.3 - Fluxograma do processo de produção de biodiesel, gerando glicerina como subproduto (KNOTHE; GERPEN, 2006).

Após a separação obtém-se a glicerina bruta, a partir da fase mais densa, que é submetida a um processo de evaporação para a recuperação do álcool. A glicerina é então destilada, podendo ser submetida a um tratamento adicional em colunas de troca iônica, alcançando uma pureza de cerca de 99%. A purificação dos ésteres ocorre pelo processo de centrifugação e desumidificação, obtendo-se o biodiesel (MA; HANNA, 1999; KNOTHE; GERPEN, 2006).

Um outro processo para o refino consiste na acidificação da glicerina, para que ocorra quebra dos sais de ácidos graxos (sabões) em ácidos graxos livres e sais. Como os ácidos graxos livres não são solúveis na fase do glicerol, flotam à superfície da mistura e podem ser removidos. Após acidificação e remoção do metanol por evaporação, o glicerol apresenta uma pureza de aproximadamente 85% (KNOTHE; GERPEN, 2006).

Se for levado em conta que o Brasil, ao longo de 2008, produziu cerca de 1,16 bilhões de litros de biodiesel para atender o mercado interno, a oferta de glicerol chegou a 146 mil toneladas. De acordo com um levantamento da Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim), a capacidade de produção das indústrias químicas é de 35,8 mil toneladas de glicerol ao ano, para um consumo anual de 13,5 mil toneladas (OS MERCADOS DA GLICERINA, 2009). Se o glicerol do processamento do biodiesel não for direcionado a mercados específicos, poderá causar efeitos ainda mais drásticos nos preços e levar indústrias químicas a abandonar a produção de glicerol. Quando for obrigatória a adição de 5% de biodiesel ao diesel comum, a quantidade de glicerol atingirá pelo menos 200 mil toneladas/ano (ÁVILA FILHO, 2008; BATISTA, 2008). Não há legislação específica no Brasil para o descarte da glicerina, somente para efluentes industriais em geral. As duas formas de descarte possíveis são o despejo nos rios e a queima, mas, de

modo geral, essas duas formas de descarte geram problemas ambientais, uma vez que o resíduo apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a sua queima libera compostos cancerígenos como a cloreína (BATISTA, 2008). Segundo Thompson e He (2006), a composição da glicerina varia em função da matéria-prima e do processo utilizado na fabricação de biodiesel. A Tabela 2.3 apresenta a composição da glicerina bruta proveniente da fabricação do biodiesel com diferentes matérias-primas. Algumas empresas vendem a glicerina no mercado interno a preços que variam de 0,10 a 0,5 R$/kg. Outras indústrias a queimam para produzir energia e, em locais com alta concentração de usinas de biodiesel, algumas empresas estocam o material, sem dar um destino específico ao mesmo (BATISTA, 2008, OS MERCADOS DA GLICERINA, 2009). Torna-se, então, necessário converter o glicerol em produtos de alto valor econômico para que o biodiesel se torne competitivo no mercado de biocombustíveis e também para que não haja impactos ambientais negativos pelo seu acúmulo (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Várias estratégias baseadas em transformações químicas e biológicas têm sido propostas para converter o glicerol em produtos de valor econômico. Na Tabela 2.2 encontram-se alguns trabalhos que foram realizados utilizando glicerol como substrato, por via química ou biotecnológica. O glicerol oriundo da fabricação do biodiesel apresenta-se como um substrato promissor para aplicação em processos biotecnológicos, destacando-se a produção de 1,3-propanodiol (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003; MU et al., 2006; PAPANIKOLAOU et al., 2008; REHMAN et al., 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002; PAPANIKOLAOU et al., 2008), etanol e hidrogênio (ITO et al., 2005).

Entre os problemas em se utilizar a glicerina em fermentações está a alta concentração de sais como cloretos, fosfatos ou sulfatos de sódio ou potássio, os

quais permanecem na fase do glicerol após a sua acidificação (REHMAN et al., 2008; ITO et al., 2005).

Tabela 2.2 - Produtos obtidos a partir do glicerol por via química e biotecnológica.

Produto	Referências
1,3-propanodiol	Himmi; Bories e Barbirato (1999)*; Papanikolaou e Aggelis (2003)*; Xiu et al. (2007)*; Wang et al. (2001)*; Mu et al. (2006)*; Xiu et al. (2008)*; Papanikolaou et al. (2008)*; Rehman et al. (2008)*
Hidrogênio	Ito et al. (2005)*; Wood (2002)*; Hirai et al. (2005)**; Huber; Shabaker e Dumesic (2003)*
Ácido Succínico	Lee et al. (2001)*
1,2-propanodiol	Dasari et al. (2005)**; Perosa eTundo (2005)**
Dihidroxicetona	Kimura (2001)**; Bauer et al. (2005)*
Poliésteres	Stumbe e Bruchmann (2004)**; Pramanick e Ray (1988)*
Ácido cítrico	Papanikolaou et al. (2002)*; Imandi et al. (2007)*; Papanikolaou et al. (2008)*
Ácido docosahexaenóico	Chi et al. (2007)*
Polihidroxialcanoatos	Koller et al. (2005)*

* via biotecnológica
** via química

Rehman et al. (2008) avaliaram a influência do tratamento do resíduo de glicerol obtido da fabricação de biodiesel de óleo de girassol sobre a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum*. Impurezas como metanol e ácidos graxos livres inibiram drasticamente o crescimento da bactéria. Acidificação com ácido fosfórico seguida de decantação foi utilizada para remoção do sabão e parte dos

ácidos graxos. Com o tratamento, os resultados obtidos foram próximos aos obtidos com glicerol puro.

Tabela 2.3 - Composição da glicerina proveniente da produção de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas (THOMPSON; HE, 2006).

	Óleos utilizados na fabricação do biodiesel					
Composição	**Mostarda (*Ida Gold*)**	**Mostarda (*Pac Gold*)**	**Canola**	**Soja**	***Crambe***	**Óleo de fritura**
ppm						
Ca	11,7	23,0	19,7	11,0	163,3	nd
K	Nd	Nd	Nd	nd	216,7	nd
Mg	3,9	6,6	5,4	6,8	126,7	0,4
P	25,3	48,0	58,7	53,0	136,7	12
S	21,0	16,0	14,0	nd	128,0	19
Na	1,17	1,23	1,07	1,2	1,10	1,4
Gorduras (%)	2,03	1,11	13,91	7,98	13,1	7,98
Proteínas (%)	0,14	0,18	0,06	0,05	0,44	0,23
Fontes de Carbono (%)	82,8	83,8	75,2	76,2	78,6	26,9
Calorias kJ/kg	14,6	14,5	17,5	15,8	16,3	27,2
Cinzas (%)	2,80	1,90	0,65	2,73	0,25	5,5

nd: não detectado

Ito et al. (2005) utilizaram *Enterobacter aerogenes* para a produção de hidrogênio e etanol a partir de glicerol derivado da produção de biodiesel, e obtiveram rendimentos inferiores quando comparados ao meio sintético. Segundo os autores, a alta concentração de sais, como cloreto de sódio, presente no resíduo de glicerol, formados devido à adição de ácido para a neutralização do catalisador alcalino, inibiu o crescimento da bactéria, prejudicando a fermentação.

Segundo Furusawa e Koyama (2004), os ácidos graxos saturados, presentes em maior quantidade na glicerina derivada da produção de biodiesel com gordura animal, geralmente não interferem no crescimento de bactérias; entretanto, ácidos graxos insaturados (particularmente ácido oléico e linoléico) exercem profunda influência no desenvolvimento de bactérias. Decréscimo na viabilidade e mudanças morfológicas, como perda de forma e danos na membrana celular, foram observados em células expostas a ácidos graxos insaturados (KNAPP; MELLY, 1986; HAZELL; GRAHAM, 1990). A presença de nutrientes adicionais como fontes de carbono, nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio no resíduo de glicerol exercem efeito positivo no crescimento de microrganismos (ÇELIK et al., 2008).

2.2.3 Assimilação e metabolismo por microrganismos

O crescimento de microrganismos utilizando compostos com baixo número de carbonos, como L-malato, acetato ou glicerol, requer a capacidade de sintetizar hexoses necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, glicogênio armazenado e outros compostos derivados de hexoses (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Oxigênio, dióxido de carbono, amônia e água difundem pela membrana para o interior da célula sem nenhum obstáculo. O glicerol é a única fonte de carbono que é transportada por difusão facilitada em células procarióticas (DILLIS et al., 1980; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Embora possa haver entrada de glicerol na célula por difusão simples, quando este está em baixas concentrações as células não são capazes de capturá-lo em quantidades suficientes para o crescimento utilizando apenas o mecanismo de transporte passivo (DILLIS et al., 1980). Evidências de uma proteína facilitadora do transporte foram descritas por Sanno; Wilson e Lin (1968), que observaram os efeitos osmóticos do glicerol no

crescimento de células de *E. coli*. A adição de uma solução hipertônica de glicerol às células crescidas em glicose resultou em plasmólise, e, depois, lentamente as células recuperaram sua forma normal. No entanto, as células que cresceram previamente em glicerol recuperaram sua forma rapidamente, o que sugeriu a presença de um transportador glicerol-específico induzido pelo crescimento em glicerol. A proteína transportadora de glicerol do tipo poro-canal (Figura 2.4) atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerol, e foi identificada em células de *E. coli*, espécies de *Pseudomonas* (TSAY; BROWN; GAUDY, 1971), *Klebsiella* (SANNO; WILSON; LIN, 1968), *Shigella* (RICHEY; LIN, 1972) e *Bacillus* (SAHEB, 1972). Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxi-álcoois, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

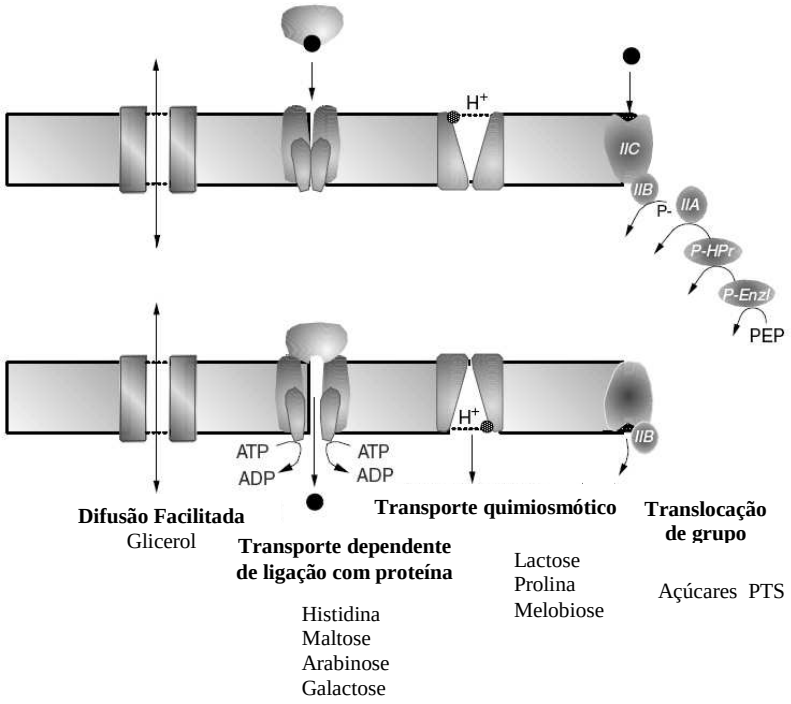

Figura 2.4 - Sistemas de transporte de moléculas em células de bactérias (adaptado de: MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Em células eucarióticas, quando o glicerol chega ao citoplasma é fosforilado pela enzima glicerol quinase a glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (Figura 2.5) (YAZDANI; GONZALEZ, 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008). A expressão dessas enzimas é reprimida durante o crescimento celular em substratos fermentescíveis como glicose (GRAUS LUND; RONNOW, 2000). Em bactérias, o glicerol é oxidado à dihidroxicetona pela enzima glicerol desidrogenase. A dihidroxicetona é fosforilada a dihidroxicetona-fosfato pela enzima dihidroxicetona quinase (YAZDANI; GONZALEZ, 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

Após a formação de dihidroxicetona fosfato, várias vias são possíveis para metabolisar este composto, dependendo das necessidades nutricionais e fisiológicas da célula. Os intermediários gerados no Ciclo de Krebs permitem a posterior formação de aminoácidos, essenciais para a formação de proteínas por mecanismo de tradução. Para a metabolização do glicerol e para o Ciclo de Krebs permanecer ativo, há necessidade de O_2 para a reoxidação eficiente das coenzimas NADH (LEHNINGER, 1977).

2.3 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo, gram-positiva, em forma de bastonete, formadora de esporos, anaeróbica facultativa, que se destaca pela capacidade de sintetizar um cristal protéico, adjacente ao esporo, responsável pela ação tóxica contra insetos susceptíveis (STAHLY; ANDREWS; YOUSTEN, 1990). Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1911 por Berliner, quando este pesquisador o isolou da lagarta *Anagasta kuehniella*, e a nomeou em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (POLANCZYC, 2004).

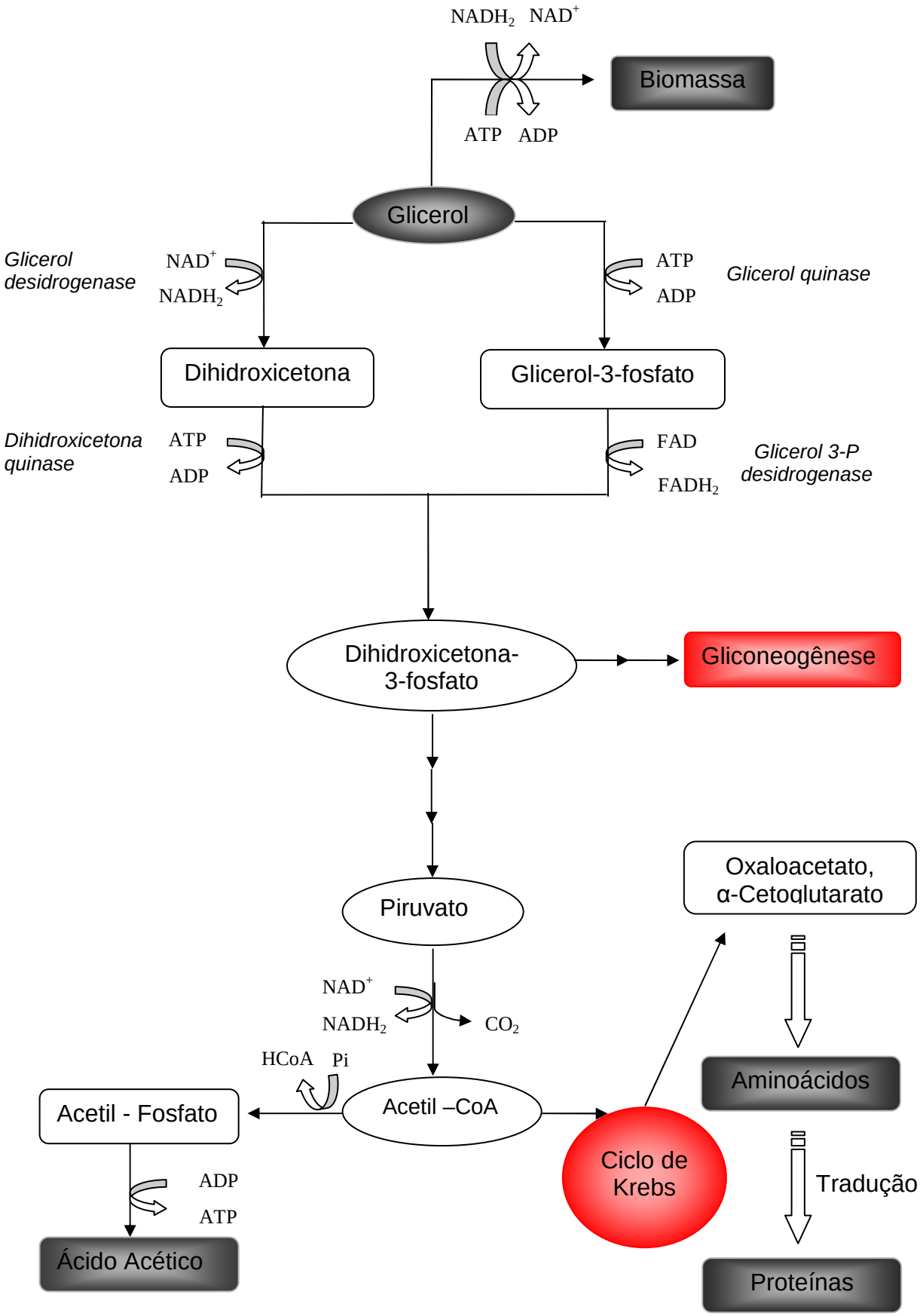

Figura 2.5 - Via metabólica de assimilação de glicerol por leveduras e bactérias (Adaptado de: LEHNINGER, 1977; YAZDANI; GONZALEZ, 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome *Bacillus thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento deste microrganismo. Em 1901, o pesquisador S. Ischiwata isolou a bactéria que descobriu ser a causadora de epidemias em lagartas de *Bombyx mori* (bicho da seda). Esta foi denominada *B. sotto* Ischiwata, mas este nome não foi mantido, sendo substituído mais tarde por *Bacillus thuringiensis* (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998).

A atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* é atribuída aos cristais paraesporais que produz, e, devido à estrutura cristalina destes, eles são chamados de proteínas cristalinas (Cry) ou δ-endotoxinas. Os genes que codificam as proteínas são denominados genes *cry*, e são expressos durante a fase estacionária de crescimento (CRICHMORE et al., 1998; ARONSON; SHAI, 2001). Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, *Bacillus thuringiensis* entra em processo de esporulação durante a fase estacionária (PRAMATHA, 2000). O ciclo completo do crescimento desta bactéria começa com a germinação do esporo e, na fase vegetativa, a bactéria propaga-se por fissão binária. Ao final da fase de divisão celular, inicia-se novo ciclo de esporulação, durante o qual são produzidas as proteínas que compõem os cristais protéicos (XIAOYAN et al., 2005). A capacidade de formação destas inclusões citoplasmáticas confere a esta espécie uma característica entomopatogênica que a diferencia de todas as demais espécies de *Bacillus* (ANDREWS; KANDA; BULLA, 1982; BULLA et al., 1985), tendo sido constatada sua ação tóxica sobre diversas espécies de insetos, incluindo pragas agrícolas (LACEY; KAYA; VAIL, 2001).

Esta bactéria pode se multiplicar em ambientes favoráveis como solos ricos em nutrientes, folhas de plantas e insetos-alvo. De acordo com Aronson e Shai (2001), existe a hipótese de que *Bacillus thuringiensis* possa ter algum tipo de

relação simbiótica, talvez com plantas, que explique a produção de toxinas tão eficientes e específicas. Segundo estes autores, a relação de simbiose consistiria no fornecimento de alimentos para a bactéria, pelas plantas, e, em troca, *B. thuringiensis* produziria a toxina protéica para a proteção das plantas contra o ataque de lagartas. No entanto, o fato de a bactéria ser encontrada no solo, independente da presença de insetos, suporta a hipótese de ele ser um microrganismo com atividade inseticida acidental (MARTINS e TRAVERS, 1989).

Grande quantidade de cálcio é acumulada durante a esporulação em bactérias do gênero *Bacillus* (CROSBY; GREENE; SLEPECKY, 1971). Geralmente, o cálcio encontra-se associado ao ácido dipicolínico (Figura 2.6) formando um complexo que pode representar 20% da massa seca do esporo. Crosby, Greene e Slepecky (1971) sugerem que o cálcio é levado ao interior das células por um sistema de transporte localizado na membrana.

A bactéria metabolisa glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas, produzindo principalmente piruvato e acetato (LÜTHY; CORIER; FISCHER, 1982; NICKERSON; JULIAN; BULLA, 1974). Acetato é formado durante o crescimento vegetativo, sendo utilizado para a produção de energia necessária à esporulação, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (BENOIT; WILSON; BAUGH, 1990; LIU; BAJPAI; BIHARI, 1994).

A faixa de temperatura para crescimento de diversas linhagens de *Bacillus thuringiensis* encontra-se, segundo Bernhard e Utz (1993), entre 15 e 30 ^{o}C, sendo consideradas ideais para o cultivo, temperaturas entre 26 e 30 ^{o}C. Gonzáles e Carton (1984) observaram que em fermentação à temperatura de 43 ℃, com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, é verificada a perda de plasmídeos que carregam a informação que codifica a síntese do cristal tóxico. Com relação ao pH, a

faixa entre 6,5 e 7,5 é considerada ideal para o crescimento, mas a bactéria pode crescer em valores entre 5,5 e 8,5 (BERNHARD; UTZ, 1993).

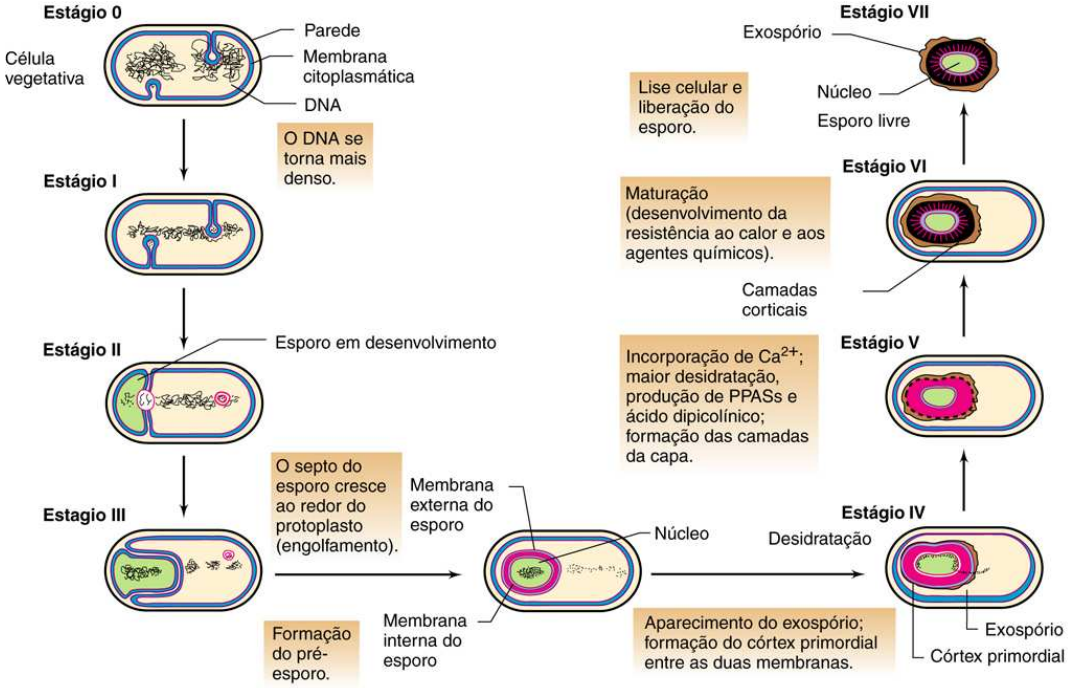

Figura 2.6 - Processo de esporulação de bactérias do gênero Bacillus (BROCK et al., 1994).

2.4 Uso de *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico de insetos

2.4.1 Atividade entomopatogênica de *Bacillus thuringiensis*

O cristal protéico depositado nas células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* durante a esporulação é composto por quatro principais endotoxinas denominadas Cry4A (125 kDa), Cry4B (134 kDa), Cry11A (67 kDa) e Cyt1A (27 kDa). Essas proteínas são denominadas coletivamente δ-endotoxinas ou proteínas inseticidas e constituem o mais importante componente inseticida desse microrganismo (CRICHMORE et al., 1998). Nenhuma das frações exerce, individualmente, um efeito tóxico correspondente àquele demonstrado pelo seu conjunto. O poder letal das δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* é resultado da

ação sinérgica entre as quatro toxinas, cuja síntese é fortemente regulada por fatores ambientais como o pH, a temperatura e a composição do meio de cultivo (HÖFTE; WHITELY, 1989; CRICKMORE et al., 1998).

A ação tóxica destas proteínas é específica contra larvas de certos insetos e não exercem qualquer atividade sobre plantas, seres humanos e outros animais (HÖFTE; WHITELEY, 1989; MILNER, 1994, ARONSON; SHAI, 2001). O cristal protéico é, na verdade, uma pró-toxina, que necessita ser ativada para exercer efeito tóxico no intestino da larva do inseto (AVIGNONE-ROSSA; MIGNONE, 1993). Para esta ativação, é necessário que o cristal seja primeiramente ingerido pela larva. O pH alcalino do seu trato intestinal, assim como a atuação de proteases, permitirá a solubilização do cristal e a consequente liberação das toxinas na sua forma ativa (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

As proteínas que constituem o cristal são constituídas de duas partes distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal associada geralmente à formação do cristal (COOPER, 1994; SCHNEPF et al., 1998). Cada variedade de *Bacillus thuringiensis* produz um tipo de toxina que é ativo contra um limitado grupo de insetos e esta especificidade deve-se, principalmente, à sua estrutura química formada por diferentes polipeptídeos (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Ressalta-se que a especificidade das proteínas é o resultado da eficiência de várias etapas envolvidas na produção das toxinas ativas e suas subsequentes interações com as células do epitélio do trato digestivo dos insetos alvos (KOZIEL et al., 1993).

Em 1989, Höfte e Whiteley propuseram uma nomenclatura sistemática para classificação das toxinas de *B. thuringiensis* em cinco grupos principais, de acordo com o espectro de atividade inseticida e homologia das sequências de aminoácidos

(Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV e Cyt). A primeira classe, denominadas endotoxinas CryI, representavam as proteínas ativas contra os insetos da ordem Lepidoptera. Proteínas CryII são ativas contra Lepidoptera e Diptera, CryIII são tóxicas para Coleoptera e CryIV para Díptera. Toxinas Cyt por não apresentarem homologia com as das demais classes ou atividade específica, foram reconhecidas como pertencentes a uma classe própria. Tailor et al. (1992) identificaram uma proteína com atividade inseticida contra *Ostrinia nubilablis* (ordem Lepidoptera) e *Leptinotarsa decemlineata* (ordem Coleoptera), sugerindo que proteínas ativas contra essas duas ordens fossem colocadas em uma nova classe, a das proteínas CryV. No entanto, com o avanço na compreensão da biologia molecular de *Bacillus thuringiensis,* novos genes *cry* foram sequenciados e catalogados, originando diversas exceções dentro da classificação proposta pelos autores. Por essa razão, Crickmore et al. (1998) propuseram uma nova classificação, baseada somente na sequência de aminoácidos codificada pelos genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade. O novo sistema de classificação é composto pelo nome da toxina (Cry ou Cyt) seguido de elementos encadeados hierarquicamente, como números, letras maiúsculas e minúsculas (ex: Cry11Aa), dependendo de sua localização na árvore filogenética. Como resultado desta classificação, atualmente as proteínas Cry são classificadas em 51 grupos e diferentes subgrupos (GLARE; O'CALLAGHAM, 1998; ARONSON; SHAI, 2001). A atualização desta classificação e de descobertas de novas toxinas podem ser acompanhadas via *internet* no endereço eletrônico http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html

A ação da toxina acontece quando um inseto suscetível ingere cristais de *Bacillus thuringiensis*, os quais, após a solubilização, resultam peptídeos que formam poros na membrana do epitélio intestinal e desestabilizam os gradientes

osmótico e iônico. A maioria das pró-toxinas conhecidas precisa ser clivada por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos, estes fragmentos ligam-se a receptores específicos do epitélio do intestino médio da larva do inseto. Como consequência, ocorre a deformação das células epiteliais e a desintegração da membrana microvilar, o que acarreta danos irreversíveis no intestino, culminando com a morte da larva poucas horas após a ingestão da toxina (KNOWLES, 1994; GLARE; O'CALLAGHAM, 1998; ARONSON; SHAI, 2001).

Uma vez que o funcionamento do intestino médio é interrompido, ocorre uma redução do pH do fluido intestinal, conjuntamente com uma liberação de nutrientes, o que cria condições para a germinação de esporos de *B. thuringiensis* e para a multiplicação de suas células vegetativas. A bactéria invade os tecidos larvais, e então a larva interrompe sua alimentação e morre. Devido ao processo infeccioso, o inseto se torna mais suscetível a invasões microbianas secundárias que podem acelerar a sua morte. O ciclo infeccioso é concluído quando o cadáver é consumido e *Bacillus thuringiensis* garante a sua perpetuação no ambiente na forma de esporo (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; ARONSON; SHAI, 2001). Segundo Chilcott et al. (1990) a larva do mosquito exposta às toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, cessa a alimentação após 1 hora da ingestão da toxina, demonstra perda de atividade após duas horas, e paralisia completa após seis horas.

2.4.2 Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores ainda são um sério problema de saúde pública (TAUIL, 2002). No mundo todo, a cada ano, cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças graves causadas por organismos patogênicos veiculados por insetos vetores

(POOPHATHI et al., 2002). A dengue é um desses problemas, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. No Brasil, as condições sócio-ambientais favorecem o desenvolvimento de *Aedes aegypti*, vetor da doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido suficientes (Ministério da Saúde, 2007). Os inseticidas químicos ainda são os mais utilizados nos países em desenvolvimento, mesmo com as diversas desvantagens advindas de seu emprego, que incluem a toxicidade aos animais (KARALLIEDDE, 1999; BROWN et al., 2000), a resistência fisiológica dos vetores (BROOKE; HUNT; COETZEE, 2000) e os impactos ambientais negativos causados, como a contaminação de alimentos e o efeito prejudicial sobre insetos que possuem um papel benéfico para o homem (BROWN et al., 2000).

Os inseticidas baseados em entomopatógenos são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade aos vertebrados e insetos benéficos (BROOKE; HUNT; COETZEE, 2000). Desta forma, verifica-se um grande interesse em investimentos com pesquisa científica, nos últimos anos, para o desenvolvimento e o emprego de agentes biológicos como alternativa para o controle de vetores (POLANCZYK, 2003).

A formulação de inseticidas com linhagens de *B. thuringiensis* apresenta diversas vantagens sobre os inseticidas químicos, principalmente pelo fato de que o cristal protéico é constituído pelo conjunto de endotoxinas, o que dificulta o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos. Outra importante vantagem é que estes produtos agem especificamente sobre o inseto-alvo, não havendo risco de intoxicação de insetos benéficos, plantas e animais vertebrados, incluindo humanos (CAPALBO; MORAES, 1987). Outras vantagens incluem a possibilidade de serem

mantidos na forma de pó ou emulsão e a facilidade de serem utilizados em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos (CAPALBO; MORAES, 1987).

Os custos para o desenvolvimento e registro de inseticidas baseados em toxinas de *Bacillus thuringiensis* são menores, quando comparados com os inseticidas químicos convencionais. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, por exemplo, tem um custo de desenvolvimento estimado em 1/40 do que é gasto para formular um novo inseticida químico sintético (SCHNEPF et al., 1998).

A descoberta de bactérias como *B. thuringiensis* representou uma nova alternativa de controle de insetos prejudiciais. Na década de 1930, surgiram na Europa as primeiras tentativas de utilização de *Bacillus thuringiensis* como bioinseticida, primordialmente para controle de pragas agrícolas da ordem Lepidoptera (van FRANKENHUYZEN, 1993). Entre os anos 50 e 80, vários trabalhos foram publicados sobre a biologia básica da bactéria (BULLA, 1980) e sobre o isolamento de novas variedades e sua aplicação (DULMAGE, 1970). Estes trabalhos estimularam o interesse no estudo de *Bacillus thuringiensis* como agente entomopatogênico (MILNER, 1994) e, nos últimos anos, alguns grupos têm publicado trabalhos a respeito dos processos fermentativos para a produção de bioinseticidas com *Bacillus thuringiensis* (ABDELL-HAMEED, 2001; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003; OZKAN et al., 2003; IÇGEN; IÇGEN; ÖZCEENGIZ, 2002; GHRIBI et al., 2007; BERBERT-MOLINA et al., 2008). Em 2004, segundo Petry et al. (2004), inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* foram responsáveis por cerca de 90% do mercado mundial de formulações de bioinseticidas comerciais.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* vem sendo usado desde 1980 para o controle de mosquitos vetores de doenças (MALDONADO-BLANCO; SOLIS-

ROMERO; GALAN-WONG, 2003). Os inseticidas produzidos com esta variedade são considerados extremamente específicos e seguros, pois afetam somente um limitado grupo de insetos e não são tóxicos para insetos benéficos para o homem, pássaros, peixes, outros mamíferos e plantas, o que lhes confere uma vantagem significativa sobre os inseticidas químicos (COUCH; ROSS, 1980; POLANCZYK, 2003). As proteínas produzidas pela bactéria distinguem-se de todas as toxinas das demais variedades já isoladas, apresentando os melhores resultados no combate às larvas de dípteros de importância sanitária, especialmente culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, insetos vetores de doenças como a dengue, a elefantíase, e a malária, respectivamente, e simulídeos do gênero *Simulium*, transmissores de vírus, protozoários e filárias (GILL; COWLES; PIENTRANTONIO, 1992; RUAS NETO; OLIVEIRA, 1985; ARONSON; SHAI, 2001). A partir de 1980, graças aos esforços da Organização Mundial da Saúde, conjugados a outros organismos internacionais e numerosos laboratórios de pesquisa, foram desenvolvidos programas internacionais para a utilização de *Bacillus thuringiensis* sorotipo *israelensis* contra os insetos veiculadores de organismos nocivos (PETRY et al., 2004).

Kroeger et al. (1995) publicaram um estudo sobre a eficácia do *Bacillus thuringiensis israelensis* contra o mosquito vetor da malária, aplicando-o em criadouros do mosquito *Anopheles*, semanalmente, por cerca de 7 semanas, em regiões na costa do Peru e Equador e na área Amazônica do Peru. A densidade do inseto adulto foi reduzida em 50-70% na região, indicando o potencial de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como um agente de controle de malária.

2.4.3 Formulações de meio para o cultivo de *Bacillus thuringiensis*

Segundo Moraes; Capalbo e Arruda (2001), a potência do caldo final fermentado depende muito da qualidade e controle do processo de produção. Para *Bacillus thuringiensis* a forma mais usual para o processo fermentativo é o processo submerso, no qual um meio nutritivo líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana. Os meios devem conter em sua composição uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de δ-endotoxinas (BERNHARD; UTZ, 1993).

Berbert-Molina et al. (2008) dividiram o ciclo celular de *Bacillus thuringiensis israelensis* em quatro fases: vegetativa, de transição para a esporulação, esporulação e maturação dos esporos e lise celular. Os autores verificaram diferenças na morfologia e em aspectos fisiológicos da bactéria nas diferentes fases, quando diferentes condições de cultivo foram empregadas no processo.

Segundo Prabakaran e Balaraman (2006) a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em larga escala ainda é um processo caro devido ao alto custo do meio de fermentação. Os autores avaliaram diferentes matérias-primas para o meio de fermentação e a farinha de soja foi considerada a mais econômica para a fermentação em larga escala. Várias matérias-primas de baixo custo têm sido avaliadas como fontes alternativas de nutrientes para o processo fermentativo com *Bacillus thuringiensis*, dentre as quais são citados farinha de soja (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990; VIDYARTHI et al., 2002 PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006), água de maceração de milho (LIU; BAJPAI, 1995; MALDONADO-BLANCO; SOLIS-ROMERO; GALAN-WONG, 2003), levedura de cervejaria (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001), soro de queijo

(ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990), extrato de batata (POOPATHI et al., 2002) e melaço de cana-de-açúcar (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990; MALDONADO-BLANCO; SOLIS-ROMERO; GALAN-WONG, 2003).

Para a fermentação com *Bacillus thuringiensis*, devem-se adotar cuidados quando se utilizam carboidratos em altas concentrações, uma vez que a bactéria produz os ácidos acético e pirúvico que podem diminuir o pH para valores abaixo de 5,5-5,7, faixa na qual a maioria das espécies de *Bacillus thuringiensis* não cresce, interrompendo a fermentação (DULMAGE, 1970). Özkan et al. (2003) avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento, taxa de esporulação e produção das endotoxinas Cry4Ba e Cry11Aa por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. De acordo com os autores, glicose, amido e melaço exerceram efeito repressivo ou inibitório sobre a produção das toxinas. Dextrina, soro de queijo, maltose, lactose, inulina, glicerol e sacarose influenciaram de maneira positiva a síntese das toxinas.

Arcas; Yantorno e Ertola (1987) relatam em seu trabalho que, em muitos casos, elevadas concentrações de nutrientes são necessárias para a obtenção de altas concentrações de esporos e do cristal protéico. Segundo os autores, a concentração desses nutrientes deve estar em torno de 15%. As fontes de nitrogênio mais utilizadas em meios para a fermentação com *Bacillus thuringiensis* são o extrato de levedura (SIKDAR; MAJUMBAR; MAJUMDAR, 1991; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003, GHRIBI et al., 2007) e a peptona (IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGIZ, 2002; PRABAKARAN; HOTI, 2008a; PRABAKARAN; HOTI, 2008b). Alguns autores relatam em seus trabalhos que, além de uma fonte de nitrogênio orgânico, a presença de uma fonte de nitrogênio inorgânico é essencial para o desenvolvimento deste processo fermentativo (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIK; VERDUYN, 2001;

ANDERSON; JAYRAMAN, 2003; GHRIBI et al., 2007). O sal sulfato de amônio é utilizado na composição da maioria dos meios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (SIKDAR; MAJUMBAR; MAJUMDAR, 1991; MIGNONE; AVIGNONE-ROSSA, 1996; GHRIBI et al., 2007). Entretanto, Ozkan et al. (2003) obtiveram maior rendimento na produção das endotoxinas quando utilizaram o sal $(NH_4)_2HPO_4$ como fonte de nitrogênio.

Sikdar; Majumbar e Majumdar (1991) destacam em seu trabalho que, para a produção de toxinas, a concentração ideal dos sais K_2HPO_4, $MgSO_4$ e $CaCO_3$ é de 1 g/L, 0,3 g/L e 1 g/L, respectivamente. Segundo Özkan et al. (2003) fosfato inorgânico em concentrações de 50 a 100 mM de K_2HPO_4 foram requeridos para a síntese da proteína Cry4Ba.

São também necessários íons metálicos para o crescimento do microrganismo tais como cálcio, zinco, manganês e magnésio. O balanço adequado dos sais minerais auxilia no equilíbrio do pH do caldo de fermentação, e muitos íons são cofatores de enzimas que catalisam as reações do processo de fermentação (DULMAGE, 1970). Segundo Bernhard e Utz (1993), quando substratos complexos são utilizados para a síntese do cristal protéico é necessário um balanço cuidadoso dos íons no meio. Yao et al. (2002) destacam a importância da concentração de Mn^{+2} para o metabolismo e crescimento de *Bacillus thuringiensis*. Concentrações deste íon entre 800-1600 µg/mL promovem o crescimento de *Bacillus thuringiensis* sendo que concentrações abaixo de 800 µg/mL inibem o crescimento da bactéria. A influência de Cu^{+2} também foi observada por Yao et al. (2003). Concentrações entre 0 e 30 µg/mL promovem o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, mas quando essa concentração é elevada para valores entre 40 e 120 µg/mL o crescimento da bactéria pode ser inibido e valores acima de 130 µg/mL prejudicam

significativamente o crescimento. O Mn^{+2} foi o elemento mais crítico para a produção das toxinas e não deve estar em concentrações inferiores a 10^{-6} M no meio. Os íons Mg^{+2} e Ca^{+2} favoreceram a produção quando estavam em concentrações de 8 mM e 0,55 mM, respectivamente, enquanto que Fe^{+2} e Zn^{+2} influenciaram negativamente a biossíntese.

Metais pesados como Hg, Cr, Cd e Co foram testados em meios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* por Hassen et al. (1998). Os autores mostraram que o uso de Hg, Cr, Cd, em concentrações de 0,2, 0,5 e 1 mM, respectivamente, não afetou a biossíntese de toxina pela bactéria, mas o uso de Co a uma concentração de 0,1 mM levou a uma inibição significativa da síntese da proteína tóxica.

3 OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o glicerol proveniente da fabricação de biodiesel de sebo bovino como substrato para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, visando à produção de bioinseticida de baixo custo.

Específicos

- Estabelecer um tratamento adequado para o glicerol de forma a permitir o crescimento da bactéria e a obtenção de toxicidade do meio fermentado;

- Definir a composição do meio de fermentação formulado com o glicerol, avaliando-se as concentrações de glicerol, de extrato de levedura, de sulfato de amônio e de cloreto de cálcio que proporcionem a maior atividade tóxica do meio fermentado;

- Verificar a existência de relação entre a esporulação da bactéria e a síntese de toxinas em meio contendo glicerol;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (sorotipo H-14) IPS 82, obtida no Instituto Pasteur de Paris, foi utilizada em todos os experimentos. A cultura foi mantida na forma esporulada sob refrigeração a 4 ℃ .

As culturas foram repicadas semestralmente, utilizando-se a técnica de semeadura em superfície em meio Agar Nutriente sólido, composto por: extrato de carne (3,0 g/L), peptona de carne (5 g/L) e Agar-agar (18 g/L).

4.2 Meios de Cultivo

4.2.1 Substrato

No presente trabalho foi empregada a glicerina fornecida pelo Grupo Bertin - Lins – SP, proveniente da produção de biodiesel a partir de sebo bovino, com hidróxido de potássio como catalisador.

4.2.2 Meio sintético

O meio denominado GLYS, cuja composição está apresentada na Tabela 4.1, foi utilizado para o preparo de inóculo e para avaliar o desempenho da bactéria em meio sintético (neste caso, com concentração de 20 g/L de glicerol). Este meio foi formulado de acordo com o meio GYS (ROGOFF; YOUSTEN, 1969) substituindo-se glicose por glicerol.

4.3 Condições de Cultivo

4.3.1 Preparo da cultura estoque de esporos

As culturas estoque foram obtidas por semeadura por estria simples em superfície de Agar Nutriente em tubos inclinados, incubados a 30 ºC por 72 h, tempo

para garantir a total esporulação da cultura. Os tubos foram armazenados a 4 ºC e utilizados por, no máximo, seis meses.

Tabela 4.1 - Composição do meio de cultivo GLYS.

Componente	Concentração no meio de fermentação (g/L)	Concentração da solução original (g/L)
Glicerol	10,0	-
Extrato de levedura	12,0	-
$(NH_4)_2SO_4$	3,0	333,0
$CaCl_2.2H_2O$	0,12	100,0
$MgSO_4.7H_2O$	1,5	90,0
$MnSO_4.H_2O$	0,09	10,0
K_2HPO_4	1,5	150,0
KH_2PO_4	1,5	150,0

Para o preparo do meio GLYS foram utilizadas alíquotas de soluções concentradas dos sais, conforme apresentado na Tabela 4.1. O extrato de levedura foi pesado e solubilizado em água destilada, e todos os componentes, inclusive o glicerol, foram esterilizados separadamente a 121 ºC por 20 minutos. Após a composição do meio, o pH foi ajustado para 7,0 com adição de hidróxido de potássio.

4.3.2 Preparo do inóculo

Uma alíquota de esporos da cultura estoque foi transferida para frasco *Erlenemeyer* de 250 mL com 50 mL de meio GLYS. Os frascos foram colocados em incubadora de movimento orbital (New Brunswick Sci.Co., modelo Innova 4000) a 30 ºC sob agitação de 180 rpm, por 20 h.

4.3.3 Ensaios de fermentação em frascos

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL providos de chicanas, contendo 200 mL de meio, cobertos com fina manta de algodão e gaze presa com elástico. Os frascos foram inoculados com o *pellet* resultante da centrifugação de 10 mL do inóculo (5%, v/v), o qual foi ressuspenso no próprio meio de fermentação. Os frascos foram colocados em incubadora/agitadora de movimento orbital (New Brunswick Sci.Co., modelo Innova 4000) a 30 ºC e 180 rpm. O final da fermentação correspondeu ao tempo de total dissociação dos grumos de células e esporos formados durante a esporulação, comportamento característico da bactéria. Este fenômeno foi monitorado por observações periódicas de lâminas a fresco de amostras do cultivo, em microscópio óptico (Leitz).

4.4 Sequência Experimental

4.4.1 Tratamento da glicerina

A glicerina foi separada do biodiesel por decantação, ainda na indústria, onde não recebeu nenhum tratamento posterior. O produto assim obtido foi tratado conforme proposto por Rehman et al. (2008), com algumas modificações: procedeu-se a uma primeira decantação para a separação de parte das impurezas da fase glicerínica, conduzida em funil separador, por 24 horas. A parte inferior (fase mais densa) que contém o glicerol, denominada G1, foi acidificada com H_3PO_4 85%, abaixando-se o pH até os valores 7, 6, 5 e 4, para a quebra do sais de ácidos graxos (sabões) em ácidos graxos livres e fosfato de potássio. Em seguida, o material foi colocado em um funil separador, por 24 horas, para decantação e consequente separação de ácidos graxos livres e outras impurezas insolúveis na fase do glicerol. A parte inferior, que contém glicerol, foi separada, obtendo-se as amostras GpH7,

GpH6, GpH5 e GpH4 (com pH 7, pH 6, pH 5 e pH 4, respectivamente). O metanol contido nas amostras foi removido por aquecimento a 70 ºC por 4 horas, seguido por nova decantação em funil separador por 24 h. As amostras com pH 7, pH 6, pH 5 e pH 4, submetidas a todo o tratamento descrito, foram denominadas G7, G6, G5 e G4, respectivamente.

4.4.2 Avaliação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meios contendo glicerol

Para avaliação do desempenho da bactéria no meio GLYS e nos meios preparados com o glicerol G7, G6, G5 e G4, foram realizados ensaios em frascos *Erlenmeyer*, conforme descrito no item 4.3.3, empregando-se uma concentração inicial de substrato de 20 g/L. Os parâmetros para avaliação dos resultados foram as concentrações finais de células e a atividade larvicida dos meios fermentados. Os resultados destes ensaios foram empregados para se determinar o procedimento de tratamento do resíduo a ser adotado para os ensaios subsequentes.

4.4.3 Formulação do meio de fermentação com glicerol

A influência dos principais componentes do meio GLYS sobre o crescimento e a síntese de toxinas por *B. thuringiensis* foi avaliada em ensaios em frascos agitados nas condições descritas no item 4.3.3. Foram avaliadas as concentrações de glicerol, extrato de levedura, sulfato de amônio e de cloreto de cálcio, segundo um planejamento fatorial 2^4 com quatro repetições do ponto central, cujos níveis dos fatores constam na Tabela 4.2. A matriz do planejamento, com as respectivas concentrações está apresentada na Tabela 4.3. As variáveis resposta utilizadas para avaliação dos resultados foram a concentração final de esporos, a taxa de esporulação e a atividade tóxica do meio.

Tabela 4.2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^4, para avaliação do efeito dos nutrientes sobre o crescimento de *B. thuringiensis* e toxicidade do meio fermentado (concentrações em g/L).

	Níveis		
Fatores	-1	0	+1
Glicerol	10	20,0	30,0
Extrato de Levedura	0	6,0	12,0
Sulfato de amônio	0	3,0	6,0
Cloreto de cálcio	0	0,12	0,24

-1: nível inferior; 0: ponto central; +1: nível superior.

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento fatorial 2^4, apresentando as concentrações dos nutrientes (g/L) estudados na fermentação com *B.thuringiensis* .

Ensaio	Glicerol	Extrato de Levedura	Sulfato de amônio	Cloreto de cálcio
1	10	0	0	0
2	30	0	0	0
3	10	12	0	0
4	30	12	0	0
5	10	0	6	0
6	30	0	6	0
7	10	12	6	0
8	30	12	6	0
9	10	0	0	0,24
10	30	0	0	0,24
11	10	12	0	0,24
12	30	12	0	0,24
13	10	0	6	0,24
14	30	0	6	0,24
15	10	12	6	0,24
16	30	12	6	0,24
17	20	6	3	0,12
18	20	6	3	0,12
19	20	6	3	0,12
20	20	6	3	0,12

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Concentração celular

A determinação da concentração celular foi feita de duas formas, segundo Berbert-Molina et al. (2008). Nas primeiras horas de cultivo, durante a fase vegetativa de crescimento, enquanto não se observou a formação de grumos ou inclusões no interior das células, a biomassa foi quantificada indiretamente por turbidimetria. Neste caso, medidas de absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado foram convertidas em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por meio de uma equação que descreve o trecho linear de uma curva de calibração. A partir do momento em que se iniciou a formação de grumos no meio, a concentração celular foi determinada por medidas de massa seca.

4.5.2 Número de células e de esporos

O número de células vegetativas (CV), de células esporuladas (CE) e de esporos livres (EL), ao final da fermentação, foi obtido por contagem em câmara de Neubauer.

Alíquotas de 10 μL de meio fermentado, convenientemente diluídas em solução salina, foram aplicadas na câmara e observadas em microscópio óptico com aumento de 400x. A partir dos valores obtidos na contagem foram calculados o número total de células (CT), o número total de esporos (ET) e a taxa de esporulação (T_{ESP}). O número total de células (CT) foi obtido pelo somatório do número de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (EL) (CT=CV+CE+EL). O número total de esporos foi obtido pela soma de CE e EL (ET=CE+EL) e a taxa de esporulação pela equação T_{esp} = (ET/CT) x 100 (BERBERT-MOLINA et al., 2008).

4.5.3 Morfologia celular

As variações da morfologia celular ao longo da fermentação foram acompanhadas pela observação de preparações a fresco do meio fermentado em microscópio ótico (Leitz) com aumento de 400x.

4.5.4 Concentração de glicerol

As concentrações de glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Waters), empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 ^{o}C, fluxo do eluente 0,6 ml/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep pak C18 (MILLIPORE). O eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida desgaseificado com ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

4.5.5 Obtenção do complexo esporo-cristal

Os meios fermentados foram submetidos à centrifugação (centrífuga Jouan MR 1812) a 10.000 rpm (11.170 x g) por 20 min. O *pellet* resultante foi ressuspenso em solução de NaCl 1M e a mistura permaneceu em repouso por um período de 30 min, após o qual foi submetida a nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram lavadas duas vezes com água destilada, obtendo-se o complexo esporo-cristal, que foi utilizado para realização dos bioensaios (ZOUARI; ALI; JAOUA, 2002).

4.5.6 Determinação da atividade larvicida dos meios

4.5.6.1 Larvas de *Aedes aegypti*

Foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* provenientes do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos

dos Goytacazes. Para atingir o estágio de crescimento desejado, as larvas foram colocadas em estufa a 30 ℃ por um período de 3 a 4 dias.

4.5.6.2 Bioensaios

A atividade larvicida da suspensão obtida ao final do processo (complexo esporos-cristais) foi estimada por meio de bioensaios efetuados segundo metodologia descrita por Misch, Burnside e Cecil (1992), com algumas modificações. O teste consistiu da exposição de larvas de *Aedes aegypti* no 4º ínstar de desenvolvimento (Figura 4.1) a suspensões de esporo-cristal com concentrações variadas. Foram obtidas previamente as faixas de concentrações suficientes para que ocorresse a morte de no mínimo uma e no máximo quatro larvas, de um total de cinco. Para cada faixa, foram avaliadas quatro concentrações com dez tubos de ensaio para cada concentração, em triplicata. Depois de 24 horas de exposição foram obtidos os dados de mortalidade, e a atividade larvicida do meio fermentado foi expressa como a concentração letal necessária para reduzir a população de larvas em 50% (CL_{50}), de acordo com a regressão linear log-Probit, utilizando o programa EPA PROBIT ANALYSIS versão 1.5.

4.5.7 Estimativa do teor de sais de ácidos graxos

A análise dos sais de ácidos graxos (sabões) contidos na fase do glicerol foi realizada por titulação colorimétrica utilizando-se o azul de bromofenol como indicador (0,4%) e solução de HCl 0,1 N como titulante. A solução titulada foi composta de uma mistura de 100 g do resíduo de glicerol, 98 mL de acetona (utilizada como solvente) e 2 mL de água destilada. A solução titulante, ao ser adicionada a um meio contendo sais de ácidos graxos, leva à formação de cloreto

de potássio (devido à presença de hidróxido de potássio no meio, o qual é catalisador da reação de transesterificação) e ácido graxo molecular. O primeiro excesso de ácido clorídrico leva à mudança de cor da solução, indicando que foi atingido o ponto de equivalência. O volume de HCl gasto na titulação das amostras foi registrado e utilizado como medida indireta da quantidade de sabão presente no resíduo de glicerol, em cada etapa do tratamento (REHMAN et al., 2008).

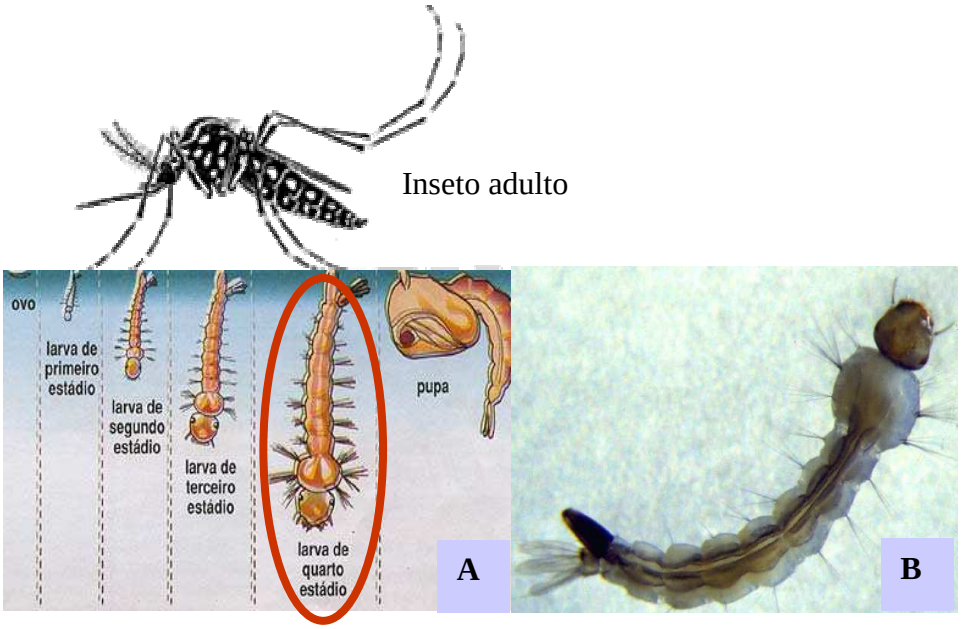

Figura 4.1 - (A) Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* e (B) fotografia da larva no 4º ínstar de desenvolvimento (O Aedes, 2008).

4.6 Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados pela avaliação dos parâmetros fermentativos fator de conversão de substrato em células e produtividade volumétrica em células. Além disso, foram avaliados o crescimento celular, a taxa de esporulação e a atividade larvicida do meio fermentado (CL_{50}) contra larvas de *Aedes aegypti*. Programas específicos de estatística foram empregados para análise das variáveis resposta mencionadas, nos ensaios em que um planejamento experimental tenha

sido empregado, obtendo-se superfícies de resposta que permitem definir as condições mais adequadas para a condução do processo. Neste caso, foram empregados os programas DESIGN-EXPERT 6.0. e STATISTICA versão 6.0. Estes programas fornecem tabelas de análise de variância dos resultados, identificando as variáveis que têm efeito significativo sobre o processo, assim como superfícies de resposta, que permitem definir as melhores condições para o processo, em função das variáveis estudadas. Os parâmetros fermentativos, assim como sua forma de cálculo, estão apresentados a seguir.

- **Fator de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$)**

Foi determinado pela relação entre a quantidade de células produzidas e a correspondente quantidade de glicerol consumido, durante o tempo considerado da fermentação, conforme a equação abaixo,

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} ,$$

em que:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão de glicerol em células (g/g); X_f = concentração final de células (g/L); X_i = concentração inicial de células (g/L); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

- **Produtividade volumétrica em células (Q_X)**

Foi determinada pela relação entre a variação da concentração de células e o intervalo do tempo correspondente, conforme a equação abaixo,

$$Q_X = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} ,$$

em que:

Q_X = produtividade volumétrica em células (g/L.h); X_f = concentração final de células (g/L); X_i = concentração inicial de células (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado da fermentação (h).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Definição do Tratamento da Glicerina

5.1.1 Tratamento

A glicerina utilizada neste trabalho foi obtida por decantação do material obtido na etapa final do processo de produção de biodiesel de sebo bovino. A Tabela 5.1 apresenta as características físico-químicas do material, conforme laudo de análise fornecido pela empresa BERTIN.

Tabela 5.1 - Características da glicerina proveniente da fabricação do biodiesel a partir de sebo bovino.

	Unidade	Valor
Glicerol	% massa	70,32
Umidade	% massa	6,201
Extração com éter	% massa	1,048
Cloretos	% massa	7,28
pH	-	12,57
Densidade	g/cm^3	1,294
Cinzas	% massa	8,49
Metanol	% massa	0,37

A Tabela 5.2 apresenta as características do resíduo de glicerol submetido aos diferentes tratamentos (item 4.4.1). Verifica-se que a primeira decantação, conduzida com a glicerina bruta, permitiu a separação de parte de impurezas do material, produzindo um aumento de 10,5% na sua concentração de glicerol.

Com a acidificação do material, empregando H_3PO_4, obtiveram-se amostras com concentrações de glicerol de 84% (m/v) a 92,2% (m/v), havendo um aumento máximo de 25,8% na concentração do glicerol (GpH 4) em relação à glicerina bruta. A acidificação permite a quebra de sais de ácidos graxos (sabões) em ácido graxo

molecular (apolar) e fosfato de potássio, o que leva à separação de parte dos ácidos graxos e outras impurezas da fase do glicerol (KNOTHE; GERPEN, 2006). Rivaldi (2008) empregou ácido fosfórico para o tratamento da glicerina proveniente da fabricação de biodiesel com óleo de soja, e obteve uma concentração de glicerol de 914 g/L com a acidificação até pH 4, semelhante ao obtido no presente trabalho, embora neste caso, não seja um resíduo proveniente de matéria-prima vegetal.

Tabela 5.2 - Características do resíduo de glicerol submetido a diferentes tratamentos, com base em acidificação, decantação e aquecimento.

Tratamento	Amostra	Glicerol (g/L)	Volume de HCl (mL)*
-	Glicerina bruta	733	-
1ª decantação	G1	810	-
Acidificação e decantação	GpH 7	850	6,1
	GpH 6	840	4,2
	GpH 5	916	3,5
	GpH 4	922	0
Aquecimento e decantação	G7	977	4,3
	G6	950	2,3
	G5	981	0
	G4	1180	0

* volume de HCl 0,1 N gasto na titulação de 100 g do resíduo de glicerol

Na Figura 5.1 apresentam-se imagens da glicerina durante o tratamento. Observa-se a interface entre as fases polar (glicerol e impurezas) e apolar (ácidos graxos, triglicerídeos e outras impurezas) após a decantação da glicerina bruta e da glicerina acidificada.

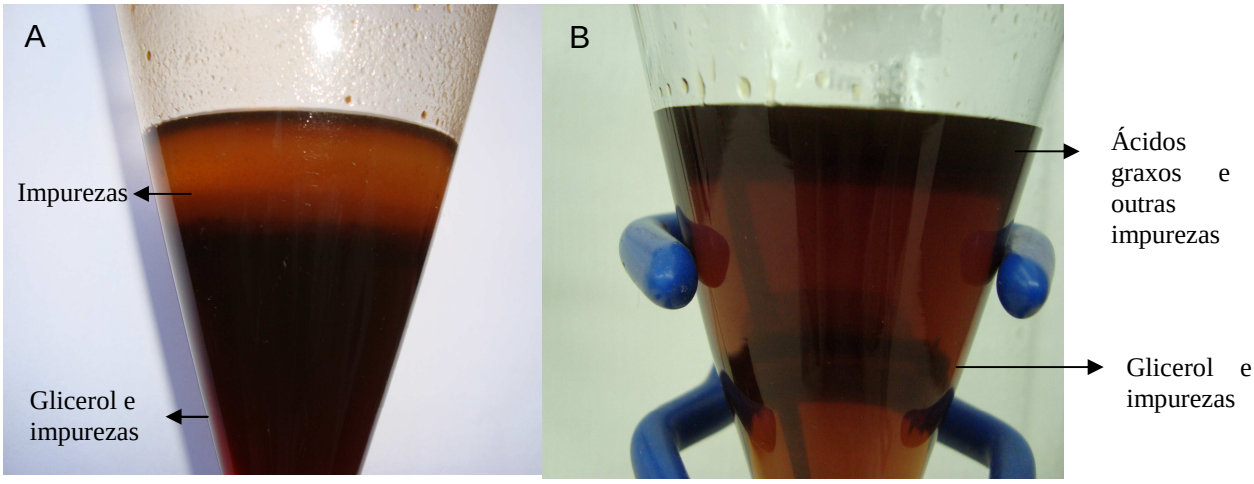

Figura 5.1 - Aspecto da mistura após a 1ª etapa de decantação (A); Aspecto da mistura após acidificação até pH 5,0 e decantação (B).

O aquecimento foi realizado com objetivo de retirar o metanol presente nas amostras, uma vez que este é prejudicial ao crescimento de bactérias (YAZDANI; GONZALEZ, 2007; REHMAN et al., 2008). O aumento de temperatura até 70 ℃ promoveu a precipitação de componentes que foram novamente separados da fase glicerínica por decantação, obtendo-se amostras com concentrações de até 1.180 g/L de glicerol, o que equivale a 92% (m/m) de glicerol. Rehman et al. (2008) obtiveram resíduo com 96% (m/m) de glicerol por acidificação da amostra com ácido fosfórico até pH 4, seguida de aquecimento para remoção de metanol, e tratamento com hexanol para remoção de ácidos graxos.

Foi realizada também a análise indireta de sais de ácidos graxos (sabões) presentes na fase do glicerol por titulação colorimétrica, conforme descrito no item

4.5.7. Não foi observada a presença de sais de ácido graxo apenas no resíduo de glicerol em que o pH foi ajustado para 4,0, uma vez que não houve gasto de ácido clorídrico na titulação deste resíduo. Quando as amostras foram aquecidas, parte dos sais de ácido graxo foi removida, uma vez que os volumes de ácido clorídrico gastos na titulação foram menores, como em G7 e G6, ou zero, como em G5 (Tabela 5.2). Segundo Rehman et al. (2008) as impurezas presentes no glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como sais de ácido graxo e ácidos graxos livres, podem inibir o crescimento de bactérias, dependendo da concentração destes no meio de fermentação. Portanto, os resultados das análises dos sais de ácido graxo sugerem que os procedimentos adotados são eficientes para a remoção de impurezas do resíduo contendo glicerol.

5.1.2 Ensaios de fermentação com glicerina tratada

As fermentações para a definição do tratamento a ser utilizado nos ensaios subsequentes foram realizadas com glicerol G7, G6, G5 e G4. A fermentação controle foi conduzida com glicerol puro para fins de comparação dos perfis de crescimento e toxicidade dos meios fermentados. As Figuras 5.2 e 5.3 apresentam a variação da concentração de glicerol e de células, respectivamente, em função do tempo de fermentação para os diferentes meios. Observa-se que nas primeiras 5 horas não houve consumo de glicerol em nenhum dos ensaios, apesar de ter ocorrido crescimento neste período (Figura 5.3). Este fato ocorreu possivelmente pela presença de pequenas quantidades de glicose no meio, proveniente do extrato de levedura adicionado, o qual contém de 4 a 13% de carboidratos (YEAST EXTRACT, 2008).

A expressão das enzimas necessárias para assimilação do glicerol é reprimida durante o crescimento celular em substratos fermentescíveis como glicose

(GRAUS LUND; RONNOW, 2000). Segundo Ghribi et al. (2007), em fermentações realizadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, empregando meios contendo glicose e glicerol, a glicose é assimilada mais rapidamente que o glicerol, sustentando a hipótese acima.

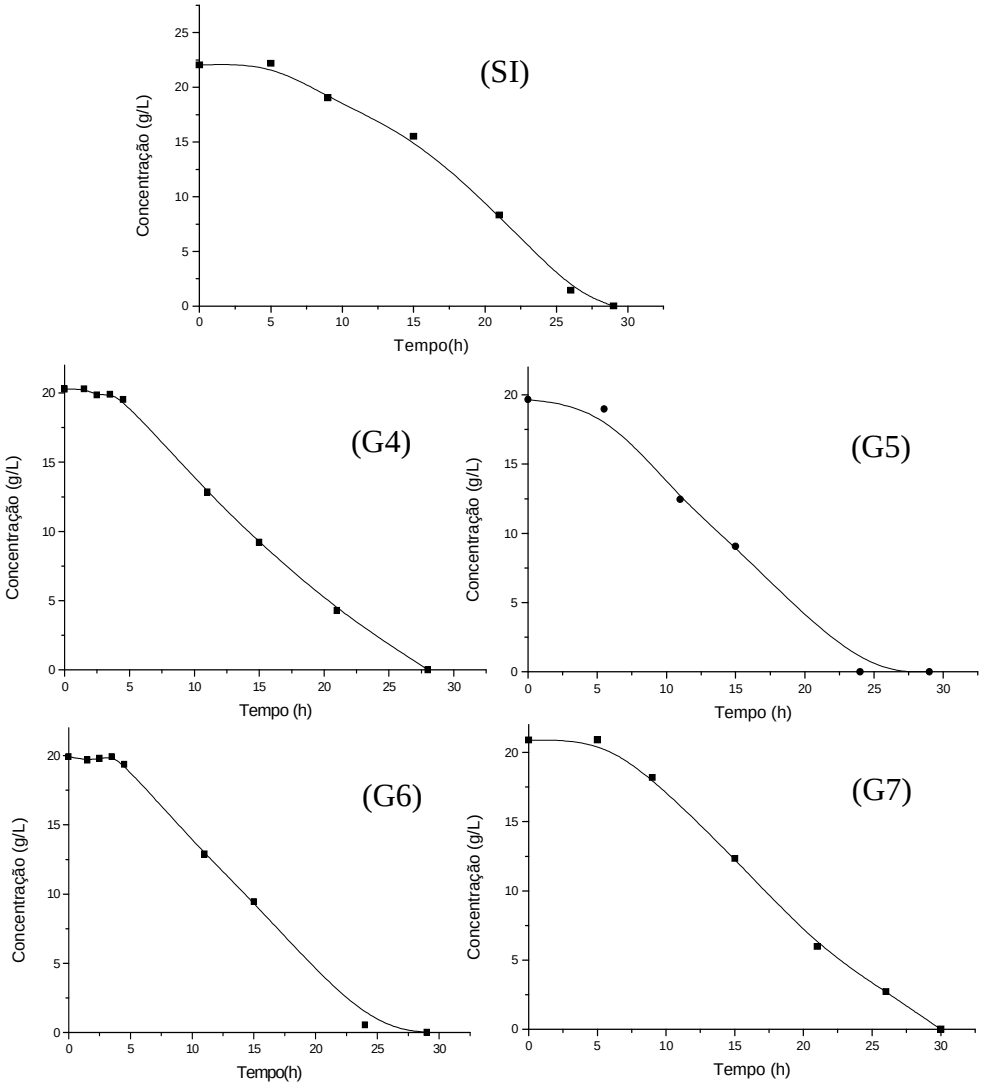

Figura 5.2 - Concentração de glicerol em função do tempo durante a fermentação em meio sintético (SI) e em meios com glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

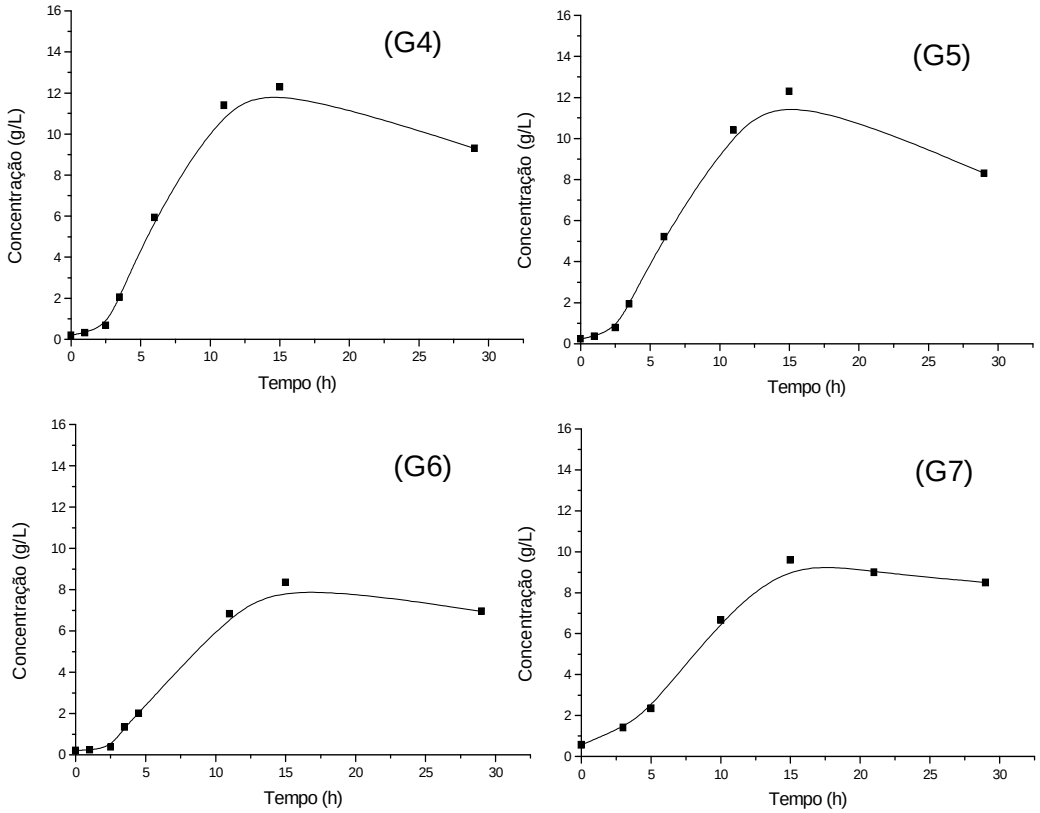

Figura 5.3 - Concentração de células em função do tempo durante a fermentação em meios com glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Os maiores valores de concentração final de células foram obtidos quando se utilizou o meio sintético (9,7 g/L) e o meio contendo G4 (9,4 g/L). As Figuras 5.4 e 5.5 apresentam os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e os valores de produtividade em células (Q_X), respectivamente, para os ensaios em questão. Os menores valores de concentração de células (Figura 5.3), $Y_{X/S}$ e Q_X foram obtidos com a fermentação conduzida com a glicerina G6. Isso pode ser explicado pelo de fato que, como demonstrado na Tabela 5.2, esta glicerina foi a que apresentou a menor pureza em relação às obtidas com os outros tratamentos. Loureiro (2004) obteve um valor de $Y_{X/S}$ de 0,4 g/g utilizando meio GYS com 21,7 g/L de glicose, enquanto que Berbert-Molina et al. (2008) encontraram $Y_{X/S}$ = 0,58 g/g para meio GYS com 30,8 g/L de glicose.

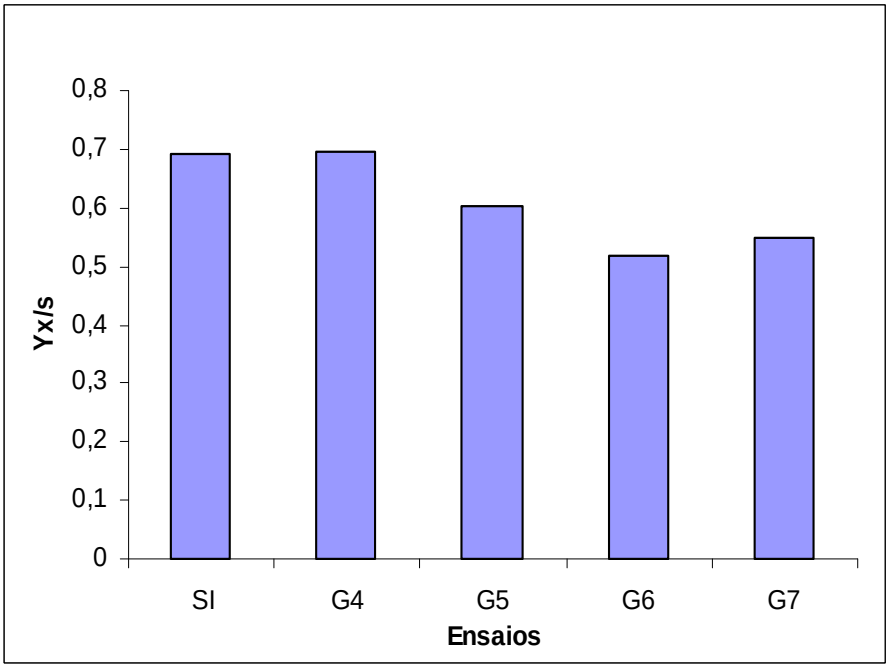

Figura 5.4 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$), considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

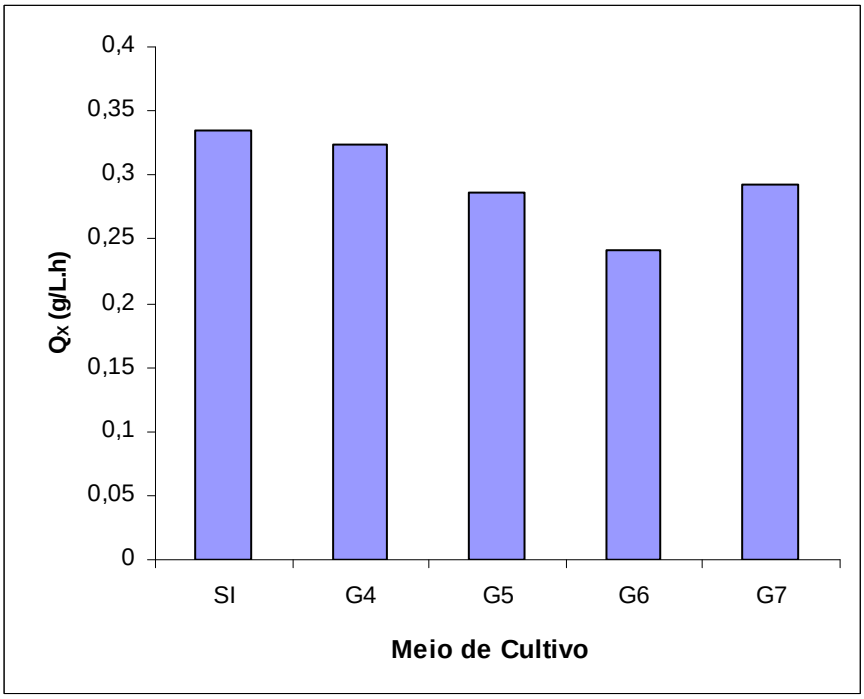

Figura 5.5 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

A presença do sal fosfato de potássio, formado devido à acidificação, de ácidos graxos e de outras impurezas, explicam as diferenças de crescimento da bactéria *Bacillus thuringiensis* frente aos diferentes tratamentos. Verifica-se que com a utilização de G4 obteve-se um decréscimo de apenas 4% no crescimento, comparado ao meio sintético, o que demonstra que a inibição do crescimento da bactéria por componentes advindos do glicerol G4 foi praticamente insignificante.

As Figuras 5.6 e 5.7 apresentam a contagem de células totais e esporos totais, respectivamente, e a Figura 5.8 as respectivas taxas de esporulação, obtidas para cada ensaio, no tempo final de fermentação.

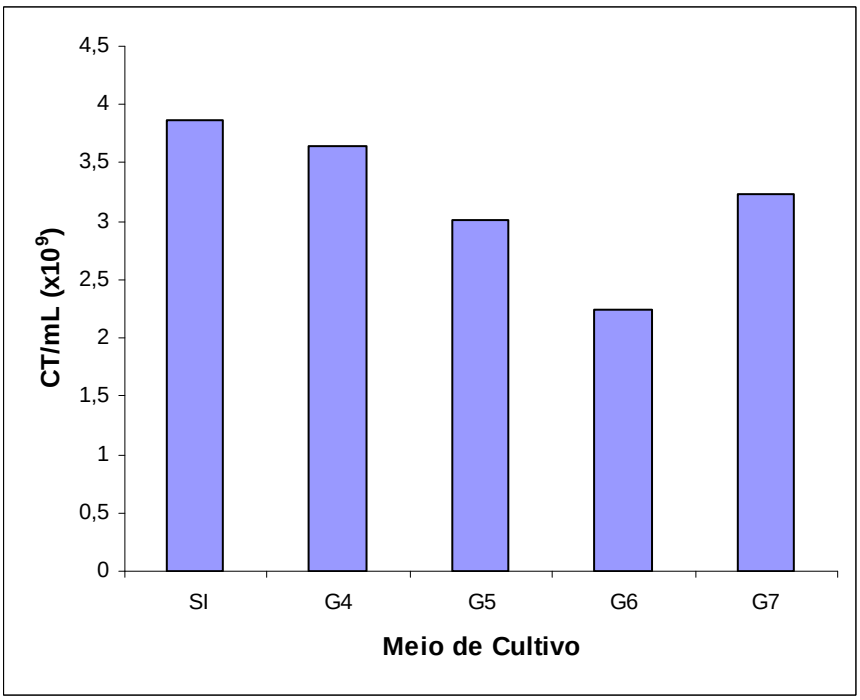

Figura 5.6 - Número total de células (CT) obtido nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis.*

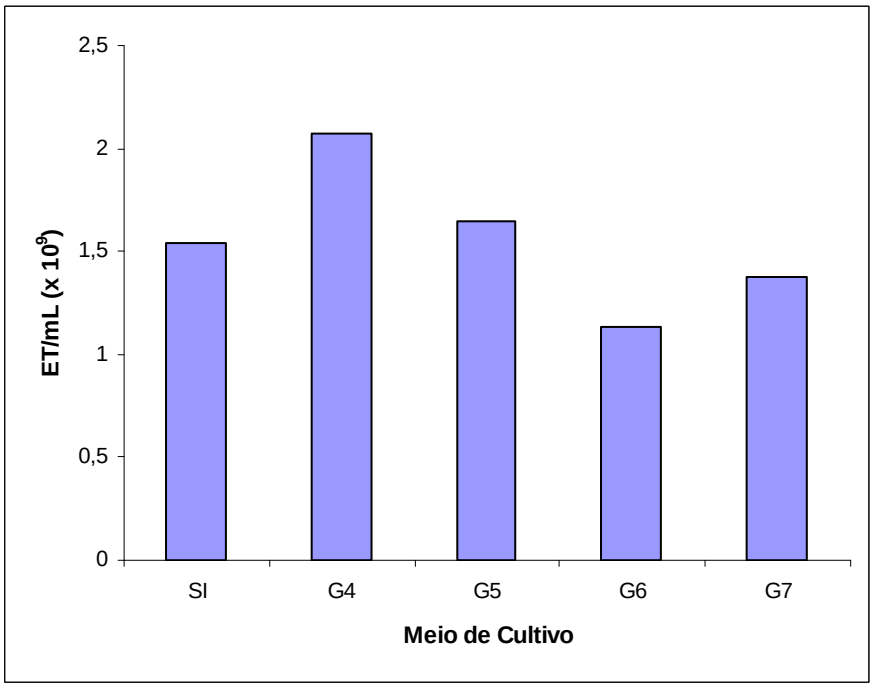

Figura 5.7 - Número total de esporos (ET/mL) obtido nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

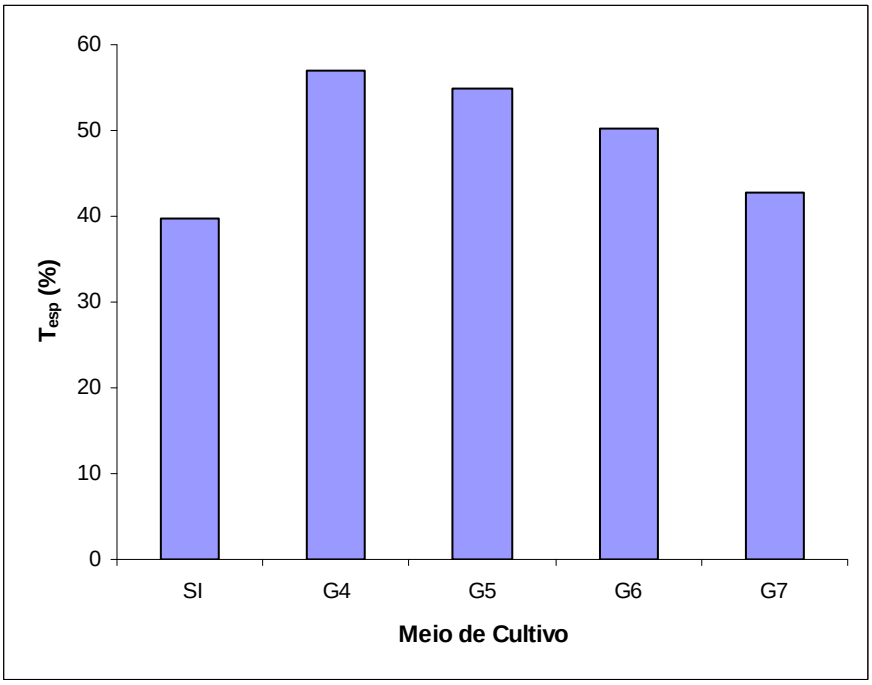

Figura 5.8 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtida nos diferentes meios, obtidos por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Observa-se pela Figura 5.8 que as maiores taxas de esporulação foram obtidas com os meios G4, G5 e G6, e as menores taxa de esporulação foram obtidas com os meios SI e G7. O cristal protéico produzido por *Bacillus thuringiensis* é um metabólito secundário, ou seja, sua formação não está associada ao crescimento, uma vez que a síntese das proteínas ocorre concomitantemente à esporulação (HOFTE; WHITELY, 1989; CRICKMORE et al., 1998). Por isso, frequentemente na literatura há associação direta entre formação de esporos e obtenção de toxinas. Assim, condições para a produção de toxinas de *Bacillus thuringiensis,* em alguns casos, são otimizadas visando a alcançar alta densidade de células e alta taxa de esporulação (BERNHARD; UTZ, 1993; LIU; TZENG, 1998; PESSANHA, 2008). Entretanto, há relatos de que alta quantidade de esporos não é suficiente para garantir a síntese eficiente de toxinas (AVIGNONE-ROSA; MIGNONE, 1993; PRAMATHA, 2000; IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGIZ, 2002; OZKAN et al., 2003).

Özkan et al. (2003) obtiveram taxa de esporulação de 20% utilizando glicerol como fonte de carbono, e, utilizando glicose como substrato, a taxa de esporulação foi de 80%, mas o rendimento das proteínas Cry4Ba Cry11Aa foi inferior ao obtido com glicerol. Desta forma, apesar de o meio contendo G4 ter proporcionado o maior crescimento e maior taxa de esporulação, estes parâmetros não podem ser utilizados como critério para a escolha do tratamento mais adequado para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis*. Portanto, a estimativa da atividade larvicida do meio foi realizada com o objetivo de se escolher o tratamento mais adequado para a glicerina. Foi empregado o procedimento descrito no item 4.5.6 e os resultados encontram-se na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Porcentagens de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas à suspensão esporo-cristal em diferentes concentrações, obtidas por fermentação em meio sintético (SI) e em meios contendo glicerina tratada (G4 a G7), com *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Concentração* (mg/L)	Porcentagem de mortalidade das larvas (%)				
	SI	G4	G5	G6	G7
100	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	40
500	40	0	0	0	60

*Concentração do complexo esporo-cristal empregada no bioensaio.

Observa-se que, utilizando a concentração de 500 mg/L do complexo esporo-cristal de todos os meios, a maior mortalidade das larvas foi obtida com o emprego do meio de fermentação contendo o glicerol G7, ocorrendo 60% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*. O fato de não haver morte de nenhuma larva com a suspensão de esporo-cristal proveniente do meio fermentado com G4 indica que, quando o glicerol proveniente de biodiesel é usado como substrato, não há relação direta entre esporulação e produção de toxinas, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Isto é, portanto, mais um indício de que a contagem de esporos e/ou taxa de esporulação não devem ser empregadas como critério para avaliar a produção de toxinas por esta bactéria.

O glicerol G7 é o que tem em sua composição a menor quantidade de íons fosfato, derivados da acidificação com H_3PO_4, o que pode explicar a maior toxicidade obtida com o emprego deste na fermentação. Há muitas divergências na literatura em relação ao efeito do íon fosfato sobre a produção de toxinas pela bactéria. Segundo Ozkan et al. (2003) os íons de fosfato inorgânico são críticos na biossíntese da toxina protéica e devem estar presentes em concentrações de 50 a 100 mM no meio para que ocorra a produção eficiente das proteínas Cry4Ba e

Cry11Aa. Entretanto, essa faixa de concentração ótima é 10 vezes maior do que aquela reportada por Sikdar; Majumbar e Majumdar (1991) para a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

No presente trabalho, há também a possibilidade de ter ocorrido estímulo da produção da toxina por algum componente presente em G7 e/ou inibição da síntese da toxina por outros componentes presentes nos demais meios. Tendo em vista os resultados obtidos, o glicerol G7 foi o escolhido para continuar os experimentos, por ter proporcionado resposta satisfatória no bioensaio com larvas de *Aedes aegypti*, juntamente com o meio sintético. A vantagem deste tratamento é que o abaixamento do pH do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel até 7 leva a um menor gasto com ácido, comparado aos outros tratamentos.

5.2 Avaliação da Suplementação do Glicerol com Nutrientes

5.2.1 Ensaios do planejamento fatorial 2^4

5.2.1.1 Ensaios de fermentação

Os ensaios do planejamento fatorial 2^4 foram realizados com o objetivo de avaliar a influência da concentração de glicerol, extrato de levedura, sulfato de amônio e de cloreto de cálcio sobre a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. A Figura 5.9 apresenta os perfis de crescimento da bactéria, em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento.

Os ensaios 3, 7, 11 e 15 foram realizados com adição de extrato de levedura em concentração no nível superior (12 g/L) e glicerol no nível inferior (10 g/L), já os ensaios 1, 5, 9 e 13 também foram realizados com 10 g/L de glicerol, mas sem adição de extrato de levedura ao meio.

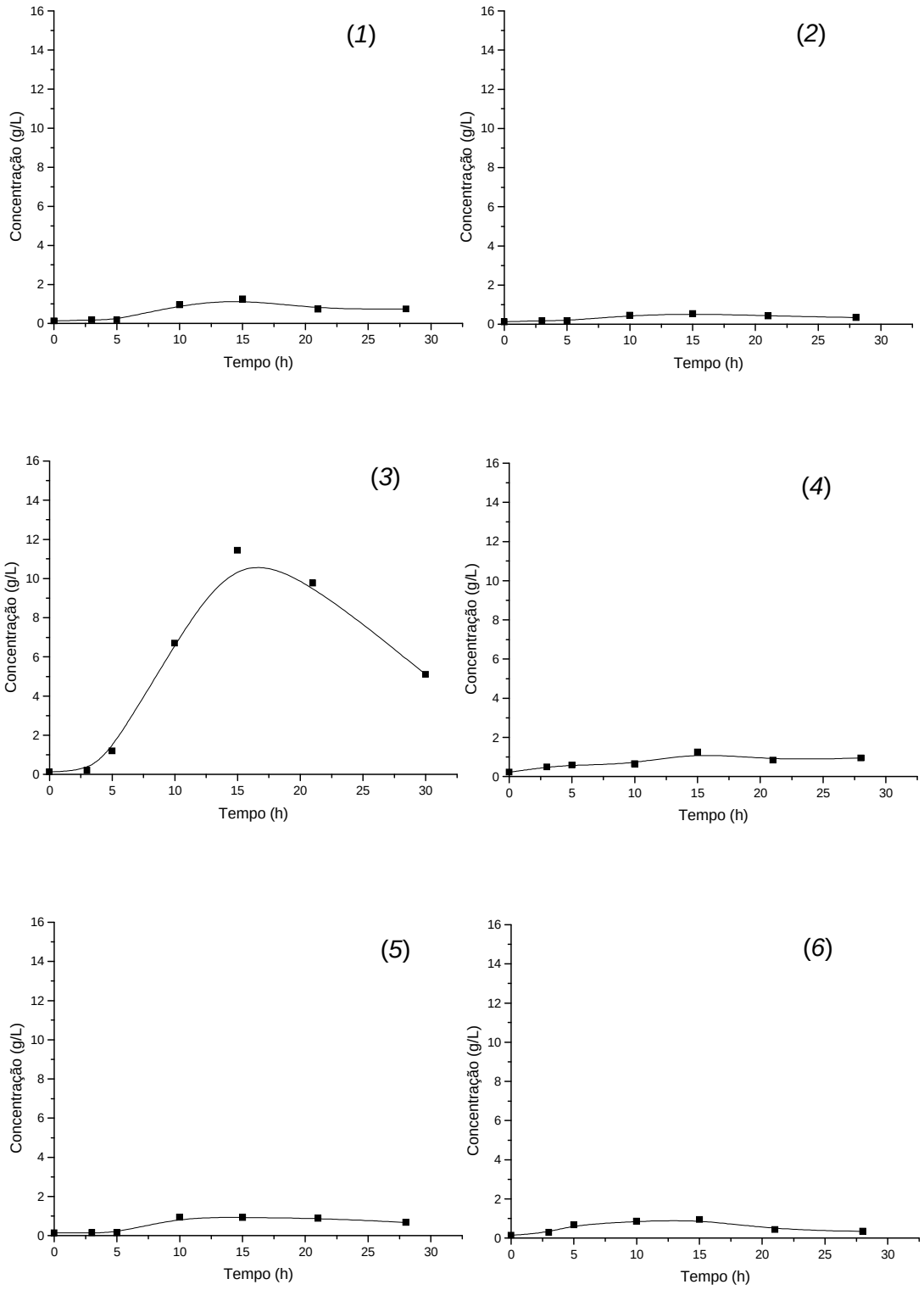

Figura 5.9 - Continua...

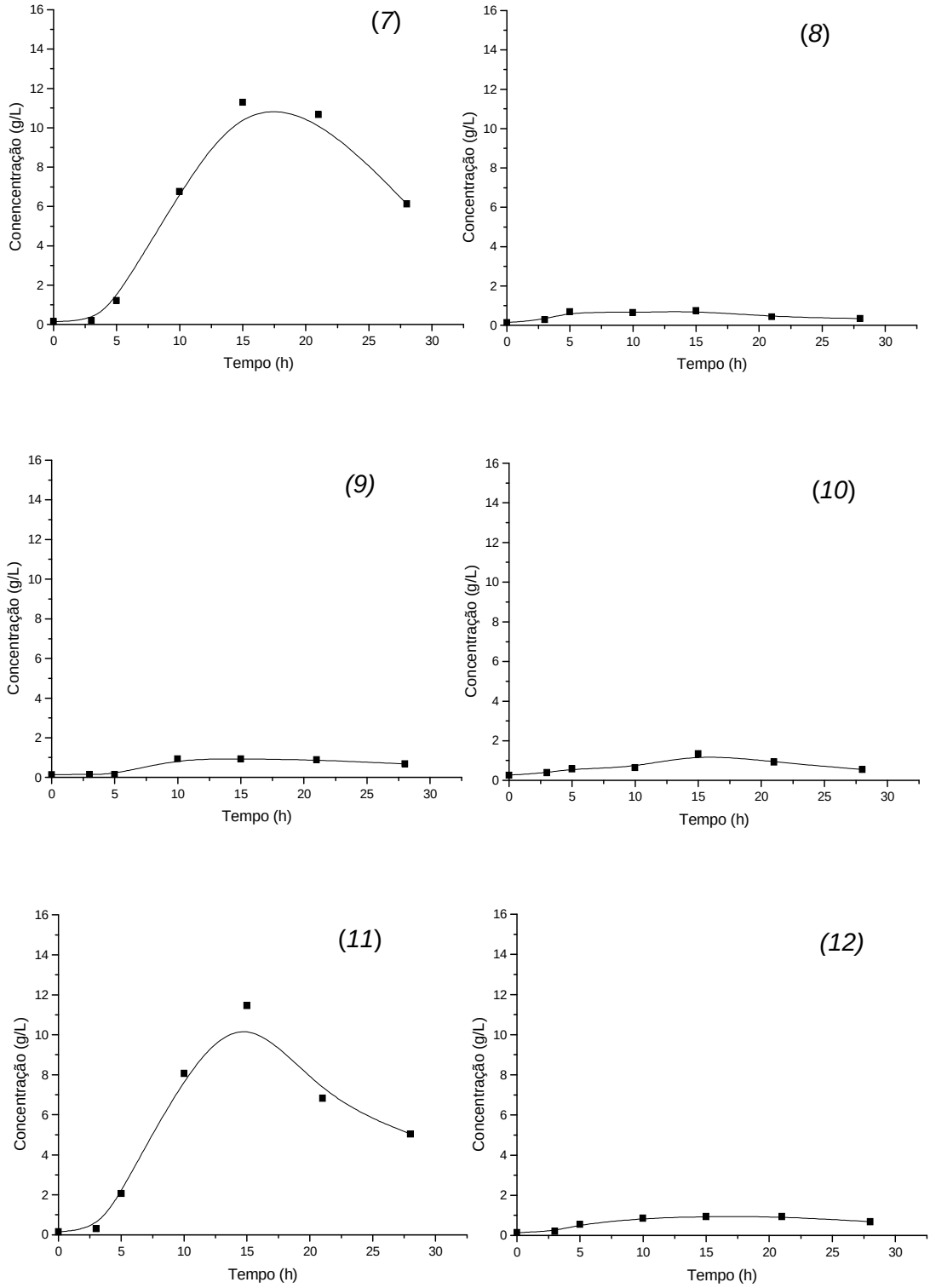

Figura 5.9 - Continua...

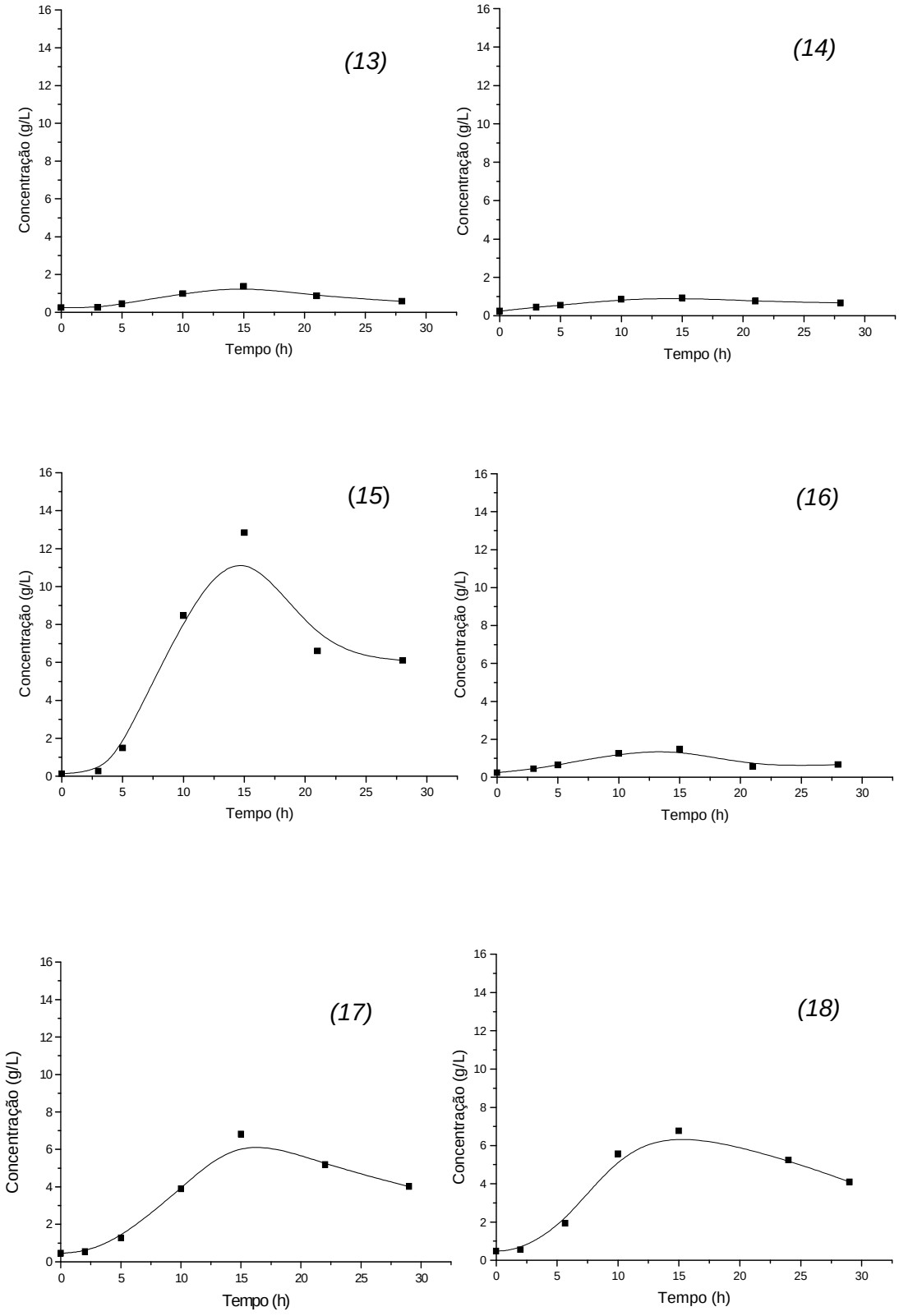

Figura 5.9 - Continua...

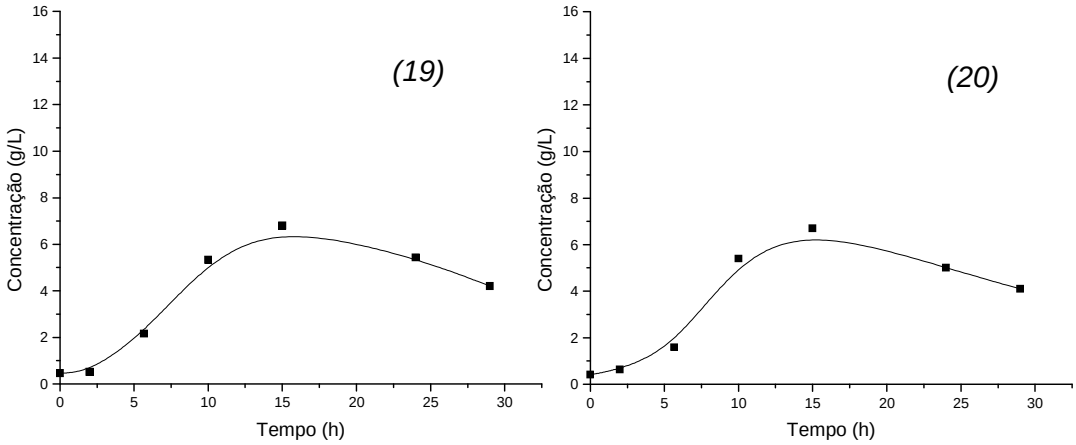

Figura 5.9 - Variação da concentração celular em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4.

A diferença de crescimento observada nos dois conjuntos de ensaios indica que a adição de extrato de levedura ao meio de fermentação é fundamental para o crescimento satisfatório da bactéria. Içgen, Içgen e Ozcengiz (2002) também constataram que a omissão de extrato de levedura do meio de fermentação (meio sintético) levou a um crescimento muito pobre de *B. thuringiensis* 81.

Observa-se que não houve crescimento quando o glicerol derivado do processamento do biodiesel foi utilizado na concentração de 30 g/L (ensaios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16), apesar de ter ocorrido crescimento da bactéria empregando-se glicerol na concentração de 20 g/L (ensaios 17,18,19 e 20). A fim de se averiguar o motivo da ausência de crescimento, foi realizado um ensaio em meio sintético com 30 g/L de glicerol, obtendo-se uma concentração final de células de 11 g/L. Isto demonstra que houve inibição do metabolismo da bactéria por algum componente presente no glicerol G7, quando este foi empregado na concentração de 30 g/L. Segundo Rehman et al. (2008) as impurezas presentes no glicerol gerado da

fabricação do biodiesel, como sais de ácido graxo e ácidos graxos livres, podem inibir o crescimento de bactérias, dependendo da concentração destes no meio de fermentação. O glicerol G7 contém sais de ácidos graxos em sua composição, conforme revelado pela análise apresentada na Tabela 5.2, o que pode ser um dos motivos da inibição do crescimento da bactéria quando este foi empregado a 30 g/L.

Verifica-se que nos ensaios 3, 7, 11, 15 e nos ensaios do ponto central (ensaios 17 a 20) houve um comportamento semelhante de crescimento celular, caracterizado por aumento de massa de células nas primeiras 15 horas de fermentação e queda de massa após este período. Formados os esporos maduros, proteases intracelulares produzidas pela bactéria lisam as células, liberando esporos e cristal protéico (BALABAN et al., 2002; BALABAN et al., 2003). A lise celular é acompanhada de diminuição da massa de células até o final da fermentação, como observado na Figura 5.9 (*3,7,11,15,17,18,19 e 20*).

Berbert-Molina et al. (2008) dividem o desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis* durante a fermentação em quatro fases: (I) Crescimento Vegetativo; (II) Transição para Esporulação; (III) Esporulação; e (IV) Maturação de Esporos e Lise Celular. Na Fase II a motilidade celular cessa por completo e tem início a floculação do cultivo (formação de grumos). Na Fase III esta floculação é bastante intensificada, havendo aumento no tamanho dos grumos e poucas células isoladas. No presente trabalho, observaram-se todas as etapas descritas por estes autores nos ensaios em que houve crescimento satisfatório da bactéria. Ghribi et al. (2007) compararam fermentações com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* empregando glicose e glicerol como fonte de carbono e observaram que, independentemente da fonte de carbono utilizada, a esporulação iniciou-se após 13 horas da incubação. A Figura 5.10 apresenta uma microscopia óptica obtida durante fermentação com

glicerol, referente ao ensaio 11, observando-se a floculação da cultura e a presença de células livres, com 21 horas de fermentação.

No final das fermentações, os ensaios 7 e 15 apresentaram a mesma concentração celular (6,1 g/L), que foi ligeiramente maior que as obtidas nos ensaios 3 e 11 (5,1 e 5,0 g/L, respectivamente), embora a máxima concentração celular obtida (com 15 horas de fermentação) foi cerca de 11 g/L para os ensaios 3, 7 e 11 e de 12,8 g/L para o ensaio 15. Os ensaios 7 e 15 diferenciam-se dos ensaios 3 e 11 pela adição de sulfato de amônio ao meio de fermentação.

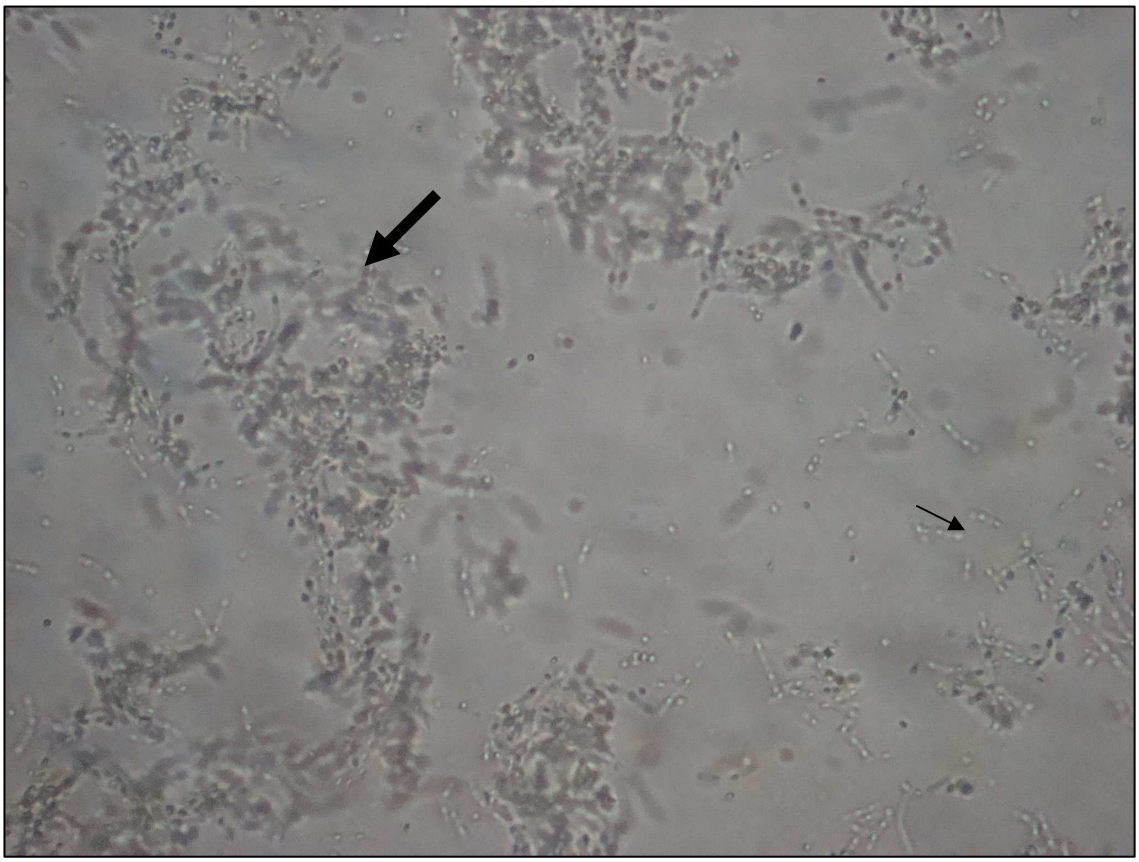

Figura 5.10 – Microscopia óptica do cultivo de *B. thuringiensis* var*. israelensis* em meio contendo glicerol (ensaio 11), com 21 horas de fermentação, mostrando floculação (grumos – seta larga) e células livres esporuladas (seta fina).

Com o emprego do glicerol na concentração de 10 g/L, aparentemente o cálcio não influenciou o crescimento da bactéria. Segundo Eisenstadt e Silver

(1972), o cálcio está envolvido na formação da parede e membrana celular de bactérias, mas somente baixas concentrações deste íon permanecem no citoplasma, sendo que o excesso normalmente deve ser transportado para fora da célula. Isto indica que há cálcio no glicerol G7 em quantidade suficiente para permitir o crescimento adequado da bactéria.

A concentração final de células nos ensaios do ponto central foi em média igual a 4,1 g/L, enquanto que a máxima concentração (com 15 horas de fermentação) foi de 6,8 g/L de células. Em geral, houve maior crescimento da bactéria quando se utilizou 10 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura (relação C:N de 1,6:1), que nos ensaios realizados com 20 g/L de glicerol e 6 g/L de extrato de levedura (relação C:N de 6,3:1), o que demonstra que a utilização da menor relação C:N levou a um maior crescimento das células.

As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e produtividade em células (Q_X) para os respectivos ensaios, calculados utilizando a máxima concentração de células observada (com 15 horas de fermentação, em todos os ensaios). Observa-se que os menores valores de $Y_{X/S}$ foram obtidos nos ensaios 17, 18, 19 e 20 (em média igual a 0,44 g/g), e o maior valor de $Y_{X/S}$ (1,26 g/g) foi obtido no ensaio 15. Este valor foi superior ao obtido por Berbert-Molina et al. (2008) de $Y_{X/S}$ = 0,83 g/g para meio GYS com 10 g/L de glicose. Os valores de produtividade em células obtidos nos ensaios 3, 7, 11 e 15 também foram maiores que os obtidos nos ensaios do ponto central (17, 18, 19 e 20), uma vez que obtiveram-se maiores concentrações de células nos ensaios realizados com 10 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura para tempos de duração das fermentações similares (cerca de 29 horas).

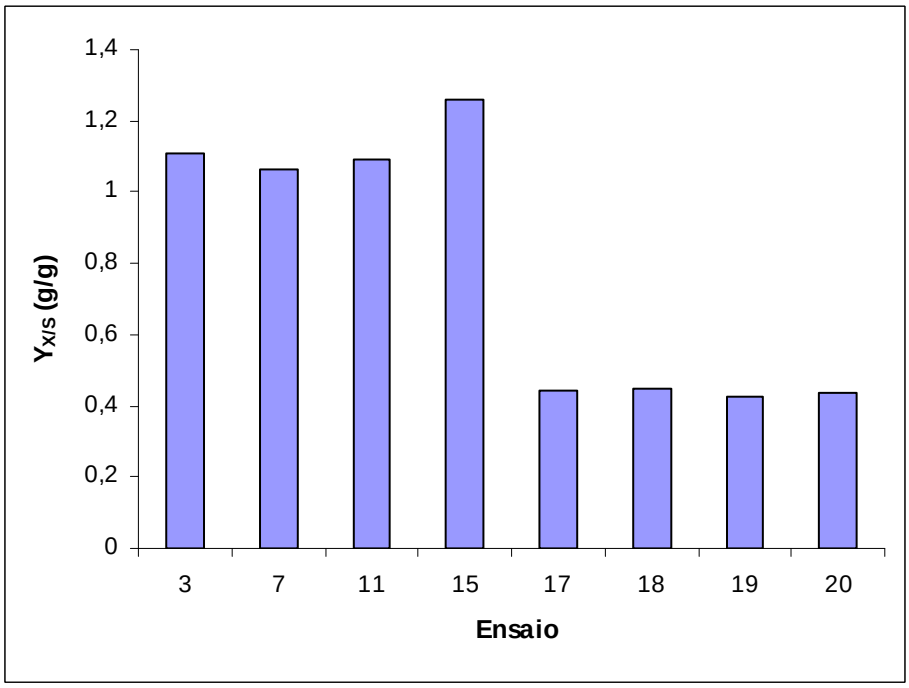

Figura 5.11 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*

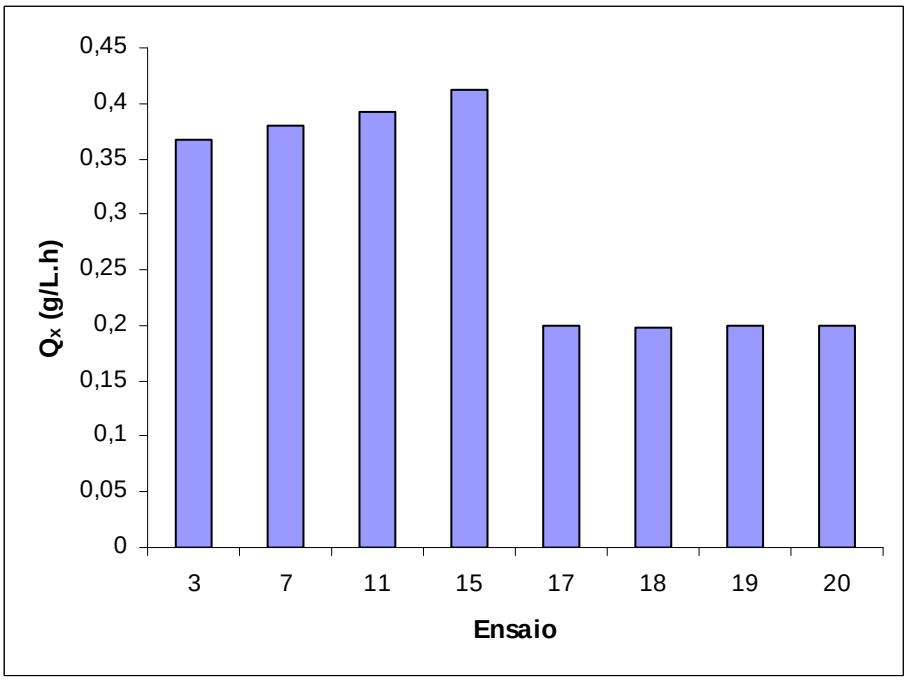

Figura 5.12 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*

A Figura 5.13 apresenta as concentrações de glicerol em função do tempo de fermentação, somente para os ensaios em que houve crescimento celular. Observa-se que o consumo de glicerol nas 5 primeiras horas de fermentação foi maior nos ensaios 11 e 15, uma vez que neste período houve consumo de 26,8% e 16,51% de glicerol, respectivamente, enquanto que nos ensaios 3 e 7 praticamente não houve consumo no período. Os ensaios 11 e 15 diferenciam-se dos ensaios 3 e 7 pela adição de cloreto de cálcio, portanto, a presença deste no meio de fermentação promoveu um maior consumo de substrato no início do processo.

Nos ensaios 17 a 20 não houve esgotamento do glicerol ao final da fermentação, restando cerca de 40% da quantidade inicial do substrato no meio. Isso pode ser explicado fato de que, com 29 horas de fermentação, o pH do meio atingiu valores próximos de 5,0 (mostrados a seguir na Figura 5.14) nestes ensaios. Segundo Bernhard e Utz (1993), *Bacillus thuringiensis* pode crescer em meios com valores de pH de 5,5 a 8,5, indicando que, no presente trabalho, quando o pH do meio atingiu valores menores que 5,5 a bactéria cessou seu desenvolvimento, não havendo esgotamento do substrato do meio. Além disso, pode não ter havido fonte de nitrogênio suficiente para que a bactéria consumisse todo o glicerol, uma vez que a relação C:N utilizada nestes ensaios é 4 vezes maior que a empregada nos ensaios 3, 7, 11 e 15. Anderson e Jayaraman (2003) avaliaram a influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de toxinas por *B. thuringiensis* var. *galleriae* e observaram que a glicose não foi completamente consumida em meios com baixas concentrações de extrato de levedura. Cabe salientar que o consumo de glicerol nos ensaios mencionados foi mais lento desde o início, provavelmente devido ao emprego de 20 g/L de glicerol, resultando o dobro da concentração de possíveis inibidores em relação aos meios com 10 g/L de glicerol.

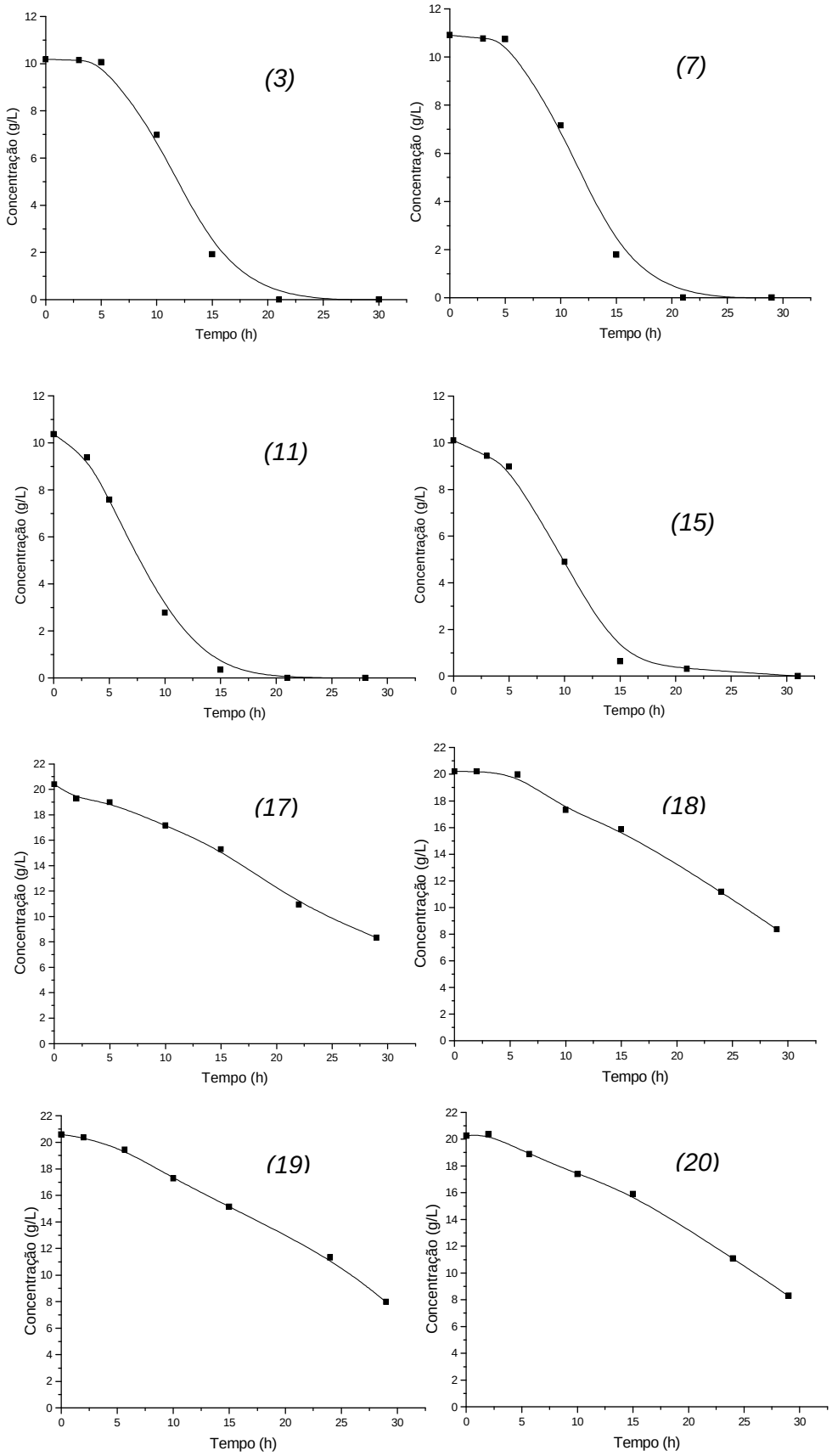

Figura 5.13 - Variação da concentração de glicerol em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4.

A Figura 5.14 apresenta a variação de pH do meio de fermentação em função do tempo para os ensaios do planejamento 2^4. Observa-se que nos ensaios 3 e 7 houve um decréscimo de pH do meio nas primeiras 10 horas de fermentação, e, entre 10 h e 15 h, iniciou-se um aumento desta variável, que continuou até o tempo final de fermentação. Nos ensaios 11 e 15, o decréscimo de pH ocorreu somente até as 5 horas de fermentação. Este comportamento está de acordo com o observado nos perfis de consumo de glicerol (Figura 5.13). Nos ensaios em questão, nos quais o consumo foi maior nas primeiras 5 horas de fermentação, a queda de pH ocorreu durante um intervalo de tempo menor, devido à produção de ácidos pela bactéria. Nos ensaios 3, 7, 11 e 15 a queda de pH do meio de fermentação foi pouco pronunciada, não atingindo valores menores que 6,4. Pessanha (2008) utilizou sacarose a 10 g/L e extrato de levedura a 12 g/L e observou que o valor do pH não atingiu valores menores que 6,2 no início do cultivo. No entanto, segundo o autor, a bactéria demonstrou baixa capacidade de consumir o dissacarídeo, o que não ocorreu no presente trabalho, em relação ao glicerol. Quando a glicose foi utilizada na concentração de 10 g/L, o menor valor de pH foi próximo de 5,5, nas 5 primeiras horas de fermentação.

Nos ensaios 17,18,19 e 20 o comportamento do pH do meio de fermentação com o tempo foi diferente: decresceu durante as 5 primeiras horas e aumentou entre 5 e 10 horas de cultivo, para depois novamente decrescer até atingir um valor próximo de 5,0. De acordo com Rogoff e Yousten (1969), quando a glicose é utilizada como substrato, durante a fase de crescimento exponencial os ácidos acético e pirúvico são acumulados no meio de cultura, e o pH cai para valores de 4,8 a 5,0, durante 2 a 3 horas de cultivo, para depois subir.

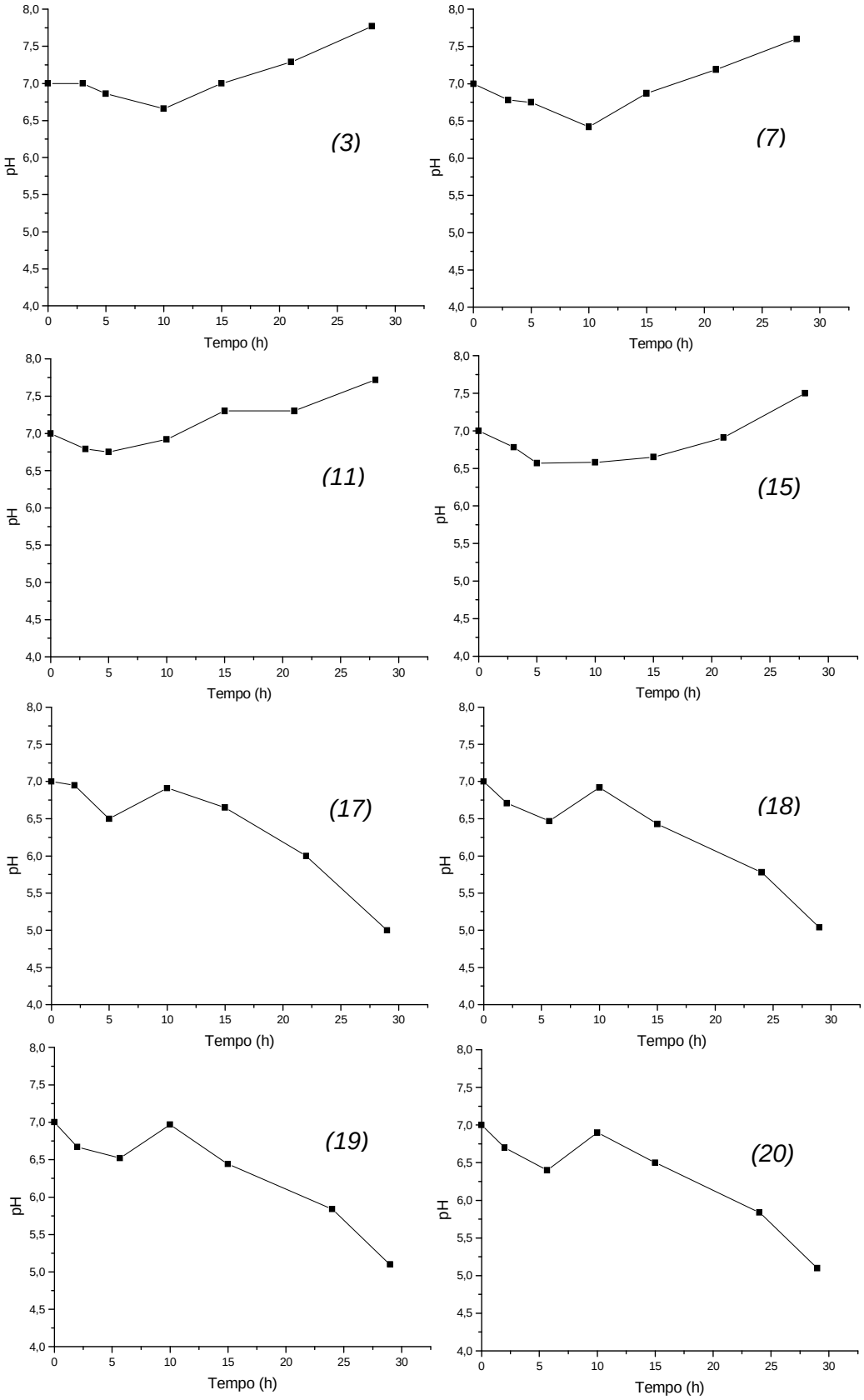

Figura 5.14 - Variação de pH em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^4.

É necessário que haja um balanço adequado entre fontes de carbono e nitrogênio no meio de fermentação para que ocorra manutenção do pH do meio na faixa que permita o crescimento da bactéria *Bacillus thuringiensis* (BERNHARD; UTZ, 1993). Segundo Yezza et al. (2005), durante a fase de esporulação, aminoácidos são consumidos para que ocorra a formação e maturação do esporo e também a síntese do cristal protéico. A desaminação de aminoácidos contribui para que o pH do meio aumente gradativamente, devido à liberação de amônia. Além disso, de acordo com Benoit; Wilson e Baugh (1990), durante a fase de transição e esporulação de *B. thuringiensis* var *israelensis,* o ácido acético formado no meio é, em seguida, assimilado pela própria bactéria via Ciclo de Krebs e posteriormente utilizado para a síntese de polissacarídeos de reserva. De acordo com Rogoff e Yousten (1969) e Mignone e Avignone-Rossa (1996), o metabolismo do acetato é necessário para o fornecimento de energia para a formação de esporos e síntese do cristal protéico.

As Figuras 5.15 e 5.16 apresentam a contagem de células totais e de esporos totais, respectivamente, e a Figura 5.17 as respectivas taxas de esporulação, obtidas para os ensaios que apresentaram crescimento da bactéria.

Ghribi et al. (2007) obtiveram de 2×10^9 a $2{,}8 \times 10^9$ esporos/mL em meio sintético contendo 45 g/L de glicerol, sendo que a produção das toxinas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foi inversamente proporcional à quantidade de esporos obtidos. Observa-se, pela Figura 5.17, que as taxas de esporulação obtidas foram muito próximas nos ensaios 3, 7,11, e 15 (realizados com 10 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura), variando de 96,7% a 98,7%. O cálcio está envolvido na esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* (CROSBY; GREENE; SLEPECKY, 1971), no entanto, no presente trabalho, com o emprego do glicerol a 10 g/L, a

adição de cálcio não influenciou a taxa de esporulação obtida nos diferentes ensaios. Nos ensaios 17,18,19 e 20 (realizados com 20 g/L de glicerol e 6 g/L de extrato de levedura), a taxa de esporulação foi em média 55,3%. Anderson e Jayaraman (2003) em fermentações com *B. thuringiensis* var. *galleriae* observaram que quanto maior a concentração de glicose utilizada no meio de fermentação, maior foi a heterogeneidade da população celular, que continha uma mistura de células vegetativas, esporuladas e esporos livres. Segundo Yang e Wang (2000), a limitação de fontes de nitrogênio e de fósforo no meio de fermentação são os principais fatores que desencadeiam a esporulação de *Bacillus thuringiensis.* A presença de fontes de carbono após o esgotamento de fontes de nitrogênio leva à produção de novas células vegetativas enquanto ainda há esporulação de células mais velhas (GHRIBI et al., 2007), o que pode ter acontecido nos ensaios 17 a 20.

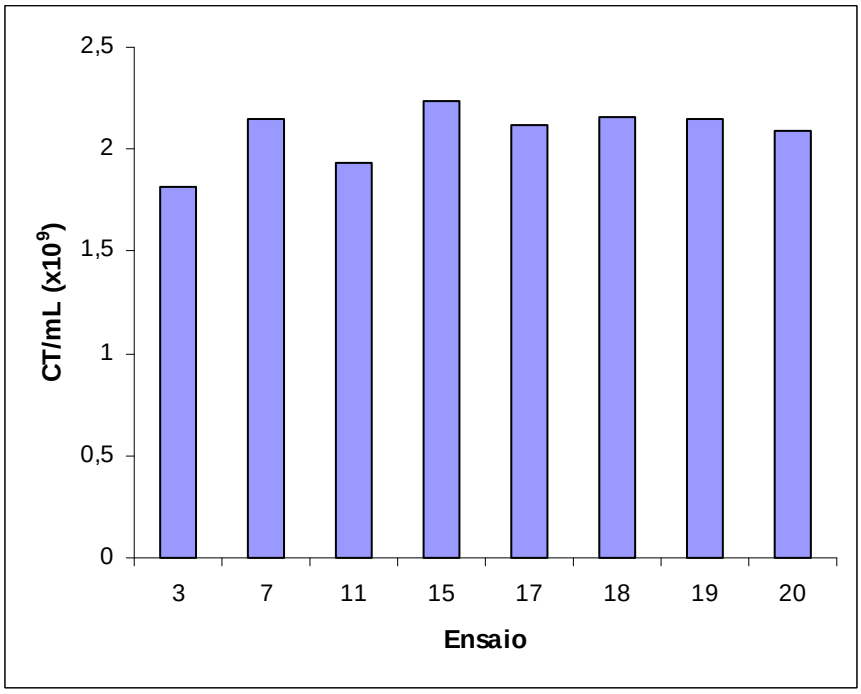

Figura 5.15 - Número total de células (CT) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*

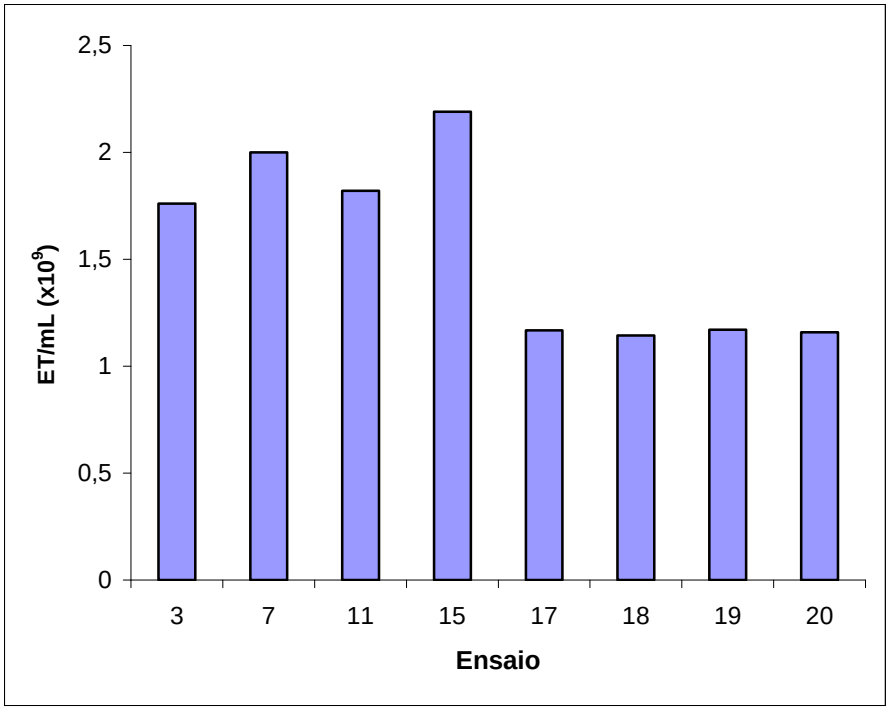

Figura 5.16 - Número total de esporos (ET) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*

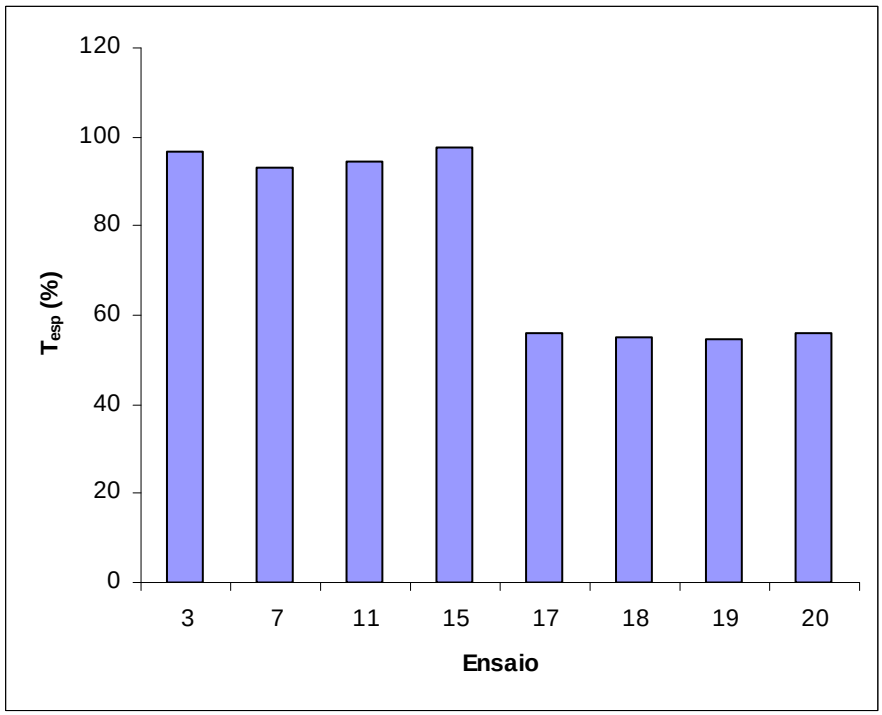

Figura 5.17 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtida por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^4, com *B. thuringiensis israelensis.*

Para analisar a toxicidade dos meios fermentados obtidos com ensaios do planejamento 2^4 foram realizados os bioensaios conforme descrito no item 4.5.6. Não foi realizada a análise estatística com valores de CL_{50} devido ao fato de que em alguns ensaios do planejamento não houve crescimento celular, e por isso, não foi possível quantificar CL_{50}. Para que os dados de toxicidade pudessem ser analisados estatisticamente, seus valores foram convertidos em porcentagens do maior valor obtido (0,410 mg/mL). Estes dados foram denominados CL_{50} percentual relativa. Para os ensaios em que não houve crescimento celular, o valor da CL_{50} percentual relativa foi considerado zero. Os valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, contagem de esporos totais (ET/mL), taxa de esporulação (T_{esp}) e tempo final de fermentação obtidos para os ensaios do planejamento 2^4 estão apresentados na Tabela 5.4.

Para os ensaios em que não houve crescimento celular satisfatório (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 16), não foram quantificados esporos totais, taxa de esporulação e atividade tóxica do meio fermentado. Observa-se que a menor quantidade do complexo esporo-cristal necessário para matar 50% da população de larvas (CL_{50}) foi obtida no ensaio 11. A análise estatística dos dados para avaliar a importância das variáveis estudadas no processo de fermentação está apresentada a seguir.

5.2.1.2 Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2^4

Com o auxílio dos programas Statistica 5.0 e Design-Expert 6.0 foram realizadas as estimativas dos efeitos e a análise de variância para os fatores estudados segundo o planejamento 2^4 com quatro repetições no ponto central. A significância dos fatores experimentais foi determinada pelo teste *t* de *Student*.

Tabela 5.4 - Valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, esporos totais, taxa de esporulação e tempo final de fermentação obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Ensaio	Gl	EL	SA	CC	CL_{50} (mg/mL)	CL_{50} percentual relativa	ET/mL ($x10^9$)	T_{esp} (%)	T_f (h)
1	10	0	0	0	-	0	-	-	-
2	30	0	0	0	-	0	-	-	-
3	10	12	0	0	0,736	55,7	1,761	98,70	30
4	30	12	0	0	-	0	-	-	-
5	10	0	6	0	-	0	-	-	-
6	30	0	6	0	-	0	-	-	-
7	10	12	6	0	1,132	36,2	2,002	96,69	29
8	30	12	6	0	-	0	-	-	-
9	10	0	0	0,24	-	0	-	-	-
10	30	0	0	0,24	-	0	-	-	-
11	10	12	0	0,24	0,410	100	1,823	97,30	28
12	30	12	0	0,24	-	0	-	-	-
13	10	0	6	0,24	-	0	-	-	-
14	30	0	6	0,24	-	0	-	-	-
15	10	12	6	0,24	0,601	68,2	2,191	97,78	31
16	30	12	6	0,24	-	0	-	-	-
17	20	6	3	0,12	0,498	82,3	1,203	56,66	29
18	20	6	3	0,12	0,517	79,3	1,218	56,44	29
19	20	6	3	0,12	0,542	75,6	1,171	54,44	29
20	20	6	3	0,12	0,511	80,2	1,179	55,99	29

Gl – glicerol; EL - extrato de levedura; SA - sulfato de amônio; CC - cloreto de cálcio; T_f – tempo final de fermentação.

As análises da estimativa dos efeitos para as variáveis dependentes (toxicidade do meio fermentado, produção de esporos e taxa de esporulação) foram realizadas empregando-se o gráfico de Pareto (Figuras 5.18 a 5.20), sendo considerados significativos os termos cujos valores de $t_{calculado}$ (representados por barras horizontais) fossem superiores ao valor de $t_{tabelado}$ = 2,35 (representado pela linha tracejada vertical), para distribuição de *Student* ao nível de 95% de confiança.

Verifica-se pela Figura 5.18 que somente o fator sulfato de amônio (X_2) não exerceu efeito principal significativo ao nível de 95% sobre a resposta toxicidade.

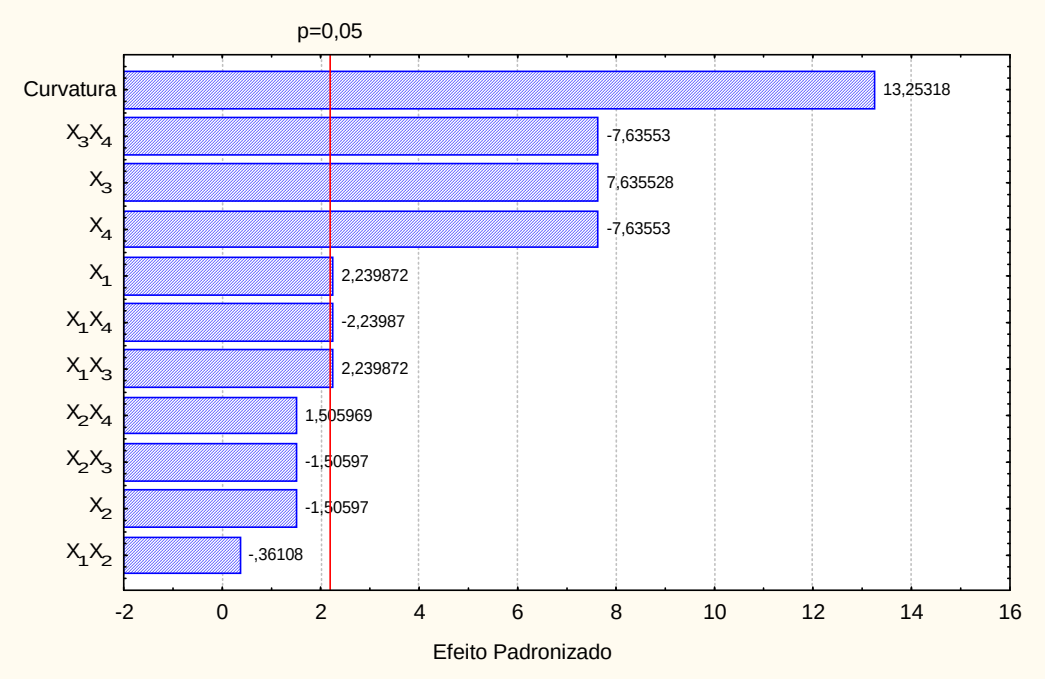

Figura 5.18 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta toxicidade. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol

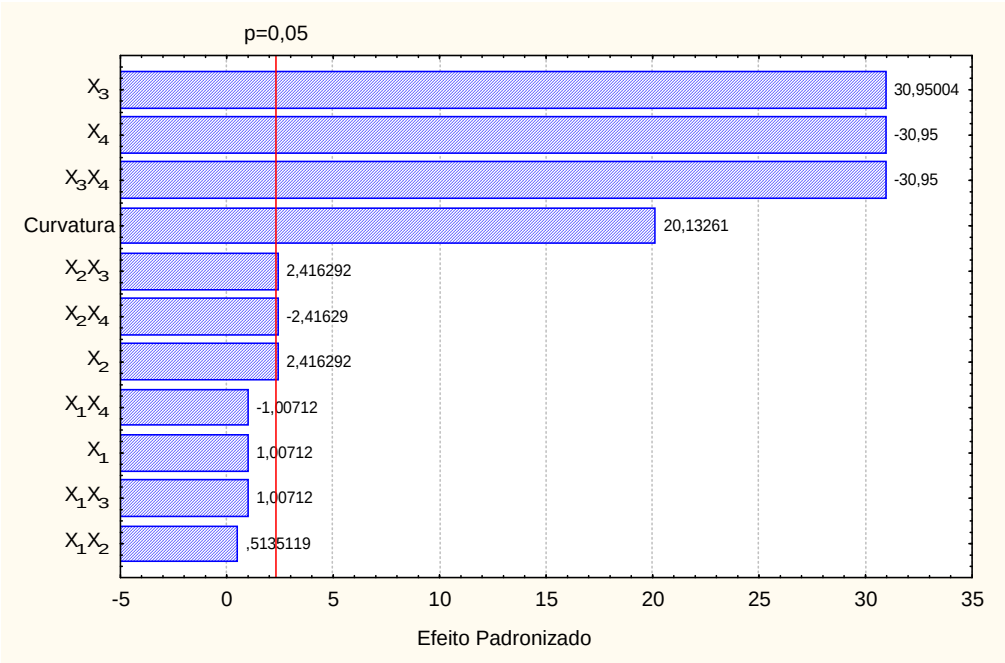

Figura 5.19 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta esporos totais. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol.

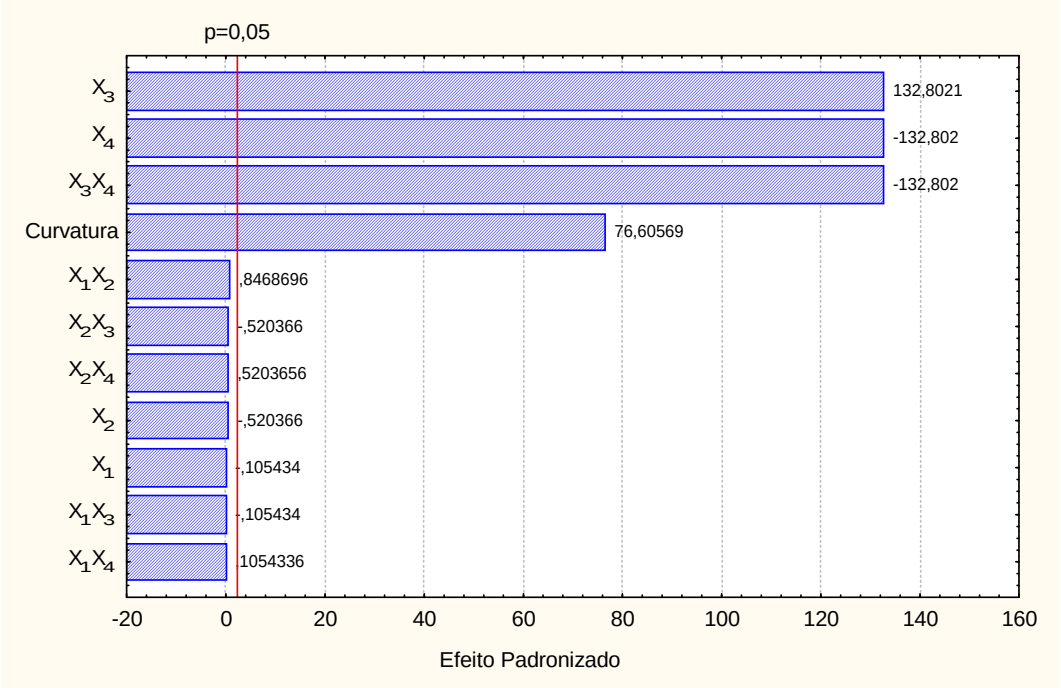

Figura 5.20 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança sobre a resposta taxa de esporulação. X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol.

Os fatores extrato de levedura (X_3) e glicerol (X_4) exerceram efeito principal e de interação mais pronunciado sobre a variável resposta, comparando-se aos outros fatores e interações. Variações nas concentrações de glicerol (X_4) e de extrato de levedura (X_3) no meio de fermentação também exerceram maior efeito sobre produção de esporos pela bactéria. Neste caso, somente o cloreto de cálcio (X_1) não apresentou efeito principal significativo ao nível de 95% de confiança sobre a resposta (Figura 5.19). Conforme discutido anteriormente, o teor de cálcio no resíduo é suficiente para promover a esporulação adequada da bactéria. Quanto à resposta taxa de esporulação (Figura 5.20), somente a concentração de glicerol (X_4) e de extrato de levedura (X_3) e a interação entre elas (X_3X_4) exerceram influência significativa ao nível de 95% de confiança. Anderson e Jayaraman (2003) avaliaram a influência de fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de toxinas por *B. thuringiensis* var. *galleriae* e verificaram que o aumento da concentração de

extrato de levedura exerceu efeito mais pronunciado sobre a formação das endotoxinas quando comparado com o aumento de glicose. No entanto, os autores constataram que a variação da concentração de extrato de levedura foi insignificante sobre a esporulação da bactéria.

Observa-se pela Figura 5.18 que o sinal do efeito do extrato de levedura (X_3) sobre a resposta toxicidade foi positivo (+7,64), indicando que a adição deste ao meio, na concentração de 12 g/L, favorece a síntese de toxinas pela bactéria. No presente trabalho, a presença de extrato de levedura no meio de fermentação foi fundamental para que houvesse crescimento da bactéria e, consequentemente, atividade larvicida no meio fermentado. Isso é explicado pelo fato de que é necessária a presença de vários aminoácidos para a síntese das toxinas protéicas, os quais são fornecidos pelo extrato de levedura. Além disso, o extrato de levedura comercial contém vitaminas e alguns elementos traços como o ferro, que são essenciais para o crescimento de microrganismos e estímulo do metabolismo secundário (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001). O efeito do glicerol (X_4) sobre esta resposta foi negativo (-7,64), indicando que o aumento da concentração deste prejudica a síntese de toxinas pela bactéria. Neste caso, o efeito do glicerol se deveu à ausência de crescimento adequado da bactéria quando este foi empregado na concentração de 30 g/L, obtendo-se um meio fermentado sem atividade tóxica nesta condição. Anderson e Jayaraman (2003) obtiveram a maior concentração de toxinas quando utilizaram meio contendo 34 g/L de glicose, 23 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona, o que representa uma relação carbono:nitrogênio de cerca de 4,0:1. Quando a relação C:N foi aumentada para 5,9:1, a quantidade de toxinas produzidas foi 2,7 vezes menor que a máxima. De acordo com Holmberg; Sievanen e Calberg (1980) a concentração de carboidrato

utilizada para a produção de endotoxinas não deve ultrapassar 23 g/L. Zouari; Achour e Jaoua (2002) verificaram que quando a concentração de substrato foi aumentada de 42 g/L para 50 g/L, em biorreator de 2 L, houve decréscimo na produção das endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki.* Isto ocorreu, segundo os autores, devido ao fluxo de energia ter sido direcionado para a manutenção estrutural e funcional da grande quantidade de biomassa produzida em detrimento da síntese de toxinas.

No presente trabalho, o sulfato de amônio não influenciou significativamente a síntese das toxinas, quando presente na concentração de 6 g/L no meio. Ozkan et al. (2003) relataram a importância da presença de íons amônio durante a fase de crescimento exponencial para a produção de endotoxinas e esporos por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os autores verificaram que a substituição de sulfato de amônio e de extrato de levedura por outras fontes de nitrogênio como peptona, farinha de soja ou licor de milho, levou a uma redução das concentrações das proteínas Cry4Ba e Cry11Aa produzidas. Entretanto, um forte efeito negativo na produção das mesmas proteínas foi observado por Yang e Wang (2000) com a adição de sulfato de amônio no início da fase de esporulação. A repressão ou inibição do metabolismo secundário pelo catabolismo de fontes de carbono prontamente assimiláveis (especialmente glicose) e fontes de nitrogênio (principalmente íons amônio), também têm sido frequentemente relatados (DEMAIN, 1995; IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGIZ, 2002; GHIRBI et al., 2006). Zouari; Ali e Jaoua (2002) verificaram que quando foi adicionado extrato de levedura a 5 g/L ao meio contendo 20 g/L de farinha de peixe, houve um aumento de 18% no rendimento das endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, enquanto que com a adição de sulfato de amônio não se observou melhora na produção. Ainda

considerando a Figura 5.18, verifica-se que o cálcio favoreceu a produção das toxinas pela bactéria, embora exerça o menor efeito principal (+2,24) sobre a variável resposta. Içgen; Içgen e Özcengiz (2002) verificaram que o cálcio estimulou a esporulação da bactéria *Bacillus thuringiensis* 81, em meio sintético, mas não influenciou significativamente o crescimento e a síntese das toxinas Cry4B e Cry11A. Cabe salientar que, no presente trabalho, apesar de a adição de cálcio ter favorecido a síntese de toxinas, não influenciou a esporulação da bactéria, indicando a inexistência de correlação entre a esporulação e/ou taxa de esporulação e síntese de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

No caso da resposta esporos totais, extrato de levedura (X_3) exerceu efeito positivo sobre a produção de esporos, ao passo que glicerol (X_4) exerceu efeito negativo (Figura 5.19). Isto está de acordo com o comportamento da toxicidade do meio fermentado, conforme demostrado na Figura 5.18. No entanto, sulfato de amônio exerceu efeito positivo sobre a produção de esporos (+2,41). Isto significa que, para a obtenção de maior quantidade de esporos, deve-se adicionar sulfato de amônio (X_2) ao meio de fermentação, o que não está de acordo com o comportamento observado para toxicidade (Figura 5.18). Liu e Tzeng (1998) otimizaram a composição do meio de cultura de *B. thuringiensis* para a produção de esporos, estudando concentrações de farinha de peixe, farinha amilácea, sulfato de amônio e carbonato de cálcio. Os autores verificaram que o sulfato de amônio exerceu efeito positivo sobre a produção de esporos, assim como o observado no presente trabalho. Para se confirmar a significância dos efeitos principais e suas interações sobre as respostas em estudo foi realizada a análise de variância dos efeitos (Tabelas 5.5 a 5.7).

Tabela 5.5 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	G.L	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	12738,63	1	12738,63	175,6467	0,000001*
X_1	363,86	1	363,86	5,0170	0,050436*
X_2	164,48	1	164,48	2,2679	0,170496
X_3	4228,25	1	4228,25	58,3013	0,000061*
X_4	4228,25	1	4228,25	58,3013	0,000061*
X_1X_2	9,46	1	9,46	0,1304	0,727389
X_1X_3	363,86	1	363,86	5,0170	0,050436*
X_1X_4	363,86	1	363,86	5,0170	0,050436*
X_2X_3	164,48	1	164,48	2,2679	0,170496
X_2X_4	164,48	1	164,48	2,2679	0,170496
X_3X_4	4228,25	1	4228,25	58,3013	0,000061*
Erro	580,19	8	72,52		
SQ total	27598,04	19			

R^2 = 0,97 - X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol; G.L – grau de liberdade; * significativo a 95% de confiança.

Tabela 5.6 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	G.L	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	1,59867	1	1,598669	405,321	<0,00001*
X_1	0,00400	1	0,004001	1,0143	0,343364
X_2	0,02303	1	0,023028	5,8385	0,042093*
X_3	3,77816	1	3,778164	957,904	<0,00001*
X_4	3,77816	1	3,778164	957,904	<0,00001*
X_1X_2	0,00104	1	0,001040	0,2637	0,621471
X_1X_3	0,00400	1	0,004001	1,0143	0,343364
X_1X_4	0,00400	1	0,004001	1,0143	0,343364
X_2X_3	0,02303	1	0,023028	5,8385	0,042093*
X_2X_4	0,02303	1	0,023028	5,8385	0,042093*
X_3X_4	3,77816	1	3,778164	957,904	<0,00001*
Erro	0,03155	8	0,003944		
SQ total	13,04684	19			

R^2 = 0,998 - X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol; G.L – grau de liberdade; * significativo a 95% de confiança.

Tabela 5.7- Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	3170,79	1	3170,792	5868,43	<0,00001*
X_1	0,01	1	0,006	0,01	0,918627
X_2	0,15	1	0,146	0,27	0,616899
X_3	9529,18	1	9529,176	17636,39	<0,00001*
X_4	9529,18	1	9529,176	17636,39	<0,00001*
X_1X_2	0,39	1	0,388	0,72	0,421677
X_1X_3	0,01	1	0,006	0,01	0,918627
X_1X_4	0,01	1	0,006	0,01	0,918627
X_2X_3	0,15	1	0,146	0,27	0,616899
X_2X_4	0,15	1	0,146	0,27	0,616899
X_3X_4	9529,18	1	9529,176	17636,39	<0,00001*
Erro	4,32	8	0,540		
SQ total	31763,49	19			

R^2 = 0,9998 - X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol; GL – grau de liberdade; * significativo a 95% de confiança.

Constata-se que os termos que influenciaram significantemente as respostas analisadas foram os mesmos revelados anteriormente pelos gráficos de Pareto. A curvatura é medida pela diferença entre a média dos resultados dos pontos fatoriais e a média dos resultados dos pontos centrais, e sua significância pode indicar o ajuste de um modelo quadrático aos dados experimentais (MONTGOMERY,1991).

Os modelos empíricos e as análises estatísticas desempenham um papel extremamente importante na elucidação dos mecanismos básicos em situações complexas, proporcionando uma melhor compreenssão e controle do processo. A metodologia da superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização baseada no emprego de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. Se a resposta for bem modelada por uma função linear das variáveis independentes,

então a função de aproximação é um modelo de primeira ordem. Se existir curvatura, um polinômio de grau superior, como um modelo de segunda ordem, será usado para aproximar a resposta (SEM; SWAMINATHAN, 1997). Segundo Moldavsky e Cohen (1996) existem três critérios principais para a validação de modelos:

1- Análise de variância para determinar a significância de cada termo na equação ajustada e para determinar a qualidade de ajuste em cada caso. O valor de *F* de Fischer calculado é comparado com o valor de F teórico ($F_{\alpha,\ p-1,\ n-p}$) onde α é o risco escolhido, sendo normalmente 0,05; n é o número total de ensaios e p o número de termos do modelo.

2- Coeficiente de correlação múltipla ou de determinação (R^2)

3- Teste da falta de ajuste, que indica se a falta de ajuste entre os valores experimentais e calculados pelas equações de modelo pode ser explicada pelo erro experimental. Os critérios para a validação do modelo podem ser resumidos, conforme consta na Tabela 5. 8.

Tabela 5.8 - Critérios para validação de modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).

Análise de variância	Coeficiente de correlação	Falta de ajuste	Validação do modelo
_____	$R^2 > 0,9$	_____	Sim
$p < 0,1$	$0,7 < R^2 < 0,9$	$p > 0,01$	Sim
		$p < 0,01$	Não
	$R^2 < 0,7$	_____	Não
$p > 0,1$	_____	_____	Não

O possível ajuste de modelos lineares aos dados experimentais foi verificado pela análise de regressão múltipla (Tabelas 5.9 a 5.11) e segundo critérios apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.9 - Análise de variância da regressão que representa a resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	14279,22	10	1427,92	0,96	0,5260	0,52
Falta de ajuste	13295,33	6	2215,89	283,00	0,0003*	-
Curvatura	12738,63	1	12738,63	175,647	<0,0001*	-

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.10 - Análise de variância da regressão que representa a resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	11,42	10	1,14	6,31	0,0053*	0,87
Falta de ajuste	1,63	6	0,27	579,55	0,0001*	-
Curvatura	1,60	1	1,60	405,27	<0,0001*	-

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.11 - Análise de variância da regressão que representa a resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^4.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	28588,37	10	2858,84	8,10	0,0021*	0,90
Falta de ajuste	3288,18	6	548,03	546,63	0,0001*	-
Curvatura	3170,79	1	3170,792	5868,43	<0,0001*	-

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Observa-se pela Tabela 5.9 que o modelo linear não é significativo ao nível de 90% de confiança, portanto, segundo critérios para validação de Moldavsky e Cohen (1996), este não é válido para representar o comportamento da variável resposta toxicidade em função dos fatores estudados. Além disso, há falta de ajuste do modelo aos dados experimentais ($p<0,01$), e o valor de R^2 é menor que 0,7. Como a curvatura é significativa, possivelmente um modelo quadrático se ajustaria melhor

aos dados experimentais. No entanto, o número de experimentos realizados no planejamento não é suficiente para determinar os coeficientes do modelo quadrático, sendo necessário a realização de ensaios complementares ao planejamento original.

Constata-se pela Tabela 5.10 que o modelo linear é significativo ao nível de 99% de confiança. No entanto, a falta de ajuste é significativa ($p<0,01$) e o valor de R^2 é menor que 0,9. Portanto, o modelo linear não pode ser utilizado para representar o comportamento da variável resposta esporos totais em função dos fatores estudados, na região analisada. No entanto, o ajuste de um modelo linear aos dados experimentais obtidos para a taxa de esporulação é possível, uma vez que este modelo é significativo ao nível de 99% de confiança (Tabela 5.11), e, apesar de haver falta de ajuste ($p<0,01$), o valor de R^2 é igual a 0,9.

Foi realizada uma nova análise de variância dos efeitos principais e de interações sobre a resposta taxa de esporulação, desconsiderando a curvatura. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.12. Observa-se que, desconsiderando a curvatura, os fatores X_3 e X_4 mantiveram-se como os fatores significativos sobre a taxa de esporulação, ao nível de 95% de confiança.

Também foi realizada um nova análise de variância desconsiderando os parâmetros não significativos, que está apresentada na Tabela 5.13. Neste caso, apesar de a análise de variância indicar curvatura significativa, há possibilidade de utilização de modelo linear para representar o comportamento da variável dependente em função dos fatores, na região analisada (Tabela 5.11). Esta região, portanto, pode ser descrita satisfatoriamente por uma equação de 1ª ordem, que é uma equação de um plano. Há uma certa divergência na literatura especializada, sobre o fato de se retirar ou não do modelo os parâmetros inerentes a um fator ou a uma interação não significativa.

Tabela 5.12 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta taxa de esporulação, desconsiderando curvatura.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
X_1	0,01	1	0,006	0,00002	0,996798
X_2	0,15	1	0,146	0,00041	0,984197
X_3	9529,18	1	9529,176	27,01087	0,000566*
X_4	9529,18	1	9529,176	27,01087	0,000566*
X_1X_2	0,39	1	0,388	0,00110	0,974285
X_1X_3	0,01	1	0,006	0,00002	0,996798
X_1X_4	0,01	1	0,006	0,00002	0,996798
X_2X_3	0,15	1	0,146	0,00041	0,984197
X_2X_4	0,15	1	0,146	0,00041	0,984197
X_3X_4	9529,18	1	9529,176	27,01087	0,000566*
Erro	3175,11	9	352,790		
SQ total	31763,49	19			

R^2 = 0,90 - X_1 – cloreto de cálcio; X_2 – sulfato de amônio; X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol; GL – grau de liberdade; * significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.13 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta taxa de esporulação, desconsiderando os efeitos não significativos.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
X_3	9529,18	1	9529,176	48,00655	0,000003*
X_4	9529,18	1	9529,176	48,00655	0,000003*
X_3X_4	9529,18	1	9529,176	48,00655	0,000003*
Erro	3175,96	16	198,497		
SQ total	31763,49	19			

R^2 = 0,90 - X_3 – extrato de levedura e X_4 – glicerol, GL – grau de liberdade;

* significativo ao nível de 95% de confiança

Segundo Rodrigues e Iemma (2005), cada caso deve ser estudado isoladamente. Neste caso, a retirada dos coeficientes não significativos do modelo não leva a um grande aumento dos resíduos. O fato de as SQ (somas quadráticas) destes serem adicionados às SQRes (somas quadráticas dos resíduos) não altera o coeficiente de determinação (o valor de R^2 continua sendo igual a 0,9), conforme demonstrado nas Tabelas 5.12 e 5.13. Por esse motivo, os parâmetros não significativos podem ser retirados do modelo sem prejudicar sua capacidade de predição.

Portanto, o modelo matemático obtido para estimar a taxa de esporulação em função dos fatores estudados, para a região investigada, é descrito pela equação 1.

$$Y_1 = 30{,}700 + 24{,}404\ X_3 - 24{,}404\ X_4 - 24{,}404\ X_3X_4 \qquad \textbf{(equação 1)}$$

Onde Y_1 corresponde à resposta taxa de esporulação (T_{esp}).

A representação em perspectiva dos valores preditos por esta equação, correspondente à superfície de resposta, está apresentada na Figura 5.21. Observa-se que para se obter maior taxa de esporulação deve-se aumentar a quantidade de extrato de levedura (X_3) e diminuir a de glicerol (X_4), assim como observado para as respostas toxicidade e esporos totais. Pessanha (2008) utilizou caldo de cana-de-açúcar em fermentação com *B. thuringiensis* var. *israelensis* e verificou que o aumento da concentração de extrato de levedura afetou negativamente a produção de esporos e a taxa de esporulação, enquanto que o sulfato de amônio prejudicou somente a produção de esporos pela bactéria. O autor constatou ainda, que variações nas concentrações de sacarose não foram significantivas para ambas as respostas.

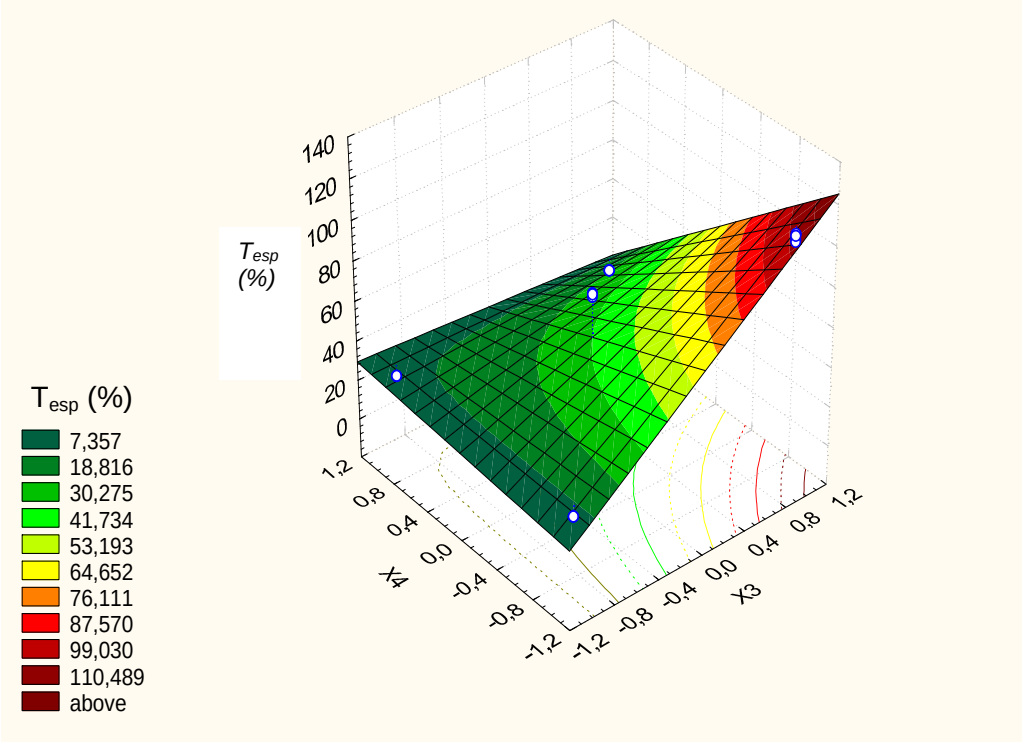

Figura 5.21 - Superfície de resposta para a taxa de esporulação obtida em fermentações com *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas (sulfato de amônio e cloreto de cálcio ambos fixados em 0 g/L).

5.2.2 Ensaios do planejamento fatorial 2^2

5.2.2.1 Ensaios de fermentação do planejamento fatorial 2^2

Para a otimização da toxicidade do meio fermentado, foram realizados ensaios complementares ao planejamento original, e, para isso, estudou-se a região experimental acima da investigada originalmente para os fatores extrato de levedura e cloreto de cálcio (Figura 5.18). Como o sulfato de amônio não influenciou significativamente a síntese de toxinas e a sua concentração no nível inferior é zero, este foi excluído do meio de fermentação. A concentração de glicerol foi mantida a 10 g/L para não prejudicar a produção de biomassa, o que poderia acontecer se fosse diminuída a concentração de glicerol abaixo de 10 g/L. Portanto, foi realizado um novo planejamento 2^2 com três repetições no ponto central, variando-se apenas

a concentração de extrato de levedura e a concentração de cloreto de cálcio. Os níveis dos fatores e a matriz do planejamento 2^2 estão apresentados nas Tabelas 5.14 e 5.15, respectivamente.

Tabela 5.14 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, visando à otimização da resposta toxicidade.

	Níveis		
Fatores	-1	0	+1
Extrato de Levedura	10	15	20
Cloreto de Cálcio	0,20	0,4	0,6

Tabela 5.15 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, visando à otimização da resposta toxicidade.

Ensaio	Extrato de Levedura	Cloreto de Cálcio
21	10	0,2
22	20	0,6
23	10	0,6
24	20	0,2
25	15	0,4
26	15	0,4
27	15	0,4

A Figura 5.22 apresenta os perfis de crescimento da bactéria em função do tempo nos ensaios do planejamento fatorial 2^2. Verifica-se que houve um comportamento semelhante de crescimento celular em todos os ensaios, caracterizado por aumento de massa de células nas primeiras 15 horas de fermentação e queda de massa após este período. As máximas concentrações de células obtidas foram muito próximas entre os ensaios 21 e 23 (8,1 e 8,3 g/L, respectivamente) e também entre os ensaios 22 e 24 (10,4 e 10,6 g/L, respectivamente). Isso era esperado, pois os ensaios com igual crescimento foram realizados com a mesma concentração de glicerol e de extrato de levedura.

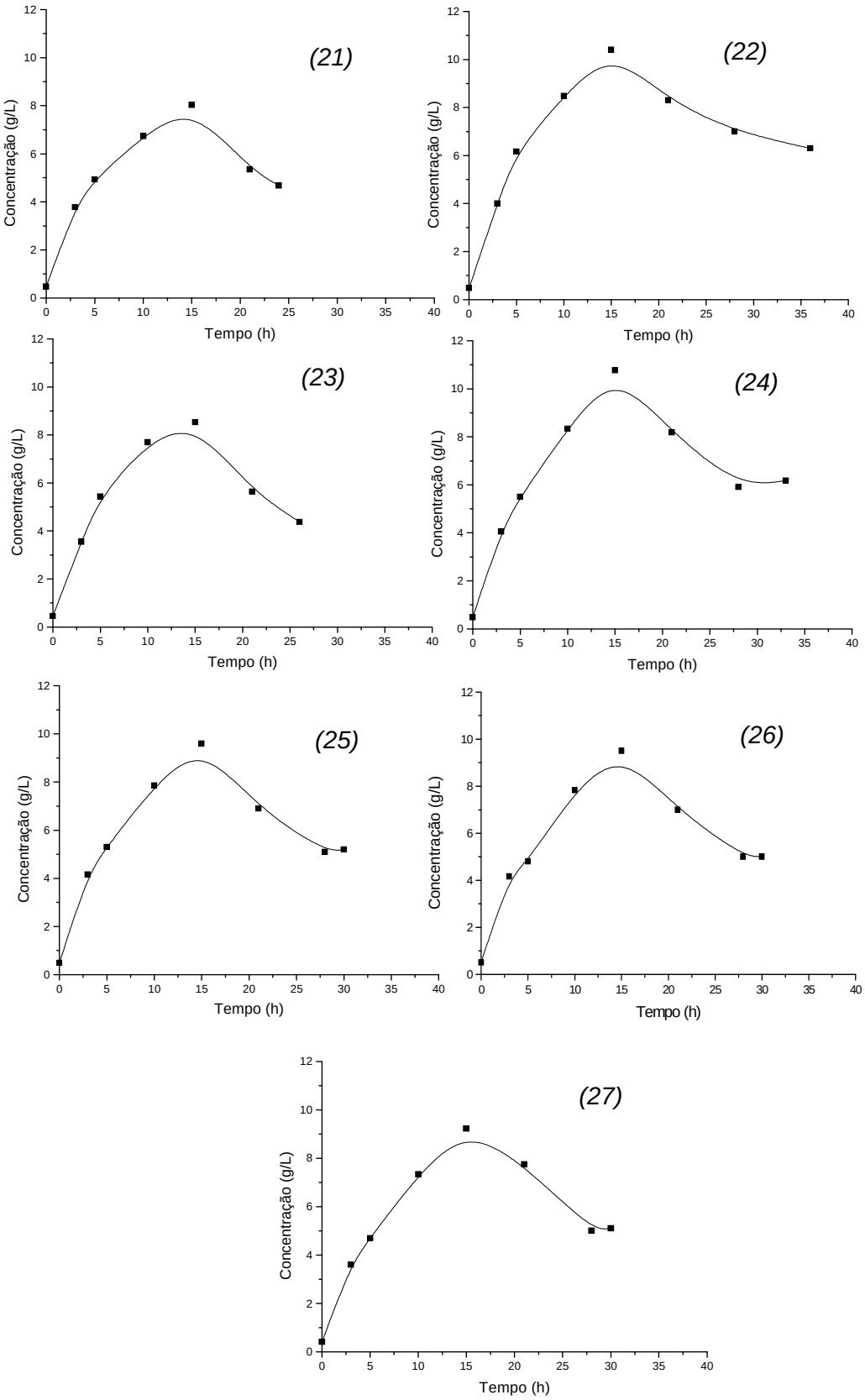

Figura 5.22 - Variação da concentração celular em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2.

A Figura 5.23 apresenta a concentração de glicerol em função do tempo de fermentação para os ensaios do planejamento 2^2. Observa-se que apenas nos ensaios em que se utilizou extrato de levedura no nível inferior (ensaios 21 e 23) não houve esgotamento de glicerol com 15 horas de fermentação. Diferentemente dos ensaios do planejamento original (Figura 5.13), a presença de cloreto de cálcio em quantidades diferentes não modificou pronunciadamente o consumo inicial de glicerol.

A Figura 5.24 apresenta a variação de pH do meio de fermentação em função do tempo. A queda mais acentuada do valor do pH nas primeiras horas de fermentação foi observada nos ensaios 22 e 24, os quais foram realizados com concentração de extrato de levedura no nível superior (20 g/L). Nestes ensaios, após dez horas de fermentação o pH aumentou até atingir cerca de 8, no final da fermentação. Os ensaios 21 e 23 apresentaram comportamento similar de variação de pH em função do tempo, ocorrendo decréscimo e aumento ao longo do cultivo. Os ensaios do ponto central (25 a 27) apresentaram valores de pH em torno de 7,5 no final fermentação, demonstrando-se que, quanto maior for a concentração de extrato de levedura empregada, maior é a variação de pH do meio de fermentação. Os aminoácidos liberados por proteases, e posteriormente consumidos, contribuem para elevação do pH, juntamente com o consumo dos ácidos produzidos (YEZZA et al., 2005).

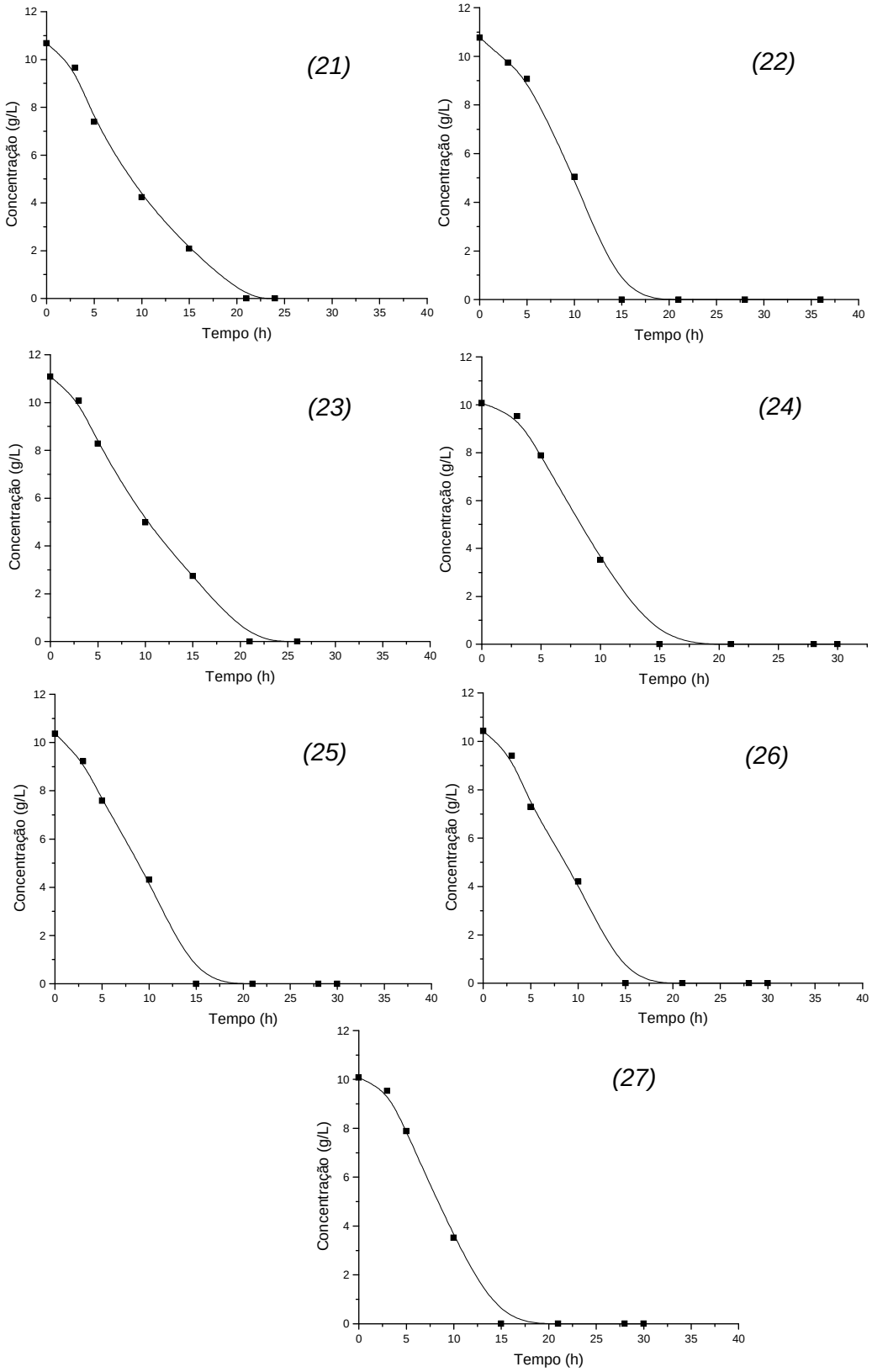

Figura 5.23 - Variação da concentração de glicerol em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2.

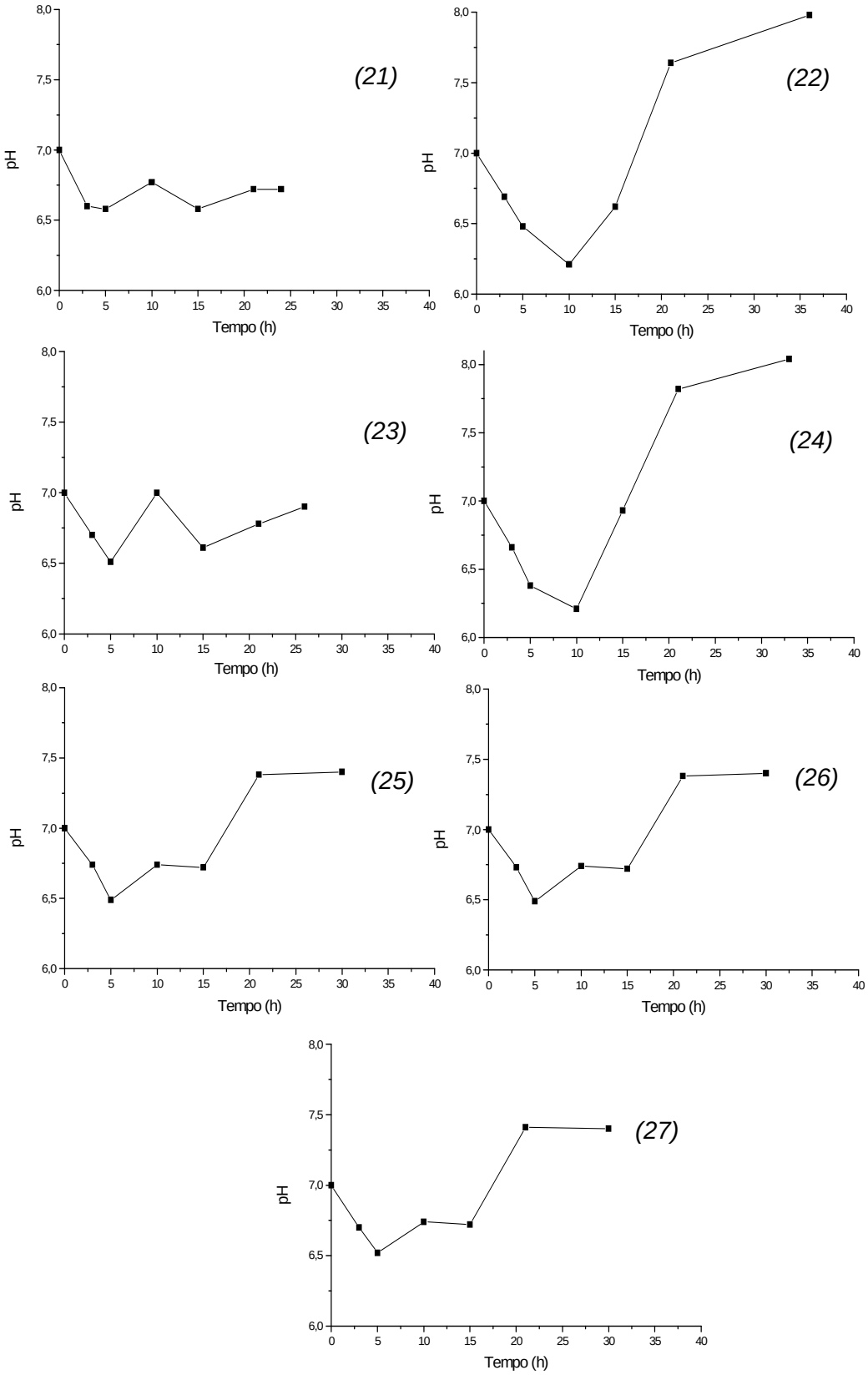

Figura 5.24 - Variação do pH em função do tempo, durante a fermentação de meios formulados com glicerina G7, por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os números entre parênteses correspondem aos respectivos ensaios do planejamento 2^2.

As Figuras 5.25 e 5.26 apresentam os fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) e produtividade em células (Q_X) para os respectivos ensaios. Observa-se que os menores valores de $Y_{X/S}$ foram obtidos nos ensaios 21 e 23 (0,71 e 0,72 g/g, respectivamente), e os maiores valores de $Y_{X/S}$ foram obtidos nos ensaios 22 e 24 (0,92 e 0,99 g/g, respectivamente). Anderson (1990) estudou a influência da relação carbono:nitrogênio (C:N) sobre a fermentação empregando *Bacillus thuringiensis* e verificou que o meio balanceado com relação C:N = 7,5:1 resultou em um maior valor de $Y_{X/S}$, comparado ao meio com relação de 5:1 ou de 11:1. Neste trabalho, os valores de produtividade em células obtidos foram muito próximos, uma vez que os ensaios em que se obtiveram as maiores concentrações de células foram também os que tiveram maior tempo de fermentação. Quando a concentração de extrato de levedura foi aumentada, o tempo de fermentação foi maior (Tabela 5.16).

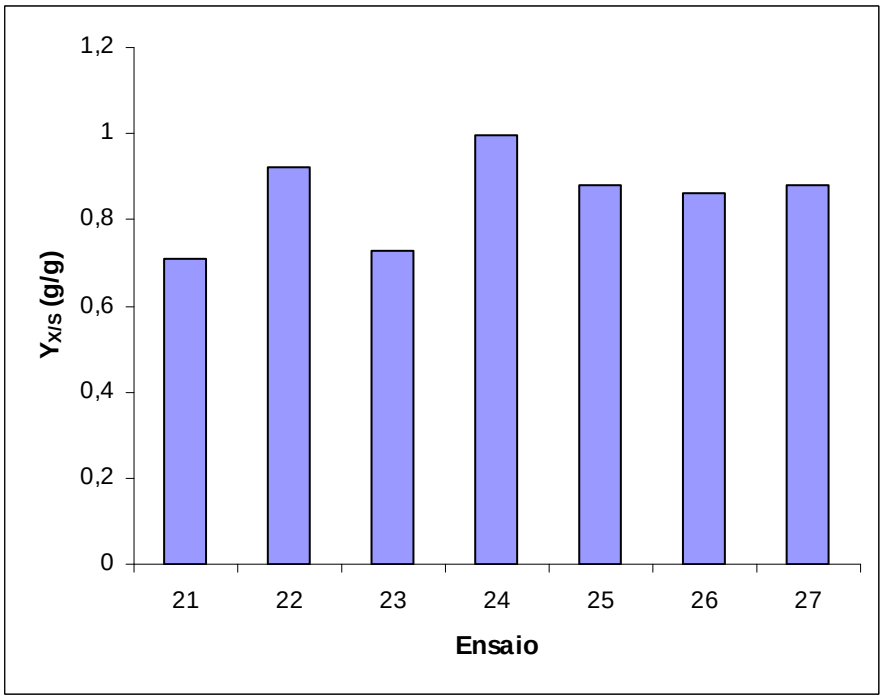

Figura 5.25 - Fatores de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.*

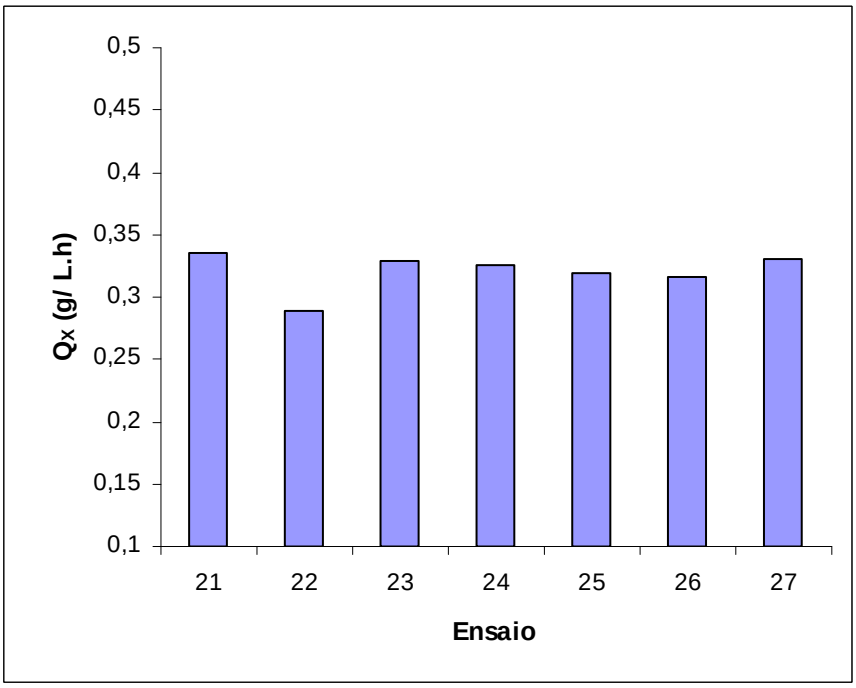

Figura 5.26 - Produtividade em células (Q_X) considerando $X_{máximo}$ com 15 horas de fermentação, obtidos por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.*

As Figuras 5.27 e 5.28 apresentam a contagem de células totais e de esporos totais, respectivamente, e a Figura 5.29 as respectivas taxas de esporulação obtidas. Observa-se que a quantidade de células obtidas por contagem está de acordo com as concentrações obtidas por massa seca (Figura 5.22), em que se obteve maior quantidade de células nos ensaios 22 e 24, seguida dos ensaios do ponto central e, com menor concentração celular, os ensaios 21 e 23. Embora os ensaios 21 e 23 apresentem menor contagem de esporos (Figura 5.28), obteve-se maior taxa de esporulação. Nos ensaios 22 e 24 obtiveram-se as menores taxa de esporulação, com uma população mais heterogênea de células. Como já foi mencionado anteriormente, quando não há um balanço adequado entre as fontes de nitrogênio e de carbono, a população de células produzidas pode ser heterogênea devido à produção de novas células vegetativas enquanto ainda há esporulação de células mais velhas (ANDERSON; JAYARAMAN, 2003; GHRIBI et al., 2007).

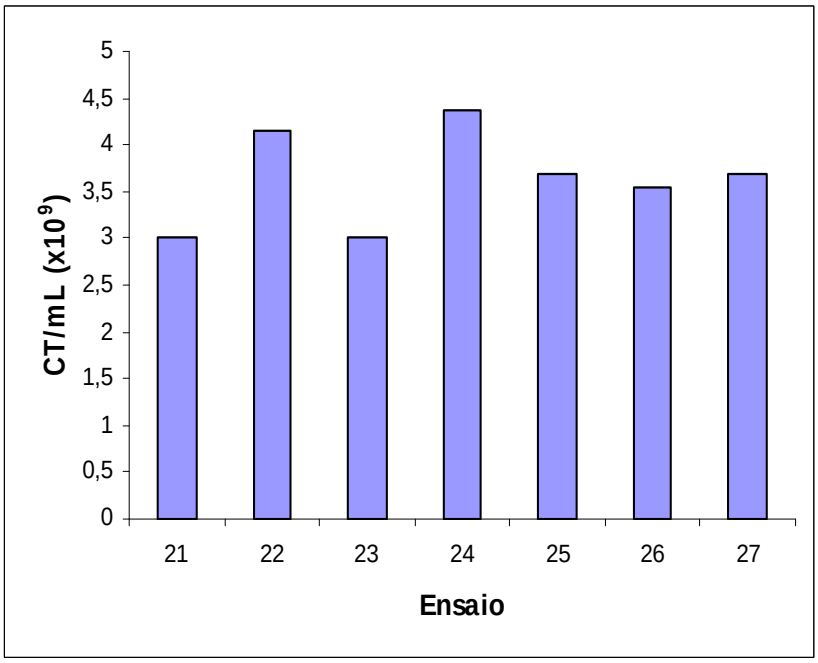

Figura 5.27 - Número total de células (CT) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.*

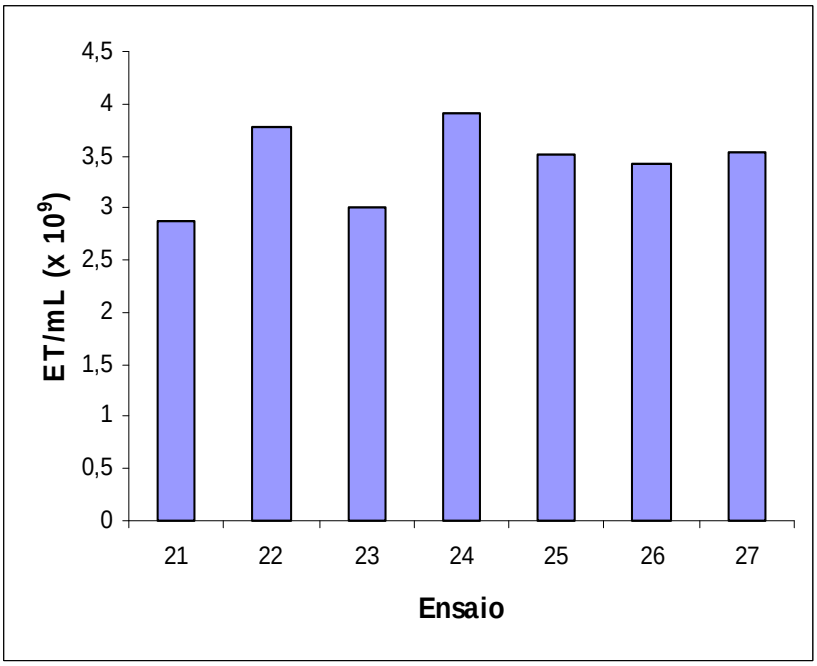

Figura 5.28 - Número total de esporos (ET) obtido por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.*

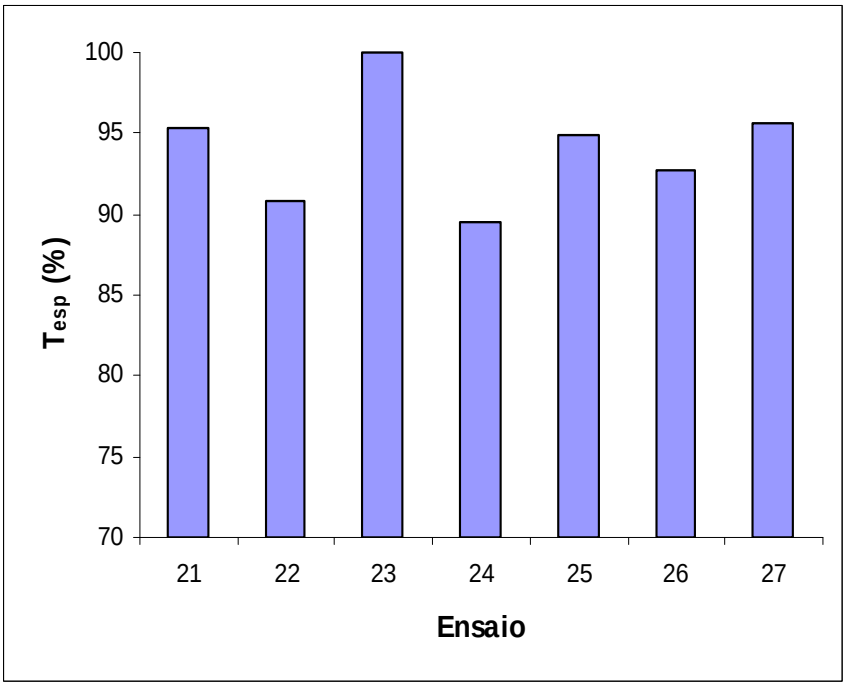

Figura 5.29 - Taxa de esporulação (T_{esp}) obtida por fermentação de meios formulados com glicerina G7, nos ensaios do planejamento 2^2, com *B. thuringiensis israelensis.*

Os valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, contagem de esporos totais (ET/mL), taxa de esporulação (T_{esp}) e tempo final de fermentação obtidos para os ensaios do planejamento 2^2 estão apresentados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Valores de CL_{50}, CL_{50} percentual relativa, esporos totais e taxa de esporulação, obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 2^2.

Ensaio	Extrato de Levedura	Cloreto de Cálcio	CL_{50} (mg/mL)	CL_{50} percentual relativa	ET/mL ($x10^9$)	T_{esp} (%)	T_f
21	10	0,2	0,426	69,2	2,88	95,36	24
22	20	0,6	0,534	55,2	3,78	90,87	35
23	10	0,6	0,378	78,0	3,00	100	26
24	20	0,2	0,584	50,5	3,90	89,45	33
25	15	0,4	0,295	100,0	3,51	94,86	30
26	15	0,4	0,298	99,0	3,43	92,70	30
27	15	0,4	0,309	95,5	3,54	95,68	30

T_f – tempo final de fermentação

Observa-se que houve uma melhora dos valores de CL_{50} nestes novos ensaios, comparando-se aos ensaios do planejamento 2^4 (Tabela 5.4). Os ensaios que proporcionaram maior valor de toxicidade contra larvas de *Aedes aegypti* foram os referentes ao ponto central, ou seja, ensaios 25 a 27, demonstrando que a região estudada corresponde à região de otimização. Farrera; Pérez-Guevara e Torre (1998) obtiveram maior concentração da endotoxina Cry1A, quando utilizaram a relação C:N de 7:1. Entretanto, para que haja eficiência na ação do bioinseticida deve haver a ação sinérgica das quatro endotoxinas, uma vez que nenhuma proteína individual é tão tóxica quanto o complexo protéico intacto (CRICKMORE et al., 1995). Tal fato sugere que a análise de apenas uma das endotoxinas não é suficiente para se obter um produto com atividade tóxica eficaz.

Prabakaran e Hoti (2008a) empregaram o meio NYSM (MYERS; YOUSTEN, 1980) em fermentação com *B. thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de 100 L, e obtiveram meios fermentados com valores de CL_{50} que variaram de 28 a 75 nL/mL, contra larvas de *Aedes aegypti*. O meio NYSM utilizado pelos autores contém como fontes de nitrogênio orgânico peptona (5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e extrato de levedura (0,5 g/L) e, como principal fonte de carbono, a glicose (5 g/L). Neste caso, a relação C:N é de aproximadamente 2,3:1, ou seja, menor que a relação de 7:1 mencionada por Farrera; Pérez-Guevara e Torre (1998). No presente trabalho a relação C:N mais adequada para a síntese das toxinas pela bactéria foi de 2,6:1, próxima a relatada por Prabakaran e Hoti (2008a).

Neste trabalho, os valores de toxicidade obtidos são baixos em relação aos relatados na literatura, para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, conforme pode ser observado na discussão anterior. Tal fato pode ser atribuído a vários fatores, tais como: inibidores ainda presentes na glicerina tratada, falta de adequação dos metais

presentes no meio, assim como suas concentrações, ausência de outros compostos necessários para a síntese das toxinas e fornecimento inadequado de oxigênio durante a fermentação. Com relação a este último fator, alguns trabalhos podem ser destacados. Morris et al. (1996) avaliaram a influência da relação entre volume de meio e volume de frasco (V_m/V_f) sobre a produção de toxinas por *B. thuringiensis* var. *aizawai* e verificaram que utilizando uma relação de V_m/V_f de 0,05 a morte de larvas de *Mamestra configurata* foi de 95%, com uma concentração de 0,500 mg/mL do complexo esporo-cristal. Porém, quando esta relação foi de 0,2, a porcentagem de morte caiu para 66%. A concentração de esporo-cristal utilizada por estes autores está na mesma ordem de grandeza da utilizada no presente trabalho.

Maldonado-Blanco, Sólis-Romero e Galán-Wong (2003) estudaram o efeito da tensão de oxigênio na produção de toxinas por *B. thuringiensis* var. *israelensis* e constataram que houve menos de 1% de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* em bioensaios de uma suspensão de 0,05 mg/L do complexo esporo-cristal quando se utilizaram as combinações de taxa de aeração (vvm) e velocidade de agitação (rev/min) de 0,6 vvm e 100 rev/min, 0,2 vvm e 300 rev/min e 0,6 vvm e 300 rev/min. No entanto, quando os autores utilizaram as combinações de 1 vvm e 300 rev/min e 0,6 vvm e 500 rev/min houve morte de 47,2 e 59,7% das larvas, respectivamente. Isso demonstra que a quantidade de oxigênio dissolvido no meio é de fundamental importância para a obtenção de um meio fermentado com toxicidade satisfatória (MORRIS et al., 1996; MALDONADO-BLANCO; SÓLIS-ROMERO; GALÁN-WONG, 2003; GHRIBI, 2007) o que pode ser alcançado mais facilmente com controle adequado da oxigenação do meio, ou seja, com ensaios em biorreator.

5.2.2.2 Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2^2

Foi realizada a análise estatística dos dados para a verificação de ajuste de um modelo ao novo conjunto de dados experimentais, que é apresentado a seguir. As Figuras 5.30 a 5.32 apresentam os gráficos de Pareto referentes ao ensaios do planejamento fatorial 2^2.

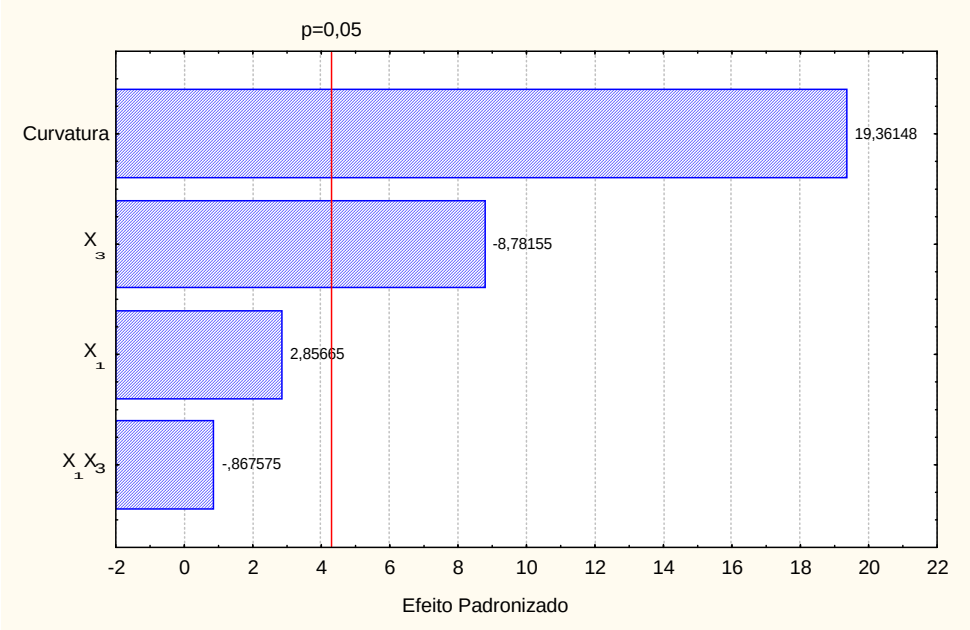

Figura 5.30 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos com 95% de confiança sobre a resposta toxicidade. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura.

Verifica-se que o fator extrato de levedura (X_3) exerceu efeito significativo sobre todas as respostas estudadas (toxicidade, esporos totais e taxa de esporulação) ao nível de 95% de confiança. O cloreto de cálcio (X_1), nas concentrações estudadas, não influenciou significantemente nenhuma das respostas analisadas, diferente do que ocorreu quando estudou-se concentrações de 0 a 0,24 g/L, em que X_1 exerceu efeito significativo sobre a toxicidade do meio fermentado (Figura 5.18).

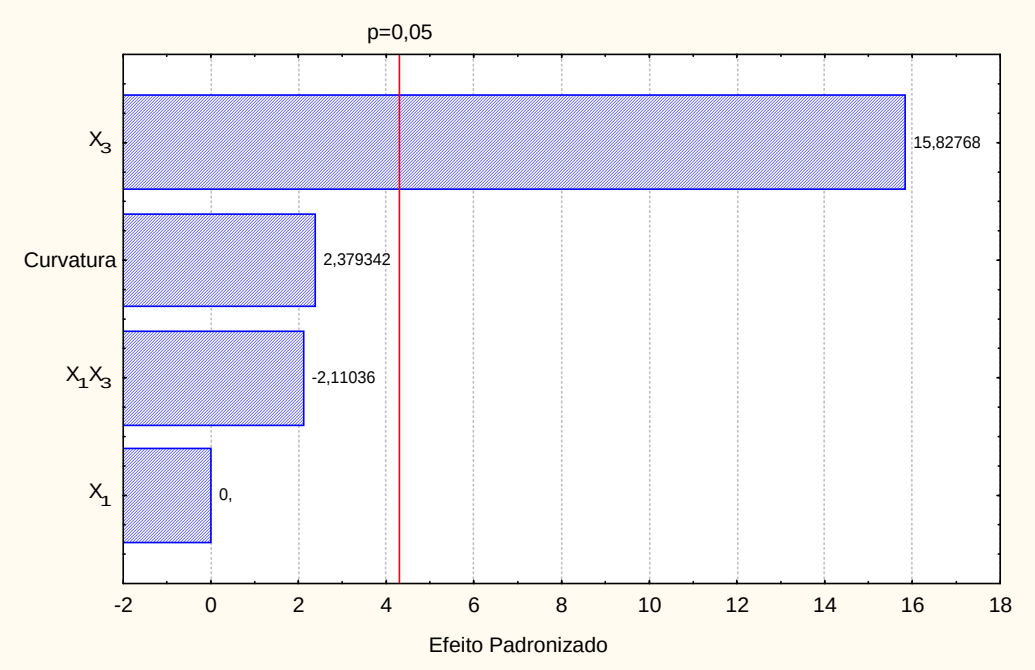

Figura 5.31 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos com 95% de confiança sobre a resposta esporos totais. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura.

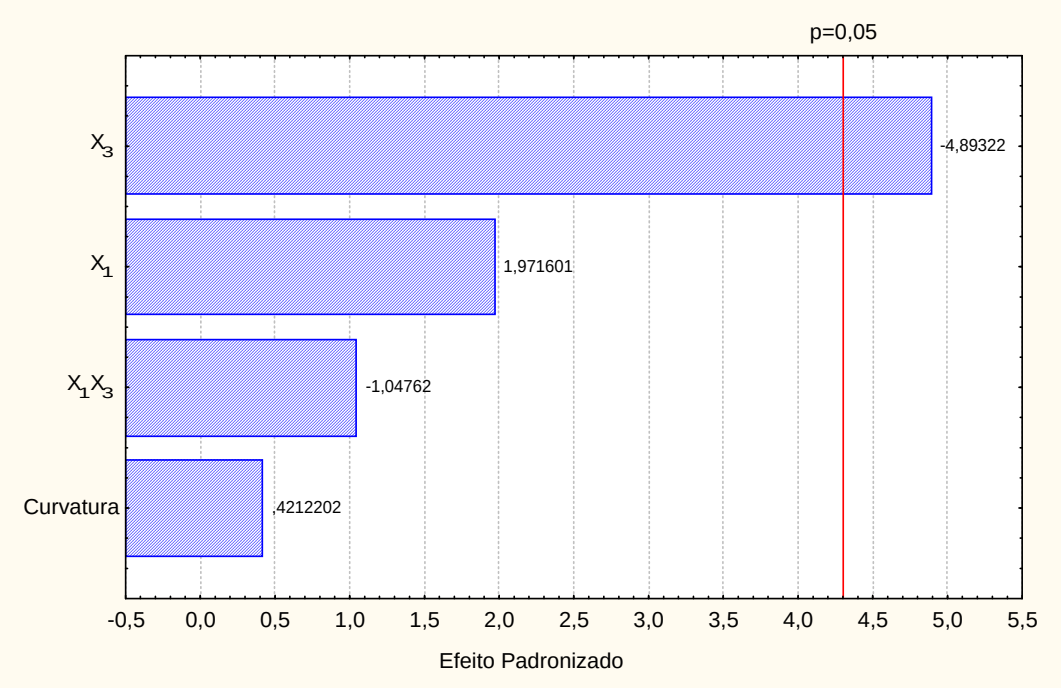

Figura 5.32 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos com 95% de confiança sobre a resposta taxa de esporulação. X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura.

O sinal negativo do efeito de X_3 (-8,78) indica que o aumento da concentração de extrato de levedura de 10 para 20 g/L prejudica a formação de toxinas pela bactéria (Figura 5.30). Este aumento da concentração de extrato de levedura também prejudica a taxa de esporulação (Figura 5.32), mas favorece a produção de esporos (Figura 5.31). As Tabelas 5.17 a 5.19 apresentam a análise de variância dos efeitos.

Tabela 5.17 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta toxicidade, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	2093,006	1	2093,006	374,8667	0,002657*
X_3	430,563	1	430,563	77,1157	0,012721*
X_1	45,562	1	45,562	8,1604	0,103809
X_1X_3	4,202	1	4,202	0,7527	0,477088
Erro	11,167	2	5,583		
SQ total	2584,500	6			

R^2 = 0,996 - X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura; GL – grau de liberdade. * significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.18 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	0,018305	1	0,018305	5,6613	0,140380
X_3	0,810000	1	0,810000	250,5155	0,003968*
X_1	0,000000	1	0,000000	0,0000	1,000000
X_1X_3	0,014400	1	0,014400	4,4536	0,169280
Erro	0,006467	2	0,003233		
SQ total	0,849171	6			

R^2 = 0,992 - X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura; GL – grau de liberdade. * significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.19 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta taxa de esporulação, obtida com ensaios do planejamento fatorial 2^2.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
Curvatura	0,41905	1	0,41905	0,17743	0,714545
X_3	56,55040	1	56,55040	23,60167	0,039854*
X_1	9,18090	1	9,18090	3,83171	0,189415
X_1X_3	2,59210	1	2,59210	1,08183	0,407518
Erro	4,79207	2	2,39603		
SQ total	73,57309	6			

R^2 = 0,94 - X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura; GL – grau de liberdade. * significativo ao nível de 95% de confiança.

Constata-se que neste caso a curvatura é significativa somente para a resposta toxicidade, ao nível de 95% de confiança. O possível ajuste de um modelo linear aos dados experimentais será analisado a seguir. Observa-se pela Tabela 5.20 que o modelo linear não é significativo ao nível de 95% de confiança, portanto, segundo critérios para validação de Moldavsky e Cohen (1996), este não é válido para representar o comportamento da variável resposta toxicidade em função dos fatores estudados. Neste caso, os dados se ajustariam mais adequadamente a um modelo quadrático. Para se determinar os parâmetros deste modelo é necessário a ampliação do planejamento 2^2, o que poderia ser feito com a realização de mais quatro ensaios, utilizando um planejamento com face centrada (MONTGOMERY, 1991; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Constata-se pela Tabela 5.21 que o modelo linear é significativo ao nível de 99% de confiança, não há indícios de falta de ajuste e o valor de R^2 é maior que 0,9. Assim, o modelo linear pode ser utilizado para representar o comportamento da variável resposta esporos totais em função dos fatores estudados, na nova região analisada. O ajuste de um modelo linear aos dados experimentais de taxa de

esporulação também é possível, uma vez que este modelo é significativo ao nível de 99% de confiança e não há indícios de falta de ajuste (Tabela 5.22).

Tabela 5.20 - Análise de variância da regressão que representa a resposta toxicidade, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 .

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	480,33	3	160,11	0,23	0,8718	0,18
Curvatura	2093,006	1	2093,006	374,867	0,0027*	-
Falta de ajuste	2093,01	1	2093,1	374,87	0,0027*	-

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.21 - Análise de variância da regressão que representa a resposta esporos totais, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 .

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	0,82	3	0,27	33,28	0,0084*	0,97
Curvatura	0,018305	1	0,018305	5,6613	0,1403	-
Falta de ajuste	0,018	1	0,018	5,66	0,1404	-

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.22 - Análise de variância da regressão que representa a resposta taxa de esporulação, obtida nos ensaios do planejamento 2^2 .

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p	R^2
Modelo linear	68,32	3	22,77	13,32	0,0307*	0,93
Curvatura	0,41905	1	0,41905	0,17743	0,7145	-
Falta de ajuste	0,75	1	0,75	0,59	0,5225	-

* significativo a 95% de confiança.

Foi realizada uma nova análise de variância dos efeitos principais e de interações sobre as respostas produção de esporos e taxa de esporulação, desconsiderando a curvatura. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5.23 e 5.24. Observa-se que, desconsiderando a curvatura, o extrato de levedura (X_3) manteve-se como o único fator significativo sobre as respostas.

Tabela 5.23 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, desconsiderando curvatura.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
X_3	0,810000	1	0,810000	98,09689	0,002189*
X_1	0,000000	1	0,000000	0,00000	1,000000
X_1X_3	0,014400	1	0,014400	1,74394	0,278346
Erro	0,024771	3	0,008257		
SQ total	0,849171	6			

R^2 = 0,97 - X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura; GL – grau de liberdade;

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.24 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta esporos totais, desconsiderando curvatura.

Fonte	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	Nível de significância (p)
X_3	56,55040	1	56,55040	32,98879	0,010482*
X_1	9,18090	1	9,18090	5,35570	0,103628
X_1X_3	2,59210	1	2,59210	1,51211	0,306461
Erro	5,14269	3	1,71423		
SQ total	73,46609	6			

R^2 = 0,93 - X_1 – cloreto de cálcio e X_3 – extrato de levedura; GL – grau de liberdade;

* significativo ao nível de 95% de confiança.

Portanto, os modelos matemáticos obtidos para estimar a quantidade de esporos produzidas pela bactéria e a taxa de esporulação em função dos fatores estudados, para a nova região investigada, são descritos pelas equações 2 e 3.

$Y_1 = 3,432 + 0,450\ X_3$ **(equação 2)**

$Y_2 = 94,131 - 3,760\ X_3 + 1,515\ X_1 - 0,805\ X_1X_3$ **(equação 3)**

Onde Y_1 e Y_2 correspondem às respostas esporos totais (ET/mL x 10^9) e taxa de esporulação (T_{esp}), respectivamente.

A equação 2 pode ser simplificada sem prejudicar a capacidade de predição do modelo, uma vez que a retirada dos parâmetros X_1 e X_1X_2 (inerentes a efeitos não significativos na resposta) leva a uma pequena redução do valor de R^2 (de 0,97 para 0,95). No entanto, em relação à equação 3, a retirada de tais parâmetros não significativos leva a uma redução do valor de R^2 de 0,93 para 0,77, o que tornaria o modelo inválido, portanto, este foi mantido com todos os termos para que sua capacidade de predição não fosse prejudicada.

As superfícies de resposta obtidas (Figuras 5.33 e 5.34) são referentes a um plano e apresentam os valores preditos pelas equações 2 e 3. Observa-se que o aumento da concentração de extrato de levedura favoreceu a produção de esporos (Figura 5.33) mas prejudicou a taxa de esporulação (Figura 5.34). Quanto maior a quantidade de células vegetativas produzidas em relação às esporuladas, menor a taxa de esporulação, assim, o aumento da concentração de extrato de levedura nos meios de fermentação prejudicou a taxa de esporulação. Pessanha (2008) estudou o efeito de extrato de levedura, sulfato de amônio e caldo de cana-de-açúcar no meio de fermentação para a produção de esporos por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Extrato de levedura prejudicou ambas as repostas, produção de esporos e taxa de esporulação, diferente do que ocorreu no presente trabalho.

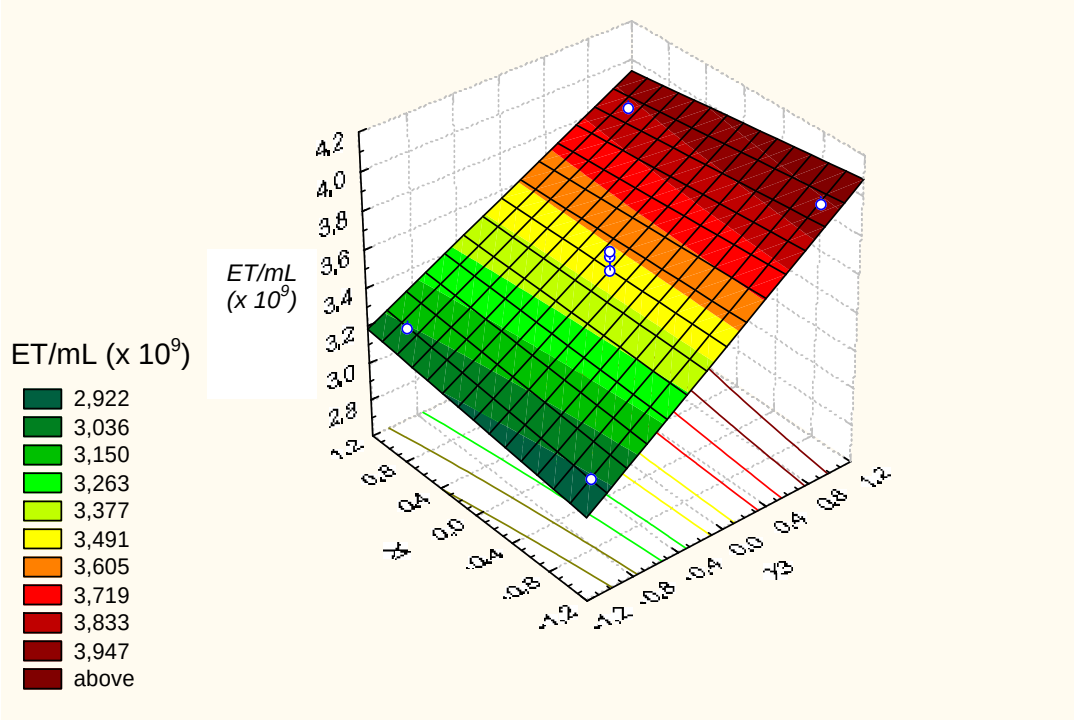

Figura 5.33 - Superfície de resposta para a produção de esporos por *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas $CaCl_2$ (X_1) e extrato de levedura (X_3).

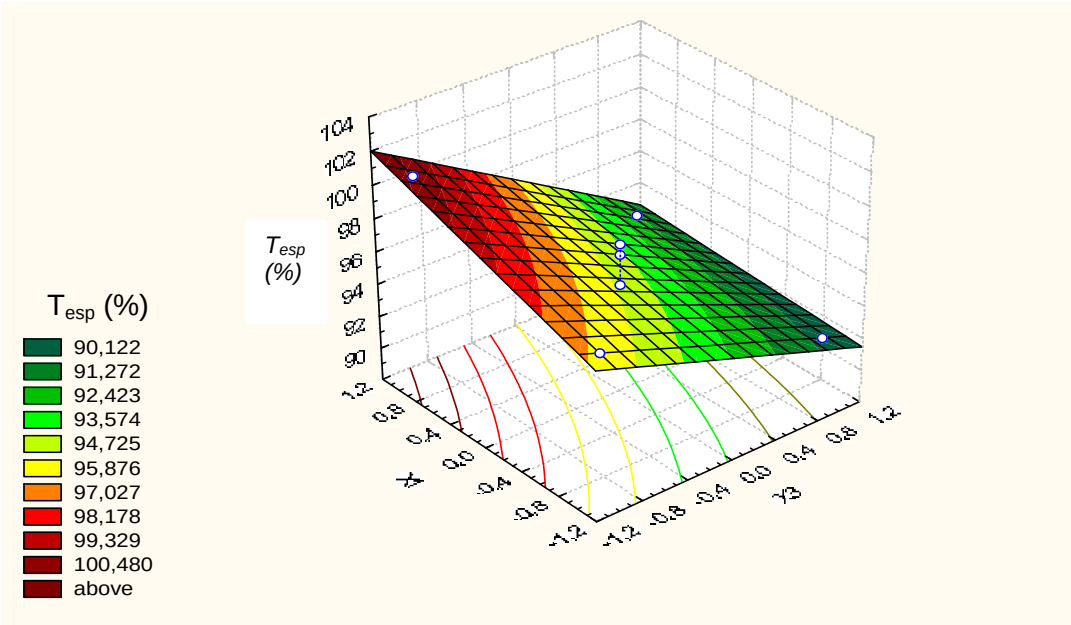

Figura 5.34 - Superfície de resposta para a taxa de esporulação obtida em fermentações com *B. thuringiensis* var. *israelensis* em função das variáveis codificadas $CaCl_2$ (X_1) e extrato de levedura (X_3).

6 CONCLUSÕES

- A glicerina proveniente da fabricação do biodiesel é um substrato adequado para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*, desde que submetida a um tratamento adequado;
- O tratamento adequado para viabilizar o emprego da glicerina proveniente da fabricação de biodiesel a partir de sebo bovino para a produção de bioinseticida consiste de decantação, acidificação até pH 7,0 e aquecimento a 70 ^{o}C;
- A glicerina proveniente do processamento do biodiesel a partir de sebo bovino (a 10 g/L de glicerol) não contém fonte de nitrogênio suficiente para permitir o crescimento da bactéria, necessitando de suplementação com extrato de levedura;
- A bactéria não é capaz de crescer em meio contendo glicerina na concentração de 30 g/L de glicerol, devido à inibição por componentes presentes no resíduo, os quais não foram removidos pelo tratamento estabelecido;
- Com o emprego do glicerol como substrato em fermentações com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* não há relação direta entre formação de esporos e produção de toxinas pela bactéria ;
- O sulfato de amônio, na concentração de 6 g/L, embora favoreça a esporulação da bactéria, não influencia a síntese de toxinas, não tendo necessidade, portanto, de adicioná-lo ao meio;
- A presença de cloreto de cálcio no meio de fermentação favorece a síntese de toxinas na concentração de 0,24 g/L, mas em concentrações acima deste valor não influencia este parâmetro;
- A relação carbono:nitrogênio influencia acentuadamente a produção de endotoxinas por *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo que a relação mais adequada para a fonte de carbono estudada é de 2,6:1;

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar fontes de nitrogênio alternativas no meio de fermentação contendo o glicerol;

- Estudar a influência da concentração de O_2 dissolvido no meio de fermentação sobre a produção de toxinas pela bactéria, com ensaios em biorreator;

- Avaliar o efeito da concentração de ácido acético no meio sobre a produção de toxinas e esporulação;

- Otimizar as condições de processo, incluindo a análise dos íons essenciais no meio de fermentação para a produção eficaz do bioinseticida;

- Formular o bioinseticida e realizar bioensaios em campo.

REFERÊNCIAS

ABDELL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – III. Selection of media for delta–endotoxin production. **World Journal Microbiology and Biotechnology,** v.6, p.313-317, 1990.

ABDELL-HAMEED, A. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensisis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modeling and scaling-up studies. **World Journal Microbiology and Biotechnology,** v.17, p.857-861, 2001.

ANDERSON, T.B. **Effects of carbon:nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein**. 1990, 123p. Dissertação (Mestrado) - University of Western Ontario, Canadá, 1990.

ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* for biopesticide production. **Chemical and Biochemestry Engineering Quarterly,** v.17, n.3, p.225-231, 2003.

APPLEBY, D.B. Glicerol. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Blucher, 2006. p. 295-300.

ANDREWS, R. E. Jr.; KANDA, K.; BULLA Jr., L.A. In vitro translation of the entomocidal toxin of *B. thuringiensis*, In: GANESAN, A. T.; CHANG, S.; HOCH, J. A. **Molecular cloning and gene regulation in bacilli**. New York: Academic Press, 1982. p.121–130.

ARCAS, J.; YANTORNO, G.; ERTOLA, R. Effect of High Concentration of Nutrients on *Bacillus thuringiensis* Cultures*.* **Biotechnology Letters**, v.9, n.2, p.105-110, 1987.

ARONSON, A.I; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **Microbiology Letters**, v.195, n.1, p.1-8, 2001.

ASSIS, M.R.M. **Desde 1º/01/2008 o Biodiesel é obrigatório.** Disponível em: <http://www.procon.go.gov.br/procon/imp.php?textoId=001047>. Acesso em 10 de junho 2008.

AVIGNONE-ROSSA, C.; MIGNONE, C. Delta-endotoxin Activity and Spore Production in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters,** v.15, n.3, p.295-300, 1993.

ÁVILA FILHO, S. **Usineiros de Biodiesel podem parar a produção: Glicerina, oportunidade ou problema?** Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/colunistas/avila/usineiros-biodiesel-parar-producao-glicerina-oportunidade-problema-31-05-07.htm>. Acesso em 10 de junho 2008.

BALABAN, N.P.; GABDRAKHMANOVA, L.A.; SHARIPOVA, M.R.; MARDANOVA, A.M.; SOKOLOVA, E.A.; RUDENSKAYA, G.N. Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation. **Medical Science Monitor**, v.8, n.5, p.68–71, 2002.

BALABAN, N.P.; SHARIPOVA, M.R.; GABDRAKHMANOVA, L.A.; MARDANOVA, A.M.; TOKMAKOVA, Y.S.; SOKOLOVA, E.A. Synthesis and secretion of proteinases by *Bacillus intermedius* in the late stages of sporulation. **Microbiology,** v.72, p.295–299, 2003.

BAUER, R.; KATSIKIS, N.; VARGA, S.; HEKMAT, D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, p.37-43, 2005.

BATISTA , F. **Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel**. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm>. Acesso em 10 de junho 2008.

BENOIT, T.G.; WILSON, G.R.; BAUGH, C.L. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p.15-18, 1990.

BERBERT-MOLINA, M. A.; PRATA; A.M.R.; PESSANHA, L.G.; SILVEIRA, M.M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.1397-1404, 2008.

BERNHARD, 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.** New York: Jonh Wiley, 1993. p.255-267.

BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B; HILLION, G.; CHODORGE, J.A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, p. 190-192, v.106, 2005.

BRISSON, D.; VOHL, M-C.; ST-PIERRE, J; HUDSON, T.J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?. **BioEssays**, v.23, p.534-542, 2001.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Endospore Forming Gram-Positive Rods em Cocci. In: Biology of Microorganisms, 8th ed., New Jersey, 1994. p.722.

BRONNER, F; FREUND, T.S. Calcium transport em *Bacillus megaterium*. **Israel Journal of Medical Science**, v.7, p.1224-1229, 1972.

BROOKE, B.D.; HUNT, R.H.; COETZEE, M. Resistance to dieldrin+ fipronil assorts with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p.190–194, 2000.

BROWN, M.D., WATSON, T.M., GREEN, S., GREENWOOD, J.G., PURDIE, D.& KAY, B.H. Toxicity of insecticides for control of freshwater *Culex annulirostris* (Diptera: Culicidae) to the non-target shrimp *Cardina indistincta* (Decapoda: Atyidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p.667–672, 2000.

BULLA JR., L.A.; FAUST, R.M.; ANDREWS, R.; GOODMAN, N. Insecticidal *bacilli*. In: D. A. DUBNAU. **The molecular biology of the *bacilli***, New York: Academic Press, v.2, 1985. p.185-209.

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.D. Produção de Inseticida Biológico com *Bacillus thuringiensis*. **EMBRAPA - CNPDA. Boletim de Pesquisa**, n.1, 1987.

ÇELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for Fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris.* **Industrial Engineering Chemistry Research**, v.47, p. 2985-2990, 2008.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahesaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.

CHILCOTT, C. N.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J.; DROBNIEWSKI, F. A. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body.** In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies, London: Unwin Hyman Ltd, 1990. p. 45-65.

COOPER D. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. **Agriculture, Ecosystems and Environmental,** v.49, p.21-26, 1994.

COUCH, T.L.; ROSS, D.A. Production end utilization of *Bacillus thuringiensis.* **Biotechnology and Bioengineering,** v.22, p.1297-1304, 1980.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LAMBERT, B.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, n.3,v.62, p.807-813, 1998.

CROSBY, W.H.; GREENE, R.A.; SLEPECKY, R.A. The relationship of metal content to dormancy, germination and sporulation in *Bacillus megaterium*. **Spore Research**, p.143-169, 1971.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 28, p.225-231, 2005.

DE BARJAC. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Simulium damnosum* (DIPTERA: SIMULIIDAE) larvae. **Mosquito News,** v.39, n.4, 1978.

DEMAIN, A.L. Catabolite regulation in industrial microbiology. In: KRUMPHANAL, V.; SIKYTA, B.; VANEK, Z. **Overproduction of Microbial Products**, London: Academic Press, 1995. p. 2–30.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiology Reviews**, v.44, p.385-418, 1980.

DULMAGE, H.T. Production of endotoxin by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media**. Journal of Invertebrate Pathology,** v.16, p.385-389, 1970.

EISENSTADT, E; SILVER, S. Calcium transport during sporulation in *Bacillus subtilis*. **American Society of Microbiology**, p.180-186, 1972.

FARRERA, R. R.; PÉREZ-GUEVARA, F.; TORRE, M. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Applied Microbiology and Biotecnhology,** v. 49, p.758-765, 1998.

FREITAS, S.M.; NACHILUK, K. Desempenho da Produção Brasileira de Biodiesel em 2008. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v.4, n.2, 2009.

FURUSAWA, H.; KOYAMA, N. Effect of fatty acids on the membrane potential of an alkaliphilic *Bacillus*. **Currency in Microbiology**, v. 48, p.196–198 2004.

GHRIBI, D.; ZOUARI, N.; TRABELSI, H.; JAOUA, S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 614-622, 2007.

GILL, S. S.; COWLES, E. A., PIENTRANTONIO, P. V. The mode of action of endotoxins. **Annual Review of Entomology,** v.37, p.615-636, 1992.

GLARE, T.R.; O' CALLAGHAN, N.M. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health, Grasslands**, New Zealand: Division, AgResearch, Lincoln, 1998. p.58.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H., Microbial Biotechnology. In: Fundamentals of Applied Microbiology, 3rd ed, New York: W.H. Freeman, 1995. p.45-56.

GONZÁLEZ, J.M.; CARLTON, B.C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid,** v.11, p. 28-38, 1984.

GRAUSLUND, M.; LOPES, J.M.; RONNOW, B. Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in Saccharomyces cerevisae, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.4391-4398., 1999.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas auruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresearch Technology** v.65, p.73-82, 1998.

HAZELL, S.L.; GRAHAM, D.Y. Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p.1060–1061, 1990.

HIMMI, E.H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology,** v. 2, p.123-128, 1999.

HIRAI, T.; IKENAGA, N.O.; MIYAKE, T.; SUZUKI, T. Production of hydrogen by steam reforming of glycerin on ruthenium catalyst. **Energy and Fuels,** v.9, p.1761-1762, 2005.

HÖFTE, H.K.; WHITELEY, H.R. Isecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis.* **Microbiology Review**, v.53, p.242-245, 1989.

HOLMBERG, A.; SIEVANEN, R.; CALBERG, G. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p.1707-1724, 1980.

HUBER, G.W.; SHABAKER, J.W.; DUMESIC, J.A.. Raney Ni-Sn catalyst for H_2 production from biomass-derived hydrocarbons. **Science**, v. 300, p.2075-2077, 2003.

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

IMANDI, S.B.; BANDARU, V.V.R.; SOMALANKA, S.R.; GARAPATI, H.R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 , p.1367–1372, 2007.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, p.260–265, 2005.

KARALLIEDDE, L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. **Anaesthesia,** v.54, p.1073–1088, 1999.

KIMURA, H. Oxidation assisted new reaction of glycerol. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 12, p.697-710, 2001.

KNAPP, H.R.; MELLY, H.A. Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Infect Disease**, v. 154, p.84–94, 1986.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V. Produção de Biodiesel. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 29-54.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ-endotoxins. **Advances in Insect Physiology,** v.24, n.27, p.308, 1994.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of

polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules,** v. 6, p. 561-565, 2005.

KOZIEL, M.G.; CAROZZI, N.B.; CURRIER, T.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.V. The insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis: past, present and future uses. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v.11, p. 171-228, 1993.

KROEGER, A.; HORSTICK, O.; RIEDL, C.; KAISER, A.; BECKER, N. The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. **Acta Tropica**, v.60, p.47-57, 1995.

LACEY, L. A.; KAYA, R. H. K.; VAIL, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biological Control,** v.21, p.230–248, 2001.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of Bacillus thuringiensis. **Bioscience**. v.42, n.2, p.112-122, 1992.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N . Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of Anaerobiospirillum succiniciproducens using glycerol as a carbon. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 41-48, 2001.

LEHNINGER, A.L. Tradução: A Biossíntese de Proteínas. In: **Bioquímica: Replicação, Transcrição e Tradução da Informação Genética.** São Paulo: Edgard Blucher, 1977. v.4, p.651-661.

LIU, W. M.; BAJPAI, R.K. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Program,** v.11, p.589-591, 1995.

LIU, W. M.; BAJPAI, R.K.; BIHARI, V. High-density cultivation of sporeformers . **Annual N. Y. Academic Science,** v.721, n.1, p.310-325, 1994.

LIU, B.L.;TZENG, Y.M. Optimization of growth medium for the production of spores from Bacillus thuringiensis using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**, v.18, p. 413-418, 1998.

LOUREIRO, G.G. **Efeito dos sais de fosfato de potássio, monobásico (KH_2PO_4) e bibásico (K_2HPO_4), sobre a produção de biomassa e esporulação de *Bacillus thuringinesis* var. i*sraelensis***. 2004. 81p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2004.

LÜTHY, P.; CORIER, J.; FISCHER, H. *Bacillus thuringiensis* as a Bacterial Insecticide: Basic Considerations and Application, In: KURSTAK, E. **Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 35-74.

MAA, F.; HANNA, A.F. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v.70, p. 1-15, 1999.

MALDONADO-BLANCO, M.G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALAN-WONG, L.J. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis s*ubsp *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v.55, n.8, p.671-674, 2003.

MARCHETTI, J.M; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. **Fuel processing technology**, v. 89, p. 740-748, 2008.

MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. Worldwide and distribution of Bacillus thuringiensis isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.92, n.3, p. 2437-2442, 1989.

MIGNONE, C.F.; AVIGNONE-ROSSA, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis.* **Applied Microbiology and Biotecnhology,** v.46, p.78-84, 1996.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis.* **Agriculture, Ecosystems and Environmental,** v.49, p. 9-13, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/. Acesso em 20 de março de 2007.

MISCH, D.W.; BURNSIDE, D.F; CECIL, T.L. A Novel Bioassay System for Evaluating the Toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* against Mosquito Larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p.286-289, 1992.

MME (Ministério de Minas e Energia), 2004. Disponível em: http://www.mme.gov.br/programs_display.do?prg=8. Acesso em 15 de out. 2008.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. In: MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. **Microbial physiology**, New York: Wiley-Liss, 2002. p.363.

MOLDAVSKY, N.; COHEN, S. Determinants of liposome portioning in aqueous two-phase systems: evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p. 529-537, 1996.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed. New York: Wiley, 1991. p.648.

MORAES, O.I.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M. Produção de Bioinseticidas. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, p.253-254.

MORRIS, O.N.; CONVERSE, V.; KANAGARATNAM, P.; DAVIES, J.S. Effect of Cultural Conditions on Spore–Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133). **Journal of invertebrate pathology**, v.67, p.129–136,1996.

MORRISON, L.R. Glycerol. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**, New York: Wiley, 1994. v.11, p. 921-932.

MU, Y.; TENG, T.; ZHANG, D.; WANG, W.; XIU, Z. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1755–1759, 2006.

MYERS, P.S.; YOUSTEN, A.A. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. **Aplied Environmental Microbiolology**, v.39, p.1205-1209, 1980**.**

NAE (Núcleos de Assuntos Estratégicos da Presidência da República). Glicerol: mercados e perspectivas. In: **Biocombustíveis**, 2005, p.105-106.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Production_Graph_Slide.pdf>. Acesso em 13 out. de 2008.

NICKERSON, K.W., JULIAN G., BULLA Jr., L.A. Physiology of Spore-forming Bacteria Associated with Insects: Radiorespirometric Survey of Carbohydrate Metabolism in the 12 Serotypes of *Bacillus thuringiensis.* **Applied Microbiology,** v.28, n.1, p.129-132, 1974.

O AEDES. O *AEDES AEGYPTI*. Disponível em: <http://www.comartes.net/saude/dengue.html>. Acesso em 05 jul. de 2008.

OS MERCADOS DA GLICERINA. Disponível em: <http://www.revistabiodiesel.com.br/por-dentro-do-biodiesel/16.html>. Acesso em 04 abr. de 2009.

ÖZKAN, M.; DILEK, F.B.; YETIS, U.; ÖZCENGIZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**, v. 154, p.49–53, 2003.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities**.** In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING. 2006. Portland, Oregon. p. 9 – 12.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA. L.; CHEVALOT, I., AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol*.* **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p. 737-744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.5, p*.* 542-547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, G. M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p.60–71, 2008.

PEROSA, A.; TUNDO, P. Selective hydrogenolysis of glycerol with raney nickel. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, p.8535-8537, 2005.

PESSANHA, L.G. **Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação do caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis israelensis*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

PETRY, F.; LOZOVEI, A. L.; FERRAZ, M. E.; NETO, L. G. S. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos ertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia,** v.48 n.1, p.127-132, 2004.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda***. 2004. 144p. Tese (Doutorado em

Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R.A. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas – Do uso convencional em pulverização à Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** – n. 31- julho/dezembro, 2003.

POOPATHI, S.; KUMAR, A.; KABILAN, L.; SEKAR, V. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechonology,** v.18, p.219-216, 2002.

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K. Development of a cost-efective medium for large scale production of *B. thuringiensis* var *israelensis.* **Biologic Control**, v. 36, p.288–292, 2006.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Application of different downstream processing methods and their comparison for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after fermentation for mosquito control. **Biologicals,** p.1-4, 2008a.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ-endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechonology,** v. 35, p.961–965, 2008b.

PRAMANICK, D.; RAY, T.T. Synthesis and biodegradation of co-polyesters from citric acid and glycerol. **Polymer Bulletin**, v. 19, p.365-370, 1988.

PRAMATHA, R.B. Hyper-production of insecticidal crystal protein (δ-endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is not related to sporulation-specific biochemical functions. **Currency in Microbiology**, v.41, p.187–191, 2000.

REHMAN, A.; WIJESEKARA, R.G.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology***,* 2008.

RICHEY, D. P.; LIN, E.C.C. Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.112, p.784-790, 1972.

RIVALDI, J.D.C. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos**. 2008.

125p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. In: **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. p.325.

ROGOFF, M.; YOUSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Annual Review of Microbiology,** v.23, p.257-386, 1969.

RUAS NETO, A.L.; OLIVEIRA, C.M. Biological control of culicidae and simuliidae: bacterial insecticides. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais,** v.37, p.61-75, 1985.

SACHIDANANDHAM, R.; JENNY, K.; FIECHTER, A. Stabilization and increased production of insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae* in stead- and transient-state continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v.47, n.12-17, 1997.

SAHEB, S. A. Permeation du glycerol et sporulation chez *Bacillus subtilis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.18, p.1307-1313, 1972.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M. ; VERDUYN, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v.17, p.307-316, 2001.

SANNO, Y.; WILSON, T.H.; LIN, E.C.C. Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. **Biochemistry and Biophysics,** v. 32, p.344-349, 1968.

SCHNEPF, H.E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775–806, 1998.

SEM, R.; SWAMINATHAN, T.S. Application of Response Surface Methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.358-363, 1997.

SIKDAR, D.P.; MAJUMBAR, M.K.; MAJUMDAR, S.K. Effect of Minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Biotechnology Letters,** v.13, n.7, p.511-517, 1991.

STAHLY, P.; ANDREWS, R.E.; YOUSTEN, A.A. The genus *Bacillus* – Insect Pathogens. In: **The Prokaryotes,** 2rd, 1990.

STUMBE, J.F.; BRUCHMANN, B. Hyperbranched polyesters based on adipic acid and glycerol. **Macromolecular Rapid Communications,** v. 25, p.921-924, 2004.

TAHERZADEH, M.J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol – a review. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 53-66, 2002.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLS, 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.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.3, p.867-871, 2002.

THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p.261-265, 2006.

TSAY, S. S.; BROWN, K.K.; GAUDY, E.T. Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 108, p. 82-88, 1971.

TSURUTA, T.; ISHIMOTO, Y.; MASUOKA, T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 858, p. 217-226, 1998.

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis.* In: ENTWISTLE, P.F., CORY, J.S., BAILEY, M.J., HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis,* an Enviromental Biopesticide: Theory and Practice.** John Wiley & Sons Ltd., New York, 1993, p.1-23.

VIDYARTHI, A.S.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. **Water Research.,** v. 36, n.19, p. 4850-4860, 2002.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 201-223, 2001.

WOOD, A. 2002. Novel reforming process converts biomass molecules to hydrogen. **Chemical Week**, v. 34, p. 30, 2002.

XIAOYAN, L.; Yi, L.; PENG, L.; JUNCHENG, Z.; LIN, L.; SONGSHENG, Q.; ZINIU, Y. Microcalorimetric study of *Bacillus thuringiensis* growth with different plasmid numbers and various promoters. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, p. 649–652, 2005.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, Y-Q.; ZHANG, D-J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumonia* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42-45, 2007.

XIU, Z.L.; SONG, B.H.; WANG, Z.T.; SUN, L.H.; FENG, E.M e ZENG, A.P.. Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.3, p. 189-197, 2008.

YANG, X.M.; WANG, S.S. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, p.71–76, 2000.

YANG, X.M., WANG, S.S. Development of *B. thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. **Applied Biochemistry,** v.28, p.95-98, 1998.

YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.,; QU, S.S.; YU, Z.N. A microcalorimetric study of the biologic effect of Mn(II) on *Bacillus thuringiensis* growth. **Journal of Thernal Analyis and Calorimetry**, v.70, p.415-421, 2002.

YAO, J.; LIU, Y.; TUO, Y.; LIU, J.B.; CHEN, X.; ZHOU, Q.; DONG, J.X.; QU, S.S; YU, Z.N. Action of Cu^{2+} on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** v. 39, n.6, p. 576-580, 2003.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels. **Current Opinion in Microbiotechnology**, v.18, p. 213-219, 2007.

YEAST EXTRACT. Disponível em: <http://www.eurasyp.org/public.levure.extrait.screen>. Acesso em 13 out. de 2008

YEZZA, A.; TYAGI, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. Influence of pH control agents on entomotoxicity potency of *B. thuringiensis* using different raw materials. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1549–1558, 2005.

ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 32, p. 93-99, 2006.

ZOUARI, N.; ACHOUR, O.;JAOUA, S. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kustaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm^3 fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 877-882, 2002.

ZOUARI, N.; ALI, S.B.S; JAOUA, S. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 411–418, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Curvas padrão

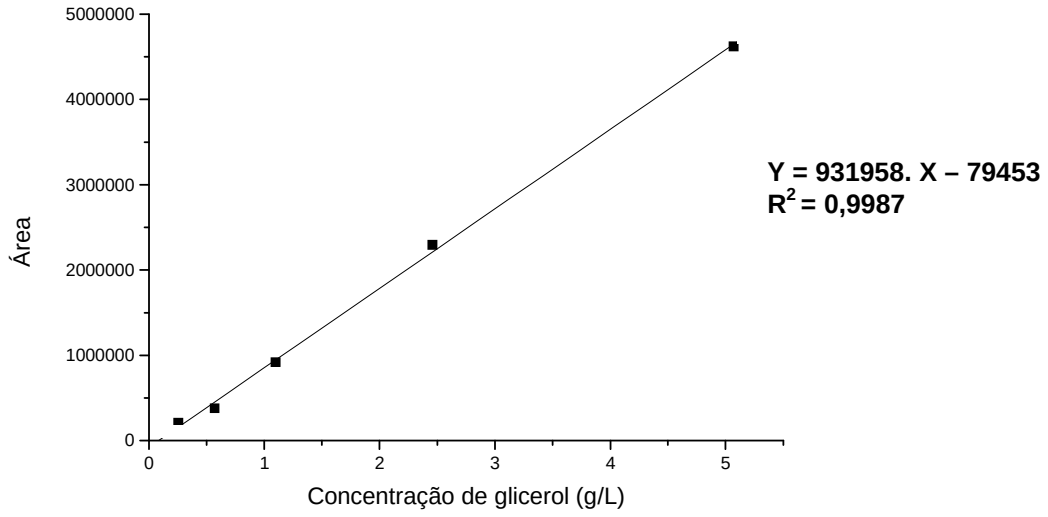

Figura A1. Curva-padrão que relaciona área dos picos com a concentração de glicerol.

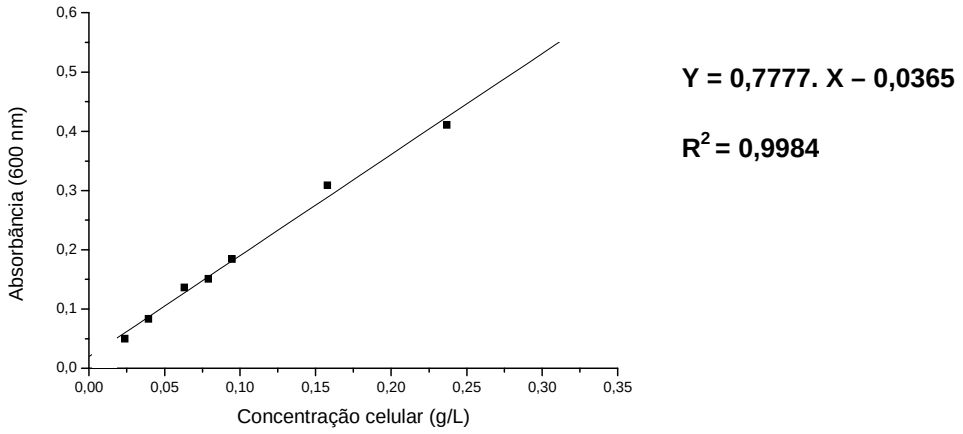

Figura A2. Curva-padrão que relaciona absorbância com concentração de células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

APÊNDICE B – Atividades tóxicas obtidas no bioensaio preliminar.

Tabela B1 – Bioensaio Preliminar - Porcentagens de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas à suspensão esporo-cristal em diferentes concentrações, obtidas nos diferentes ensaios.

Concentração* (mg/L)	Porcentagem de mortalidade das larvas (%)							
	3	7	11	15	17	18	19	20
100	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	20	0	20	20	20	20
500	20	20	60	0	40	20	40	40
700	40	20	60	20	40	40	60	40
900	60	40	80	40	80	60	80	80
1000	80	40	100	40	100	100	80	100
1200	100	60	100	60	100	100	100	100
1400	100	80	100	80	100	100	100	100
1500	100	100	100	100	100	100	100	100

*Concentração do complexo esporo-cristal empregada no bioensaio preliminar