UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ADRIANA ANDRÉIA ROSSI

**Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* a partir
de resíduo da fabricação de biodiesel**

Lorena-SP
2012

ADRIANA ANDRÉIA ROSSI

**Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* a partir
de resíduo da fabricação de biodiesel**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena
da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial na área de
conversão de biomassa.

Orientador : Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP
Maio, 2012

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.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Rossi, Adriana Andréia

Obtenção de bioinseticida *de Bacillus thuringiensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel / Adriana Andréia Rossi –ed. Reimpr., corr. – 2012.

164p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial . Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2012.
Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata.

1. Biodiesel 2. Glicerol 3. *Bacillus thuringiensis*
4. Bioinseticida 5. *Aedes aegypti* I. Título.

CDU 661.164.2

*Dedico esta tese ao meu pai (in memoriam), pelo carinho, amor,
confiança e apoio incondicional e eterno.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me iluminado e me dado saúde para a realização deste trabalho.

À todos os membros responsáveis pelo programa de Pós-Graduação que contribuem para o ensino de excelência aos pós graduandos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, que além de um excelente orientador foi e sempre será um grande amigo.

À Prof. Dra Marília Berbert-Molina, pela contribuição científica e ao Prof. Dr. Aldo Tonso pelo apoio para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Marta H. Reis Chagas e Cláudia Rodrigues Barbosa pelo apoio e companherismo em todas as horas.

Aos alunos de iniciação científica Osman Ribas e Diego Tessaro por toda a ajuda e dedicação. Espero ter compartilhado meus conhecimentos e desta forma ter contribuído para o amadurecimento científico destes dois alunos dedicados.

Ao Mário Ballarin por todo amor, apoio, carinho, amizade e companherismo. Não tenho palavras para agradecer toda sua dedicação ao meu lado.

Enfim, à minha amada mãe por toda a paciência e dedicação de uma excelente mãe e ao melhor pai do mundo, que acompanhou de perto, me dando força e confiança, 4 anos e 8 meses deste trabalho. Tenho certeza de que, onde estiver, estará olhando por mim, pois você sempre estará dentro de meu coração.

À todos que mencionei, sintam-se também autores de parte deste trabalho, pois todos contribuíram de forma positiva para a realização desta tese.

RESUMO

ROSSI, A. A. **Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel**. 2012. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2012.

A crescente demanda por combustíveis provenientes de fontes renováveis, em função de questões ambientais e possível escassez dos derivados de petróleo, juntamente com a obrigatoriedade de sua adição no óleo diesel empregado atualmente, levou a uma “explosão” do número de empresas que produzem biodiesel. Este produto é obtido pela transesterificação de gorduras animais e óleos vegetais na presença de catalisador, processo que resulta um único sub-produto, a glicerina, a qual teve um aumento de produção na medida do aumento de produção do biodiesel. Uma forma de contribuir para diminuir os problemas advindos do acúmulo da glicerina é utilizá-la como base para formular meios de fermentação e obter produtos de interesse sócio-econômico. Um exemplo é o bioinseticida produzido pela bactéria *Bacillus thuringiensis* para o controle do mosquito transmissor do vírus da dengue. Este produto apresenta várias vantagens quando comparado aos inseticidas químicos, pois impede que os insetos adquiram resistência, não polui e é seletivo, não oferecendo riscos de intoxicação para os insetos benéficos e animais vertebrados. Cabe salientar que as toxinas produzidas por esta bactéria são letais também para larvas dos mosquitos transmissores da malária e da elefantíase. Assim, no presente trabalho propõe-se obter um bioinseticida com princípio ativo produzido por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, empregando o resíduo da fabricação de biodiesel a partir de óleo vegetal. Para tanto, o trabalho compreendeu três fases: 1. Definição de um tratamento para o resíduo que proporcionasse o crescimento da bactéria e a produção de toxina. 2- Estudo do processo fermentativo com o objetivo aumentar a atividade larvicida do meio fermentado em frascos (definição da composição do meio e de condições de fermentação) e 3. Estudo da transferência de oxigênio em diferentes fases do desenvolvimento da bactéria, em biorreator. O estudo em frasco foi realizado em *Erlenmeyer* de 1.000 mL, provido ou não de chicanas, com 200 mL de meio. O estudo da transferência de oxigênio foi realizado em fermentador Bioflo III, (New Brunswick Sci. Co.) de 1,25 L. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que o melhor tratamento para o resíduo em estudo, consistiu do abaixamento do pH até 4 com ácido fosfórico, seguido de decantação por 24 horas. Com este tratamento foi possível obter uma fonte de carbono mais viável economicamente e, pelos estudos de otimização de processo, foi possível determinar a melhor composição de meio de cultura (10 g/L de glicerina tratada, 6 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,12 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 72\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g/L de MnSO_4 , 1,5 g/L de K_2HPO_4 e 1,5 g/L de KH_2PO_4) e a melhor condição de aeração (manter a concentração de oxigênio dissolvido em 45% da saturação durante todas as fases do desenvolvimento da bactéria). Desta forma, foi possível produzir um meio fermentado 583 vezes mais potente que o ensaio controle empregando glicerol PA.

Palavras-chave: biodiesel, glicerol, *Bacillus thuringiensis*, bioinseticida, *Aedes aegypti*

ABSTRACT

ROSSI, A. A. **Obtainment of bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* by the waste of biodiesel production.** 2012. 164 p. Thesis (PhD of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2012.

The increasing demand for fuels originated from renewable sources, due to environmental issues and possible scarce of petroleum products, together with the mandatory of its inclusion in diesel oil currently used, generated a significant increase in the number of biodiesel producing companies. This product is obtained through transesterification reaction of animal fat and vegetable oils in the presence of a catalyzer, process that results in a single by-product, the glycerin, which had an increase of its production as biodiesel production increases. A way to contribute for the reduction of problems generated by the excess of glycerin is to use it in the composition of fermentation medium and obtain products that are demanded by society. An example is the bioinsecticides produced by the bacteria named *Bacillus thuringiensis*, used in the controlling of mosquito vectors of the dengue viruses. This product presents several advantages when compared to chemical insecticides because it prevents insects resistance, it does not pollute the environment and it is selective, which means it does not create risks of intoxication for other insects and vertebrate animals. It is important to mention that toxins produced by these bacteria are lethal as well to the larvae of malaria and elephantiasis mosquito vectors. Thus, in this work it is intended to obtain a bioinsecticide containing active ingredient from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by using the biodiesel production waste from vegetable oils. In order to achieve that, this work consisted of three steps: 1. Definition of a treatment for the waste of biodiesel to provide the growth of *Bacillus thuringiensis* and its toxin production; 2. Study of the fermentative process to increase larvicidal activity of the fermentation broth in flasks (definition of the medium composition and the fermentative conditions) and 3. Study of the oxygen transference in bioreactor in different development phases of the bacteria. The study in flask was made in a 1000 mL *Erlenmeyer* flask, with and without baffles, and 200 mL of medium. The study of oxygen transference was realized in a 1,25 L bench fermentor (New Brunswick Sci. Co./Bioflo III). With the results obtained it was possible to conclude that the best treatment to the waste of biodiesel consisted of decreasing pH until 4 with phosphoric acid, followed by 24 hours of decantation. With this treatment it was possible to obtain a promising carbon source more and, by the process optimization studies, it was possible to determine the best composition of culture medium (10 g/L of treated glycerin; 6 g/L of yeast extract; 3 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,12 g/L of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,09 g/L of MnSO_4 ; 1,5 g/L of K_2HPO_4 and 1,5 g/L of KH_2PO_4) and the best aeration condition (maintaining the oxygen concentration at 45% of saturation during all phases of bacterial development). So, it was possible to obtain a fermented broth 583 times more potent than the control test using pure glycerol.

Key words: biodiesel, glycerol, *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, *Aedes aegypti*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto.....	24
Figura 2.2 - Evolução da produção de biodiesel no Brasil (NOGUEIRA, 2010).	26
Figura 2.3 – Atlas da produção de biodiesel no Brasil. Principais tipos de matérias-primas empregadas na fabricação de biodiesel em cada região brasileira. (BIODIESEL, 2012)	28
Figura 2.4 - Processo de esporulação de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> (BROCK et al., 1994).	33
Figura 2.5 - Ação da toxina em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2011).	35
Figura 2.6 - Via metabólica envolvida na degradação do glicerol por <i>Clostridium butylicum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Mortierella isabellina</i> , descrita por Ratledge (2002 apud Papanikolaou et al., 2008, p.65).	38
Figura 4.1 – (A) Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> e (B) fotografia da larva no 4º ínstar de desenvolvimento (O AEDES, 2008).	50
Figura 4.2 – Esquema representativo (a) da composição de cada tubo de ensaio empregado no teste piloto e no bioensaio e (b) da estrutura do teste piloto.	50
Figura 4.3 – Esquema representativo do bioensaio. V_1 representa o volume mínimo de meio fermentado que deve ser adicionado a 6 mL de água, suficiente para matar, no mínimo, uma larva. V_5 representa o volume máximo de meio fermentado que deve ser adicionado a 6 mL de água de modo a não causar 100% de morte das larvas.	51
Figura 4.4 - Fluxograma da sequência experimental empregada no presente trabalho.....	55
Figura 5.1 - Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio contendo glicerol PA como substrato.	63
Figura 5.2 - Número de larvas mortas em função da concentração de meio fermentado (em triplicata) em bioensaios realizados com meio contendo glicerol P.A.	64
Figura 5.3 - Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio empregando resíduo semi-bruto PA como substrato.....	66
Figura 5.4 - Aspecto da mistura após o final da etapa de decantação (24h) do resíduo submetido a abaixamento de pH até 4.	66

Figura 5.5 - Aspecto da mistura após a decantação (6h) do resíduo submetido à primeira etapa do tratamento por extração com hexanol.	67
Figura 5.6 - Aspecto do resíduo após cada etapa de tratamento. Da esquerda para a direita: resíduo cru, resíduo após abaixamento de pH até 4 seguido de decantação (G4), resíduo após primeira etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 1), resíduo após segunda etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 2), resíduo obtido após terceira etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 3) e resíduo tratado com hexanol e submetido à destilação (G4-Hex dest.).	67
Figura 5.7 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio empregando resíduo G4.	69
Figura 5.8 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por <i>Bacillus thuringiensis</i> , empregando o resíduo G4 como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x)	70
Figura 5.9 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio empregando resíduo tratado G4-Hex.	71
Figura 5.10 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por <i>Bacillus thuringiensis</i> , empregando o resíduo G4-Hex como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x).....	72
Figura 5.11 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio empregando resíduo tratado G4-Hex dest.	73
Figura 5.12 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por <i>Bacillus thuringiensis</i> , empregando o resíduo G4-Hex-dest. como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x).....	73
Figura 5.13 - Concentração de glicerol (a) e de células (b) em função do tempo de fermentação, para análise comparativa dos ensaios G4, G4-Hex e G4-Hex dest.	74
Figura 5.14 - Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando se empregado meio preparado com glicerol G4 na fermentação.	75
Figura 5.15 - Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado meio preparado com glicerol G4-Hex 3 na fermentação.....	75
Figura 5.16 - Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado meio preparado com glicerol G4-Hex dest. na fermentação.....	76
Figura 5.17 – Meios de cultura formulados com extratos de levedura de diferentes marcas.	77

Figura 5.18 – Concentração de glicerol em função do tempo durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.	79
Figura 5.19 – Concentração celular em função do tempo durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.	80
Figura 5.20 – pH em função do tempo durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.	81
Figura 5.21 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Difco na composição do meio de fermentação	82
Figura 5.22 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Merck na composição do meio de fermentação.	83
Figura 5.23 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado levedo de cerveja na composição do meio de fermentação.	83
Figura 5.24 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Sigma na composição do meio de fermentação.....	85
Figura 5.25 – Concentração celular em função do tempo de fermentação, durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada, empregando diferentes culturas estoque para o preparo de inóculo.	86
Figura 5.26 – Concentração de glicerol em função do tempo de fermentação, durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada, empregando culturas estoque para o preparo de inóculo.	87
Figura 5.27 - pH em função do tempo de fermentação, durante cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio contendo glicerina residual tratada, empregando diferentes culturas estoque para o preparo de inóculo.	87
Figura 5.28 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado células da cultura 1 (d1).	88
Figura 5.29 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado células da cultura 2 (d2).	88
Figura 5.30 – Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado em um total de 6 mL de mistura empregando-se meio de cultivo realizado com células 3 (d3)...	89

Figura 5.31 – Concentração celular em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (Xrecip) e em incubadora de movimento orbital (Xorb).	90
Figura 5.32 – Concentração de glicerol em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (Srecip) e em incubadora de movimento orbital (Sorb).	91
Figura 5.33 – pH em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (pHrecip) e em incubadora de movimento orbital (pHorb).....	92
Figura 5.34 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se incubadora de movimento orbital.	93
Figura 5.35 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se incubadora de movimento recíproco.....	93
Figura 5. 36 – Concentração celular em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L. ..	94
Figura 5.37 – Concentração de glicerol em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L. ..	95
Figura 5.38 – pH em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L.	96
Figura 5.39 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 500 mL.	96
Figura 5.40 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 1 L.	97
Figura 5.41 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 500 mL.	97
Figura 5.42 – Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 1L.	98
Figura 5.43 – Concentração celular em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).	99
Figura 5.44 – Concentração de glicerol em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).	99

Figura 5.45 – pH em função do tempo, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).....	100
Figura 5.46 - Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, para o ensaio realizado sob frequência de agitação de 86 rpm.	101
Figura 5.47 - Porcentagem de morte de larvas de <i>A. aegypti</i> em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, para o ensaio realizado sob frequência de agitação de 96 rpm.	101
Figura 5.48 – Concentração celular e de glicerol (eixo Y à esquerda) e pH, em função do tempo de fermentação para os ensaios de 1 a 19.....	107
Figura 5. 49 - Concentração celular máxima obtida nos ensaios de fermentação propostos pelo planejamento fatorial.....	112
Figura 5.50 - CL ₅₀ relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL ₅₀ relativa do ensaio 4.....	112
Figura 5.51 - CL ₅₀ relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial, substituindo-se o resultado do ensaio 4 original pelo resultado da repetição. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL ₅₀ relativa do ensaio 19.	113
Figura 5.52 - CL ₅₀ relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial com a repetição do ensaio 4 empregando se células isoladas do primeiro ensaio 4 realizado. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL ₅₀ relativa do ensaio 4.....	113
Figura 5.53 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta concentração máxima de células. (1) Glicerol, (2) Extrato de levedura, (3) (NH ₄) ₂ SO ₄ e (4) CaCl ₂	114
Figura 5.54 – Superfície de resposta para concentração celular máxima em função das variáveis Extrato de levedura e glicerol.	117
Figura 5.55 – Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta CL ₅₀ relativa, (2) Extrato de levedura, (3) (NH ₄) ₂ SO ₄ e (4) CaCl ₂	118
Figura 5.56 - Concentração celular em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> , correspondentes aos ensaios 4' e PC' em biorreator.....	120
Figura 5.57 – Concentração de oxigênio dissolvido (% da saturação) e frequência de agitação (rpm) em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> , correspondente ao ensaio 4'.	121
Figura 5.58 – Concentração de oxigênio dissolvido (% da saturação) e frequência de agitação (rpm) em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> , correspondente ao ensaio PC'.	122

Figura 5.59 - pH em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> , correspondente ao ensaio 4', correspondente aos ensaios 4' e PC'	123
Figura 5.60 - Porcentagens de morte de larvas em teste piloto, em função do volume de meio fermentado, obtidos com os ensaios 4' e PC'.	124
Figura 5.61 - Concentração celular (g/L), concentração de glicerol (g/L) e pH em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados baseados no planejamento fatorial 2 ²	127
Figura 5.62 – Concentração de oxigênio dissolvido (em porcentagem da saturação) e frequência de agitação, em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento 2 ² em biorreator	133
Figura 5.63 - CL ₅₀ relativa obtida em cada experimento do planejamento 2 ² em biorreator.	135
Figura 5.64 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de confiança de 95% sobre a resposta concentração celular.	136
Figura 5.65 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de confiança de 95% sobre a resposta CL ₅₀ relativa.....	138
Figura 5.66 - Perfil de concentração celular () e concentração de glicose () em função do tempo de fermentação para as fases de crescimento I, II, III e IV (BERBERT-MOLINA et al., 2008).	141
Figura 5.67 - Concentração celular e concentração de glicerol, em função do tempo de fermentação, para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de DO a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.	143
Figura 5.68 - pH em função do tempo de fermentação para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de saturação de oxigênio a partir do início da fase III e ensaio com 45% de DO durante toda a fermentação.	145
Figura 5.69 - Concentração de oxigênio (%) e frequência de agitação (rpm) para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de DO a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.	148
Figura 5.70 - Volume (mL) de meio fermentado correspondente a CL ₅₀ em um total de 6mL de água para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de DO a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.....	149
Figura 5.71 - Comparação dos volumes de meio fermentado adicionado em 6mL suficiente para matar 50% da população de larvas obtidos no ensaio empregando glicerol PA (item 5.1), melhor resultado obtido no planejamento em incubadora (item 5.3.2) e ensaio otimizado no Biorreator (item 5.4.2)	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas do glicerol (MORRISON, 1994; APPLEBY, 2006).	29
Tabela 4.1 – Composição do meio GYS (Rogoff e Yousten, 1969) e GLYS.....	46
Tabela 4.2 – Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^4 , para avaliação do efeito dos nutrientes (concentrações em g/L).....	60
Tabela 4.3 - Composição do meio de cultura e concentração de oxigênio dissolvido empregadas nos ensaios 4' e PC', em biorreator.....	61
Tabela 4.4 – Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 , para avaliação do efeito da concentração de substrato e do nível de oxigênio dissolvido.	61
Tabela 5.1 – Análise físico-química do resíduo da produção de biodiesel a partir de óleo vegetal segundo laudo fornecido pela indústria Bioverde.	64
Tabela 5.2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 , de acordo com os níveis reais dos fatores apresentados na Tabela 4.2.....	103
Tabela 5.3 – Parâmetros cinéticos $Y_{x/s}$, Q_x , μ_{max} e valores de X_M para cada ensaio realizado	109
Tabela 5.4 – Composição da glicerina proveniente da produção de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas (THOMPSON; HE, 2006).....	110
Tabela 5.5 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta concentração celular, obtida com os ensaios do planejamento 2^4	115
Tabela 5.6 - Critérios para validação de modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).....	116
Tabela 5.7 – Análise de variância de regressão que representa a resposta concentração celular obtida com os ensaios do planejamento fatorial 2^4	116
Tabela 5.8 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta CL_{50} relativa, obtida com os ensaios do planejamento 2^4	118

Tabela 5.9 – Análise de variância de regressão que representa a resposta CL_{50} relativa obtida com os ensaios do planejamento fatorial 2^4 119

Tabela 5.10 - Concentrações iniciais de glicerol e concentrações de oxigênio (% de saturação) empregadas em cada ensaio do planejamento 2^2 125

Tabela 5.11 - Parâmetros cinéticos Q_x , $Y_{x/s}$ e μ_{max} e valores de X_M e para cada ensaio realizado baseando-se no planejamento fatorial 2^2 127

Tabela 5.12 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados para a variável resposta crescimento celular, obtida com ensaios do planejamento 2^2 em biorreator 137

Tabela 5.13 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados para a variável resposta CL_{50} relativa, obtida com ensaios do planejamento 2^2 em biorreator. 138

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Biodiesel	24
2.2 Glicerol	29
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
2.4 Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> como agente de controle biológico de insetos.....	33
2.4.1. Atividade entomopatogênica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
2.4.2. Bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> para o combate da dengue	35
2.4.3. Formulações de meio para o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
2.4.4. Formulação dos bioinseticidas.....	41
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Matéria-prima	45
4.2 Microrganismo	45
4.3 Meio de Cultivo	45
4.4 Condições de Cultivo	46
4.4.1. Preparo da cultura estoque de esporos	46
4.4.2. Preparo do inóculo	46
4.4.3. Ensaio de fermentação em frascos.....	47
4.4.3.1 - Ensaio em incubadora de movimento orbital.....	47

4.4.3.2 - Ensaios de fermentação em incubadora de movimento recíproco.....	47
4.4.4. Ensaios de fermentação em biorreator	48
4.5 Métodos Analíticos	48
4.5.1. Concentração celular	48
4.5.2. Morfologia Celular.....	49
4.5.3. Concentração de glicerol	49
4.5.4. Atividade larvica do meio.....	49
4.6 Forma de análise dos resultados	52
4.7 Sequência Experimental	54
4.7.1. Ensaio Controle.....	55
4.7.2. Tratamento do resíduo de biodiesel	56
4.7.3. Avaliação do crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em resíduo tratado.....	57
4.7.3.1 – Avaliação do resíduo semi-bruto como fonte de carbono	57
4.7.3.2 – Avaliação do resíduo tratado como fonte de carbono	57
4.7.4. Formulação do meio de fermentação a partir de resíduo de biodiesel.....	57
4.7.4.1 – Testes preliminares	57
4.7.4.1.1 – Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio.....	57
4.7.4.1.2 – Avaliação da perda de capacidade de produzir toxinas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	58
4.7.4.1.3 – Definição do sistema de agitação para os ensaios em frasco.....	58
4.7.4.1.4 – Definição do tipo de frasco para o estudo da definição do meio de cultivo.....	59

4.7.4.1.5 – Avaliação da agitação em incubadora de movimento recíproco	59
4.7.4.2- Determinação da composição do meio de cultivo	59
4.7.5. Avaliação do efeito conjunto da concentração de substrato e da concentração de oxigênio dissolvido.....	60
4.7.5.1- Definição da melhor composição de meio de cultura empregando células isoladas	60
4.7.5.2- Avaliação da concentração de oxigênio e concentração de glicerol em biorreator.....	61
4.7.6. Efeito da concentração de oxigênio dissolvido durante a fase de esporulação sobre a atividade tóxica do meio	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Ensaio controle.....	63
5.2 Tratamento e avaliação do crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em resíduo semi-bruto e resíduo tratado.....	64
5.3 Definição da composição do meio para produção de bioinseticida	77
5.3.1. Testes preliminares.....	77
5.3.1.1. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio orgânico (diferentes marcas de extratos de levedura e levedo de cerveja)	77
5.3.1.2. Avaliação da perda de atividade.....	85
5.3.1.3 - Definição do sistema a ser utilizado (incubadora de movimento orbital e Erlenmeyer com chicanas ou incubadora de movimento recíproco e Erlenmeyer sem chicana).....	90
5.3.1.4 - Definição do tipo de frasco para o estudo de composição do meio de cultivo	94
5.3.1.5- Avaliação da agitação em incubadora de movimento recíproco	98
5.3.2. Definição da composição do meio de cultivo para a produção de bioinseticida	102
5.4 Avaliação da concentração de substrato e da concentração de oxigênio dissolvido ...	119

5.4.1. Definição da melhor composição de meio de cultura	119
5.4.2. Avaliação da aeração e da concentração de substrato em biorreator	125
5.4.3. Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido durante a fase de esporulação sobre a atividade tóxica do meio fermentado	140
6. CONCLUSÕES.....	152
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	154
REFERÊNCIAS.....	155

1- INTRODUÇÃO

Devido às constantes flutuações dos preços dos combustíveis derivados de petróleo e à poluição ambiental causada pelo seu emprego, as fontes renováveis de energia assumem importante papel no mundo contemporâneo. O biodiesel é um substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e óleos utilizados para fritura de alimentos.

Durante a fase de produção do biodiesel é obtida a glicerina, que possui baixo valor agregado devido às impurezas que contem. A possibilidade de purificação depende da disponibilidade de métodos viáveis. Geralmente, plantas de produção de biodiesel de pequeno e médio portes não são capazes de purificar a glicerina, com baixo custo, de modo que esta possa ser destinada a aplicações mais nobres como nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Além do mais, não há legislação específica no Brasil para o descarte deste resíduo, e as duas formas mais aplicadas para o seu descarte causam sérios problemas ambientais.

Logo, torna-se necessário criar alternativas de utilização deste glicerol residual para que o biodiesel se torne competitivo no mercado de biocombustíveis e também para minimizar os impactos ambientais negativos causados pelo acúmulo do sub-produto de sua fabricação.

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores ainda são um sério problema de saúde pública. A dengue é um desses problemas, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 e 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 do mosquito *Aedes aegypti*, vetor do vírus da doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido suficientes para um controle efetivo. O controle de insetos vetores de importantes doenças é principalmente feito por pesticidas químicos. Porém, tais substâncias acarretam sérios problemas, incluindo poluição ambiental e prejuízo para a saúde humana.

No Brasil, o controle químico tem sido ineficiente para conter o mosquito, o qual apresenta altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada, tornando-se o seu combate uma tarefa difícil.

Surgiram, desta forma, alternativas de combate aos insetos, entre as quais o uso de entomopatógenos, que incluem vírus, bactérias e fungos. Os inseticidas baseados em entomopatógenos (Bioinseticidas) são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade aos vertebrados e insetos benéficos.

O bioinseticida mais empregado para controle de insetos é o obtido por *Bacillus thuringiensis*, representando 2% do total do mercado de bioinseticida. As proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 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.

A formulação de inseticidas com linhagens de *Bacillus thuringiensis* apresenta diversas vantagens sobre os inseticidas químicos, principalmente pelo fato de que *Bacillus thuringiensis* produz toxinas que agem de forma sinérgica, sendo uma alternativa em relação ao problema do 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 para insetos benéficos, plantas e animais vertebrados, incluindo humanos. Outras vantagens incluem produção de esporos, que são bastante resistentes aos fatores adversos do ambiente, podem ser mantidos na forma de pó ou emulsão e são facilmente utilizados em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos.

A produção de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* em larga escala ainda é um processo caro devido ao alto custo do meio de fermentação. 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 farelo e farinha de soja, água de maceração de milho, soro de queijo, extrato de batata, melado de cana-de-açúcar e caldo de cana de galinha obtido após fervura.

Assim, no presente trabalho propõe-se desenvolver um tratamento para a glicerina da indústria de biodiesel que possibilite seu emprego como fonte de carbono para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e visando a produção de toxinas contra larvas de *Aedes aegypti*. De acordo Özkan et al. (2003), o glicerol sintético quando empregado como fonte de carbono proporcionou uma melhor produção de toxinas quando comparado à glicose.

Em seguida, foi estudada a influência da adição de alguns nutrientes com a finalidade de aumentar a atividade larvicida, uma vez que, segundo Lacey, Kaya e Vail (2001), o aprimoramento da formulação do meio de fermentação é indispensável para o desenvolvimento futuro do mercado de bioinseticidas.

Após a definição do meio de cultura em frascos *Erlenmeyer*, ensaios foram realizados em Biorreator a fim de avaliar a influência da concentração de substrato e da aeração durante o processo fermentativo, também com o objetivo de obter um caldo fermentado com maior atividade larvicida. Ghribi et al. (2007) concluíram que uma adequada aeração durante as diferentes fases de crescimento de *Bacillus thuringiensis* permite aumentar a produção de delta-endotoxinas por esta bactéria.

Portanto, as principais contribuições deste presente trabalho foram: (1) reduzir o custo do meio de cultura de *Bacillus thuringiensis* para a produção de bioinseticida, uma vez que custo é um dos principais desafios da produção em larga escala deste produto; (2) contribuir para viabilizar uma aplicação para a glicerina oriunda da produção de biodiesel, uma vez que a alta produção deste combustível renovável vem aumentando e resultando um excedente cada vez maior de glicerina; (3) estabelecer parâmetros de processo que permitam a produção de meio fermentado com atividade tóxica à larvas de *Aedes aegypti* e, desta forma, contribuir com o desenvolvimento de mais uma ferramenta de controle do vetor de uma grave doença recorrente em países de clima tropical, a dengue.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

Nossa economia e estilo de vida preconizam o uso de fontes fósseis para geração de materiais e combustíveis para transporte (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural (PACHAURI; HE, 2006; KNOTHE et al., 2006; REHMAN et al., 2008). Entretanto, têm surgido preocupações com respeito aos seus custos e disponibilidade sustentável, assim como ao seu impacto sobre o aquecimento global e poluição. Isto tem levado à procura de tecnologias que forneçam materiais e combustíveis a partir de fontes renováveis de carbono, como a biomassa vegetal (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

A produção de biocombustíveis vem crescendo exponencialmente, especialmente em países com extensas atividades agrícolas (VISSER et al., 2011). Biocombustíveis líquidos, principalmente o etanol produzido a partir de cana de açúcar, de milho e de outros cereais, e o biodiesel de óleos de sementes, representam 1,6% do total de combustíveis empregados em transporte no mundo (NOGUEIRA, 2010).

O biodiesel tem recebido considerável atenção mundialmente, a médio prazo, como alternativa para substituição do diesel derivado do petróleo. Pode ser produzido pela transesterificação de óleos ou gorduras com um álcool de cadeia curta, como metanol e etanol, na presença de um catalisador, com a formação de um único sub-produto da reação, o glicerol, conforme mostrado na Figura 2.1 (APOSTOLAKOU et al., 2009).

Figura 2.1 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto.

As principais vantagens do biodiesel são: (1) ser produzido a partir de fontes renováveis; (2) ser biodegradável, não-tóxico e seguro de manusear; (3) produzir menos monóxido de carbono e emissões de dióxido de enxofre (APOSTOLAKOU et al., 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). Com relação às desvantagens, destacam-se o alto preço, o aumento de emissões de óxido de nitrogênio e as preocupações com a durabilidade do motor a diesel, quando se utiliza 100% de biosiesel.

A atual produção mundial de biodiesel, empregando diferentes matérias-primas, é de cerca de 6 milhões de litros por ano e representa 10% de todo o biocombustível produzido. A distribuição da produção de biodiesel em nível mundial pode ser dividida em: 48% na Alemanha, 30% nos outros países Europeus, 15% nos Estados Unidos e o restante dividido entre outros países como: Brasil, China, Índia, Canadá, Colômbia e Malásia, sendo a grande maioria produzida a partir de óleos de sementes (NOGUEIRA, 2010). De acordo com Çelik et al. (2008) a produção norte americana de biodiesel foi projetada para alcançar 1,3 bilhões de litros no ano de 2011.

Como parte das medidas de redução dos gases causadores do efeito estufa, a União Européia vem encorajando o uso de biocombustíveis (biodiesel e etanol). Diretrizes do *EU Biofuel* exigiram que 5,75% do total da energia para transporte seja de fontes renováveis até o final de 2010 e 10% até 2020 (APOSTOLAKOU et al., 2009).

Na Europa, o biodiesel é o biocombustível mais empregado, representando 82% do total de biocombustíveis utilizados. Dentre as vantagens técnicas da substituição do biodiesel pelo diesel estão: (i) prolongamento da vida útil do motor e redução de manutenções devido ao fato de o biodiesel ter melhores propriedades lubrificantes que um derivado de petróleo; (ii) ser mais seguro de manusear, por ser menos tóxico, ser biodegradável e ter maior ponto de fusão (BOZBAS, 2008).

O Brasil é um país com abundantes fontes naturais e agrícolas e vem sendo considerado o líder global na produção de biocombustíveis. De acordo com o Plano Brasileiro de Agroenergia (2006-2011), preparado pelo Ministério da Agricultura, o Brasil possui uma série de vantagens que propiciam ao país ser o líder global do mercado de biocombustíveis, tais como: extenso campo para agricultura, clima tropical, abundante biodiversidade e fontes de água, indústria agrícola estabilizada e grande quantidade de biocombustível produzido capaz de atender uma demanda internacional (GARCEZ; VIANNA, 2009).

O óleo diesel é o maior produto derivado de petróleo consumido no Brasil, sendo empregado em transporte público e de carga em todo o país. Apesar da autosuficiência em petróleo, 13% da demanda nacional é importada (NOGUEIRA, 2010).

O programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), lançado pelo governo federal, tem como objetivos: (1) implementar técnica e economicamente a produção e o uso do Biodiesel, com um foco de inclusão social e desenvolvimento regional pela criação de empregos e receita; (2) garantir preços competitivos, qualidade e fornecimento; (3) produzir biodiesel a partir de diferentes sementes de oligenosas em diversas regiões do Brasil. Não está incluso no programa a utilização de gorduras de origem animal (GARCEZ; VIANNA, 2009).

De acordo com a Lei 11.097/2005, criada pelo PNPB, ficavam obrigados os veículos movidos a diesel a utilizar, a partir de janeiro de 2008, uma mistura de 2% de biodiesel (B2), aumentando para 3% de julho de 2008 até junho de 2009, e, a partir de julho de 2009 seria mandatória a utilização de 4%, atingindo 5% em 2013. Porém, atendendo a solicitações dos produtores de biodiesel, autoridades brasileiras decidiram antecipar a mistura B5 (5%) para janeiro de 2010 (GARCEZ; VIANNA, 2009; MISTURA, 2011). Assim, o atual consumo de biodiesel está em torno de 2,6 milhões de metros cúbicos por ano (GARCEZ; VIANNA, 2009). De acordo com a Petrobrás (2010), observa-se uma evolução da produção de biodiesel no Brasil ao longo dos últimos anos e o impacto positivo do desenvolvimento do PNPB (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Evolução da produção de biodiesel no Brasil (NOGUEIRA, 2010).

A área plantada de oleaginosas necessária para atender ao percentual de mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo foi estimada em 1,5 milhão de hectares, o que equivale a 1% dos 150 milhões de hectares plantados e disponíveis para agricultura no Brasil (O PROGRAMA, 2007). O óleo de soja representa o principal óleo vegetal no Brasil e a cadeia de produção mais estruturada, constituindo 90% do total de óleos vegetais produzidos, seguido do óleo de algodão, palmeira e girassol, entre outros (GARCEZ; VIANNA, 2009).

A redução das importações de diesel resultou uma economia de cerca de US\$ 410 milhões por ano, além de reduzir a dependência externa referente ao produto de 7% para 5% (ASSIS, 2008). Trata-se de uma vantagem estratégica, ao reduzir a dependência das importações de petróleo. Esse combustível renovável causou impacto positivo na balança comercial brasileira por permitir a redução da importação de óleo diesel. O uso comercial do B2 (mistura de 2% do biodiesel ao diesel) criou um mercado potencial para a comercialização de 800 milhões de litros de biodiesel/ano, o que representou uma economia anual da ordem de US\$ 160 milhões na importação de diesel (O PROGRAMA, 2007).

De acordo com o presidente da Petrobras Biocombustíveis, o Brasil deverá ultrapassar a Alemanha e se tornar, em 2012 o maior produtor mundial de biodiesel. A venda de biodiesel cresceu de 1,1 milhão de metros cúbicos (m³) para 2,6 milhões de m³ em apenas três anos, sendo que o Centro-Oeste e o Sul do país concentram o maior número de usinas. Conforme mencionado por aquele presidente, o programa brasileiro de biodiesel ainda sofre com a descentralização da produção e a lenta ampliação da participação da agricultura familiar como fornecedora de matéria-prima. Porém, o governo deve anunciar breves medidas para estimular o setor, como financiamentos para estocagem e linhas de crédito para renovação e/ou expansão dos canaviais e para melhor aproveitamento da capacidade das usinas (ARAÚJO, 2012).

Figura 2.3 – Atlas da produção de biodiesel no Brasil. Principais tipos de matérias-primas empregadas na fabricação de biodiesel em cada região brasileira. (BIODIESEL, 2012)

2.2 Glicerol

Durante o processo de produção do biodiesel, óleos e gorduras são misturados com metanol e catalisadores alcalinos para produzir ésteres de ácidos graxos livres, tendo glicerol como o principal subproduto da reação. Em geral, para cada 100 kg de biodiesel produzidos obtém-se 10 kg de glicerina, a qual é impura e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007).

Portanto, após a fase de produção, obtém-se duas fases. A fase superior é constituída pelo principal produto, o biodiesel, e a fase inferior corresponde a glicerol e outros produtos químicos, como água, sais orgânicos e inorgânicos, pequenas quantidades de esteres e álcool e traços de glicerídeos e pigmentos vegetais. Normalmente, a fase inferior contém em torno de 30-60 % (m/m) de glicerol (HÁJEK, 2010).

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, é um álcool que se apresenta como um líquido viscoso, inodoro, incolor e de 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 °C)	1,26 kg/m ³
Viscosidade (20 °C)	1410 mPa
Ponto de fusão	18 °C
Ponto de ebulição (1013 hPa)	290 °C
Calor específico (25 °C)	2,435 J/g
Calor de evaporação (55 °C)	88,12 J/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)
Calor de formação	667,8 kJ/mol
Tensão superficial (20 °C)	63,4 mN/m
pH (solução)	7,0

De acordo com a OECD-FAO (2010) a estimativa de produção de biodiesel para 2019 será de 41 bilhões de litros, sendo assim, a quantidade de glicerina produzida será da ordem de 4 bilhões de litros.

Não há legislação específica no Brasil para o descarte da glicerina, somente há para efluentes industriais em geral. As duas formas de descarte mais comuns são o despejo nos rios e a queima, mas, de modo geral, essas duas formas de descarte causam problemas ambientais, uma vez que o resíduo possui alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a sua queima libera compostos cancerígenos como a cloreína (BATISTA, 2008).

O glicerol é amplamente utilizado na indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêutica. Atualmente, representa 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). Além disso, o glicerol apresenta características crioprotetoras, 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).

Porém, o uso do glicerol, advindo da produção do biodiesel, tem sua aplicação limitada devido à presença de impurezas como metanol, sais e ácido graxo. Além do mais, a purificação deste glicerol residual não é economicamente viável para as plantas de biodiesel (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2011).

O glicerol bruto pode ser purificado por resina de troca-iônica (Amberlite-252) na qual os macroporos da resina seriam responsáveis pela remoção dos íons de sódio (CARMONA; VALVERDE; PÉREZ et al., 2008). Ambersep BD50 também se apresenta como resina de troca-iônica empregada para remoção de sais (LANCRENON; FEDDERS, 2008). Muitos métodos de purificação por destilação para remoção do álcool vêm sendo relatados (POTTHAST; CHUNG; MATHUR, 2010).

Outra forma de purificação do glicerol é a adição de ácido, para que ocorra quebra dos sabões em ácidos graxos livres e sais. Os ácidos graxos livres não são solúveis na fase do glicerol, flutam à superfície da mistura e podem ser removidos. Os sais que permanecem no glicerol podem precipitar, dependendo da composição química do meio (KNOTHE et al., 2006). Um método utilizado, quando o catalisador empregado é o hidróxido de potássio, é a neutralização com ácido fosfórico, de forma que o sal formado seja o fosfato de potássio, o

qual constitui fonte de fosfato e potássio para microrganismos durante a fermentação (KNOTHE et al., 2006; REHMAN et al., 2008). Após acidificação e remoção do metanol por evaporação, o glicerol apresenta uma pureza de aproximadamente 85% (KNOTHE et al., 2006).

O desenvolvimento de produtos de valor agregado empregando-se a glicerina é um ponto crítico a longo prazo para a sustentabilidade das indústrias de biodiesel (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2011).

Mu et al. (2006) utilizaram glicerol derivado do biodiesel produzido por metanólise de óleo de soja, tanto com a reação catalisada por álcalis como por via enzimática. Quando o resíduo de glicerol foi utilizado sem nenhum tratamento durante a fermentação em sistema descontínuo alimentado com *Klebsiella pneumoniae*, os autores obtiveram 51,3 e 53 g/L de 1,3-propanodiol, para o glicerol derivado da reação com catálise alcalina e catálise enzimática, respectivamente. Utilizando o glicerol puro foram obtidos 61,9 g/L de produto. Rehman et al. (2008) avaliaram a influência do tratamento do resíduo de glicerol obtido da fabricação de biodiesel de óleo de girassol. As impurezas como sabão, metanol e ácidos graxos livres inibiram drasticamente o crescimento de *Clostridium butyricum*. Acidificação com ácido fosfórico, seguida de decantação, foi utilizada para remoção do sabão e parte dos ácidos graxos. Quando os autores utilizaram resíduo com 90% e 96% (m/m) de glicerol, obtiveram rendimento de 0,51 e 0,53 (g/g) e produtividade de 1,28 e 1,33 (g/L.h) de 1,3-propanodiol, respectivamente. Para glicerol comercial foi obtido 0,53 (g/g) e 1,32 (g/L.h).

Ito et al. (2005) utilizaram *Enterobacter aerogenes* para a produção de hidrogênio e etanol a partir de glicerol residual e obtiveram rendimentos de 0,71 e 0,67 (mol/mol de glicerol) de hidrogênio e etanol, respectivamente. Com glicerol comercial os rendimentos foram de 0,89 e 0,86 (mol/mol). Segundo os autores, a alta concentração de sais presente no resíduo de glicerol, formados devido à adição de ácido para a neutralização do catalisador alcalino, como cloreto de sódio, inibiu o crescimento da bactéria, prejudicando a fermentação.

O metanol presente no resíduo é altamente tóxico para a maioria dos microrganismos (REHMAN et al., 2008). Çelik et al. (2008) empregaram a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* para a produção do hormônio eritropoetina, utilizando o resíduo de glicerol obtido a partir da transesterificação de óleo de canola e sem nenhum tratamento, obtendo uma concentração celular e de produto 1,5 e 1,3 vez maior, respectivamente, do que aquele obtido com glicerol puro. Segundo os autores, a presença de nutrientes adicionais como fontes de carbono, nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio no resíduo exerceram efeito positivo no

crescimento e formação do produto, associado ao fato de que o metanol não prejudica o crescimento da levedura.

Forrest, Sierra e Holtzaple (2010) demonstraram que o glicerol bruto oriundo da indústria de biodiesel pode ser adicionado à fermentação de misturas de cultura para a produção de ácidos carboxílicos. O cultivo de leveduras e fungos também gerou alta biomassa com o emprego do glicerol sem tratamento como fonte de carbono (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

2.3 - *Bacillus thuringiensis*

A espécie *Bacillus thuringiensis* foi primeiramente isolada de larvas infectadas de bicho da seda, *Bombyx mori*, no Japão, por Ishiwata, em 1901. Porém, a descoberta não foi oficializada. Em 1915, Berliner isolou *Bacillus thuringiensis* de larvas infectadas de traças de farelo de trigo, *Anasgasta kuehniella*, em Thuringia na Alemanha, o que derivou o nome da espécie (FEDERICI, 1999).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonete, anaeróbia facultativa (STAHLY; ANDREWS; YOUSTEN, 1991). Esta espécie de bactéria é comumente reconhecida pela capacidade de produzir um cristal proteico durante a fase de esporulação. Este cristal é a principal característica usada para diferenciar a espécie, principalmente de espécies similares como *Bacillus cereus* e outros bacilos (FEDERICI, 1999).

Esporos de *Bacillus thuringiensis* podem ser isolados de diversos ambientes como solo, raízes de plantas, água, partículas de poeira e insetos (BIZZARRI; BISHOP, 2008).

O ciclo completo do crescimento de *Bacillus thuringiensis* começa com a germinação do esporo e, na fase vegetativa, a bactéria propaga-se por fissão binária (Figura 2.4). 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). Estes cristais protéicos, classificados como Cry e Cyt toxinas, apresentam um amplo espectro seletivo de atividade tóxica para uma série de insetos (JAMES, 2009). Goldberg e Margalit isolaram, em 1976, em Israel, uma nova subespécie de *Bacillus thuringiensis*, a partir de amostras de solo (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998). Posteriormente, a subespécie foi identificada e denominada *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sorotipo H-14 (DE BARJAC, 1978). Este

microrganismo era significativamente mais tóxico para larvas de mosquitos que outras bactérias conhecidas até o momento (PETRY et al., 2004).

Figura 2.4 - Processo de esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* (BROCK et al., 1994).

A síntese dos cristais proteicos por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* é fortemente regulada por fatores ambientais como o pH, a temperatura e a composição do meio de cultivo.

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

2.4.1. Atividade entomopatogênica de *Bacillus thuringiensis*

O bioinseticida mais empregado para controle de insetos são os produzidos com *Bacillus thuringiensis*, representando 2% do total do mercado de bioinseticida. *Bacillus thuringiensis* apresenta atividade exclusiva contra larvas de diferentes insetos. A morte da larva é causada pela ruptura do tecido intestinal, seguida da infecção generalizada causada pelo próprio *Bacillus thuringiensis* ou por outras bactérias (RAYMOND et al., 2010).

Diferentes produtos à base de *Bacillus thuringiensis* tem sido desenvolvidos para controle de insetos na agricultura e contra algumas espécies de mosquitos. Na maioria dos casos, os produtos são formulados à base de esporo-cristal derivados de algumas cepas como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e HD73, *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, *B. thuringiensis* var. *san diego*, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (SOBERÓN; GILL; BRAVO, 2009).

De acordo com Margalith e Ben-Dov¹ (2000 apud BRAVO et al., 2011), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* produz quatro endotoxinas denominadas Cry4A (125 kDa), Cry4B (134 kDa), Cry11A (67 kDa) e Cyt1A (27 kDa). Estas toxinas apresentam alta toxicidade contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex sp.*, vetores da dengue e febre amarela, respectivamente, e moderada toxicidade contra *Anopheles gambiae*, vetor da malária.

Uma característica interessante destas quatro proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, também denominadas δ -endotoxinas, é a ação sinérgica entre elas. A atividade tóxica destas toxinas é muito maior quando em conjunto do que quando Cry ou Cyt está isolada (BRAVO; GILL; SOBERÓN., 2005). A toxina Cyt apresenta ação sinérgica com as três toxinas Cry, fato que está relacionado com o baixo desenvolvimento de resistência das larvas à ação tóxica do bioinseticida (BRAVO et al., 2011, p.4). Portanto, o poder letal das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* é resultado da ação sinérgica entre as toxinas Cyt1A, Cry4A, Cry4B e Cry11A.

A ação da toxina acontece quando um inseto susceptível ingere cristais da toxina, os quais, após a solubilização, resultam peptídeos que formam poros na membrana do epitélio intestinal e desestabilizam os gradientes osmótico e iônico do intestino do larva (Figura 2.5). A maioria das pró-toxinas conhecidas precisa ser hidrolisadas por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos, estes fragmentos ligam-se a receptores específicos do epitélio do intestino médio 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 do inseto poucas horas após a ingestão (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Segundo Chilcott et al. (1990) a larva do mosquito demonstra perda de atividade após duas horas da ingestão da toxina, e paralisia completa após seis horas.

¹ . MARGALITH, Y., BEN-DOV, E., 2000. Biological Control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israeliensis*. In: RECHCIGL, J.E., RECHCIGL, N.A. **Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection**. CRC Press, p.243.

Figura 2.5 - Ação da toxina em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2011).

2.4.2. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* para o combate da dengue

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores ainda são um sério problema de saúde pública. A dengue é um desses problemas, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 e 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 do mosquito *Aedes aegypti*, vetor do vírus doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido suficientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A Vigilância Sanitária em Saúde registrou 254.734 casos de dengue no Brasil no período de janeiro a março de 2011. A região sudeste apresentou 32% dos casos, seguida pelas regiões Norte (30%), Nordeste (19%), Sul (11%) e centro-oeste (8%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou o resultado do LIRAA 2011 (Levantamento de Índice Rápido de Infestação por *Aedes aegypti*), o qual revelou que 48 municípios brasileiros apresentam alto risco de ocorrência de surto de dengue nos primeiros meses do ano de 2012 (MINISTÉRIO, 2012).

O vírus da dengue vem se espalhando rapidamente pelo mundo, principalmente através de seu principal vetor, o mosquito *A. aegypti*. Pesquisa básica e clínica vem recebendo incentivo de indústrias, da WHO (World Health Organization) e do governo, para

compreender melhor a doença e a resposta imunológica. Já existem vacinas em desenvolvimento e até em fase de estudo pré-clínico. O grande desafio da vacina é produzir de forma simultânea e eficiente anticorpos contra os quatro sorotipos da dengue por um longo período de tempo (WHO et al., 2010).

Porém, enquanto não se tem uma forma aprovada de se prevenir contra a dengue, o combate ao mosquito vetor ainda é a forma mais eficiente de prevenção (BRAGA et al., 2010).

De acordo com Devine e Furlong (2007), o controle de insetos agrícolas e de vetores de doenças é feito na grande maioria por pesticidas químicos. No entanto, os pesticidas químicos são responsáveis por um grande número de problemas, como poluição ambiental e doenças nos seres humanos (como cancer e graves distúrbios no sistema imunológico). Além disso, o fato do desenvolvimento de populações de pragas resistentes aos pesticidas químicos representou a quebra do paradigma para o desenvolvimento de outros pesticidas.

Uma pesquisa da Unesp (Universidade Estadual Paulista) de Botucatu demonstrou que o emprego excessivo de inseticidas induziram os mosquitos da dengue a desenvolver resistência genética maior ao veneno. Ovos do mosquito de diferentes regiões foram coletados e foi possível verificar que os mosquitos oriundos de cidades com maior número de casos da doença apresentaram maior resistência. Isto sugeriu que o aumento da resistência deve-se ao uso descontrolado de inseticidas nas cidades com maior incidência do mosquito. Por análise bioquímica foi observada maior atividade de enzimas (grupo esterases) relacionadas à capacidade de neutralizar tais substâncias tóxicas nas larvas que originaram os mosquitos mais resistentes. Por fim, por análise genética, comprovou-se a existência de uma grande variedade de genes de *Aedes aegypti* de cada região estudada, indicando que o mosquito tende a desenvolver resistência de forma diferente em cada *habitat* (COISSI, 2012).

Logo, inseticidas produzidos por microrganismos tem sido proposto como substituto dos pesticidas químicos. Vantagens como especificidade contra certas espécies de insetos e baixo desenvolvimento de resistência são características adicionais a esta outra proposta de combate a insetos (BRAVO et al., 2011).

Desta forma, verifica-se um grande interesse em investimentos em pesquisa científica nos últimos anos para o desenvolvimento e o emprego de agentes biológicos como alternativa para o controle de vetores de doenças (POLANCZYK, 2003). Recentes estudos, especificamente em engenharia genética, vêm revolucionando a área agrícola com o uso de plantas modificadas geneticamente, as quais apresentam capacidade de sintetizar proteínas

Cry produzidas por *Bacillus thuringiensis*, proporcionando grandes vantagens para a lavoura (ICOZ; STOTZKY, 2008).

De acordo com Sreshty, Kumar e Murty (2011), o uso combinado de inseticidas de diferentes classes que agem de forma sinérgica, mostrando múltiplos sítios de ação em insetos, é reconhecido como a estratégia chave para evitar o desenvolvimento de resistência. Em seu estudo, empregou-se toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e *Bacillus sphaericus*, verificando-se uma melhora na atividade larvicida com uma composição de toxinas de 1:3.

Tem-se obtido sucesso na produção de bioinseticidas contra a dengue pelo cultivo de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Este último é o mais eficiente agente microbiano contra mosquitos, especialmente *Aedes aegypti* (POOPATHI; ABIDHA, 2007). *Bacillus sphaericus* vem despertando interesse, uma vez que apresenta maior durabilidade em águas poluídas e condições adversas de ambiente, porém um maior desenvolvimento de resistência de mosquitos à sua toxina foi identificado, enquanto que tal fato não foi observado para *Bacillus thuringiensis* (SRESHTY; KUMAR; MURTY, 2011).

De acordo com Lacey, Kaya e Vail (2001), 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*.

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

Além de glicose, algumas linhagens de *Bacillus thuringiensis* podem metabolizar outros carboidratos como fonte de carbono, incluindo sacarose, frutose, lactose, galactose e maltose (STAHLY; ANDREWS; YOUSSTEN, 1991). Özkan et al. (2003) avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento, a taxa de esporulação e a produção das endotoxinas Cry4Ba e Cry11Aa por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. De acordo com os autores, glicose, amido e melaço exerceram efeito repressivo e/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. A quantidade de toxinas produzidas ao se utilizar o glicerol como fonte de carbono foi similar àquela obtida quando se utilizaram os açúcares maltose e inulina. Por outro lado, houve maior produção de toxinas

com glicerol que com glicose, sacarose, melaço e amido, e menor produção com dextrina, lactose e soro de leite.

A Figura 2.6 apresenta as vias metabólicas para a utilização de glicerol por *Clostridium butyricum*, *Yarrowia lipolytica* e *Mortierella isabellina*, descritas por Ratledge² (2002 apud PAPANIKOLAOU et al., 2008, p.65). De acordo com Arnaud e Guiraud (1985) os *Bacillus* tem a capacidade de assimilar glicerol, o qual entra na via glicolítica na forma de diidroxicetona-fosfato.

Figura 2.6 - Via metabólica envolvida na degradação do glicerol por *Clostridium butylicum*, *Yarrowia lipolytica* e *Mortierella isabellina*, descrita por Ratledge (2002 apud Papanikolaou et al., 2008, p.65).

² RATLEDGE C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochem Soc Trans**, v.30, p.1047-1050, 2002.

A assimilação da molécula de glicerol pelas células foi mencionada por diversos autores. De acordo com Moat, Foster e Spector (2002), o glicerol é a única fonte de carbono que é transportada por difusão facilitada em células procarióticas. Porém, apesar de o glicerol ser assimilado por difusão simples, quando a molécula está em baixa concentração no meio de fermentação, 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 que células de *E. coli* cultivadas em glicose na presença de uma solução hipertônica de glicerol sofreram plasmólise e depois de um determinado tempo recuperaram seu tamanho original. 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 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).

Segundo Moraes, Capalbo e Arruda (2001), a potência e o espectro de atividade do caldo final fermentado dependem 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 é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana (BERNHARD; UTZ, 1993). 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).

Segundo Prabakaran e Balaraman (2006) a produção de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* 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 da semente de soja foi considerada a mais econômica para a produção deste bioinseticida em larga escala. Outras 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 farelo e farinha de soja (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYER, 1990; VIDYARTHI et al., 2002), água de maceração de milho (ABDELL-HAMEED CARLBERG; EL-TAYER, 1990; LIU; BAJPAI, 1995; MALDONADO-BLANCO et al., 2003), levedura de cervejaria (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA, 2001), soro de queijo (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYER, 1990), extrato de batata (POOPATHI et al., 2002), melaço de cana-de-açúcar (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYER, 1990; MALDONADO-BLANCO et al., 2003), e água de coco (PRABAKARAN et al., 2008).

Devido à busca contínua por um meio de baixo custo, com o objetivo de tornar a produção de bioinseticida economicamente viável, Poopathi e Abidha (2007) estudaram um meio baseado em caldo resultante da fervura de penas de aves (resíduo de avículas) fervidas. Foram cultivadas cepas de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e encontraram-se resultados de toxicidade muito semelhantes à toxicidade encontrada quando as bactérias foram cultivadas em meio convencional (Extrato de levedura e sais – NYSM).

A fonte de nitrogênio mais utilizada em meios para a fermentação com *Bacillus thuringiensis* é o extrato de levedura (SIKDAR; MAJUMBAR M.; MAJUMBAR S., 1991; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003). Mas, alguns autores relatam 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; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003). Sulfato de amônio é utilizado na composição da maioria dos meios de cultivo em estudo com *Bacillus thuringiensis* (SIKDAR; MAJUMBAR M.; MAJUMBAR S., 1991; MIGNONE; AVIGNONE-ROSSA, 1996), entretanto, Ozkan et al. (2003), obtiveram maior rendimento na produção das endotoxinas quando utilizaram o sal $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio inorgânico.

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 co-fatores de enzimas que catalisam o processo de fermentação (DULMAGE, 1970). Segundo Bernhard e Utz (1993), quando substratos complexos são utilizados para síntese do cristal protéico é necessário um balanço cuidadoso dos íons no meio.

Ghribi et al. (2007), em seu trabalho sobre produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*, concluíram que uma adequada aeração durante as diferentes fases de

crescimento desta bactéria permite aumentar a produção de delta-endotoxinas. Desta forma, a análise do perfil protéico dos cristais formados sob diferentes condições de fermentação constitui uma medida importante para a avaliação indireta da atividade tóxica do meio no processo de produção de bioinseticidas com *Bacillus thuringiensis*, facilitando a identificação de variáveis que interferem diretamente na expressão das toxinas.

2.4.4. Formulação dos bioinseticidas

De acordo com Gunasekaran, Prabakaran e Balaraman (2002) a eficácia de um programa de controle de insetos usando este produto depende de quão adequadamente o princípio ativo permanece matando a larva do mosquito no local aplicado.

Bacillus thuringiensis tem sido intensivamente usado na formulação de bioinseticidas devido à sua inocuidade para o meio ambiente e para os seres humanos. A difusão do uso de bioinseticida empregando *Bacillus thuringiensis* apresenta alguns desafios como o custo da produção e da formulação. Vários meios alternativos vem sendo desenvolvidos para substituir os meios convencionais, solucionando o problema do custo dos meios sintéticos. A formulação é um ponto crítico, pois influencia a produção, os fatores econômicos, a efetividade em campo, a validade do produto e a facilidade de aplicação (BRAR et al., 2006).

Existem vários fatores que influenciam na eficiência das formulações à base de *Bacillus thuringiensis*, como por exemplo: radiação ultravioleta, chuva, pH, temperatura e folhagem (BRAR et al., 2006). Luz do sol, especificadamente os espectros de UV-B (280-310nm) e UV-A (320nm-400nm) são os principais responsáveis pela inativação da toxina patogênica (COHEN et al., 1991). Chuva também é um fator natural que pode afetar a persistência dos bioinseticidas, principalmente em folhagens, provocando a lavagem antes da ação efetiva da toxina (BEHLE; McGUIRE; SHASHA, 1997). A literatura indica que a atividade da toxina de *Bacillus thuringiensis* é estável acima de pH 3 e abaixo de pH 11. Apesar de águas com pH acima de 10 não serem comuns, dependendo da aplicação do bioinseticida o pH deve ser um ponto de atenção (BRAR et al., 2006). A temperatura apresenta papel fundamental para a durabilidade da atividade tóxica após a aplicação da formulação com *Bacillus thuringiensis*. Tem sido observado que temperaturas abaixo de 10 °C e superiores a 30 °C causam efeito adverso para a toxina quando exposta por longo prazo (IGNOFFO, 1992). Com relação à aplicação foliar, o tempo de meia-vida da toxina é de

1-2 dias para locais expostos ao sol e 20 a 30 dias para locais com sombra (BRAR et al., 2006). Formulações de bioinseticidas vem sendo desenvolvidas dependendo da aplicação e de suas características, formas sólidas ou líquidas, visando superar os efeitos adversos do meio ambiente (BRAR et al., 2006).

Com relação à forma em pó, podem ser citados: pó, grânulo, tablete e pó umedecido (1-10% dispersante e 3-5% de surfactante). Formulações em pó têm vasta aplicação no controle de pragas do milho, porém, o uso da forma em pó apresenta restrições devido ao possível impacto no sistema respiratório do manipulador (IFOULIS; SAVOPOULOU-SOULTANI, 2004). Os bioinseticidas na forma granular podem ser na forma de aglomerados ou encapsulados, e apresentam melhor proteção contra radiação UV, chuva e vento (BRAR et al., 2006).

Tabletes de *Bacillus thuringiensis* tem sido empregados em setores de saúde pública para controle de mosquitos (BRAR et al., 2006). O pó umedecido com dispersante e surfactante demonstrou vantagens com relação ao prolongamento do tempo de atividade em campo, boa miscibilidade em água e fácil aplicação (JONES; BURGESS, 1998).

Os bioinseticidas à base de suspensões líquidas podem ser classificados em suspensões concentradas, emulsões e encapsulados (BRAR et al., 2006). Dentre as 3 formulações, os líquidos encapsulados apresentam a vantagem de ter proteção contra condições ambientais, como radiação solar e chuva, e melhoria da estabilidade devido à liberação controlada do formulado (BOK; KIM ; KWON, 1997).

Melo-Santos et al. (2001) avaliaram a eficiência de tabletes contendo princípio ativo de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. O produto apresentou atividade durante 40-45 dias na sombra e 13-35 dias expostos ao sol. Os autores concluíram que esta forma de aplicação apresenta a vantagem de ser fácil de usar, principalmente em pequenos recipientes de água, constituindo portanto, uma ferramenta útil para controle do mosquito. Gunasekaran, Prabakaran e Balaraman (2002) testaram, com êxito, a eficiência do princípio ativo de *Bacillus thuringiensis* imobilizado em alginato de cálcio. O produto foi aplicado em sachês contendo esferas de polietileno para promover a flutuação dos grânulos de alginato de cálcio.

De acordo com a Redação do Diário de Pernambuco, o Brasil terá um importante aliado contra a dengue em 2012. Após 10 anos de pesquisa um grupo de pesquisadores da Farmanguinhos desenvolveu um bioinseticida na forma de comprimido à base de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* para dissolução em caixas d'água (BRASIL, 2011).

Lee e Zairi (2006) estudaram a eficiência do *Bacillus thuringiensis* H-14 formulado na forma granular (VectoBac® ABG6511) contra larvas de *Aedes aegypti*. O produto demonstrou efetividade por 35 dias com redução de 80% das larvas empregadas.

Araújo et al. (2007), em seu estudo, compararam o desempenho de dois produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* na forma em pó e em tablete. Ambas formulações demonstraram excelentes resultados contra *Aedes aegypti*, atingindo 98-100% de morte por 6 meses meses, na sombra.

Prabakaran e Hoti (2008b) empregaram a técnica de imobilização em alginato de sódio para a preservação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por um longo período de estocagem. Soluções contendo esporo e cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* VCRC B-17 e IPS-82 foram imobilizados e preservados a 4 °C e foram observados excelentes resultados de viabilidade e toxicidade larvicida por 10 anos.

3. OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para o combate de larvas do mosquito transmissor da dengue, empregando resíduo da fabricação de biodiesel a partir de óleo vegetal.

Específicos

- Estabelecer um tratamento para o resíduo da fabricação de biodiesel, de forma a permitir o crescimento e a produção de toxina pela bactéria
- Definir a composição do meio de fermentação formulado com o resíduo tratado, avaliando-se as concentrações de glicerol, extrato de levedura, sulfato de amônio e cloreto de cálcio que proporcionem a maior atividade tóxica do meio fermentado.
- Determinar o nível de oxigênio dissolvido e a concentração inicial de substrato que proporcionam a maior atividade tóxica do meio fermentado.
- Verificar a influência do nível de oxigênio dissolvido durante a fase de esporulação da bactéria, para definir a melhor transferência de oxigênio durante esta fase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Matéria-prima

A matéria-prima empregada no presente trabalho foi o resíduo da fabricação de biodiesel a partir de óleo de soja, proveniente da indústria BIOVERDE – Indústria e Comércio de Biocombustíveis – Ltda - Taubaté – SP.

4.2 – Microrganismo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (sorotipo H-14) IPS 82, proveniente do Instituto Pasteur de Paris, foi utilizada em todos os experimentos. As culturas estoque foram obtidas junto ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro” (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

4.3 – Meio de Cultivo

O meio denominado como GLYS, cuja composição se encontra na Tabela 4.1 e baseado no meio GYS de Rogoff e Yousten (1969), foi utilizado para o preparo de inóculo, e também como base para a formulação dos meios de cultivo dos ensaios realizados no presente trabalho, com a substituição de glicose por glicerol. Ao substituir glicose por glicerol, o meio passou a ser denominado GLYS.

Para o ensaio empregando levedo de cerveja, primeiramente foi preparada uma solução de 20g/L de levedo de cerveja comercial. Após autoclavagem a 111 °C por 30 minutos, a suspensão foi filtrada em papel de filtro qualitativo esterilizado e adicionada dos sais e glicerol, de forma a apresentar a composição mostrada na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1 – Composição dos meios GYS (Rogoff e Yousten, 1969) e GLYS (empregado no presente trabalho)

Meio GYS	Meio GLYS	Concentração (g/L)
Glicose	Glicerol	10,0
Extrato de levedura	Extrato de levedura	12,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,12
MgSO ₄ .7H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
MnSO ₄ .H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O	0,09
K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	1,5
pH = 7,0		

4.4 - Condições de Cultivo

4.4.1 - Preparo da cultura estoque de esporos

As culturas estoque foram obtidas por semeadura por estria simples em superfície de meio Agar Nutriente em tubos inclinados, incubados a 30 °C por 72 h, tempo necessário para garantir a total esporulação da cultura. Os tubos foram armazenados a 4 °C e utilizados por, no máximo, seis meses.

4.4.2 - Preparo do inóculo

Uma alíquota de esporos da cultura estoque foi transferida para frasco *Erlenmeyer* de 250 mL com 50 mL de meio GLYS, cuja composição está descrita no item 4.3, com concentração de glicerol igual a 10 g/L. Os frascos foram incubados sob agitação, a 30 °C. O tempo de cultivo do inóculo correspondeu ao tempo máximo em que não se observava a formação de grumos, comportamento característico da bactéria.

4.4.3 - Ensaios de fermentação em frascos

4.4.3.1 - Ensaios em incubadora de movimento orbital

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL providos de chicanas, contendo 200 mL de meio e 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, correspondendo a 5% do volume de meio de fermentação, o qual foi ressuscitado neste próprio meio. Com esta relação de 5% era obtida uma concentração celular inicial em torno de 0,4 g/L. Os frascos foram incubados em incubadora/agitadora de movimento orbital (New Brunswick Sci. Co./Modelo Innova 4000) a 30 °C e 180 rpm. O final da fermentação correspondeu ao tempo de 2 horas após a total dissociação dos grumos de células e esporos de *Bacillus thuringiensis* formados durante a esporulação, comportamento característico da bactéria (RODRIGUES, 2005). Este parâmetro foi monitorado por observações periódicas de lâminas a fresco de amostras do cultivo, em microscópio óptico (Medilux/modelo MDL-150).

4.4.3.2 - Ensaios de fermentação em incubadora de movimento recíproco

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL sem chicanas, contendo 200 mL de meio e cobertos com fina manta de algodão e gaze presa com elástico.

A inoculação foi realizada da mesma forma que para os ensaios em incubadora de movimento orbital. Os frascos foram incubados em incubadora/agitadora de movimento recíproco (SOLAB/modelo SL 222) a 30 °C. Neste caso, foram empregadas duas velocidades de agitação: uma (86 rpm) correspondente àquela com a qual se verificava apenas o movimento ondular do meio nos frascos e outra (96 rpm) correspondente à máxima velocidade com a qual ainda se verificava movimento predominantemente ondular do meio. Ou seja, acima desta velocidade o movimento do meio se tornava circular, semelhante ao observado em incubadora de movimento orbital.

O final da fermentação foi determinado da mesma forma que nos ensaios em incubadora de movimento orbital.

4.4.4 – Ensaios de fermentação em biorreator

Os ensaios em fermentador de bancada foram realizados em equipamento BIOFLO III (New Brunswick Sci. Co.) de 1,25 L, com controle de temperatura, pH, agitação, aeração, oxigênio dissolvido e nível de espuma. O processo foi operado em sistema descontínuo, empregando-se um volume de meio de 1,0 L, temperatura de 30 °C e pH inicial igual a 7,0. O pH foi controlado automaticamente por adição de KOH 5 mol/L de modo a não atingir valores inferiores a 5,8 (BERBERT-MOLINA; SILVEIRA; SATO, 2000). A agitação e a aeração foram ajustadas de modo a se obter os valores de concentração de oxigênio desejados, ou seja, quando a concentração de oxigênio dissolvido atingia o valor desejado, este era mantido pela variação automática da frequência de agitação da turbina, mantendo-se constante a vazão específica de ar (1,25 vvm)

4.5 - Métodos Analíticos

4.5.1 - Concentração celular

Nas primeiras horas de cultivo, durante a fase vegetativa de crescimento, enquanto não se observava a formação de grumos ou inclusões no interior das células, a biomassa foi quantificada indiretamente por turbidimetria. A partir do momento em que ocorria a formação de grumos, a concentração celular foi determinada por medida de massa seca. As amostras de meio fermentado foram centrifugadas (CENTRIBIO/Modelo TDL80-2B) a 4000 rpm por 30 minutos e ressuspensas em solução salina (0,9%). Para as análises por turbidimetria, esta lavagem foi realizada duas vezes. Para as análises por massa seca, a primeira lavagem foi realizada com solução salina e a segunda com água.

Para análise por turbidimetria, medidas de absorbância (600 nm) de suspensões diluídas das células ressuspensas 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. Para as análises por massa seca, a suspensão de células foi colocada em cadinho de porcelana e deixada em estufa a 100 °C até massa constante. A diferença entre as massas do cadinho com meio fermentado seco e do cadinho vazio representou a massa de células presente em 5 mL, calculando-se, com o resultado, a concentração de células em g/L.

4.5.2 - Morfologia Celular

As variações da morfologia celular ao longo das fermentações foram acompanhadas pela observação de preparações a fresco do meio fermentado em microscópio óptico (Medilux/modelo MDL-150), com aumento de 400x, com objetiva de contraste de fase.

4.5.3 – Concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 °C, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, volume de amostra injetado igual a 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sepack C18 (MILLIPORE) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida desgaseificado com auxílio de ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

4.5.4 – Atividade larvícida do meio

A determinação da atividade tóxica dos meios fermentados foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da UENF. Foi empregada a metodologia descrita por Misch, Burnside e Cecil (1992), com algumas modificações. O teste consistiu da exposição de larvas de *Aedes aegypti*, no 4º instar de desenvolvimento (Figura 4.1) a volumes variados de meio fermentado.

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

Primeiramente foi realizado um teste piloto a fim de se definir qual a concentração mínima necessária para matar pelo menos 1 larva e a concentração máxima suficiente para não causar a morte de 100% das larvas do mosquito alvo. Esta concentração foi expressa em volume de meio fermentado por volume total utilizado no teste.

O teste consistiu em expor as larvas a volumes diferentes de meio fermentado (0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 e 1 mL) em um total de 6 mL de mistura (meio + água). Os testes foram feitos em quintuplicata. A Figura 4.2 apresenta um esquema explicativo da montagem de cada teste. A resposta de cada teste correspondeu ao número de larvas mortas em cada um dos 5 conjuntos de 5 tubos, verificado 24 horas após o início do teste.

Figura 4.2 – Esquema representativo (a) da composição de cada tubo de ensaio empregado no teste piloto e no bioensaio e (b) da estrutura do teste piloto.

Após a definição da faixa (máxima e mínima concentrações definidas no teste piloto) foram realizados os bioensaios para a determinação da Concentração Mínima Letal necessária para matar 50% de uma população de larvas (CL_{50}). O bioensaio consistiu em se testar 5 concentrações de princípio ativo, no caso, meio fermentado, da mesma forma descrita para o piloto, porém utilizando-se 10 larvas para cada concentração, sendo cada teste (grupo de 10 tubos) realizado em triplicata. Portanto, um bioensaio consiste em 150 tubos de teste. Na Figura 4.3 está representada a sequência de testes realizados para a determinação da CL_{50} . A resposta de cada teste correspondeu ao número de larvas mortas em cada um dos 15 conjuntos de 10 tubos, verificado 24 horas após o início do teste.

Figura 4.3 – Esquema representativo do bioensaio. V_1 representa o volume mínimo de meio fermentado que deve ser adicionado a 6 mL de água, suficiente para matar, no mínimo, uma larva. V_5 representa o volume máximo de meio fermentado que deve ser adicionado a 6 mL de água de modo a não causar 100% de morte das larvas.

A atividade larvicida foi expressa como a concentração necessária para reduzir a população de larvas em 50% (CL₅₀) no tempo de 24 horas. Os valores de CL₅₀ foram calculados a partir da leitura do teste, empregando-se o programa EPA PROBIT ANALYSIS versão 5.0.

4.6 - Forma de análise dos resultados

Foram avaliados o crescimento celular, o consumo de substrato e a atividade larvicida do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti*. Programas específicos de estatística foram empregados para análise das variáveis resposta mencionadas, nos casos em que um planejamento experimental tenha sido empregado. Neste caso, foram empregados os programas DESIGN-EXPERT 6.0.6 e STATISTICA 5.0. 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.

Para a análise comparativa entre os resultados obtidos de um conjunto de ensaios, assim como para a análise estatística dos resultados de CL₅₀, uma medida relativa foi utilizada. O menor volume de meio fermentado, correspondente ao melhor resultado de CL₅₀ encontrado, foi considerado 100%. Os demais resultados de CL₅₀ obtidos foram convertidos em porcentagem deste melhor valor, ou seja, CL₅₀ relativa = (menor CL₅₀ / CL₅₀ obtido) * 100. Por exemplo, considerando o melhor/menor valor de CL₅₀ igual a 0,01 mL e um outro valor de CL₅₀ igual a 0,1 mL, o ensaio em que foi obtido 0,01mL foi considerado 100%, sendo a CL₅₀ relativa para o ensaio de 0,1mL igual a 10%. Para os ensaios em que não houve morte no teste piloto com até 1 mL de meio fermentado, o valor da CL₅₀ relativa foi considerado zero.

Vale destacar que “melhores” valores de atividade larvicida significam “menores” volumes de meio necessário para a mortalidade de 50% de uma população de larvas.

Outra forma de se analisar os resultados foi o registro em gráficos das concentrações de células, de substrato, do pH, da frequência de agitação e da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, pelo Programa Labview.

A análise cinética dos resultados obtidos no estudo de definição da composição do meio e nos ensaios realizados em biorreator foi realizada empregando-se os seguintes parâmetros: fator de conversão de glicerol em células (Y_{X/S}), produtividade volumétrica em células (Q_X) e velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}).

O 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, do tempo inicial até o tempo correspondente à concentração máxima de células, conforme a equação 1:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} , \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que,

$Y_{X/S}$ = fator de conversão de glicerol em células (g/g);

X_f = concentração máxima de células (g/L);

X_i = concentração inicial de células (g/L);

S_f = concentração de glicerol (g/L) no tempo correspondente à concentração máxima de células

S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

A produtividade volumétrica em células (Q_X) foi determinada pela relação entre a variação da concentração celular e o intervalo do tempo correspondente (equação 2).

$$Q_X = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} , \quad \text{(Equação 2)}$$

em que:

Q_X = produtividade volumétrica em células (g/L.h);

X_f = concentração máxima de células (g/L);

X_i = concentração inicial de células (g/L);

Δt = intervalo de tempo até obtenção da concentração máxima de células (h).

A velocidade máxima específica de crescimento foi determinada traçando-se a equação exponencial que mais se adequou aos pontos experimentais correspondentes à fase exponencial. Portanto o conjunto de pontos experimentais que descreveram o crescimento exponencial foi determinado pela comparação dos coeficientes quadráticos (R^2) obtidos de curvas ajustadas a esses pontos. Assim, o melhor valor de R^2 obtido, ou seja, o valor mais próximo de 1 indicou qual conjunto de pontos experimentais corresponderam à fase exponencial e originaram a equação que descreve tal comportamento. Ou seja:

$$dx/dt = \mu X \longrightarrow X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{(Equação 3)}$$

Uma vez que durante o crescimento exponencial μ é constante e igual a $\mu_{\max}$, tem-se:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad \text{(Equação 4)}$$

Portanto o expoente determinado pela equação correspondeu ao valor de $\mu_{\max} \cdot t$.

4.7 – Sequência Experimental

Para melhor entender a sequência experimental empregada, na Figura 4.4 está apresentado o fluxograma que representa todas as etapas envolvidas no presente trabalho, visando o desenvolvimento de bioinseticida com o resíduo da indústria de biodiesel.

Figura 4. 4 - Fluxograma da sequência experimental empregada no presente trabalho.

4.7.1 – Ensaio Controle

Um ensaio preliminar, empregando glicerol PA e os nutrientes apresentados na Tabela 4.1, foi realizado com a finalidade de se confirmar a capacidade de *Bacillus thuringiensis* var.

israelensis de metabolizar, como única fonte de carbono, o glicerol e, desta forma, sintetizar o cristal proteico, resultando um meio fermentado com atividade larvícida.

4.7.2 – Tratamento do resíduo de biodiesel

Primeiramente ressalta-se que após a reação de transesterificação, a glicerina é separada do biodiesel por decantação, ainda na indústria, onde não recebe nenhum tratamento. O resíduo assim obtido foi submetido ao abaixamento de pH com ácido fosfórico 85%, a fim de se encontrar o valor de pH que proporcionasse separação de fases. O resíduo obtido pela decantação com este valor de pH foi denominado resíduo semi-bruto, e foi empregado em um ensaio de fermentação para se avaliar a eficiência do tratamento.

Em função dos resultados obtidos, foi necessário definir outro tratamento. Assim o resíduo foi tratado conforme proposto por Rehman et al. (2008), com algumas modificações. O tratamento iniciou-se com adição de ácido fosfórico 85%, abaixando-se o pH até 4,0, para a quebra do sabão em ácidos graxos livres e sais. 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, sendo denominada G4.

O resíduo G4 foi submetido a lavagens com n-hexanol para a remoção, principalmente, de ácidos graxos livres, os quais inibem o crescimento de bactérias (HAZELL; GRAHAM, 1990; REHMAN et al., 2008). A primeira lavagem foi realizada com n-hexanol:resíduo G4 na proporção de 1:1, seguida de decantação em funil separador, por 6 horas, para a separação do n-hexanol, ácidos graxos e outras impurezas solúveis em n-hexanol. Após a separação da camada inferior que contém o glicerol, este novo resíduo, denominado G4-Hex1, foi submetido a nova lavagem com n-hexanol, empregando-se a relação de 1:2 (n-hexanol:resíduo G4-Hex1), seguida de decantação, conforme descrito anteriormente, obtendo-se o resíduo G4-Hex2. A terceira lavagem foi realizada empregando-se a relação 1:4 (n-hexanol:resíduo G4-Hex2), sendo obtido o resíduo denominado G4-Hex3, após decantação. O resíduo G4-Hex3 foi submetido à destilação para remoção do n-hexanol, sendo obtido outro resíduo G4-Hex dest.

4.7.3 – Avaliação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em resíduo tratado

4.7.3.1 – Avaliação do resíduo semi-bruto como fonte de carbono

O resíduo bruto contém grande quantidade de impurezas, inclusive grande quantidade de sabão, que poderia dificultar o crescimento do microrganismo. Portanto, foi realizado um teste de fermentação empregando-se o resíduo tratado pelo abaixamento do pH com ácido fosfórico até 6, o qual foi denominado resíduo semi-bruto. O valor de pH 6 corresponde ao pH em que se inicia a separação de fases. Este teste teve como objetivo avaliar a real necessidade de se desenvolver tratamentos adicionais do resíduo de biodiesel para seu emprego como fonte de carbono na produção de bioinseticida. Uma vez que o custo do meio de cultura é um desafio para o processo, a redução do número de etapas de tratamento, amplia a possibilidade de obtenção de um meio economicamente viável para tal produção.

4.7.3.2 – Avaliação do resíduo tratado como fonte de carbono

Ensaio em frascos *Erlenmeyer*, conforme descrito no item 4.4.3.1, foram realizados a fim de se avaliar o desempenho da bactéria nos meios preparados com os resíduos G4, G4-Hex3 e G4-Hex dest, obtidos conforme descrito no item 4.7.2. Foi empregada uma concentração inicial de glicerol de 20 g/L e os componentes do meio GLYS.

Os parâmetros para avaliação dos resultados foram a concentração máxima de células e a atividade larvicida dos meios. Os resultados destes ensaios foram empregados para se determinar o procedimento de tratamento do resíduo a ser adotado para os ensaios subsequentes.

4.7.4 – Formulação do meio de fermentação a partir de resíduo de biodiesel

4.7.4.1 – Testes preliminares

4.7.4.1.1 – Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio

Este estudo teve como objetivo avaliar, na composição do meio GLYS, extratos de levedura de diferentes marcas comerciais (Difco, Sigma, Merck e Synth), a fim de se padronizar a fonte de nitrogênio orgânica empregada para os estudos subsequentes e, assim, minimizar interferentes. O estudo também envolveu um ensaio de fermentação empregando levedura de cervejaria, a fim de avaliar a possibilidade de se empregar esta matéria-prima, que apresenta baixo custo comparado ao extrato de levedura comercial. Devido à presença de grande quantidade de sólidos em suspensão neste extrato, foi utilizada uma solução estéril concentrada e filtrada de levedura de cervejaria. A composição do meio de cultura foi aquela referente ao meio GLYS (Tabela 4.1) e as condições de cultivo foram as descritas no item 4.4.3.1.

4.7.4.1.2 – Avaliação da perda de capacidade de produzir toxinas por *Bacillus thuringiensis*

Segundo Couch (2000) a perda da capacidade de sintetizar toxinas é uma preocupação frequente para os fabricantes de biosinceticida à base de *Bacillus thuringiensis*. Devido a este fato, e devido a alguns resultados de testes preliminares inconsistentes (dados não apresentados) foi realizado um teste para avaliar a perda da capacidade de sintetizar toxinas pela bactéria, após sucessivas repicagens.

Foram realizados 3 ensaios, denominados **d1**, **d2** e **d3**. No ensaio **d1** foram empregadas células repicadas da cultura fornecida pela UENF e armazenadas sob refrigeração por 3 meses. No ensaio **d2** foram empregadas células repicadas da cultura empregada em **d1** e armazenado por 55 dias sob refrigeração. No ensaio **d3** foram empregadas células provenientes da UENF. A composição do meio de cultura foi a apresentada na Tabela 4.1 (meio GLYS) e as condições de cultivo foram as descritas no item 4.4.3. A capacidade de produzir toxinas foi avaliada por bioensaios.

4.7.4.1.3 – Definição do sistema de agitação para os ensaios em frasco

Devido ao fato de Pessanha (2008) relatar bons resultados de produção de bioinseticida em incubadora de movimento recíproco, foram realizados ensaios de

fermentação comparando-se duas incubadoras de diferentes tipos de movimento (orbital e recíproco). O ensaio denominado **orb** foi realizado conforme descrito no item 4.4.3.1 e o ensaio denominado **recip**, com agitação de 86 rpm, foi realizado conforme o item 4.4.3.2. O meio GLYS foi empregado para os dois ensaios.

4.7.4.1.4 – Definição do tipo de frasco para o estudo da definição do meio de cultivo

Devido a excelentes resultados obtidos por Boniolo (2008), em incubadora de movimento recíproco, em frascos de 500 mL (informação verbal)³, foram realizados ensaios comparando-se frascos de 500 mL com frascos de 1 L. Ambos foram realizados com a mesma relação volume de meio por volume de frasco (1/5) e com o meio GLYS (Tabela 4.1).

4.7.4.1.5 – Avaliação da agitação em incubadora de movimento recíproco

Dois ensaios comparativos foram realizados conforme descrito no item 4.4.3.2 a fim de se determinar qual velocidade de agitação proporciona maior produção de toxinas. A condição definida foi empregada nos ensaios subsequentes.

4.7.4.2- Determinação da composição do meio de cultivo

A influência de alguns dos componentes do meio GLYS sobre o crescimento e a síntese de toxinas por *Bacillus thuringiensis* foi avaliada em ensaios em frascos agitados, nas condições descritas no item 4.4.3.2.

O estudo foi realizado segundo um planejamento fatorial 2⁴ com três repetições do ponto central, cujos níveis dos fatores estão apresentados na Tabela 4.2. As variáveis resposta utilizadas para avaliação dos resultados foram as concentrações máximas de células e a atividade tóxica do meio fermentado. Os níveis dos fatores foram definidos com base no meio GLYS (tabela 4.1).

³ Informação fornecida por Boniolo em Campos dos Goytacazes, em 2008.

Tabela 4.2 – Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^4 , para avaliação do efeito dos nutrientes (concentrações em g/L).

Fatores	Níveis		
	-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

4.7.5 - Avaliação do efeito conjunto da concentração de substrato e da concentração de oxigênio dissolvido

4.7.5.1- Definição da melhor composição de meio de cultura empregando células isoladas

Esporos contidos em uma alíquota de meio do ensaio 4, correspondente ao melhor resultado de atividade larvívora do planejamento fatorial 2^4 , foram semeados em tubo de ensaio contendo ágar-nutriente, preparados conforme descrito no item 4.4.1. Esta cultura foi usada como cultura estoque para os ensaios subsequentes.

Para determinar a composição do meio a ser empregado no planejamento em biorreator, foram realizados dois ensaios em biorreator denominados ensaio **4'**, empregando-se a composição do meio do ensaio 4, e ensaio **PC'**, empregando-se a composição do meio do ensaio correspondente ao ponto central. Na Tabela 4.3 esta apresentada a composição do meio empregada para cada um desses ensaios. A concentração de OD foi controlada para não atingir valores inferiores que 25% da saturação.

Tabela 4.3 - Composição do meio de cultura e concentração de oxigênio dissolvido empregadas nos ensaios 4' e PC', em biorreator.

Variáveis	ensaios	
	Ensaio 4'	Ensaio PC'
Glicerol (g/L)	10	20
Extrato de Levedura (g/L)	0	6,0
Sulfato de amônio (g/L)	6,0	3,0
Cloreto de cálcio (g/L)	0,24	0,12

4.7.5.2 - Avaliação da concentração de oxigênio e concentração de glicerol em biorreator

A influência da concentração inicial de substrato e da concentração de oxigênio dissolvido sobre a produção de toxina foi avaliada por ensaios em biorreator, nas condições descritas no item 4.4.4. Este estudo foi realizado segundo um planejamento fatorial completo 2^2 , com três repetições do ponto central, cujos níveis dos fatores estão apresentados na Tabela 4.4. As variáveis resposta utilizadas para a avaliação dos resultados foram a concentração máxima de células e a atividade tóxica do meio fermentado.

Tabela 4.4 – Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 , para avaliação do efeito da concentração de substrato e do nível de oxigênio dissolvido.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Glicerol (g/L)	10	20	30
OD (%sat.)	5	25	45

4.7.6 - Efeito da concentração de oxigênio dissolvido durante a fase de esporulação sobre a atividade tóxica do meio

A melhor condição obtida com os experimentos descritos no item 4.7.5.2, definida em termos de atividade larvicida, foi empregada na realização de ensaios para se determinar a

melhor condição de aeração durante a fase de esporulação, fase esta em que ocorre a síntese das endotoxinas pela bactéria. Os ensaios foram realizados em biorreator, conforme descrito no item 4.4.4, e foram avaliados quatro níveis de oxigênio dissolvido no meio: 5%, 25%, 75% e 90%. Estes valores foram ajustados no tempo correspondente ao início da fase III de crescimento do *Bacillus thuringiensis*, conforme descrita por Berbert-Molina et al. (2008). A avaliação dos resultados foi feita em função do crescimento e da atividade tóxica do meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio controle

Primeiramente foi realizado um ensaio empregando-se glicerol PA como fonte de carbono para verificar a capacidade da bactéria de metabolizar o glicerol e produzir células e toxinas. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2.

Figura 5.1 - Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerol PA como substrato.

Observa-se que *Bacillus thuringiensis* consome, em pouco mais de 20 horas, todo o glicerol adicionado, chegando a uma concentração celular máxima em torno de 10,0 g/L. Barbosa (2009) obteve uma concentração máxima de células de *Bacillus thuringiensis* em torno de 9,7 g/L quando empregado glicerol PA como fonte de carbono e a mesma composição do meio de cultura (Tabela 4.1). Porém, a velocidade de consumo de substrato no presente trabalho foi maior do que a obtida pelo autor, uma vez que com 20 horas de fermentação ainda restavam no meio fermentado 40% da quantidade inicial de glicerol ($S_0 = 22$ g/L).

Com relação à toxicidade, na Figura 5.2 encontra-se a leitura do bioensaio, com a qual foi determinado o volume de meio fermentado correspondente à CL_{50} , sendo obtido o valor de

0,35 mL por 6 mL de mistura. Este resultado foi utilizado para comparação com os demais resultados obtidos durante o trabalho.

Figura 5.2 - Número de larvas mortas em função da concentração de meio fermentado (em triplicata) em bioensaios realizados com meio contendo glicerol P.A.

5.2. Tratamento e avaliação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em resíduo semi-bruto e resíduo tratado

O resíduo obtido da indústria de biodiesel (Bioverde) apresenta as características apresentadas na Tabela 5.1, segundo laudo fornecido pela empresa.

Tabela 5.1 – Análise físico-química do resíduo da produção de biodiesel a partir de óleo vegetal segundo laudo fornecido pela indústria Bioverde.

Item	Unidade	Resultado
Glicerol	(%) Peso	70,61
Água	(%) Peso	1,70
Voláteis	(%) Peso	5,02
pH (50 °C)	-----	8,6
Densidade (25/4 °C)	g/cm ³	1,19
Outros	(%) Peso	22,67
Aspecto	-----	Viscoso, escuro

Primeiramente foi avaliada a necessidade de se tratar este resíduo para o seu emprego como substrato para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Para tanto, o resíduo foi tratado com ácido fosfórico até atingir pH = 6 e deixado em decantação por 12 horas, a fim de se remover as principais impurezas.

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 partes de ácidos graxos e outras impurezas da fase do glicerol (KNOTHE; GERPEN, 2006).

Apenas quando a mistura de resíduo bruto e ácido atingiu o pH 6 foi verificada separação de fases. A fase inferior foi removida e empregada como fonte de carbono para o cultivo da bactéria.

Como se pode observar (Figura 5.3), quando o resíduo semi-bruto é empregado como substrato não há crescimento nem consumo do substrato pela bactéria, o que indica que compostos tóxicos permaneceram na fase do glicerol, interferindo no crescimento da bactéria.

Neste caso, a hipótese de ter ocorrido inibição pelo substrato é descartada, uma vez que a concentração empregada não compromete o seu consumo nem o crescimento da bactéria, conforme constatado pelo cultivo com glicerol PA (Figura 5.1).

Portanto, foi comprovada a necessidade de se desenvolver um tratamento para o resíduo em estudo, de modo a viabilizar seu emprego para a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*.

Rivaldi (2008) determinou que o melhor tratamento com ácido fosfórico da glicerina obtida da produção de biodiesel a partir de óleo de soja foi com abaixamento do pH até 4, com o objetivo de produzir biomassa e ribonucleotídeos por levedura. Portanto, um estudo mais detalhado foi realizado, empregando-se o pH 4 como primeira etapa do tratamento, conforme descrito no item 4.7.2.

A Figura 5.4 mostra a separação de fases do resíduo com o pH reduzido até 4 com ácido fosfórico. Pode-se observar a interface entre as fases superior, que corresponde à fase apolar (principalmente ácidos graxos insaturados) e inferior, que corresponde à fase polar (glicerol e outros resíduos).

Figura 5.3 - Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio empregando resíduo semi-bruto PA como substrato.

Figura 5.4 - Aspecto da mistura após o final da etapa de decantação (24h) do resíduo submetido a abaixamento de pH até 4.

Como exemplo, na Figura 5.5 mostra-se a primeira etapa do tratamento com hexanol (1:4). A fase inferior, que corresponde ao glicerol, foi denominada resíduo G4-Hex 1.

Figura 5.5 - Aspecto da mistura após a decantação (6h) do resíduo submetido à primeira etapa do tratamento por extração com hexanol.

Após obtido o resíduo denominado G4-Hex, uma parte deste foi submetida à destilação para a remoção de hexanol remanescente, o qual pode interferir no metabolismo de microrganismos, conforme mencionado por Rehman et al. (2008).

Uma alíquota de cada resíduo obtido foi coletada para análise visual, como se pode observar na Figura 5.6.

Figura 5.6 - Aspecto do resíduo após cada etapa de tratamento. Da esquerda para a direita: resíduo cru, resíduo após abaixamento de pH até 4 seguido de decantação (G4), resíduo após primeira etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 1), resíduo após segunda etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 2), resíduo obtido após terceira etapa de tratamento com hexanol seguido de decantação (G4-Hex 3) e resíduo tratado com hexanol e submetido à destilação (G4-Hex dest.).

Pode-se observar pela Figura 5.6 que com o abaixamento do pH seguido de decantação foi removida uma parte dos pigmentos e impurezas (G4), sendo o restante dos pigmentos removidos após tratamento com hexanol. Após cada uma das etapas de tratamento foram obtidas as seguintes concentrações de glicerol e suas respectivas purezas: G4 1.123 g/L (91,3%), G4-Hex-3 994 g/L (81%) e G4-Hex dest. 1.144 g/L (93%), considerando a densidade do glicerol igual a 1,23 g/mL para o cálculo da % de pureza.

Considerando os valores fornecidos pelo laudo da empresa (Tabela 5.1), pode-se verificar que foi possível remover uma quantidade significativa de impurezas, passando de uma pureza de 70,6% para 93%. Rivaldi (2008) empregou ácido fosfórico para tratamento de glicerina proveniente da fabricação de biodiesel com óleo de soja, obtendo uma concentração de glicerol de 914 g/L, com acidificação até pH 4, ou seja, 18,6 % menos do que a concentração obtida para G4. Barbosa (2009) utilizou abaixamento de pH até 4 com ácido fosfórico, seguido de aquecimento, para tratar o resíduo da fabricação de biodiesel com matéria-prima de origem animal e obteve uma concentração de glicerol em torno de 1.180 g/L de glicerol, valor similar ao obtido para G4.

Os resíduos tratados denominados G4, G4-Hex e G4-Hex dest. foram empregados em ensaios de fermentação em frascos agitados, conforme descrito no item 4.7.3.2. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.7 a 5.12.

Quando empregado o resíduo tratado com abaixamento do pH até 4, ocorreu consumo de glicerol e crescimento celular, ao contrário do observado quando empregou-se o resíduo semi-bruto (Figura 5.3), como pode ser observado na Figura 5.7. Isto indica que com o abaixamento do pH até 4 foi possível remover compostos tóxicos ou inibitórios do crescimento celular que não foram removidos com o abaixamento do pH até 6.

Observa-se, também, que a concentração de glicerol aumenta nas primeiras 15 horas de fermentação, aumento este acompanhado de baixo crescimento celular, comparado com o meio contendo glicerol P.A. (Figura 5.1). Segundo Arnaud e Guiraud (1985) algumas bactérias produzem lipases que são capazes de degradar moléculas de lipídeos em glicerol e ácido graxo. Tal fato pode explicar o aumento da concentração de glicerol observada, uma vez que, apesar do tratamento empregado, podem estar presentes alguns trigliceróis que não foram removidos. Possivelmente, nestas primeiras 15 horas, a velocidade de degradação de lipídeos é maior que a velocidade de consumo de glicerol. Considera-se neste caso, também a possibilidade de a bactéria consumir carboidratos provenientes do extrato de levedura.

Figura 5.7 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio empregando resíduo G4.

Outro fato a destacar é que, nesta condição, a bactéria não foi capaz de consumir todo o substrato presente no meio. Logo, ainda restavam no meio de fermentação 14 g/L de glicerol quando foi observado por microscopia apenas células livres e esporuladas (fim de fermentação). Algum fator, que não o esgotamento de substrato e nutrientes provocou a esporulação celular, pois nos demais ensaios, G4-Hex 3 (Figura 5.9) e G4-Hex Dest (Figura 5.11) houve consumo total de substrato, apesar de terem sido utilizadas as mesmas composições de meio quanto aos demais nutrientes. Provavelmente algum composto não removido apenas com o tratamento G4 foi responsável pela esporulação.

Ainda com relação ao resíduo G4, após 20 horas foi observado intenso consumo de substrato, até 48 horas de fermentação. Já a concentração celular manteve-se constante após 25 horas de fermentação, indicando que o substrato consumido foi direcionado para outras funções celulares, como manutenção e formação de esporos, e não para formação de biomassa.

Na Figura 5.8 apresenta-se a morfologia celular em diferentes tempos de cultivo, quando se empregou o resíduo G4. Verifica-se que houve crescimento e esporulação, porém não foram observadas as fases de crescimento bem definidas. Berbert-Molina et al. (2008) dividiram o desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 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 das células (formação de grumos). Na fase III esta floculação é bastante intensificada, havendo aumento no tamanho dos grumos, poucas células isoladas e presença de esporos.

Figura 5.8 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por *Bacillus thuringiensis*, empregando o resíduo G4 como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x)

Com o abaixamento do pH até 4 não estão mais presentes os resíduos de sabão de ácidos graxos, e toda base utilizada como catalizador na reação de trans-esterificação (quando da fabricação do biodiesel) foi removida, pois, ao submeter o resíduo a uma titulação, não foi consumido ácido clorídrico (dados não apresentados). Porém, segundo Rehman et al. (2008), os óleos vegetais são compostos por gorduras insaturadas e, durante a reação de trans-esterificação, são formados ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico, que interferem

na viabilidade celular. Estes ácidos não são removidos na etapa de decantação, o que pode ter prejudicado o crescimento. Segundo os autores, tais ácidos são removidos facilmente com a utilização de hexanol.

Em seguida, foram testados os resíduos submetidos aos tratamentos com hexanol (G4-Hex), e aquele submetido à destilação à vácuo para a remoção do hexanol (G4 Hex dest.). Na Figura 5.9 estão apresentados os resultados da fermentação realizada com o resíduo G4-Hex, e, na Figura 5.10, mostram-se as características morfológicas da bactéria em diferentes tempos de cultivo, para este ensaio.

Figura 5.9 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio empregando resíduo tratado G4-Hex.

Observa-se que o glicerol foi totalmente consumido em menos de 30 horas. Neste ensaio não foi observado aumento da concentração de glicerol no início da fermentação, o que confirma a hipótese de que os triglicerídeos permaneceram no meio quando o resíduo não foi tratado com hexanol, sendo degradados para formação de glicerol pelas células. Neste caso foram observadas as fases de crescimento celular bem definidas (Figura 5.10).

Figura 5.10 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por *Bacillus thuringiensis*, empregando o resíduo G4-Hex como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x)

Os resultados obtidos da fermentação realizada empregando-se o resíduo G4-Hex dest. estão apresentados nas Figuras 5.11 e 5.12.

A velocidade de consumo de glicerol neste caso foi maior que no ensaio com o resíduo G4-Hex, pois uma maior quantidade de substrato foi consumida (24 g/L) em praticamente o mesmo tempo de fermentação (Figuras 5.9 e 5.11).

Pela Figura 5.12 verifica-se que as fases de crescimento da bactéria foram bem definidas: crescimento de células isoladas (A), início de formação dos grumos (B), grumos bem definidos (C) e células livres e esporos livres (D), conforme descrito por Berbert-Molina et al. (2008).

Figura 5.11 – Concentração de glicerol e de células em função do tempo de fermentação durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio empregando resíduo tratado G4-Hex dest.

Figura 5.12 – Microscopia ótica de amostras de meio, durante a fermentação por *Bacillus thuringiensis*, empregando o resíduo G4-Hex-dest. como substrato, nos tempos de fermentação: 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) e 48 h (D). (400x)

Para melhor analisar os resultados, gráficos de concentração de glicerol e de células em função do tempo foram construídos para os três ensaios (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Concentração de glicerol (a) e de células (b) em função do tempo de fermentação, para análise comparativa dos ensaios G4, G4-Hex e G4-Hex dest.

A partir destes ensaios pode-se observar que *Bacillus thuringiensis* não sofre inibição por hexanol, uma vez que a remoção deste composto acarretou maior concentração celular, porém, acompanhada de maior consumo de substrato. Pode-se observar que ambos os ensaios (com G4-Hex e com G4-Hex dest.) apresentaram perfis semelhantes de consumo de substrato, o que indica que a presença de hexanol não provoca alterações das funções celulares, uma vez que o fator de conversão de substrato em células foi igual nos dois casos (0,80 g/g). O cálculo de $Y_{x/s}$ para o ensaio G4 foi prejudicado devido ao aumento da concentração de glicerol no meio de fermentação.

Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento baseado no procedimento descrito por Rehman et al. (2008) (item 4.7.2) é adequado para purificar o resíduo da fabricação de biodiesel de forma que este possa ser empregado para formular meio de cultivo para o crescimento da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Nas Figuras 5.14 a 5.16 são apresentados os valores de toxicidade do meio fermentado, em teste piloto, para cada um dos ensaios.

Figura 5.14 - Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando se empregado meio preparado com glicerol G4 na fermentação.

Figura 5.15 - Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado meio preparado com glicerol G4-Hex 3 na fermentação.

Figura 5.16 - Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado meio preparado com glicerol G4-Hex dest. na fermentação.

Apesar de a concentração celular ter atingido maiores valores nos ensaios com glicerol G4-Hex e G4-Hex dest., a maior atividade lavicida foi encontrada para o meio fermentado com o resíduo G4 (Figura 5.14). Portanto, o tratamento do glicerol residual definido neste trabalho como o mais adequado para produção de bioinseticida é o de redução do pH até 4,0 com ácido fosfórico 85%, seguida de decantação por 24 horas.

Este resultado indica que componentes do glicerol residual da fabricação de biodiesel a partir de óleo de soja prejudicam o crescimento e o consumo de substrato por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, porém, proporcionaram condições que estimulam a produção de toxinas pela bactéria.

Barbosa (2009) também identificou dois tratamentos diferentes de glicerol oriundo da fabricação de biodiesel de sebo bovino para otimizar o crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* e a toxicidade do meio fermentado. O autor obteve maior concentração celular quando o resíduo foi tratado com ácido fosfórico até pH igual a 4 seguido de aquecimento. Quanto à toxicidade, o melhor tratamento estabelecido foi o abaixamento do pH com ácido fosfórico 85% até 7,0 seguido de aquecimento. Portanto, os resultados obtidos no presente

trabalho e os resultados apresentados por Barbosa (2009) confirmam o fato de a produção de toxinas não estar associada ao crescimento celular.

5.3. Definição da composição do meio para produção de bioinseticida

5.3.1. Testes preliminares

Antes de se iniciar o estudo da composição do meio, conforme previsto no item 4.7.4.2, foram realizados testes preliminares a fim de se definir algumas condições de cultivo e diminuir efeitos de fatores que pudessem interferir nas respostas obtidas com o planejamento estatístico.

5.3.1.1. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio orgânico (diferentes marcas de extrato de levedura e levedo de cerveja)

O objetivo deste teste foi avaliar a influência de diferentes marcas de extratos de leveduras sobre o desempenho da bactéria. A primeira diferença detectada foi na coloração do meio de cultura, antes mesmo da esterilização, conforme pode ser observado na Figura 5.17, fato que sugere uma diferença na composição dos produtos comerciais testados.

Figura 5.17 – Meios de cultura formulados com extratos de levedura de diferentes marcas.

Meios preparados com cada um dos extratos de levedura indicados e com glicerol tratado (G4) foram empregados para fermentação, nas condições definidas no item 4.7.4.1.1. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.18 (concentração de substrato), 5.19 (concentração celular), 5.20 (pH) e 5.21 a 5.22 (atividade larvicida do meio).

Na Figura 5.18 notam-se diferentes perfis de consumo de substrato, considerando os cultivos realizados com os respectivos extratos de levedura. O extrato de levedura da marca Difco foi o que proporcionou uma maior velocidade de consumo, uma vez que a curva apresentou maior inclinação comparada com as demais. Porém, de uma maneira geral, com 20 horas de fermentação havia menos de 4 g/L de substrato em todos os meios. Os resultados indicam que todos os extratos de levedura testados, na concentração empregada, fornecem nitrogênio em quantidade suficiente para que a bactéria possa consumir todo o substrato do meio. Por outro lado, fica evidente a diferença entre estes produtos, considerando a velocidade global de consumo de substrato proporcionada por cada um. Por exemplo, para o extrato de levedura Difco a velocidade global de consumo de substrato foi igual a 1,10 g/L.h, enquanto que para o extrato de levedura Synth foi de 0,78 g/L.h

Prabakaran e Hoti (2008a) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio oriundos de peptonas e extratos de levedura de diferentes marcas comerciais para o crescimento e a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Foram obtidos resultados significativamente diferentes, quando empregados peptona e extrato de levedura com alto teor de proteína (4,78 g/L de células e uma CL₅₀ de 18,52 ng/mL), e quando empregados peptona e extrato de levedura com baixo teor de proteína (1,64 g/L de células e CL₅₀ igual a 27,01 ng/L).

No ensaio em que se empregou levedo de cerveja, com 23 horas de fermentação foram observadas as características morfológicas (células livres) que determinam o fim da fermentação. Observa-se que não houve consumo total de glicerol, sugerindo que, neste caso, a quantidade de nitrogênio fornecida foi insuficiente para promover o consumo total do substrato.

Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) avaliaram o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* com 2,5 % (m/v) de glicose e levedo de cerveja 1% (m/v) comparado com extrato de levedura comercial da marca Difco. Quando empregado levedo de cerveja também foi observada baixa concentração celular e incompleta utilização da glicose. Segundo os autores, o meio composto com levedo de cerveja possivelmente contém baixas concentrações de compostos chaves, principalmente ferro, para o crescimento, e sua exaustão ocasionaria limitação do crescimento celular e ineficiente consumo do substrato. Já no ensaio

empregando extrato de levedura da marca Difco os autores verificaram maior velocidade de consumo e consumo total de glicose no tempo final de fermentação, assim como maior concentração celular, comparados com ensaios com levedo de cerveja.

Figura 5.18 – Concentração de glicerol em função do tempo durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.

Com relação ao crescimento, nota-se uma semelhança entre os valores de concentração celular máxima obtidos quando se emprega extrato de levedura das Marcas Sigma, Difco e Merck: valor médio de 11 g/L com cerca de 20 horas de fermentação (Figura 5.19).

As diferenças mais evidentes foram identificadas quando empregado extrato de levedura da marca Synth e levedo de cerveja, sendo que, para este último, a concentração celular máxima foi em torno de 5,5 g de células/L, representando um valor 50% menor que a média mencionada anteriormente.

Figura 5.19 – Concentração celular em função do tempo durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.

Quando se compara a variação do pH em função do tempo de fermentação ficam evidentes as diferenças no comportamento da bactéria, conforme mostrado na Figura 5.20. Para todos os extratos de levedura o pH cai nas primeiras 5 horas de fermentação. Neste momento as células estão crescendo dispersas no meio, sem formação de grumos. Segundo Yezza et al. (2005) em cultivo em sistema descontínuo, na fase de crescimento vegetativo, a fonte de carbono é metabolizada principalmente via Embden-Meyerhof-Parnas, com formação de intermediários como acetato, o que explica o abaixamento do pH. Durante a fase de transição e esporulação de *Bacillus thuringiensis*, o ácido acético formado no meio é assimilado pela bactéria via ciclo de Krebs e, posteriormente, utilizado para síntese de polissacarídeos de reserva (BENOIT et al., 1990).

Figura 5.20 – pH em função do tempo durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerina residual tratada como fonte de carbono (G4) e empregando diferentes fontes de nitrogênio orgânico.

Até 5 horas de fermentação é observado um comportamento semelhante entre os extratos de levedura Difco, Sigma e Merck. Nestes casos, após 5 horas de fermentação há uma oscilação do pH, voltando este a atingir valores muito próximos ao do valor inicial, ao fim da fermentação.

Para o extrato de levedura Synth é observada uma drástica queda no pH após 10 horas de fermentação, atingindo valores abaixo do relatado como crítico para o crescimento de *Bacillus thuringiensis* (BERNHARD; UTZ, 1993). Saksinchai, Supphantharika e Verduyn (2001), ao empregarem levedo de cerveja como fonte de nitrogênio para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*, observaram baixos valores de pH durante a fermentação, atingindo valores em torno de 4,7, devido à intensa produção de ácidos carbônicos, como o ácido acético. Com o extrato de levedura Difco, o pH apresentou uma diminuição nas primeiras horas, atingindo valores em torno de 5,4, seguido de um aumento até atingir novamente valores próximos ao do início da fermentação e baixa formação de subprodutos. Os autores sugerem que diferenças nas composições das fontes de nitrogênio acarretam desvios nas vias metabólicas o que pode explicar diferentes comportamentos de pH para diferentes fontes de nitrogênio ocorridas no presente trabalho.

Com relação à atividade larvica, pode-se observar que a composição do extrato de levedura, que varia de acordo com a marca empregada, apresenta nítida influência na produção das proteínas que compõem o bioinseticida (Figuras 5.21 a 5.24).

Figura 5.21 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Difco na composição do meio de fermentação

Quando o extrato de levedura Difco foi empregado como fonte de nitrogênio orgânico, obteve-se 100% de morte das larvas nos testes com 0,6 mL de meio fermentado em 6 mL de mistura (Figura 5.21).

Para o extrato de levedura Merck (Figura 5.22), em nenhum dos testes foi atingido 100% de morte de larvas. O teste com a maior proporção de meio fermentado (1 mL/6mL) só apresentou 80% de morte.

Figura 5.22 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Merck na composição do meio de fermentação.

Figura 5.23 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado levedo de cerveja na composição do meio de fermentação.

Para o experimento realizado com levedo de cerveja foi obtido 100% de morte no teste realizado com 0,4 mL de meio fermentado em 6 m/L de mistura (Figura 5.23). Porém, essa atividade larvicida diminuiu nos testes com maiores proporções de meio de fermentação. O meio fermentado contendo este tipo de fonte de nitrogênio orgânico contém uma grande quantidade de sólidos em suspensão, o que possivelmente prejudicou a ingestão da toxina pela larvas. Este resultado é interessante, pois indica que o levedo de cerveja pode ser um potencial substituto para fontes de nitrogênio orgânico de alto custo, porém, um estudo mais detalhado deve ser realizado. Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) obtiveram bons resultados ao utilizar levedo de cerveja, evidenciando também a possibilidade do emprego desta fonte de nitrogênio mais econômica. Porém seu estudo foi realizado com glicose. Nenhum outro estudo foi encontrado na literatura abordando o emprego do levedo de cerveja como suplemento em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Na Figura 5.24, que apresenta os resultados para o ensaio com extrato de levedura Sigma, observa-se morte de 100% das larvas quando empregado 0,6 mL de meio fermentado, valores semelhantes aos encontrados no experimento empregando extrato de levedura da marca Difco. A diminuição da % de morte quando empregado 1 mL de meio fermentado no teste piloto pode ser explicada da mesma forma que os resultados obtidos no teste piloto com levedo de cerveja. Uma maior concentração de meio fermentado pode dificultar a ingestão dos cristais pela larva, diminuindo a eficiência do bioinseticida. Porém, este resultado não prejudica a utilização deste extrato de levedura, uma vez que o objetivo é utilizar concentrações menores possíveis de bioinseticida e nunca trabalhar com excesso do composto.

No experimento empregando extrato de levedura da marca Synth não foi verificada atividade larvicida em nenhum dos testes realizados. Este fato sugere que a queda do pH atingiu valores prejudiciais às células, no que se refere a síntese de toxinas. Segundo Bernhard e Utz (1993), *Bacillus thuringiensis* não sofre significativa influência no crescimento em valores de pH entre 5,5 e 8,5, porém, valores abaixo de 5,5 podem acarretar danos às células. Isto justificativa o menor crescimento celular e o fato de não haver a produção das proteínas que compõem o bioinseticida.

Figura 5.24 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado extrato de levedura Sigma na composição do meio de fermentação.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, extrato de levedura de ambas as marcas, Difco e Sigma, podem ser empregados para o processo em estudo, sem diferenças que comprometam os resultados. Para os experimentos subsequentes foi empregado o extrato de levedura da marca Sigma.

5.3.1.2. Avaliação da perda de atividade

Estudos realizados por Carlton e Gonzalez (1985) revelaram a existência de correlação entre a produção de δ -endotoxinas e a presença de plasmídeo em *Bacillus thuringiensis*. De acordo com Couch (2000) *Bacillus thuringiensis* pode perder e trocar plasmídeo durante o cultivo. Por isso, os fabricantes de bioinseticida à base desta bactéria limitaram o número de passagens entre o frasco inicial e o tanque de fermentação. Portanto, a perda de plasmídeo é um risco real para processos industriais envolvendo *B. thuringiensis*, podendo-se produzir uma grande quantidade de meio fermentado sem atividade. Assim, um estudo preliminar sobre perda de atividade larvicida pela bactéria foi realizado.

O ensaio 1 foi realizado com células repicadas de uma cultura fornecida pela UENF (**d1**), o ensaio 2 foi realizado com células repicadas da cultura empregada em d1 (**d2**), e o terceiro experimento foi realizado com células não repicadas (**d3**), conforme descrito no item 4.7.4.1.2. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.25 a 5.30.

Figura 5.25 – Concentração celular em função do tempo de fermentação, durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerina residual tratada, empregando diferentes culturas estoque para o preparo de inóculo.

Verifica-se que o perfil de crescimento foi similar nos três casos (Figura 5.25), porém, com a cultura que não foi repicada (**d3**), a concentração celular máxima atingida foi nitidamente inferior, assim como o consumo de substrato foi mais lento (Figura 5.26).

O perfil de variação do pH apresentou um comportamento característico, conforme relatado por outros autores (YEZZA et al., 2005; BERBERT-MOLINA et al., 2008; BARBOSA, 2009), nos casos de **d2** e **d3**. O comportamento ocorrido com a cultura do requipe **d1** foi o que menos se assemelhou ao comportamento característico (Figura 5.27).

Figura 5.26 – Concentração de glicerol em função do tempo de fermentação, durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerina residual tratada, empregando culturas estoque para o preparo de inóculo.

Figura 5.27 - pH em função do tempo de fermentação, durante cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerina residual tratada, empregando diferentes culturas estoque para o preparo de inóculo.

Quanto à atividade larvícida, foi obtido um valor muito superior quando foram empregadas as células não repicadas (Figura 5.30).

Figura 5.28 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado células da cultura 1 (d1).

Figura 5.29 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, quando empregado células da cultura 2 (d2).

Figura 5.30 – Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado em um total de 6 mL de mistura empregando-se meio de cultivo realizado com células 3 (**d3**).

Sarrafzadeh et al. (2007) realizaram estudos comparativos com cepas de *Bacillus thuringiensis* H-14 com e sem o plasmídeo responsável pela síntese das δ -endotoxinas (Cry+ e Cry⁻, respectivamente). Verificou-se que a cepa Cry⁻ apresentou crescimento mais rápido e não houve formação de grumos. De acordo com os autores, a formação de grumo é explicada pelo fenômeno de conjugação. Supondo-se desta forma, que as células sem plasmídeo não teriam a necessidade de realizar conjugação e, portanto, não formariam grumos e cresceriam mais rapidamente.

Pela análise morfológica das amostras de fermentação dos ensaios **d1**, **d2** e **d3** foi possível identificar a formação de grumos em todos os meios. Isto está coerente porque, apesar da menor produção de toxinas nos meios **d1** e **d2**, todos os ensaios apresentaram toxicidade (Figuras 5.28 e 5.29).

Verifica-se que os meios com menor atividade larvívora (Figuras 5.28 e 5.29) apresentaram maior crescimento e crescimento mais rápido (Figura 5.25) associados a uma maior velocidade de consumo de substrato (Figura 5.26). Tal fato sugere que parte das células não apresentava o plasmídeo, o que fez com que o crescimento fosse mais rápido e a produção de toxina fosse consideravelmente menor.

Em função destes resultados, optou-se por utilizar uma única cultura para todos os experimentos e não realizar repique no laboratório.

5.3.1.3 - Definição do sistema a ser utilizado (incubadora de movimento orbital e Erlenmeyer com chicanas ou incubadora de movimento recíproco e Erlenmeyer sem chicana)

Devido a resultados de outros trabalhos empregando-se incubadora de movimento recíproco no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (PESSANHA, 2008), os quais relataram excelentes resultados de atividade larvicida, foram realizados testes comparando-se a incubadora de movimento recíproco com a de movimento orbital.

A composição do meio de cultura foi a mesma em ambos os experimentos. Na incubadora de movimento orbital foi empregado frasco *Erlenmeyer* com chicanas e uma agitação de 180 rpm e na de movimento recíproco, frasco *Erlenmeyer* sem chicanas e uma agitação de 86 rpm. A agitação de 86 rpm foi escolhida após estudo da movimentação do meio de fermentação no frasco. Para agitações superiores a este valor, era observada uma tendência de movimento circular do meio. Os resultados obtidos de crescimento celular, consumo de substrato e atividade larvicida, estão apresentados nas Figuras 5.31 a 5.35.

Figura 5.31 – Concentração celular em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (Xrecip) e em incubadora de movimento orbital (Xorb).

Figura 5.32 – Concentração de glicerol em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (Srecip) e em incubadora de movimento orbital (Sorb).

Na incubadora de movimento circular ocorreu uma maior velocidade de crescimento, assim como de consumo de substrato (Figuras 5.31 e 5.32). Além disso, esta condição proporcionou o perfil de crescimento característico da bactéria, ao contrário do ensaio em incubadora de movimento recíproco.

Com relação ao perfil de pH (Figura 5.33), foram obtidos comportamentos muito semelhantes entre os ensaios. Foi observado uma redução de pH nas primeiras horas, possivelmente devido a produção de ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido succínico e lático (KRAEMER-SCHAFHALTER; MOSER, 1996), seguida de um aumento (provavelmente ocasionado pelo consumo dos ácidos produzidos) e atingindo, no caso do ensaio em incubadora de movimento orbital, valores próximos ao inicial. Tal comportamento foi observado por vários autores quando empregado glicose como substrato (MORRIS et al., 1996; ROWE; MARGARITIS; WEI, 2003; PESSANHA, 2008). De acordo com Saksinchai, Supphantharika e Verduyn (2001), em meios contendo extratos de levedura, o aumento do pH é ocasionado também pela liberação de amônia durante a desaminação de aminácidos.

Porém, o pH voltou a cair e a aumentar, diferente dos perfis relatados pelos autores, mas similar ao perfil de pH obtido por Rodrigues (2009), quando utilizou como fonte de carbono açúcares redutores no xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi. Esta

variação no perfil de pH pode ser atribuída ao metabolismo de glicerol utilizado no presente trabalho e dos outros açúcares presentes no xarope empregado por Rodrigues (2009), ao invés de glicose.

Pela Figura 5.33 verifica-se que em incubadora de movimento recíproco ocorreu uma maior variação de pH que em incubadora de movimento orbital, provavelmente devido ao fato de as células terem produzido uma maior quantidade de sub-produtos, pois como pode-se observar na Figura 5.32, havia uma maior concentração de glicerol disponível no meio de fermentação, uma vez que glicerol foi produzido nas primeiras horas de fermentação.

Neste caso, pode-se considerar, também, que a condição de transferência de oxigênio proporcionada pelo sistema frasco sem chicanas e movimento recíproco favorece a síntese de lipases pela bactéria.

Figura 5.33 – pH em função do tempo de fermentação para os ensaios em incubadora de movimento recíproco (pHrecip) e em incubadora de movimento orbital (pHorb).

Contudo, a atividade larvívora do meio foi nitidamente superior no ensaio em que se empregou agitação recíproca. Neste caso, houve 100% de morte das larvas até mesmo com a menor proporção de meio por volume de mistura (Figura 5.35).

Figura 5.34 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se incubadora de movimento orbital.

Figura 5.35 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se incubadora de movimento recíproco.

O fato dos resultados de atividade larvicida terem sido melhores em incubadora de movimento recíproco pode ser explicado pela maior adequação da transferência de O₂ durante a fase de síntese de toxina, quando comparado com a agitação orbital. Esta hipótese é sustentada por resultados de trabalhos encontrados na literatura, demonstrando a importância da aeração no processo em estudo (GHRIBI et al., 2007).

Portanto, escolheu-se a incubadora de movimento recíproco para a realização do estudo da composição do meio de cultura empregando o planejamento estatístico.

5.3.1.4 - Definição do tipo de frasco para o estudo de composição do meio de cultivo

A fim de se avaliar se o frasco *Erlenmeyer* afeta a síntese de toxinas, realizou-se um teste empregando frasco *Erlenmeyer* de 1 L com 200 mL de meio de fermentação e outro com frasco *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL de meio. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.36 a 5.42.

Figura 5. 36 – Concentração celular em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L.

Pela Figura 5.36 nota-se que não houve uma nítida diferença de crescimento celular quando se emprega os frascos de diferentes volumes. Além de o perfil das curvas ser semelhante, nos dois casos a concentração celular máxima foi cerca de 10 g/L.

Figura 5.37 – Concentração de glicerol em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L.

Pelos resultados de concentração de glicerol (Figura 5.37) verifica-se que também não ocorre influência dos sistemas adotados sobre o consumo de substrato, havendo o consumo total deste com cerca de 28 horas de fermentação.

Para o pH, também foram obtidos comportamentos semelhantes com os dois frascos (Figura 5.38).

Figura 5.38 – pH em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, em frasco de 500mL e frasco de 1L.

Nas Figuras 5.39 a 5.42 estão apresentados os valores de porcentagem de morte de larvas submetidas a diferentes concentrações de meio fermentado, para os ensaios com os frascos de diferentes volumes.

Figura 5.39 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 500 mL.

Figura 5.40 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 1 L.

Figura 5.41 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 500 mL.

Figura 5.42 – Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, empregando-se frasco de 1L.

Observa-se que os meios provenientes de ambos os ensaios apresentaram 100% de morte no teste piloto para a faixa de 0,2 a 1 mL de meio fermentado (Figuras 4.39 e 4.40). Portanto, houve a necessidade de diminuir a concentração de meio no teste piloto para possibilitar a diferenciação das duas condições em termos de atividade larvicida. Assim, uma nova faixa foi estudada (0,01 a 0,05 mL). Na Figura 5.42 verifica-se que para o ensaio realizado em frasco de 1 L ocorreu 100% de morte das larvas para todas as concentrações estudadas, enquanto que, para o ensaio realizado em frasco de 500 mL, o maior volume de meio fermentado proporcionou apenas 80% de morte (Figura 5.41). Portanto, o frasco de 1 L apresentou melhores resultados e foi empregado para os ensaios do planejamento estatístico.

5.3.1.5- Avaliação da agitação em incubadora de movimento recíproco

Neste estudo foi avaliada a influência da frequência de agitação em incubadora de movimento recíproco sobre o crescimento de *Bacillus thuringiensis* e a toxicidade do meio fermentado. Apesar de agitações superiores a 86 rpm apresentarem tendência a um

movimento circular do líquido (análise visual), um ensaio com maior agitação foi realizado (96 rpm). Em agitações superiores a 96 rpm fica evidenciado um movimento circular no meio de fermentação, similar ao movimento obtido em incubadora de movimento orbital. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.43 a 5.47.

Figura 5.43 – Concentração celular em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).

Figura 5.44 – Concentração de glicerol em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).

Observa-se que com agitação de 96 rpm a velocidade de crescimento celular é maior que em 86 rpm, embora a concentração máxima de células tenha sido semelhante nos dois casos, cerca de 10 g/L (Figura 5.43). O consumo de substrato com agitação de 96 rpm também ocorreu a uma velocidade maior que a 86 rpm (Figura 5.44).

A variação do pH durante o cultivo apresentou um perfil semelhante para os dois ensaios, porém com as alterações ocorrendo mais rapidamente no ensaio a 96 rpm (Figura 5.44).

Figura 5.45 – pH em função do tempo, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos ensaios em meio contendo glicerol, realizados sob diferentes frequências de agitação (86 e 96 rpm).

As Figuras 5.46 a 5.47 apresentam os valores de atividade larvicida do meio fermentado para o teste piloto.

Figura 5.46 - Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, para o ensaio realizado sob frequência de agitação de 86 rpm.

Figura 5.47 - Porcentagem de morte de larvas de *A. aegypti* em função do volume (mL) de meio fermentado, num total de 6 mL de mistura, para o ensaio realizado sob frequência de agitação de 96 rpm.

Verifica-se que com a agitação de 96 rpm obtém-se uma maior produção de toxina, com 100% de morte das larvas até mesmo com a menor proporção de meio fermentado (0,2 mL em 6 mL de mistura). Vale destacar que o movimento com tendência circular observado com 96 rpm em incubadora de movimento recíproco não se assemelha ao movimento circular obtido naquela de movimento orbital. O movimento circular observado com 96 rpm, no referido caso, se intercala com movimentos recíprocos, o que pode explicar uma maior perturbação no meio e consequentemente uma maior solubilização de oxigênio comparado aos demais testes realizados.

Portanto, com os resultados obtidos neste conjunto de testes (itens 5.3.1.1 a 5.3.1.5), foram estipuladas as seguintes condições para a realização o estudo do planejamento estatístico: incubadora de movimento recíproco, utilização de células sem serem repicadas no laboratório, emprego de frascos de 1 L sem chicana e agitação de 96 rpm.

5.3.2- Definição da composição do meio de cultivo para a produção de bioinseticida

A fim de se determinar a melhor composição de meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis*, fatores como concentração de glicerol, extrato de levedura, sulfato de amônio e cloreto de cálcio foram estudados.

O estudo da influência da concentração da fonte de carbono (glicerol) e de fontes de nitrogênio (extrato de levedura e sulfato de amônio) foi realizado devido aos resultados apresentados por Anderson e Jayaraman (2003). Os autores realizaram uma avaliação da relação C:N sobre a produção de toxinas de *Bacillus thuringiensis* e verificaram que é possível aumentar sua produção em 2,7 vezes, apenas ajustando a proporção de carbono e nitrogênio no meio.

Além de exercer papel como fonte de nitrogênio inorgânico, Ozkan et al. (2003) relataram a importância de íons amônio durante a fase de crescimento exponencial para a produção de endotoxinas e esporos por *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

A inclusão do cálcio no estudo da composição do meio foi realizada considerando o relato de Çelik et al. (2008), que concluíram que a presença deste íon é importante para a síntese de toxina. De acordo com Crosby (1971), o cálcio é acumulado durante a esporulação

em bactérias do gênero *Bacillus*. Geralmente, o cálcio encontra-se associado ao ácido dipicolínico, formando um complexo que pode representar 20% da massa seca do esporo.

Neste estudo foram realizados 19 ensaios e a composição do meio de fermentação de cada um está apresentada na Tabela 5.2

Tabela 5. 2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2⁴, de acordo com os níveis reais dos fatores apresentados na Tabela 4.2

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

Os resultados de concentração celular, consumo de substrato e pH, obtidos em cada ensaio do planejamento 2⁴, estão apresentados na Figura 5.48.

Figura 5.48 – Continua

Figura 5.48 – Continuação

Figura 5.48 – Continuação

Figura 5.48 – Concentração celular e de glicerol (eixo Y à esquerda) e pH, em função do tempo de fermentação para os ensaios de 1 a 19.

Observa-se que extrato de levedura é fundamental para o crescimento da bactéria, uma vez que os meios sem extrato de levedura levaram a menores concentrações celulares (ensaios 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 e 16). Içgen, Içgen e Özcengiz (2002b) e Barbosa (2009) também constataram que a omissão de extrato de levedura do meio de fermentação prejudicou o crescimento de *Bacillus thuringiensis* 81 e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H14, embora tenham empregado glicose e glicerol como substrato, respectivamente. De acordo com Içgen, Içgen e Özcengiz (2002b), a maioria das cepas de *B. thuringiensis* necessitam de fatores de crescimento que podem ser fornecidos por uma pequena quantidade de extrato de levedura.

Barbosa (2009) observou que não houve crescimento celular quando empregada uma concentração de 30 g/L de glicerol oriundo do resíduo da fabricação de biodiesel a partir de sebo bovino. Este fato não foi observado no presente trabalho. Como pode ser observado, ocorreu crescimento celular nos ensaios realizados com 30 g/L de glicerol (ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15). Isto indica que o glicerol obtido da fabricação de biodiesel a partir de óleos vegetais apresenta menor quantidade de compostos tóxicos, os quais podem inibir o crescimento bacteriano, quando comparado ao obtido a partir de sebo bovino.

Com relação ao pH, observou-se que, para os ensaios 1, 2, 9 e 13, de maneira geral, o valor caiu nas primeiras horas de fermentação, seguido de um aumento e uma tendência a voltar para o valor inicial. De acordo com Rogoff e Yousten (1969), quando a glicose é utilizada como substrato, durante a fase de crescimento exponencial o ácido acético é acumulado no meio de cultura, causando um abaixamento no pH. Após a fase vegetativa, o ácido é consumido, causando um aumento do pH. Além disso, segundo Yezza et al. (2005),

durante a fase de esporulação, aminoácidos são consumidos para que ocorra a formação e a maturação dos esporos e, também, a síntese do cristal proteico. A desaminação de aminoácidos contribui para que o pH do meio aumente gradativamente.

Para os ensaios 3, 7, 11 e 16 o pH foi praticamente constante, o que pode ser explicado pelo fato de não ter ocorrido crescimento. Nos ensaios 4, 10, 17, 18 e 19, o comportamento do pH foi bem diferente do esperado, uma vez que este não aumentou nas últimas horas de fermentação e, ao contrário, apresentou queda. De acordo com Bernhard e Utz (1993) é necessário que haja um balanço adequado entre fontes de carbono e nitrogênio no meio de fermentação para que ocorra manutenção do seu pH na faixa que permite o crescimento do *Bacillus thuringiensis*.

Com os dados obtidos, foram calculados os parâmetros cinéticos: $Y_{x/s}$, Q_x e μ_{max} os quais estão apresentados na Tabela 5.3. Nesta Tabela estão apresentadas, também, as concentrações celular máximas (X_M).

Para melhor avaliar a influência da concentração de substrato (glicerol), os ensaios 1 e 2, 5 e 6, 9 e 10 e 13 e 14 foram analisados separadamente. Nos ensaios 3 e 4, 7 e 8 e 15 e 16 não houve crescimento devido à falta de extrato de levedura, conforme mencionado anteriormente e, por isto, não foram considerados nesta análise.

Comparando-se os ensaios 1 e 2, ambos com 12 g/L de extrato de levedura, 6 g/L de sulfato de amônio e 0,24 g/L de cloreto de cálcio, porém com 30 g/L e 10 g/L de glicerol, respectivamente, verifica-se que a concentração máxima de células (X_M) foi muito semelhante, demonstrando que o crescimento da bactéria foi nitidamente afetado pela concentração de substrato, o que é evidenciado pelos valores dos fatores de conversão de substrato em células. Quanto aos parâmetros cinéticos, verifica-se que com uma menor concentração de substrato (10 g/L) obteve-se maior produtividade em células e maior velocidade específica máxima de crescimento (Tabela 5.3). Maiores valores dos parâmetros cinéticos ($Y_{x/s}$, Q_x e μ_{max}) para os ensaios empregando 10 g/L comparado com 30 g/L também foram observados nos ensaios 5 e 6, confirmando o fato relatado anteriormente. Isto pode ser atribuído à presença de alguma substância no resíduo de glicerol, a qual inibe o crescimento celular, visto que nos ensaios com 30 g/L houve um menor valor nos parâmetros cinéticos. İçgen, İçgen e Özcengiz (2002b) analisaram a influência de alguns íons no crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* 81 e verificaram que concentrações superiores à 4×10^{-3} mol/L de Mg^{2+} e 3×10^{-4} mol/L de Mn^{2+} inibiram o crescimento microbiano.

Tabela 5. 3 – Parâmetros cinéticos $Y_{x/s}$, Q_x , μ_{max} e valores de X_M para cada ensaio realizado

Ensaio	$Y_{x/s}$ (g/g)	Q_x (g/L.h)	μ_{max} (h ⁻¹)	X_M (g/L)
1	0,24	0,17	0,34	13,9
2	0,51	0,44	0,96	12,9
3	0,05	0,36	-	1,30
4	0,03	0,11	-	1,07
5	0,19	0,30	0,37	5,8
6	0,41	0,49	0,84	7,85
7	0	0	-	0,30
8	0	0	-	0,70
9	0,40	0,24	0,69	17,7
10	0,19	0,17	0,39	4,25
11	0,07	0,20	-	1,63
12	0	0	-	0,05
13	0,22	0,22	0,44	13,9
14	0,03	0,25	0,08	0,89
15	0	0,01	-	0,10
16	0	0	-	0,07
17	0,19	0,39	0,36	4,80
18	0,22	0,22	0,39	5,98
19	0,16	0,11	0,22	4,90

Outros autores também observaram o mesmo efeito do aumento de fonte de carbono no meio de fermentação sobre a conversão de substrato em células. Rodrigues (2009) observou que, ao aumentar a concentração inicial de substrato, neste caso açúcares redutores, de 31 para 106,2 g/L, o valor de $Y_{x/s}$ reduziu de 0,7 para 0,42 g/g, respectivamente. Berbert-Molina et al. (2008) encontraram valores de $Y_{x/s}$ de 0,58, 0,51, 0,42, 0,41 e 0,36, ao utilizar concentrações iniciais de glicose de, aproximadamente, 30, 60, 80, 120 e 150 g/L. Estes fatos podem ser atribuídos ao aumento da relação C:N, ao se aumentar a concentração de substrato. Barbosa (2009) observou que uma menor relação C:N levou a um maior crescimento celular.

Pelos resultados dos ensaios 9 e 10, observa-se que com 30 g/L (ensaio 9) foi obtida uma concentração celular máxima de 17,7 g/L e com 10 g/L a concentração foi de 4,25 g/L (ensaio 10). Neste caso, uma maior concentração de carbono resultou uma maior massa celular e maiores parâmetros cinéticos, o que pode ser atribuído à falta de cálcio no meio de fermentação, única diferença entre os ensaios 10 e 2. No ensaio 2, com 0,24 g/L de cálcio, foi obtido um $X_M = 12,9$ g/L e no ensaio 10, sem adição deste íon, o valor de X_M foi de 4,25 g/L. A elevada concentração celular no ensaio 9, mesmo sem adição de cálcio, pode ser explicada pela presença deste no resíduo de glicerol, conforme dados da composição dos óleos empregados na fabricação de biodiesel apresentados na Tabela 5.4. Esta maior conversão de substrato em células pode ser melhor observada pelo valor de $Y_{x/s}$, que foi 2 vezes maior para o ensaio 9 comparado ao ensaio 10. Com relação ao parâmetro cinético Q_X , apesar do tempo de fermentação do ensaio 9 ter sido maior (Figura 5.48), ele ainda resultou um melhor valor, igual a 0,4 g/L.h comparado com 0,19 g/L.h do ensaio 10. A velocidade específica de crescimento também foi maior no ensaio 9, comprovando que a ausência de algum nutriente interferiu no crescimento celular.

Tabela 5. 4 – 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 (<i>Ida Gold</i>)	Mostarda (<i>Pac Gold</i>)	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

Nos ensaios 13 e 14, em que não foram adicionados sulfato de amônio e cloreto de cálcio, pode-se verificar nítida diferença entre os valores de X_M , 13,9 e 0,89 g/L, respectivamente. Diferença que novamente pode ser explicada pela presença de traços de cálcio e possivelmente fonte de nitrogênio inorgânico no resíduo. Assim, uma maior concentração de resíduo resulta maior concentração destes elementos. Ao comparar os ensaios 10 e 14 verifica-se uma nítida influência do sulfato de amônio sobre a concentração celular máxima em concentrações baixas de resíduo. Ao comparar os ensaios 9 e 13, ambos com 30 g/L porém com e sem adição de sulfato de amônio respectivamente, esta influência em X_M não foi muito evidenciado (17,7g/L e 13,9 g/L). Estudos realizados por İçgen, İçgen e Özcengiz (2002b), demonstraram que a ausência de $(NH_4)_2SO_4$ no meio de fermentação de *Bacillus thuringiensis* 81 levam a um menor crescimento microbiano, porém esta fonte de nitrogênio inorgânico pôde ser facilmente substituído por outras fontes como: KNO_3 , $NH_4H_2PO_4$ e NH_4Cl . Logo, a evidência de que outras fontes inorgânicas de nitrogênio pode suprir a necessidade da adição de $(NH_4)_2SO_4$ reforça a teoria de que o resíduo, em determinadas concentrações poderia fornecer fonte de nitrogênio inorgânico suficiente.

Pela Tabela 5.3 verifica-se que os maiores valores dos parâmetros cinéticos calculados (Q_x , $Y_{x/s}$ e μ_{max}) foram obtidos nos ensaios 2 e 6. Nestes ensaios os meios continham 10 g/L de glicerol, 12 g/L de extrato de levedura e 0,24 g/L de cloreto de cálcio. Pode ser observada apenas uma pequena redução nos valores de Q_x e $Y_{x/s}$ quando sulfato de amônio não foi adicionado ao meio. Barbosa (2009) também observou melhores resultados de produtividade em células e conversão de substrato em células, em torno de 0,4 g/L.h e 1,26 g/g, respectivamente, quando empregou 10 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura do que quando utilizou maiores concentrações de glicerol. Logo, os resultados obtidos no presente trabalho são próximos ao obtido pelo autor, apesar de o glicerol empregado ser de resíduo industrial que utiliza óleo de soja na fabricação de biodiesel ao invés de sebo bovino.

As Figuras 5.49 e 5.50 apresentam os valores de concentração celular máxima e de CL_{50} relativa, respectivamente, para todos os ensaios do planejamento.

Figura 5.49 - Concentração celular máxima obtida nos ensaios de fermentação propostos pelo planejamento fatorial

Figura 5.50 - CL₅₀ relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL₅₀ relativa do ensaio 4.

Verifica-se que não existe uma relação direta entre crescimento celular e produção de toxina, pois os ensaios que apresentam maiores concentrações celulares não coincidem com os ensaios de maior toxicidade. O melhor resultado de atividade obtida foi observado no ensaio 4, porém, como este ensaio apresentou baixo crescimento, o experimento foi repetido 2 vezes para confirmar o resultado. Contudo, após repetições, a atividade larvicida foi nula para o intervalo de concentração de meio estudado (Figura 5.51).

Figura 5.51 - CL_{50} relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial, substituindo-se o resultado do ensaio 4 original pelo resultado da repetição. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL_{50} relativa do ensaio 19.

Como o resultado do primeiro ensaio foi excelente, decidiu-se isolar as células do meio fermentado do ensaio 4 e repetir o experimento utilizando as células isoladas. Novamente uma alta atividade larvicida foi encontrada (Figura 5.52), sendo o volume de meio fermentado referente ao CL_{50} igual a 0,0019 mL para o primeiro ensaio e 0,0022 mL para o segundo ensaio.

Figura 5.52 - CL_{50} relativa para todos os ensaios do planejamento fatorial com a repetição do ensaio 4 empregando-se células isoladas do primeiro ensaio 4 realizado. Em destaque, o volume de meio fermentado correspondente a CL_{50} relativa do ensaio 4.

Com o teste, comprovou-se que as células sofreram algum tipo de alteração e, para realizar as análises estatísticas, foram empregados os resultados apresentados na Figura 5.51, cujos melhores resultados de atividade larvicida corresponderam aos ensaios do ponto central.

A análise da estimativa dos efeitos para a variável dependente concentração celular foi realizada empregando-se o gráfico de Pareto (Figura 5.53), sendo considerados significativos os termos cujos valores de $t_{\text{calculado}}$ (representados por barras horizontais) foram superiores ao valor de $t_{\text{tabelado}} = 2,35$ (representado pela linha tracejada vertical), para distribuição de *Student* ao nível de 95% de confiança.

Figura 5.53 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta concentração máxima de células. (1) Glicerol, (2) Extrato de levedura, (3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e (4) CaCl_2 .

Observa-se que, com relação à concentração máxima de células, os fatores concentração de extrato de levedura, concentração de glicerol e a interação entre eles são estatisticamente significativos no nível de confiança de 95%. Não foi verificado efeito significativo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e CaCl_2 , apesar da análise dos resultados terem sugerido influência no crescimento. Provavelmente esta falta de significância deve-se ao fato de o resíduo fornecer cálcio e fonte de nitrogênio inorgânico quando empregado em maior concentração, não tornando evidente o efeito destes fatores nestes ensaios. Na Tabela 5.5, tem-se a análise de variância dos efeitos e das interações.

Tabela 5. 5 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta concentração celular, obtida com os ensaios do planejamento 2⁴.

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Media quadrática	F	Nível de significância (p)
(1)GLICEROL	35,37275625	1	35,37275625	7,003876	0,033110275
(2)EXT.LEVEDURA	301,6300563	1	301,6300563	59,72335	0,000113593
(3) (NH ₄) ₂ SO ₄	13,45055625	1	13,45055625	2,663237	0,146711314
(4) CaCl ₂	3,54380625	1	3,54380625	0,701681	0,429888524
1 by 2	40,10055625	1	40,10055625	7,93999	0,025854819
1 by 3	13,19505625	1	13,19505625	2,612647	0,150048311
1 by 4	18,64080625	1	18,64080625	3,690917	0,096163218
2 by 3	0,56625625	1	0,56625625	0,11212	0,747553388
2 by 4	15,98000625	1	15,98000625	3,164073	0,118505375
3 by 4	9,62550625	1	9,62550625	1,905869	0,209893494
Erro	35,35318125	7	5,050454464		
Total SS	487,4776105	18			

$R^2 = 0,93$

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 5.6.

Tabela 5. 6 - Critérios para validação de modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).
Análise de variância Coeficiente de correlação Falta de ajuste Validação do modelo.

Análise de variância	Coeficiente de correlação	Falta de ajuste	Validação do modelo
-----	$R^2 > 0,9$	-----	Sim
p < 0,05	$0,7 < R^2 < 0,9$	p > 0,05	Sim
		p < 0,05	Não
	$R^2 < 0,07$	-----	Não
p > 0,05	-----	-----	Não

Na Tabela 5.7 observa-se que a variância do modelo é significava ($p < 0,05$) e não é verificada significância da falta de ajuste do modelo aos pontos experimentais ($p > 0,05$). Considerando o valor de $R^2 > 0,9$ para a resposta concentração celular (Tabela 5.5), conclui-se que o comportamento estudado pode ser representado por um modelo linear.

Tabela 5. 7– Análise de variância de regressão que representa a resposta concentração celular obtida com os ensaios do planejamento fatorial 2^4 .

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	Nível de significância (p)
Modelo	452,11	10	45,21	10,23	0,00015
Falta de ajuste	34,58738125	5	6,91747625	18,06601	0,053276946
Erro puro	0,7658	2	0,3829		
Total SS	487,4776105	18			

O modelo linear representativo da influência da concentração de glicerol (1) e de extrato de levedura (2) sobre a resposta concentração celular máxima corresponde à Equação 5. Com este modelo foi constituída uma superfície de resposta que mostra a influência das duas variáveis mencionadas sobre a concentração celular máxima (Figura 5.54).

$$Y = 5,46313 + 1,48688.(1) + 4,34188.(2) + 1,58313.(1).(2) \quad (\text{Equação 5})$$

Figura 5.54 – Superfície de resposta para concentração celular máxima em função das variáveis Extrato de levedura e glicerol.

Pela superfície de resposta, nota-se que o aumento das concentrações de glicerol e de extrato de levedura proporciona um aumento do crescimento celular. Porém, como o objetivo deste estudo é o aumento da toxicidade do meio e, como, de acordo com os resultados obtidos, a produção de toxina não está relacionada ao crescimento, estudos adicionais não foram realizados para encontrar a concentração destes nutrientes que pudessem proporcionar a maior concentração celular.

Para a variável resposta CL_{50} relativa, pelo gráfico de Pareto da Figura 5.55 verifica-se que nenhuma variável tem efeito significativo ao nível de 95% de confiança.

Figura 5.55 – Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta CL₅₀ relativa, (2) Extrato de levedura, (3) (NH₄)₂SO₄ e (4) CaCl₂.

Na Tabela 5.8 verifica-se novamente que os fatores e nem suas interações foram significativos e não foi encontrado um bom coeficiente de correlação.

Tabela 5.8 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta CL₅₀ relativa, obtida com o ensaios do planejamento 2⁴.

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	Nível de confiança (p)
(1)GLICEROL	0,072124811	1	0,072124811	1,982791	0,201924782
(2)EXT.LEVEDURA	0,054829867	1	0,054829867	1,507334	0,259225447
(3)(NH ₄) ₂ SO ₄	0,063565487	1	0,063565487	1,747486	0,227752794
(4)CACL2	0,07373196	1	0,07373196	2,026973	0,197537893
1 by 2	0,039373952	1	0,039373952	1,082434	0,332748807
1 by 3	0,062058784	1	0,062058784	1,706065	0,232776858
1 by 4	0,075373452	1	0,075373452	2,0721	0,193193162
2 by 3	0,040601813	1	0,040601813	1,116189	0,325832735
2 by 4	0,052064357	1	0,052064357	1,431307	0,270496351
3 by 4	0,052352646	1	0,052352646	1,439232	0,269288502
Erro	0,254627771	7	0,036375396		
Total SS	2,709991823	18			

R²=0,2163

Pela análise de variância para o modelo (Tabela 5.9), confirma-se que o comportamento da variável resposta CL_{50} não pode ser explicado por um modelo linear, pois este não é significativo e é observada a falta de ajuste significativa dos pontos experimentais.

Tabela 5. 9 – Análise de variância de regressão que representa a resposta CL_{50} relativa obtida com os ensaios do planejamento fatorial 2^4

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	Nível de confiança (p)
Modelo	0,59	10	0,059	0,22	0,9856
Falta de ajuste	2,11	6	0,35	72,64	0,0136
Pure Error	0,009701	2	0,004851		
Total SS	2,709992	18			

O comportamento da variável resposta CL_{50} poderia ser explicado por um modelo quadrático, porém o número de experimentos realizados no planejamento não é suficiente para determinar os coeficientes do modelo quadrático, sendo necessária a realização de ensaios complementares ao planejamento original.

Logo, conclui-se que a melhor composição de meio de cultura para produção de toxinas contra o mosquito *Aedes aegypti*, empregando resíduo da fabricação de biodiesel a partir de óleo de soja, é em relação aos componentes estudados: 20 g/L de glicerol, 6 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de sulfato de amônio e 0,12 g/L de cloreto de cálcio. Cabe salientar que os demais componentes do meio (Tabela 4.1) devem ser mantidos em suas concentrações originais.

5.4 Avaliação da concentração de substrato e da concentração de oxigênio dissolvido

5.4.1 Definição da melhor composição de meio de cultura

Como não foi possível determinar a composição do meio de cultura que permitisse a maior produção de toxinas pelo planejamento estatístico realizado em incubadora, foi realizado um teste em biorreator empregando-se diferentes composições de meio de cultura, conforme descrito no item 4.7.5.1. Considerando-se apenas os resultados dos ensaios do planejamento estatístico, a composição de meio de cultura que proporcionou maior produção

de toxinas foi aquela correspondente à do ponto central (Figura 5.51). Apesar de o ensaio 6 ter apresentado resultado similar ao do ponto central, sua composição foi desconsiderada por apresentar o dobro de extrato de levedura que a do ponto central, o que eleva o custo do meio. Além disso, durante a realização do planejamento, foi possível isolar, a partir do meio fermentado do ensaio 4, células com maior capacidade de produção de toxinas (Figuras 5.50 e 5.52), conforme discutido no item 5.3.2. Devido a isto, dois ensaios em biorreator foram realizados, empregando-se as células isoladas a partir do meio fermentado do ensaio 4 do planejamento (denominadas células isoladas). Para o primeiro (denominado ensaio **4'**) a composição do meio foi a mesma utilizada no ensaio 4 do planejamento e, para o segundo (denominado ensaio **PC'**) a composição do meio foi a mesma utilizada para os ensaios do ponto central. Para este teste, foi escolhido o valor de concentração de oxigênio mínima correspondente ao ponto central do estudo da avaliação da aeração (5.4.2), ou seja, 25%. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.56 a 5.61.

Figura 5.56 - Concentração celular em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, correspondentes aos ensaios 4' e PC' em biorreator.

Verifica-se que praticamente não houve crescimento celular no ensaio **4'**. Este experimento foi realizado sem adição de extrato de levedura e, conforme concluído com os resultados dos ensaios do planejamento em frasco, o extrato de levedura é fundamental para o crescimento da bactéria em estudo. Para o ensaio **PC'** foi encontrada uma concentração

máxima de células de 6,2 g/L, além do fato de a curva de crescimento ter apresentado o perfil característico da bactéria (Figura 5.56).

Nas Figuras 5.57 e 5.58 estão apresentados os dados concentração de OD (%) e frequência de agitação (rpm) em função do tempo de fermentação para os ensaios 4' e PC', respectivamente. A linha tracejada em vermelho indica a concentração de oxigênio que deveria ser mantida durante toda a fermentação.

Figura 5.57 – Concentração de oxigênio dissolvido (% da saturação) e frequência de agitação (rpm) em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, correspondente ao ensaio 4'.

Observa-se queda da concentração de OD nas primeiras horas de cultivo e, com 5 horas de fermentação, o controle da concentração de oxigênio foi acionado, ocorrendo um aumento da agitação do sistema. Porém, após 8 horas de cultivo, a agitação voltou para seu valor inicial de 300 rpm e não aumentou novamente (Figura 5.57). A baixa demanda de oxigênio, evidenciada pelo aumento da sua concentração a partir de 10 h, deve-se ao baixo crescimento celular (Figura 5.56), quando se emprega o meio do ensaio 4.

Figura 5.58 – Concentração de oxigênio dissolvido (% da saturação) e frequência de agitação (rpm) em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, correspondente ao ensaio PC'.

Empregando-se a composição do meio de cultura do ponto central (ensaio **PC'**), foi observada uma queda da concentração de oxigênio abaixo do valor mínimo estipulado (25% da saturação) com 2 horas de cultivo. Após atingido o valor limite, o sistema de controle de oxigênio dissolvido foi acionado, o que pode ser verificado pelo aumento da agitação. Com 5,5 horas de fermentação a agitação atingiu o valor máximo de 700 rpm com a finalidade de manter a concentração em 25% (Figura 5.58). O menor tempo para a queda da % OD, assim como a necessidade de alta frequência de agitação para manter 25% de OD decorre da maior concentração celular, que por sua vez, é devida a presença de fonte de nitrogênio orgânica, o que não foi o caso do ensaio **4'**.

Não foi observada grande variação de pH para o ensaio **4'**, como pode ser observado na Figura 5.59. Este comportamento é característico de ensaios com baixo crescimento celular, que neste caso foi causado pela ausência de extrato de levedura.

Figura 5.59 - pH em função do tempo de fermentação, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, correspondente ao ensaio 4', correspondente aos ensaios 4' e PC'.

Para o ensaio **PC'**, o comportamento do pH, nas primeiras horas de fermentação, não correspondeu ao comportamento relatado por Rogoff e Yousten (1969), que descrevem que nas primeiras horas de fermentação o pH decresce devido ao acúmulo de ácido acético. Porém, após 5 horas de fermentação foi observado aumento de pH, conforme descrito por Berbert-Molina et al. (2008). Este aumento pode ser ocasionado pelo consumo de ácidos orgânicos presentes no resíduo de glicerol ou aquele produzido pelas células nas primeiras horas de fermentação, que, devido a algum efeito tamponante do meio, não provocaram abaixamento de pH conforme relatado em vários trabalhos. Após 7 horas de fermentação foi observado um abaixamento do valor de pH, atingindo este, no final de fermentação, um valor de 6,1.

O perfil de pH no ensaio **PC'** (Figura 5.59) foi nitidamente distinto do perfil de pH obtido nos ensaios do ponto central do planejamento (Figura 5.48 – ensaios 17, 18 e 19), apesar da composição do meio ser igual. Isto pode ser explicado pela diferença no sistema de aeração, pois, o ensaio **PC'** foi realizado em biorreator e os ensaios 17, 18 e 19 foram realizados em frascos e, portanto, sem controle de aeração. A única semelhança encontrada foi o valor final do pH, que em todos os casos apresentou-se abaixo de 7,0.

A partir dos resultados de toxicidade obtidos em cada ensaio, foi possível definir a composição do meio a ser empregada para o estudo da concentração de substrato e da concentração de OD, em biorreator. A Figura 5.60 apresenta os resultados de toxicidade do meio fermentado obtido nos ensaios **4'** e **PC'**. Observa-se que, apesar de no ensaio **4'**

praticamente não haver crescimento celular, o meio apresentou toxicidade contra larvas de *A. aegyptis*. Tal fato permite inferir que o resíduo empregado como fonte de carbono possui, mesmo que em baixas concentrações, os componentes necessários para a síntese da toxina pela bactéria.

Portanto, novamente comprovou-se que a produção de toxinas não está diretamente relacionada com o crescimento celular. De fato, de acordo com Khedher et al. (2011), algumas composições de meio de cultura proporcionam alta concentração de biomassa, porém baixa toxicidade, sendo o contrário também observado.

Comparando-se os resultados de toxicidade, verifica-se que, para o ensaio 4', ocorre 100% de morte das larvas quando um volume de 0,03 mL de meio fermentado é empregado. Para o ensaio PC', 100% de morte foi atingido com um volume de até 0,006 mL de meio fermentado (Figura 5.60), o que representa um valor de toxicidade 5 vezes melhor, ou seja, um ganho de 400%.

Figura 5.60 - Porcentagens de morte de larvas em teste piloto, em função do volume de meio fermentado, obtidos com os ensaios 4' e PC'.

Portanto, para o estudo da aeração e da concentração de substrato em Biorreator (item 5.4.2) foram utilizadas as células isoladas e a composição do meio do ponto central do planejamento 2⁴ (20 g/L de glicerol, 6 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de (NH₄)₂SO₄ e os demais sais conforme a Tabela 4.

5.4.2 Avaliação da aeração e da concentração de substrato em biorreator

Vários trabalhos referentes a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* em que se utilizou glicose como fonte de carbono demonstraram a influência da concentração inicial de glicose e da concentração de oxigênio na produção de toxinas (AVIGNONE-ROSSA; ARCAS; MIGNONE, 1992; MALDONADO-BLANCO et al., 2003; GHRIBI et al., 2007; BERBERT-MOLINA et al., 2008; BONIOLO et al., 2012). Portanto com o intuito de avaliar a influência destas variáveis sobre a produção de bioinseticida a partir de glicerol, um estudo foi realizado empregando-se diferentes concentrações iniciais de glicerol e diferentes concentrações de oxigênio, baseando-se na ferramenta estatística planejamento fatorial. Todos os ensaios iniciaram com 100% de oxigênio dissolvido (OD) e com o auxílio do sistema de controle de OD, que o fermentador dispõe, foi possível manter o valor mínimo estipulado para cada caso.

Na Tabela 5.10 estão apresentadas as concentrações de glicerol e as concentrações de oxigênio mínimas, expressas em % da saturação, empregadas em cada ensaio de fermentação.

Tabela 5.10 - Concentrações iniciais de glicerol e concentrações de oxigênio (% de saturação) empregadas em cada ensaio do planejamento 2².

Ensaio	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração de oxigênio (% saturação)
1	30	45
2	30	5
3	10	45
4	10	5
5	20	25
6	20	25
7	20	25

Os dados obtidos de concentração celular, concentração de glicerol e pH nos ensaios de 1 a 7 estão apresentados na Figura 5.61 .

Figura 5.61 – Continua

Figura 5.61 - Concentração celular (g/L), concentração de glicerol (g/L) e pH em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados baseados no planejamento fatorial 2^2 .

Após obtidos os dados de crescimento e consumo de substrato, foram determinados os parâmetros cinéticos Q_x , $Y_{x/s}$ e $\mu_{\max}$, sendo os valores apresentados na Tabela 5.11. Para facilitar a discussão dos resultados, o valor máximo de concentração celular também foi incluída na Tabela.

Tabela 5.11 - Parâmetros cinéticos Q_x , $Y_{x/s}$ e $\mu_{\max}$ e valores de X_M e para cada ensaio realizado baseando-se no planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	$Y_{x/s}$ (g/g)	Q_x (g/L.h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	X_M (g/L)
1	0,95	0,73	0,51	5,54
2	0,25	0,19	0,27	4,16
3	1,61	0,67	0,80	4,92
4	0,51	0,21	0,30	4,24
5	1,16	0,62	0,61	5,84
6	0,46	0,31	0,82	4,30
7	0,47	0,53	0,47	4,76

Quanto aos ensaios 1 e 2, ambos com 30 g/L de glicerol, porém com 45% e 5% de OD, respectivamente, observa-se que uma menor concentração desta variável levou a uma menor concentração celular. Amicarelli et al. (2010), também observaram efeito negativo do

oxigênio dissolvido, abaixo de 10% na fase vegetativa, sobre o crescimento celular de *Bacillus thuringiensis*. No ensaio 2, o final da fase vegetativa ocorreu com 5 horas de fermentação (determinação realizada por microscopia, caracterizada pelo início da formação de grumos) e, pela Figura 5.62 verifica-se que o oxigênio dissolvido atingiu valores abaixo de 10% logo após 1 hora de fermentação, o que confirma o efeito mencionado.

Uma maior concentração de oxigênio também acarretou um significativo aumento de produtividade em células (0,73 comparado a 0,19), uma vez que, além de se obter maior concentração de células no ensaio 1, a máxima concentração celular foi obtida em menor tempo: 7 horas de fermentação comparado com 9 horas no ensaio 2. Consequentemente, foi observado também maior valor de $\mu_{\max}$ para o ensaio 1 comparado ao ensaio 2. Verifica-se que a conversão de substrato em células é mais eficiente em condições de maior concentração de oxigênio dissolvido. Em baixas concentrações, provavelmente o metabolismo foi direcionado para outras vias, como, por exemplo, formação de sub-produtos ou manutenção celular, e não para a formação de biomassa.

Esta influência positiva do oxigênio pode ser observada também nos ensaios 3 e 4, ambos com 10 g/L de glicerol, porém com 45% e 5% de OD, respectivamente. Como pode-se observar na Tabela 5.11, os parâmetros cinéticos calculados foram maiores no ensaio 3 que no ensaio 4.

Boniolo et al. (2012) realizaram ensaios de fermentação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio de cultura com 30 g/L de glicose e diferentes concentrações de oxigênio dissolvido: 5, 20 e 50%. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com 5 e com 50% de OD foram: X_m de 12,4 g/L e 14,8 g/L, $Y_{x/s}$ de 0,46 e 0,53 g/g e Q_x de 0,89 e 1,23 g/L.h, respectivamente. Logo, apesar de os autores terem utilizado uma fonte de carbono diferente, foi confirmada a influência positiva do aumento da concentração de OD sobre o crescimento celular e os parâmetros cinéticos correlacionados.

Com relação ao consumo de substrato (Figura 5.61), verifica-se que nos ensaios com 30 g/L de glicerol (ensaios 1 e 2) não houve consumo total de substrato, sendo consumido apenas 13 g/L de glicerol em ambos os ensaios, independente da concentração de OD. Este consumo parcial de substrato e valor de ΔS também foram observados nos ensaios do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), havendo apenas consumo total de substrato nos ensaios com 10 g/L de glicerol. Barbosa (2009), ao realizar ensaios de fermentação com *Bacillus thuringiensis* com diferentes concentrações de glicerol, também observou baixo consumo de substrato em ensaios com maior relação C:N. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho e os obtidos

pelo autor indicam que pode não ter havido fonte de nitrogênio suficiente para que a bactéria consumisse todo o glicerol disponível no meio de fermentação. Provavelmente o início da esporulação nos ensaios nos quais não ocorreu consumo total de substrato foi ocasionado por limitação de outras fontes de nutrientes. 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*.

Berbert-Molina et al. (2008) observaram o comportamento do pH de um cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, em um meio GYS (Tabela 4.1), em biorreator, e um valor mínimo de concentração de OD igual a 35%. Conforme descrito, o valor de pH diminui rapidamente atingindo valores próximos a 5,6 nas primeiras horas de fermentação, correspondentes à fase I de crescimento microbiano (crescimento vegetativo), devido à produção de ácidos orgânicos. A fase II de crescimento inicia-se com a formação de grumos, ocorrendo em torno de 5 horas de fermentação e, neste caso, o pH aumenta até atingir valores próximos ao inicial, pH 7. Isto devido ao consumo dos ácidos produzidos na fase I.

Porém, como pode ser observado na Figura 5.61, foram obtidos diferentes perfis de pH para as condições estudadas. Nos ensaios com valores mínimos de concentração de OD (ensaios 2 e 4) foi observado um abaixamento de pH na fase I de crescimento, em média com 5 horas de fermentação. Porém, os valores mínimos observados foram em torno de 6,2, superiores ao valor encontrado por Berbert-Molina et al. (2008), de 5,6. Isto deve-se, além da diferença de concentração de OD entre os ensaios comparados, à diferença metabólica entre as vias de assimilação de glicose e de glicerol. Após a fase I, em ambos os ensaios foi observado aumento de pH, atingindo valores próximos ao valor inicial, conforme mencionado na literatura.

Para os ensaios realizados com concentração de OD de 25 e 45% (ensaios 1, 3, 5, 6 e 7) foram observados comportamentos de pH semelhantes entre estes, porém distintos dos ensaios 2 e 4 e da literatura. Como apresentado na Figura 5.61 o pH apresentou valores praticamente constantes nas primeiras horas de fermentação, correspondente à fase I. Aparentemente, uma maior concentração de OD provocou uma alteração no metabolismo de consumo de glicerol ao ponto de as células produzirem menos ácidos ou acelerarem seu consumo, diminuindo a quantidade de ácidos acumulados, e, conseqüentemente, não ocasionando abaixamento de pH. Porém, a existência de toxicidade no meio de fermentação (Figura 5.63) indica que ácido acético foi produzido, uma vez que, de acordo com Liu e Tzeng (1998) a produção de δ -endotoxinas é observada quando acetato e PHB estão presentes no

meio no início da formação do cristal. De acordo com Benoit et al. (1996), ácido acético é usado para a síntese de PHB e este é consumido durante a fase de produção de toxinas.

Por outro lado, a fonte de carbono empregada neste trabalho é oriunda de um resíduo da fabricação de biodiesel, e, portanto apresenta uma composição indefinida, podendo este fornecer os compostos essenciais para formação de PHB. Neste sentido, cabe salientar a hipótese levantada quanto da análise do crescimento celular observado no ensaio 4' (item 5.4.1).

Um outro fator observado nos ensaios realizados neste estudo é uma fase lag variando de 3 a 4 horas, ao contrário do observado por Berbert-Molina et al. (2008), que com 3 horas de fermentação já ocorria a fase exponencial de crescimento. Tal fato também constitui uma razão para os valores praticamente constantes de pH com até 5 horas de fermentação.

Portanto os diferentes perfis de pH obtidos entre os ensaios 2 e 4 e 1, 3, 5, 6 e 7 indicam que a concentração de OD apresenta influência no metabolismo microbiano e, consequentemente, no perfil de pH.

Na Figura 5.62 estão apresentados os valores de concentração de OD e agitação para os ensaios do planejamento 2². As linhas tracejadas em vermelho indicam o valor de concentração de OD desejado. Ao atingir valores abaixo do estipulado, o sistema de controle de DO do fermentador foi acionado automaticamente, aumentando a agitação para garantir que não atingisse valores mais baixos que o mínimo estabelecido.

Figura 5.62 – Continua

Figura 5. 62 – Continuação

Figura 5.62 – Continuação

Figura 5.62 – Concentração de oxigênio dissolvido (em porcentagem da saturação) e frequência de agitação, em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento 2^2 em biorreator

Amicarelli et al. (2010) trabalharam no desenvolvimento de um modelo que descrevesse a dinâmica do oxigênio dissolvido na produção de δ -endotoxina. De acordo com os autores o *Bacillus thuringiensis* apresenta diferentes exigências de oxigênio dependendo da fase de crescimento, sendo a maior demanda de oxigênio durante a fase vegetativa e diminuindo na fase de esporulação. Pelos perfis de oxigênio dissolvido observa-se que em praticamente todos os ensaios a concentração de oxigênio diminui bruscamente nas primeiras horas de fermentação, isto devido ao intenso metabolismo respiratório das células na fase vegetativa (Berbet-Molina et al., 2008). A única exceção observada foi no ensaio 6, que, devido a uma perturbação no sistema ocasionado por um problema no controle automático de OD do biorreator, levou a uma incorporação maior de oxigênio ao meio de fermentação, retardando a queda da sua concentração logo nas primeiras horas de cultivo. Como a falha no sistema foi prontamente corrigida e não foi observada variação nos valores de toxicidade entre os pontos centrais (Figura 5.63) não foi considerado necessário repetir o ensaio.

Em pontos específicos na curva de OD, verifica-se uma queda repentina no seu valor, causando uma perturbação no sistema e atingindo, em alguns casos, valores abaixo do mínimo

estipulado. Este fato se deve à adição de anti-espumante (AMICARELLI et al., 2010), que ocorre de forma automática e esporádica pelo fermentador, na medida em que espuma era detectada pelo sensor. Como a adição de anti-espumante deu-se de forma automática pelo fermentador, tornou-se difícil estimar o volume exato de anti-espumante adicionado.

Nos ensaios 1 e 3 verifica-se que o controle automático de concentração de OD do biorreator não foi suficiente para manter o valor em 45%. Com 4 horas de fermentação a agitação atingiu o valor máximo de 700 rpm (Figura 5.62), sendo portanto necessário aumentar a aeração constantemente, o que foi realizado manualmente. Portanto, apenas a variação da agitação é insuficiente para estudar condições com valores mínimos superiores a 45% de OD no fermentador empregado. Neste caso a velocidade de respiração torna-se maior do que a transferência de oxigênio fornecida pelo sistema.

Nos ensaios 2 e 4 observou-se rápida queda da concentração de OD e, com menos de 4 horas, o valor atingiu o mínimo estipulado. O controle de aeração automático do biorreator foi acionado, mantendo o valor de 5% durante praticamente toda a fermentação. Nos ensaios 3 e 4, observa-se uma queda brusca no consumo de oxigênio com 15 e 24 horas, que coincide exatamente com o ponto de exaustão de substrato e diminuição da biomassa (Figura 5.61). Este fato também foi observado por Berbert-Molina et al. (2008), que relataram diminuição da velocidade de respiração e diminuição da biomassa com o esgotamento de substrato. Nestes casos, o fornecimento de oxigênio foi superior à demanda, levando a um aumento da concentração de OD.

Para os ensaios 5 e 7, verifica-se que o oxigênio atingiu o valor mínimo estipulado (25% da saturação) em 1 hora. O sistema de controle de agitação foi acionado e, apesar de o valor de agitação ter atingido valor máximo (700 rpm), não foi necessário aumentar a aeração manualmente.

O ensaio 6 apresentou um perfil distinto de concentração de OD, provavelmente devido a problemas no controle de automático do fermentador, conforme já mencionado, o que acabou resultando um atraso em torno de 4 horas para a concentração de OD atingir o valor estipulado. Esta diferença de 4 horas também pode ser observada no perfil de pH (Figura 5.61). Pelo perfil de pH dos ensaios do ponto central, verifica-se uma diferença de tempo em que ocorreu o aumento de pH no ensaio 6 de 4 horas quando comparado com os ensaios 5 e 7.

Contudo, ao analisar todos os perfis de concentração de OD nota-se diferentes comportamentos, até mesmo em ensaios com as mesmas condições (ponto central). Fato

também observado e discutido por Amicarelli et al. (2008) que, ao realizar uma série de repetições de experimentos de cultivo de *Bacillus thuringiensis*, para ajustar os dados a um modelo que descreve a cinética de assimilação de oxigênio, concluíram que este bioprocessamento apresenta uma não linearidade nos resultados, sendo severamente influenciado por fatores externos levando, por várias vezes, a diferentes resultados para ensaios nas mesmas condições.

De acordo com os valores de X_m (Tabela 5.11) verifica-se que não foi encontrado nenhum resultado expressivo de concentração celular, uma vez que a variação de concentração celular máxima entre os ensaios 1 a 4 é similar à variação entre as concentrações celulares máximas encontradas para os ensaios do ponto central. Contudo, uma expressiva diferença de atividade larvicida entre os meios foi encontrada para os ensaios deste planejamento (Figura 5.63).

Verifica-se uma melhor resposta no ensaio 3, correspondendo ao ensaio com maior concentração de oxigênio e menor concentração de glicerol. Salienta-se que a CL_{50} relativa é um valor de porcentagem em relação ao melhor resultado obtido. Portanto, quanto maior for o valor de CL_{50} relativa, melhor será a resposta e menor será o valor de CL_{50} .

Figura 5.63 - CL_{50} relativa obtida em cada experimento do planejamento 2^2 em biorreator.

Boniolo et al. (2012) realizaram testes de fermentação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio GYS com diferentes concentrações de OD (5, 20 e 50%), obtendo um valor de CL_{50} 8,3 vezes melhor no ensaio com 50%, comparado ao ensaio empregando 5% de OD. Avignone-Rossa, Arcas e Mignone (1992) compararam ensaios de fermentação realizados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sob condição de limitação de oxigênio e

com a concentração de OD mínima de 70%. Os autores concluíram que a síntese de δ -endotoxina é afetada pela concentração de oxigênio e que para aumentar sua produção é necessário contínuo fornecimento de oxigênio.

Portanto os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, uma vez que melhores resultados foram obtidos com a maior concentração de oxigênio dissolvido estudada.

A análise estatística dos dados foi feita, primeiramente, para a variável dependente concentração celular. A estimativa dos efeitos foi realizada por gráfico de Pareto (Figura 5.64). Como todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram inferiores ao t_{tabulado} , nenhum fator estudado apresenta influência significativa ao nível de confiança de 95% para a variável resposta crescimento.

Figura 5.64 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de confiança de 95% sobre a resposta concentração celular.

Na Tabela 5.12 estão apresentados os valores obtidos para a análise de variância dos fatores estudados, concentração de glicerol e concentração de OD, sobre a variável resposta concentração celular. Novamente verifica-se que não há influência significativa destes fatores e observa-se um baixo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,4859$).

Tabela 5.12 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados para a variável resposta crescimento celular, obtida com ensaios do planejamento 2^2 em biorreator

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	Nível de significância
Glicerol	0,090	1	0,090	0,158	0,718
Oxigênio (%)	1,440	1	1,440	2,521	0,211
Interação	0,090	1	0,090	0,158	0,718
Erro	1,714	3	0,571		
Total SS	3,334	6			

$$R^2 = 0,4859$$

Devido ao fato de nenhum fator ser significativo e o valor de $R^2 < 0,9$, conclui-se que o crescimento celular não apresenta comportamento explicado por um modelo linear, em função dos fatores estudados. Isto deve-se ao fato de que, independentemente dos fatores estudados, o consumo do glicerol foi cerca de 10 g/L para todos os ensaios realizados. Portanto, não era de se esperar significativas diferenças de concentração celular.

Estes resultados permitem estimar uma relação entre quantidade de fonte de nitrogênio e consumo de glicerol pela bactéria da ordem de 6 para 10, em termos de concentração em g/L. Em vista da considerável diferença entre as concentrações de OD empregadas (5 e 45%) pode-se considerar que apenas a exaustão da fonte de nitrogênio levou à limitação do consumo de glicerol.

Verifica-se que os maiores valores dos parâmetros cinéticos foram obtidos nos ensaios com 45% de OD. Ao analisar $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ verifica-se que maiores valores foram obtidos quando empregada menor concentração de glicerol. Portanto, se o objetivo do cultivo for obtenção de células e maior eficiência na utilização de substrato para formação de biomassa, a condição mais indicada seria 10 g/L de glicerol e 45% de OD.

A Figura 5.65 apresenta o gráfico de Pareto para a variável resposta toxicidade (CL_{50} relativa), considerando o ajuste a um modelo linear.

Figura 5.65 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de confiança de 95% sobre a resposta CL_{50} relativa.

Observa-se que nenhum fator foi significativo, pois nenhum apresentou $p < 0,05$. De acordo com a análise de variância dos efeitos (Tabela 5.13), observa-se um baixo valor de coeficiente de correlação, indicando que os valores obtidos de CL_{50} relativa não apresentam boa relação para um modelo linear. Existe a possibilidade do comportamento da variável resposta CL_{50} ser explicada por um modelo quadrático porém seria necessário realizar testes adicionais.

Tabela 5. 13 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados para a variável resposta CL_{50} relativa, obtida com ensaios do planejamento 2^2 em biorreator.

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F	Nível de Confiança
Glicerol	0,0085	1	0,0085	0,1116	0,7603
Saturação (OD)	0,772	1	0,0772	1,0142	0,3881
Interação	0,4301	1	0,4301	5,6511	0,09786
Erro	1,714	3	0,571		
Total SS	0,7441	6			

$$R^2 = 0,693$$

Logo, pelo presente trabalho não foi possível traçar um modelo que descreve o comportamento das variáveis resposta crescimento celular e CL₅₀ com os dados obtidos.

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, e devido ao fato de os dados de outros autores (AVIGNONE-ROSSA; ARCAS; MIGNONE, 1992; MALDONADO-BLANCO et al., 2003; GHRIBI et al., 2007; BONIOLO et al.; 2012) confirmarem que uma maior concentração de OD e uma menor concentração de fontes de carbono proporcionarem maior produção de toxinas, decidiu-se estabelecer a melhor condição de produção, sem realizar ensaios adicionais para tentar encontrar um modelo satisfatório, possivelmente de segunda ordem. Portanto, estabeleceu-se como melhor condição para produção de toxina, em relação às variáveis estudadas, 10 g/L de glicerol inicial e 45% de concentração de oxigênio.

A maior produção de toxinas com a diminuição de glicerol pode ser explicada por estudos realizados por Ghribi et al. (2007). Os autores demonstraram que a maior limitação de produção de bioinseticida está relacionada com a regulação da repressão da síntese de endotoxinas causada pelo aumento da concentração de fontes de carbono assimiláveis pela bactéria. Basicamente, a repressão catabólica corresponde à limitação da síntese de proteínas por fontes de carbono assimiláveis em altas concentrações. Os resultados obtidos pelos autores comprovaram a repressão da produção de δ -endotoxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* com o aumento da concentração de glicose e de glicerol no meio de fermentação. Em princípio, a repressão catabólica por fontes de carbono para esta bactéria não está relacionada com o modelo clássico de repressão em bactérias Gram-positivas via HPr kinase, uma vez que, neste modelo clássico, a repressão catabólica não deveria ser observada quando se emprega glicerol, pois este entra no ciclo de Krebs sem produção de 1,6-frutose-bifosfato, principal fator de estimulação de HPr Kinase (GHRIBI et al., 2007).

Barbosa (2009), em seu estudo empregando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel de sebo bovino como fonte de carbono, também observou um efeito negativo do aumento da concentração de glicerol no meio de fermentação sobre a produção de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Segundo Zouari, Achour e Jaoua (2002), o decréscimo da produção de endotoxinas com o aumento da concentração de fontes de carbono também pode ser explicado pelo direcionamento do fluxo de energia para a manutenção estrutural e funcional da grande quantidade de biomassa produzida em detrimento da síntese de toxinas.

Com relação ao aumento da produção com o aumento da concentração de oxigênio, como já mencionado, alguns trabalhos podem ser citados. Maldonado-Blanco et al. (2003),

estudaram o efeito da tensão de oxigênio dissolvido na produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* e constataram que uma maior aeração no meio fermentado possibilitou uma melhora na produção de toxinas. Ao empregar uma combinação de 0,6 vvm e 300 rpm foi obtido menos de 1% de mortalidade de larvas enquanto que ao empregar 0,6 vvm e 500 rpm foi obtido 59,7% de morte.

Estudos realizados por Ghribi et al. (2007) e por Boniolo et al. (2012), demonstraram a necessidade de se determinar um adequado nível de aeração para superar a repressão da síntese de δ -endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*. De acordo com resultados obtidos por Ghribi, altas concentrações de toxinas foram obtidas quando se empregou 60% de concentração de OD nas 6 primeiras horas de fermentação seguida da redução para 40% até o tempo final do cultivo. Porém resultados apresentados por Boniolo et al. (2012), demonstraram uma melhora de quase 5 vezes na produção de toxinas ao aumentar a concentração de OD de 50% para 100% na fase III de crescimento celular. Por este motivo, foram realizados testes variando-se a concentração de oxigênio antes e depois da fase de esporulação, de acordo com o descrito no item 4.7.6, a fim de se obter um meio fermentado com maior atividade larvicida.

5.4.3. Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido durante a fase de esporulação sobre a atividade tóxica do meio fermentado

Como o melhor resultado de atividade tóxica obtido no estudo de avaliação da concentração de OD e concentração de glicerol em biorreator foi o ensaio realizado com 10 g/L de glicerol e 45% de concentração de OD, estas foram as condições empregadas em todos os ensaios deste próximo estudo. Ou seja, 10g/L de glicerol foi a concentração inicial de substrato e o biorreator foi ajustado para que a concentração de OD até o início da fase III de crescimento não atingisse valores inferiores a 45%. Todos os ensaios foram analisados de hora em hora coletando-se uma amostra do meio fermentado e observando-se a morfologia celular por microscopia. Conforme mencionado no item 4.7.6, quando identificado o início da fase III, como descrito por Berbert-Molina et.al (2008), a concentração de oxigênio foi alterada para 5, 25, 75 e 90%.

Na Figura 5.66 observam-se todas as fases de crescimento microbiano e os respectivos perfis de consumo de substrato, no caso, glicose, e concentração celular, conforme descrito por Berbert-Molina et.al (2008). De acordo com os autores a fase I, denominada crescimento

vegetativo, apresenta rápido decréscimo do pH, atingindo valores em torno de 5,6, e intenso consumo de oxigênio. Nesta fase são observadas as fases lag, crescimento exponencial e linear, por microscopia são observadas células isoladas e com alta mobilidade. A fase II inicia-se com 5 horas de fermentação, é observado aumento de pH, perda de mobilidade, início da formação de grumos e drástica redução na velocidade de consumo de oxigênio. A fase III inicia-se com 13 horas de fermentação e é caracterizada pelo início da formação de esporos, são observados grandes grumos de células e, durante esta fase, é observado diminuição da biomassa e aumento da concentração de oxigênio. O final desta fase ocorre com 20 horas de fermentação, com uma taxa de esporulação de 90% e início da dissociação dos grumos. Na fase IV, é observada completa maturação dos esporos, progressiva diminuição dos tamanhos dos grumos de células, consecutivamente lise celular e liberação dos esporos.

Figura 5.66 - Perfil de concentração celular (■) e concentração de glicose (▲) em função do tempo de fermentação para as fases de crescimento I, II, III e IV (BERBERT-MOLINA et al., 2008).

De acordo com Sarrafzadeh et al. (2005), as proteínas responsáveis pela atividade tóxica Cry4A (125 kDa), Cry4B (134 kDa), Cry11A (67 kDa) e Cyt1A (27 kDa) denominadas como δ -endotoxinas são produzidas em diferentes momentos do crescimento de *Bacillus thuringiensis*. Segundo os autores a primeira endotoxina sintetizada é a Cry11A, sendo detectada logo no início da esporulação e sua síntese está associada a uma outra proteína produzida na fase vegetativa. As demais proteínas são sintetizadas quando atingida uma taxa

de esporulação em torno de 40%. Os autores também observaram que as proteínas Cry11 A e Cyt1A aumentavam a concentração durante o cultivo, porém as proteínas de massa molecular em torno de 130 kDa (Cry4A e Cry4B) diminuíam sua intensidade devido a ações de enzimas proteolíticas. Portanto a obtenção de um meio com expressiva toxicidade está relacionada com todas as fases de crescimento, fazendo-se necessário compreender cada fase separadamente.

Para os experimentos realizados, o início da fase III foi estabelecido como a fase em que não era mais observada mobilidade, e havia presença de grumos e de esporos. O tempo identificado como início da fase III está representado pelas linhas tracejadas em vermelho. As linhas tracejadas em preto indicam o início das demais fases de crescimento (Figura 5.67).

Figura 5.67 – Continua

Figura 5.67 - Concentração celular e concentração de glicerol, em função do tempo de fermentação, para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de DO a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.

Como pode ser observado, todos os ensaios apresentaram fase lag de crescimento em torno de 2 a 4 horas, diferente do relatado por Berbert-Molina et al (2008), que com 3 horas de fermentação já se observava fase exponencial de crescimento. Este fato pode ser explicado pela diferença de metabolismo de diferentes fontes de carbono, pois os autores empregaram glicose e no presente trabalho utilizou-se glicerol. Além disso, o fato de se utilizar um glicerol residual de um processo industrial, e consequentemente de composição complexa, pode proporcionar este prolongamento da fase adaptação celular.

Em todos os ensaios foi observado início da fase II com 5 horas de fermentação, caracterizado principalmente pela formação de grumos. Já a fase III, na maioria dos ensaios ocorreu em torno de 11 horas de cultivo, sendo com 12 horas apenas no ensaio 45-75%. Este atraso de 1 hora não teve causa aparente, uma vez que todas as condições de cultivo foram as mesmas até a fase III em todos os ensaios, correspondendo portanto a variações inerentes ao bioprocessos. Além disso conforme já mencionado anteriormente, outros autores já mencionaram a não lineariedade do comportamento da bactéria em questão (AMICARELLI et al., 2010).

Foi também observada diferença na duração da fase III entre os ensaios: até 45% de concentração de DO (ensaios 45-5%, 45-25% e 45-45%) a fase III apresentou 6 horas de

duração, porém, com o aumento da concentração de DO este tempo foi se reduzindo, sendo de 4 horas para o ensaio 45-75% e de 3 horas para o ensaio 45-90%. Aparentemente o aumento do fornecimento de oxigênio acelerou a fase de esporulação, fazendo com que a maturação dos esporos ocorresse de forma mais rápida.

Nos ensaios empregando a menor e maior concentração de oxigênio dissolvido (45-5% e 45-90%) não foi observado consumo total de substrato, restando em torno de 1 g/L de glicerol, 10% do valor inicial. Para os demais ensaios, foi observado consumo total de substrato até o final da fase III. Isto indica que tanto baixas quanto altas concentrações de oxigênio interferem na assimilação de glicerol pela bactéria.

Na Figura 5.68 estão apresentados os perfis de pH para os ensaios realizados no presente estudo.

Figura 5.68 – Continua

Figura 5.68 - pH em função do tempo de fermentação para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de saturação de oxigênio a partir do início da fase III e ensaio com 45% de DO durante toda a fermentação.

Verificam-se, comportamentos muito semelhantes do pH até a fase III de crescimento (em torno de 11 horas de fermentação). O valor de pH não apresentou significativa variação nas primeiras horas de cultivo, apresentando um aumento no início da fase II, e, no início da fase III, praticamente em todos os casos foram atingidos valores próximos aos iniciais. Conforme discutido anteriormente, o comportamento observado nas primeiras horas de fermentação pode ser devido ao metabolismo de glicerol nas condições de concentração de DO empregadas, fazendo com que as células produzissem menos ácidos ou acelerassem seu consumo, diminuindo quantidade de ácidos acumulados e consequentemente não se observando abaixamento de pH. Além disso, compostos presentes no resíduo também podem afetar tal comportamento. O aumento do pH observado pode ser ocasionado pelo consumo de ácidos orgânicos presentes no meio ou daqueles sintetizados pela bactéria.

Porém, após alteração da concentração, observou-se comportamentos muito distintos. A maior variação de pH foi observada no ensaio com menor concentração de OD, atingindo valor mínimo de 5,7, ao contrário dos outros ensaios que não atingiram valor inferior de 6,2. Outro ensaio que apresentou bastante variação no perfil de pH foi o ensaio com 45-75%, que apresentou aumento ao invés de redução após alteração da concentração de DO.

A falta de estudos relacionando glicerol, concentração de OD e pH dificultam a apresentação de embasamento teórico que justifique tais comportamentos de pH.

Na Figura 5.69 estão apresentados os valores de concentração de OD e frequência de agitação para os ensaios realizados neste estudo.

Figura 5.69 – Continua

Figura 5.69 – Continuação

Figura 5.69 - Concentração de oxigênio (%) e frequência de agitação (rpm) para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de DO a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.

Observa-se que nas duas primeiras horas de fermentação, correspondente à fase lag, ocorreu intenso consumo de oxigênio, em todos os ensaios, fazendo com que a concentração de OD atingisse o valor mínimo de 45% e com que o sistema de agitação fosse ativado para manter constante este valor mínimo.

Durante a fase II, a agitação atingiu um valor máximo em torno de 600 rpm para manter a concentração de OD em 45%.

Comparando os ensaios 45-5% e 45-25% observa-se que o tempo de fermentação diminuiu com o aumento da concentração de OD de 5% para 25%, passando de 23 horas para 19 horas. Maldonado-Blanco et al. (2003), também observaram redução do tempo de fermentação com o aumento da concentração de OD. Em seu estudo, o tempo de fermentação reduziu de 30,3 para 18 horas quando empregada uma agitação de 500 rpm e uma aeração de 1 vvm ao invés de 100 rpm e 0,6 vvm.

A atividade tóxica dos meios (volume de meio fermentado correspondente a CL_{50}) estão apresentadas na Figura 5.70.

Figura 5.70 - Volume (mL) de meio fermentado correspondente a CL_{50} em um total de 6mL de água para os ensaios com 5, 25, 75 e 90% de concentração de OD a partir do início da fase III e ensaio com 45% de OD durante toda a fermentação.

Como pode ser observado, o menor valor de CL_{50} obtido foi quando a concentração de OD foi mantida constante a 45% durante todo o processo. O segundo melhor resultado obtido foi quando a concentração de OD foi reduzida para 25% durante a fase III de crescimento. Porém este valor ainda está 8,3 vezes maior que o melhor resultado.

Portanto, a melhor condição para produção de bioinseticida, empregando o glicerol residual da produção de biodiesel como fonte de carbono, é manter o valor de 45% de OD durante todo o processo fermentativo.

Boniolo et al. (2012), estudaram a influência da concentração de OD na fase vegetativa e na fase de esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cultivado em meio GYS. Em seu estudo, foram realizados 4 ensaios com as seguintes concentrações de OD: 50-0%, 50-5%, 50-20% e 50-100%, sendo a alteração da concentração de OD também realizada no início da fase III de crescimento. Os autores verificaram diferença no perfil de crescimento apenas quando foi empregado 100% de oxigênio, no qual observou-se um rápido decréscimo da concentração celular após alteração da concentração de OD, devido ao aumento da lise celular ocasionado pela alta concentração de oxigênio. No presente estudo não foi observada significativa alteração no perfil de crescimento celular após a fase III. Os

autores também observaram diminuição da velocidade de consumo de substrato nos ensaios com 50-0% e 50-5%, sendo observado o esgotamento do substrato em um tempo maior que nos outros ensaios, fato que também foi observado no ensaio 45-5% do presente trabalho.

Com relação à atividade tóxica, Boniolo et al. (2012) não observaram atividade tóxica no ensaio com interrupção de fornecimento de oxigênio (50-0%). Ensaios sem controle de oxigênio, no presente trabalho, nos quais foram atingidas concentrações de OD próximas a zero logo no início da fermentação, também produziram meios sem atividade larvicida (dados não apresentados). Com relação aos demais ensaios (50-5%, 50-20%, 50-50%), os autores não observaram diferença significativa de atividade tóxica, porém quando empregada a condição 50-100% foi encontrada uma atividade tóxica 4 vezes maior. Tal fato não foi observado no presente estudo, como discutido anteriormente, ao aumentar a saturação de oxigênio, após a fase III, de 5 para 45% teve um valor de CL_{50} 25 vezes menor, demonstrando o efeito positivo do aumento da concentração de OD sobre a produção de toxinas. Porém, ao se aumentar de 45 para 90% ocorreu um aumento de CL_{50} em torno de 30 vezes, respectivamente. Assim, conclui-se o aumento da concentração de OD até um determinado valor favorece a produção de toxina e, acima deste, é prejudicial.

O aumento da atividade larvicida com o aumento da concentração de OD já foi observado por vários autores (AVIGNONE-ROSSA; ARCAS; MIGNONE, 1992; MALDONADO-BLANCO et al., 2003; GHRIBI et al., 2007; BONIOLO et al., 2012), porém, conforme concluído anteriormente, para as condições de cultivo estipuladas neste estudo, trabalhar com concentrações de OD superiores a 45% prejudica a produção de toxinas.

Uma possível explicação para a redução da produção de toxinas com o aumento da concentração de OD pode ser a redução da duração da fase III (fase de esporulação). Ghribi et al. (2007), também realizaram um estudo com diferentes concentrações de OD na fase vegetativa e na fase de esporulação no cultivo de *Bacillus thuringiensis* em glicose e observaram melhores resultados de produção de toxinas no ensaio 60-40% do que no ensaio 60-80%. Segundo os autores, o prolongamento do tempo da fase de esporulação no ensaio com menor concentração de OD (60-40%) poderia ter fornecido adicional tempo para a expressão dos genes Cry e formação do cristal, justificando o aumento da síntese da toxina.

Outro resultado obtido por Ghribi et al. (2007), que poderia explicar as diferenças entre os resultados apresentados por Boniolo et al. (2012) e os observados no presente trabalho, foram os obtidos no estudo da determinação das melhores concentrações de OD na fase vegetativa e na fase de esporulação de *Bacillus thuringiensis* em meio com glicose e com

glicerol. Segundo os autores, uma menor concentração de OD foi necessário no ensaio com glicerol (60-40%) comparado aos ensaios com glicose (80-60%), para otimizar a produção de δ -endotoxina.

Portanto, a melhora na produção de toxina obtida pode ser observada na Figura 5.71, que apresenta uma comparação entre os volumes de meio fermentado correspondentes ao CL_{50} do ensaio empregando glicerol PA (item 5.1), ao melhor resultado obtido no planejamento em incubadora de movimento recíproco (item 5.3.2) e ao melhor valor de CL_{50} determinado como melhor condição (45-45%) em biorreator (item 5.4.2). Foi verificado que, após os estudos realizados, foi possível obter um meio fermentado, empregando-se glicerol residual como substrato e realizando-se a fermentação em biorreator, 583 vezes mais eficiente que o ensaio controle em incubadora de movimento circular e empregando glicerol PA como fonte de carbono.

Figura 5.71 - Comparação dos volumes de meio fermentado adicionado em 6mL suficiente para matar 50% da população de larvas obtidos no ensaio empregando glicerol PA (item 5.1), melhor resultado obtido no planejamento em incubadora (item 5.3.2) e ensaio otimizado no Biorreator (item 5.4.2)

Logo, conclui-se que este estudo contribuiu para otimizar o meio de cultura e condições de processo para a obtenção de um meio fermentado com maior atividade larvica contra o mosquito *Aedes aegypti*, empregando a glicerina residual da fabricação de biodiesel como fonte de carbono.

6. CONCLUSÕES

- O resíduo da fabricação de biodiesel necessita ser submetido a um tratamento, a fim de se remover compostos tóxicos para *Bacillus thuringiensis*, e assim ser empregado como fonte de carbono para a produção de bioinseticida.
- O melhor tratamento do resíduo da fabricação de biodiesel a partir de óleo de soja, que garante maior produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* consiste do abaixamento do pH até 4 com ácido fosfórico, seguido de decantação por 24 horas.
- A produção de toxina por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no meio estudado não está diretamente relacionada com o crescimento da bactéria, portanto não necessariamente meios com maior concentração celular apresentarão maior atividade larvicida.
- Dos nutrientes estudados (glicerol, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), apenas glicerol e extrato de levedura exercem influência significativa sobre o crescimento celular e nenhum dos nutrientes exercem influência significativa sobre a produção de toxina.
- Nas condições estudadas, não há influência significativa da concentração de oxigênio e concentração inicial de glicerol sobre a concentração celular máxima.
- A produção de toxina é influenciada positivamente pela concentração de oxigênio dissolvido no meio fermentado e negativamente pela concentração inicial de glicerol. Obtém-se excelentes resultados de atividade larvicida do meio, mantendo-se a concentração de O.D. a 45% da saturação, durante todo o processo fermentativo.
- Em biorreator, o aumento da concentração de fonte de carbono, glicerol, apresenta um efeito negativo na produção de toxina, portanto a concentração de glicerol que proporciona maior produção de toxinas é 10 g/L.
- O aumento da concentração de oxigênio a partir da fase III de crescimento (fase de esporulação) favorece a produção de toxinas, até o valor de 45% da saturação. Valores de concentração de oxigênio dissolvido superiores a 45% prejudicam a produção de toxina.

- É possível produzir bioinseticida a partir de resíduo da fabricação de biodiesel empregando-se *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar as alterações biológicas sofridas por *Bacillus thuringiensis* após submetido a requipe e estabelecer as melhores condições para diminuir as variações de processo.
- ✓ Estudar o perfil proteico das proteínas que compõem as δ -endotoxinas em diferentes condições e relacionar com atividade tóxica visando uma melhor compreensão de sua síntese para a otimização do processo.
- ✓ Estudar o emprego de levedo de cervejaria como fonte de nitrogênio orgânico na composição do meio de fermentação de *Bacillus thuringiensis* utilizando glicerol proveniente do resíduo obtido da fabricação de biodiesel
- ✓ Avaliar a influência da adição de ácido acético durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* na produção de toxina.
- ✓ Estudar, paralelamente, a produção de PHB durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* para melhor compreender a relação entre a produção de PHB e da toxina.
- ✓ Aprofundar o estudo sobre a influência de oxigênio, estudando concentrações menores que 45% nas fases I e II do crescimento e mantendo-se constante 45% para as demais fases.
- ✓ Estudar uma forma de formular o bioinseticida produzido, sendo sugerida a imobilização em alginato de cálcio ou alginato de zinco.
- ✓ Estudar os parâmetros que influenciam na produção das esferas de alginato de cálcio, de modo a proporcionar uma liberação adequada da toxina.
- ✓ Estudar formas de acondicionamento das esferas proporcionando uma liberação mais efetiva e prolongada.
- ✓ Realizar estudos de aplicação em campo do bioinseticida desenvolvido.

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. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.6, p.313-317, 1990.

AMICARELLI, A.; DI SCIASCIO, F, TOIBERO, J.M.; ALVAREZ, H. Including dissolved oxygen dynamics into the Bt δ -entoxins production process model and its application to process control. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n.01, p. 44-62, 2010

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 Biochem. 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. cap.11, p. 295-300.

APOSTOLAKOU, A. A.; KOOKOS, I. K.; MARAZIOTI, C.; ANGELOPOULOS, K. C. Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetables oils. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.1023-1031, 2009.

ARAÚJO, V.M. **Nosso desafio é continuar crescendo com sucesso”, afirma o presidente da Petrobras Biocombustíveis.** Disponível em: <<http://www.producaodebiodiesel.com.br/combustiveis-e-o-mundo/brasil-lider-producao-mundial-biodiesel-biocombustivel-2012>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

ARAÚJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS, S. O.; RIOS, E. M. M. M.; REGIS, L. Evaluation of na experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. Against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v. 41, p.339-347, 2007.

ARNAUD, A.; GUIRAUD, J-P. Bioquímica Microbiana. In: SCRIBAN, R. coord., **Biotecnologia**. São Paulo: Manole Ltda., p. 47-102, 1985.

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 jun. 2008.

AVIGNONE-ROSSA C.; ARCAS J.; MIGNONE C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnolog.** v.8, p. 301-304, 1992.

BARBOSA, C.R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2009.

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 jun. 2008.

BEHLE, R. W.; MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Effects of sunlight and simulated rain on the residual activity of *Bacillus thuringiensis*. **J Econ Entomol**, v. 90, p. 1506-1516, 1997.

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.; SILVEIRA, M.M.; SATO, S. Estudo cinético do crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio semi-sintético com diferentes concentrações iniciais de glicose. In: SINAFERM – Simpósio Nacional de Fermentações, 13., 2000, Teresópolis. **Anais**. CD-ROM.

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: John Wiley Sons Ltd., p.255-267, 1993.

BIODIESEL no Brasil. **biodieselbr.com**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm>>. Acesso em: 05 jan 2012.

BIZZARRI, M.F.; BISHOP, A.H. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. **Microb. Ecol.**, v. 56, p. 133-139, 2008.

BOK S. H.; KIM S. K; KWON Y. **Bioencapsulated biopesticides and process for the manufacture thereof**. CIPO 2, CA 2118267, 17 out. 1994, 30 dez. 1997.

BONIOLO, F.S.; RODRIGUES, C.; PRATA A.M.R.; LÓPEZ, M.L; JACINTO, T.; SILVEIRA, M.M.; BERBET-MOLLINA, M.A. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentation: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, ref. AMAB-D-11-00965R2.

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.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production an policies in the European Union. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Turkey, v. 12, p. 542-552, 2008.

BRAGA, C.; LUNA, C. F.; MARTELLI, C. M. T.; SOUZA, W. V.; CORDEIRO, M. T.; ALEXANDER, N.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; JÚNIOR, J. C. S.; MARQUES, E. T. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in sócio-economically distinct áreas of Recife, Brazil. **Acta Tropica**. v. 113, p. 234-240, 2010.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacilluss thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 323-342, 2006.

BRASIL terá bioinseticida contra a dengue em 2012. **Diário de Pernambuco**. Disponível em: <<http://www.diariodepernambuco.com.br/brasil/nota.asp?materia=20111217113314>>. Acesso em: 17 dez 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanism and use. In: GILBERT, L. I., IATROU, K., GILL, S. S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**. 1 ed., Califórnia: Elsevier, 2005. p.175-206.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1-9, 2011.

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.

CARLTON, B. C.; GONZALEZ, J. M.; Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. In: HOCH, J. A., SETLOW, P. **Molecular biology of microbial differentiation**. Washington: America Society for Microbiology, p. 246-252, 1985.

CARMONA, M.; VALVERDE, J.; PÉREZ, A. Purification of glycerol/water solutions from biodiesel synthesis by íon exchange: sodium removal Part I. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 738-744, 2008.

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.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIORI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosaheptaenoic 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.; DROBNIIEWSKI, 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.

COISSI, J. Mosquito da dengue pode diblar veneno. **A FOLHA DE S. PAULO**, São Paulo, 5 jan. 2012. Caderno Ciência, p. C11

COHEN, E.; ROZEN, H.; JOSEPH, T.; BRAUN, S.; MARGULIES, L. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* from ultraviolet irradiation. **J Invertebr Pathol**, v.57, p. 343-351, 1991.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F., DELECLUSE, A.; ROUX N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 2000. cap 5.2 p. 524.

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.

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

DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agr. Hum. Values**, v. 24, p. 281-306, 2007.

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. **J.Invertebr. Pathol.**, v.16, p.385-389, 1970.

FEDERICI, B.A. *Bacillus thuringiensis* in Biological Control. In: **Handbook of Biological Control**. Califórnia:Universidade da Califórnia, 1999. p.575-593.

FORREST, A. K.; SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of biodiesel glycerol type and fermentor configuration on mixed-acid fermentations. **Biosource Technology**, v. 101, p. 9185-9189, 2010.

GARCEZ, C. A. G.; VIANNA, J. N. S. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. **Energy Brasil**, v. 34, p. 645-654, 2009.

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

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, N.M. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. Chichester: Wiley and Sons, 2000. 350p

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.

GUNASEKARAN, K., PRABAKARAN, G., BALARAMAN, K. Efficacy of a floating sustained release formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* in controlling *Culex quinquefasciatus* larvae in polluted water habitats. **Acta Tropica**, v. 83, p. 241-247, 2002.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3242-3245, 2010.

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

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

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 605-609, 2002b

ICOZ, I.; STOTZKY, G. Fate and effects of insect-resistance *Bt* crops in soil ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 559-586, 2008.

IFOULIS, A. A.; SAVAPOULOU-SOULTANI, M. Biological control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae by using different formulations of *Bacillus thuringiensis* in 11 vine cultivars under Field conditions. **J Econ Entomol**, v. 97, n. 2, p. 340-343, 2004.

IGNOFFO, C. M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. **Florida Entomol**, v. 75, p. 516-525, 1992.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria 217**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

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

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

JONES, K. A.; BURGESS, H. D. Formulation of bacterial, viruses and protozoa to control insects. In: BURGESS, H. D. **Formulation of microbial biopesticides: beneficial micro-organisms, nematodes and seed treatment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 7-127.

KHEDHER, S.B.; KAMOUN A.; JAOUA, S. ZOUARI, N. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. **New Biotechnology**, v.28, p. 705-712, 2011.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. Glicerol. **Manual de Biodiesel**, São Paulo: editora Blucher, 2006. p. 295-297.

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

LACEY, L. A., 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.

LANCRENON, X.; FEDDERS, J. Na innovation in Glycerin Purification. Biodiesel Magazine, 2008. Disponível em: <<http://www.biodieselmagazine.com/articles/2388/an-innovation-in-glycerin-purification/>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

LEE, Y. W.; ZAIRI, J. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes* mosquitoes. **Tropical Biomedicine**, v. 23, n.1, p. 37-44, 2006.

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

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

MALDONADO-BLANCO, M.G., SOLIS-ROMERO, G., GALAN-WONG, L.J. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, n.7, p.671-674, 2003.

MELO-SANTOS, M. A. V.; SANCHES, E. G.; JESUS, F. J.; REGIS, L. Evaluation of a New Tablet Formulation Based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for Larvicidal Control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1-2, 2001.

MIGNONE, C.F., AVIGNONE-ROSSA, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Apply Microbiol Biotechnol**, v.46, p.78-84, 1996.

MINISTÉRIO da Saúde apresenta mapa da dengue no país. **Portal da saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3562/162/ministerio-da-saude-apresenta-mapa-da-dengue-no-pais.html>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Balanço Dengue, Informe-janeiro a março/2011**. Disponível em: http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_janeiro_e_marco_13_04.pdf. Acesso em: 10 de jun. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/>>. Acesso em: 20 de mar. 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.

MISTURA de biodiesel no diesel convencional pode aumentar. **Folha.com**. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ambiente/876379-mistura-de-biodiesel-no-diesel-convencional-pode-aumentar.shtml>>. Acesso em: 28 de mar. 2011.

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 twophase systems: evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p. 529-537, 1996.

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* var. *aizawa* (HD 133). **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. **Biotechnol Lett.**, v.28, p.1755–1759, 2006.

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

NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. **Bioresource Technology**, Honolulu, v. 102, p. 5808-5814, 2011.

NOGUEIRA, L. A. H. Does Biodiesel make sense?. **Energy**, v. 30, p. 1-8, 2010.

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

O PROGRAMA. **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, 2007**. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>>. Acesso em: 08 jun. 2008.

OECD-FAO agricultural outlook 2010 -2019, OECD, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD Publishing**. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org/dataoecd/13/13/45438527.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

ÖZKAN, M.; DILEK, F. B.; YETIS, Ü.; ÖZCENGIS, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipterian 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, Portland, Oregon, 2006. p. 9 – 12.

PAPANIKOLAOU, S., FAKAS, S., FICK, M., CHEVALOT, I., PANAYOTOU, G. M., KOMAITIS, M., MARC, I., AGGELIS, G. Biotechnological valorisation 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.

PESSANHA, L.G. **Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia).– Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 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. **Rev. Bras. Entomol.** v.48 n.1, p.127-132, 2004.

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

POOPATHI S, KUMAR A, KABILAN L, Sekar V., (2002) Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. **World J. of Microbiol. and Biotechnol.** v.18, p.219-216, 2002.

POOPATHI, S.; ABIDHA, S. use of feather-based culture media for the production of mosquitocidal bactéria. **Biological Control**, v. 43, p. 49-55, 2007.

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

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for long-term preservation. **Journal os Microbiological Methods**, v. 72, p. 91-94, 2008a.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin anf biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for large-scale production of mosquito control agent. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.35, p. 961-965, 2008b

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L.; MANONMANI, A. M.; BALARAMAN, K. Coconut water as a cheap source for the production of delta- endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. **Acta Tropica**, v. 105, p. 35-38, 2008b.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Cell press**, v. 18, n.5, p. 189-194, 2010.

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**, v. 83. P. 1072-1080, 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.** 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2008.

RODRIGUES, R.C. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico sobre a produção de biomassa e a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Monografia (Licenciatura em Biologia)** - UENF, Campos dos Goytacazes, 2006.

RODRIGUES, R.C. **Aproveitamento de xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi para cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Produção Industrial) – Centro de Ciência e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2009.

ROGOFF, M., YOUSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.23, p.257-386, 1969.

ROWE, G.E.; MARGARITIS, A.; WEI, N. Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. **Biotechnology Process**, v.19, p. 1439-1443, 2003

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 J. Microbiol. & Biotechnol.**, 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.

SARRAFZADEH, M. H.; BIGEY, F.; CAPARICCIO, B.; MEHRNIA, M.; GUIRAUD, J.; NAVARRO, J. Simple indicators of plasmid loss during fermentation of *Bacillus thuringiensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1052-1058, 2007.

SIKDAR, D.P., MAJUMBAR, M.K., MAJUMDAR, S.K. effect of Minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnol. Lett.** v.13, n.7, p.511-517, 1991.

SILVEIRA, M.M.; BERBERT-MOLINA, M.B. Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, n.4, p.495-500, 2005.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 1337-1349, 2009.

SRESHTY, M. A. L.; KUMAR, K. P.; MURTY, U. S. N. synergism between wild-type *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* strains: A study based on isobolographic analysis and histopathology. **Acta Tropica**. v. 118, p. 14-20, 2011.

STAHLY, P., ANDREWS, R.E., YOSTEN, A.A. The genus *Bacillus* – Insect Pathogens. In: BALOWS, A.H.G.; TRUPPER, M.; DWORKIN, W.; HERDER, K.H. **The Prokaryotes**. 2nd. Ed., New York: Springer-Verlag, 1991. p. 4770.

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.

POTTHAST R; CHUNG C. P.; MATHUR I. **Purification of glycerin obtained as a bioproduct from the transesterification of triglycerides in the synthesis of biofuel.**, US 7718833, 03 nov. 2003, 18 maio 2010.

VISSER, E. M.; FILHO, D. O.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 489-494, 2011.

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.

WHO, World Health Organization. WHO Working Group on technical specifications for manufacture and evaluation of dengue vaccines. **Vaccine**, v.28, p.8246-8255, 2010

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.

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.

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.

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.

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-dm³ fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 877-882, 2002.