STEPHANIE CAROLINE TAVARES TABUCHI

Utilização do extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
Setembro, 2013

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

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Tabuchi, Stephanie Caroline Tavares
Utilização do extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* / Stephanie Caroline Tavares Tabuchi. –ed. reimpr., corr.– 2013.
80 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.
Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata

1. *Bacillus thuringiensis* 2. Levedo de cerveja 3. Biodiesel 4. Glicerol 5. Formulação de meio. I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orient.

661.164.2 - CDU

AGRADECIMENTOS

À Escola de Engenharia de Lorena, em especial ao Departamento de Biotecnologia, por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela orientação, paciência, dedicação e, em especial, pela amizade construída ao longo desses anos.

À minha mãe Isabel, por todo apoio, confiança, cuidado e dedicação. Por sempre acreditar na minha capacidade e me incentivar a ir adiante. Cada vitória minha é sua também.

Ao meu pai Yutaka, que, mesmo à distância, sempre cuidou de mim.

Ao Rodrigo, por todo amor, carinho, incentivo e companheirismo. Pela paciência e interesse em ouvir todos os meus comentários e explicações sobre os experimentos.

Às minhas amigas Thais, Beatriz e Rebeca pela amizade e por todos os momentos maravilhosos que trago em minha lembrança e que tenho muita saudade. Nosso Quarteto é e sempre será inesquecível.

Ao Rogério, mais do que um colega de laboratório, um amigo querido. Desejo-lhe muita sorte nessa nova fase da sua vida.

Às colegas Mirela, Thais e Júlia, pela ajuda e pelos momentos compartilhados no laboratório.

À Prof. Drª Rita de Cássia L. Brambilla Rodrigues pela paciência e ajuda quando eu não conseguia enxergar além da estatística.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e torceram por mim.

(Charles M. Schulz)

RESUMO

TABUCHI, S. C. T. **Utilização do extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis***. 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2013.

A utilização de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* tem se mostrado eficaz no combate às larvas de insetos veiculadores de doenças como a dengue, elefantíase e malária. O bioinseticida apresenta alta especificidade, ausência de resistência nos insetos alvos e baixo impacto ambiental comparado aos inseticidas químicos. Porém, a difusão do uso de bioinseticida apresenta alguns desafios como o custo da produção e da formulação. O levedo excedente da indústria cervejeira pode tornar a produção do bioinseticida economicamente viável devido ao seu baixo custo, assim como o glicerol, resíduo da produção de biodiesel. A escolha adequada dos componentes do meio de cultivo é essencial para o sucesso de um produto e deve ser realizada buscando-se obter uma alta produtividade com o menor custo. Além disso, no caso do bioinseticida, os componentes do meio exercem uma grande influência no crescimento e na síntese de toxinas pela bactéria. No presente trabalho, propôs-se formular um meio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando levedo de cerveja e glicerol proveniente da fabricação de biodiesel, visando obter um meio fermentado com elevada toxicidade e de menor custo, comparado aos obtidos atualmente. Inicialmente foi definido um procedimento de preparo do extrato de levedo de cerveja. Constatou-se que o melhor método consiste da esterilização da suspensão de levedo de cerveja (121 ºC por 20 minutos) seguida de filtração qualitativa. Foi definida também a faixa de concentração de extrato de levedo de cerveja que seria utilizada no estudo de composição do meio (10 g/L a 30 g/L). Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1000 mL em incubadora de movimento recíproco. Os componentes do meio de cultivo (glicerol residual, extrato de levedo de cerveja, KNO_3, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$, K_2HPO_4 e KH_2PO_4) foram avaliados segundo um planejamento experimental e, nas condições estudadas, não exerceram influência significativa sobre a produção de toxinas. Definiu-se então a composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio. O glicerol e o extrato de levedo de cerveja não exerceram influência significativa sobre o consumo de substrato pela bactéria. Quanto à concentração celular máxima, o aumento da concentração de glicerol apresentou efeito negativo, enquanto o aumento da concentração de extrato de levedo de cerveja apresentou efeito positivo. Embora as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio não tenham sido significativas para a atividade larvicida, a interação entre os fatores foi significativa em seu nível negativo. O melhor resultado quanto à atividade larvicida do meio foi apresentado pelo meio composto por 10 g/L de glicerol residual, 30 g/L de extrato de levedo de cerveja, 5 g/L de KNO_3, 0,12 g/L de $CaCl_2.2H_2O$, 1,5 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 0,09 g/L de $MnSO_4$, 1,5 g/L de K_2HPO_4 e 1,5 g/L de KH_2PO_4. Essa mesma composição de meio de cultivo foi testada em um ensaio em biorreator, obtendo-se um meio fermentado mais eficiente que o ensaio realizado em incubadora, e com CL_{50} de 2,43 μL.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Levedo de cerveja. Biodiesel. Glicerol. Formulação de meio.

ABSTRACT

TABUCHI, S. C. T. **Utilization of brewer's yeast extract as a supplement to medium based on residual glycerol for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis***. 2013. 80 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2013.

The use of bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis* has been shown to be effective against larvae of insects able to spread diseases such as dengue, malaria and elephantiasis. The bioinsecticide has high specificity, absence of resistance in target insects and low environmental impact compared to chemical insecticides. However, there are some challenges in the way of widespread use of bioinsecticide, such as the costs of production and formulation. The surplus yeast from the brewing industry can make the production of bioinsecticide economically feasible due to its low cost, as well as the residual glycerol from the biodiesel production. The proper choice of the components of the culture medium is essential for the success of a product and must be carried out in order to obtain a high productivity at the lowest cost. Furthermore, in the case of bioinsecticide, medium components have a major influence on the growth and synthesis of toxins by the bacteria. In the present study it was proposed the formulation of a fermentation medium for *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* using brewer's yeast and glycerol from the biodiesel manufacturing, seeking to obtain a fermented broth with high toxicity and lower cost compared to those currently obtained. Initially it was defined a procedure to prepare the extract of brewer's yeast. It was found that the best method is the sterilization of the brewer's yeast suspension (121 °C for 20 minutes) followed by qualitative filtration. The range of brewer's yeast extract concentration to be used in the study of the medium composition was also defined (10 g/L to 30 g/L). Assays were performed in 1000 mL *Erlenmeyer* flasks in a reciprocal motion shaker. The components of the medium (glycerol waste, brewer's yeast extract, KNO_3, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$, K_2HPO_4 e KH_2PO_4) were evaluated according to an experimental design and, considering the studied conditions, they did not have significant influence on the toxin production. Thus, the composition of the fermentation medium was defined in terms of nitrogen and carbon source. Glycerol and brewer's yeast extract did not have any significant influence on the substrate consumption by the bacteria. For the maximum cell concentration, the increase of glycerol concentration showed a negative effect, while increasing the concentration of brewer's yeast extract showed a positive effect. Although the concentrations of carbon and nitrogen sources were not significant for the larvicidal activity, the interaction between such factors was significant in its negative level. The best result of larvicidal activity was shown by the following medium: 10 g/L of residual glycerol, 30 g/L of brewer's yeast extract, 5 g/L of KNO_3, 0.12 g/L of $CaCl_2.2H_2O$, 1.5 g/L of $MgSO_4.7H_2O$, 0.09 g/L of $MnSO_4$, 1.5 g/L of K_2HPO_4 and 1.5 g/L of KH_2PO_4. This same composition of the culture medium was tested in a bench fermenter, resulting in a more efficient fermented broth than the one obtained in shaker flask, and with LC_{50} of 2.43 μL.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Brewer's yeast. Biodiesel. Glycerol. Medium formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel (GERIS, 2007). 17

Figura 2.2 - Evolução anual da produção de biodiesel no Brasil (Adaptado de ANP, 2013 e UBRABIO; FGV, 2013). 18

Figura 2.3 - Ação da toxina de *Bacillus thuringiensis* em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2011).....266

Figura 4.1 - Procedimentos dos métodos de preparo utilizados para a obtenção do extrato de levedo de cerveja.....38

Figura 5.1 - Fluxo de permeado do Ensaio I em função do tempo, durante filtração tangencial de extrato de levedo de cerveja... 45

Figura 5.2 - Porcentagens de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes volumes do meio fermentado no qual se utilizou 20 g/L de levedo de cerveja preparado pelo Método 1. 47

Figura 5.3 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos, ao nível de confiança de 95%, sobre a resposta % de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*.....50

Figura 5.4 - Concentração celular (-♦-) e concentração de glicerol (-■-), em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central. 52

Figura 5.5 - Valores de pH, em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central. 54

Figura 5.6 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a 0,01 mL de meio fermentado, proveniente dos ensaios do planejamento fatorial 2^2.....56

Figura 5.7 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a 0,005 mL de meio fermentado, proveniente dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^2.....57

Figura 5.8 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos, ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta concentração máxima de células, para os ensaios do planejamento fatorial 2^2. 58

Figura 5.9 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à concentração celular máxima ($X_{máx}$) em função dos fatores investigados, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2. 60

Figura 5.10 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta consumo de substrato, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2. 61

Figura 5.11 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta atividade larvicida, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2. 62

Figura 5.12 - Concentração celular (-♦-) e concentração de glicerol (-■-), em função do tempo, durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados. 64

Figura 5.13 - Valores de pH, em função do tempo,durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados. 64

Figura 5.14 - Concentração de OD (-♦-), em % da saturação, e frequência de agitação (-■-), em função do tempo, durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados 66

Figura 5.15 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* em função de diferentes volumes de meio fermentado empregado no teste de atividade larvicida do meio obtido no ensaio em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Análise química do extrato de levedo de cerveja e extrato de levedura comercial (Difco, USA). Os valores estão expressos em % (m/m) de massa seca (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001).....22

Tabela 2.2 - Principais componentes e suas concentrações utilizadas no meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* (COUCH, 2000).....30

Tabela 4.1 - Correspondência entre os valores reais e codificados dos fatores empregados para o planejamento fatorial fracionário 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central. 39

Tabela 4.2 - Matriz do planejamento dos ensaios, com os níveis dos fatores codificados, do planejamento fatorial 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central.....39

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento dos ensaios, com os valores codificados e reais do planejamento fatorial completo 2^2 com 3 repetições do ponto central para avaliação da influência das variáveis glicerol (A) e extrato de levedo de cerveja (B)......40

Tabela 5.1 - Valores de vácuo e de vazão testados para a filtração tangencial do extrato de levedo de cerveja. 44

Tabela 5.2 - Porcentagens de Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes volumes de meio fermentado.....46

Tabela 5.3 - Matriz do planejamento fatorial 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central, para avaliação da influência das variáveis glicerol (X_1), Extrato de levedo de cerveja (X_2), KNO_3 (X_3), $CaCl_2.2H_2O$ (X_4), $MgSO_4.7H_2O$ (X_5), $MnSO_4.H_2O$ (X_6), K_2HPO_4 (X_7), KH_2PO_4 (X_8) sobre a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*.....47

Tabela 5.4 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta atividade larvicida, obtida com os ensaios do planejamento 2^{8-4}.....50

Tabela 5.5 - Concentração máxima de células ($X_{máx}$) e produtividade volumétrica em células (Q_x), referentes aos ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio. 55

Tabela 5.6 - Variáveis resposta referentes aos ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.....57

Tabela 5.7 – Critérios para validação de diferentes modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996). 58

Tabela 5.8 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta concentração celular máxima, obtida com os ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio. 59

Tabela 5.9 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta consumo de substrato, obtida com os ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio. 61

Tabela 5.10 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta atividade larvicida, obtida com os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio. 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

2.1 Biodiesel 17

2.2 Glicerol 19

2.3 Levedo de cerveja 21

2.4 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 233

2.4.1 Características 23

2.4.2 Atividade Entomopatogênica 24

2.5 A dengue e seu combate 26

2.6 Formulações de meio para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* 29

3. OBJETIVOS 33

4. MATERIAL E MÉTODOS 34

4.1 Microrganismo 34

4.2 Componentes do meio 34

4.2.1 Substrato 34

4.2.2 Fonte de Nitrogênio 34

4.2.3 Sais 35

4.3 Meios de cultivo 35

4.4 Condições de cultivo 36

4.4.1 Preparo do inóculo 36

4.4.2 Ensaios de fermentação em frascos 36

4.4.3 Ensaios de fermentação em biorreator 36

4.5 Sequência Experimental 37

4.5.1 Definição da condição de filtração tangencial da suspensão de levedo de cerveja 37

4.5.2 Avaliação da concentração do levedo de cerveja 37

4.5.3 Definição da composição do meio de fermentação 38

4.5.4 Definição da composição do meio de cultura em termos de fonte de carbono e de nitrogênio 40

4.5.5 Teste em biorreator 40

4.6 Métodos Analíticos 41
4.6.1 Concentração celular 41
4.6.2 Morfologia celular 41
4.6.3 Concentração de glicerol 42
4.6.4 Atividade larvicida dos meios 42
4.7 Forma de análise dos resultados 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
5.1 – Definição do procedimento de filtração tangencial 44
5.2 – Avaliação da concentração de levedo de cerveja 45
5.3 – Definição da composição do meio de fermentação 48
5.4 – Definição da composição do meio de cultura em termos de fonte de carbono e nitrogênio 51
5.5 – Avaliação, em biorreator, do meio definido em frascos agitados 63
6. CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS 69

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, e que, durante a fase de esporulação, produz toxinas que são eficientes no combate às larvas de insetos veiculadores de doenças, principalmente dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, transmissores da dengue, da elefantíase e da malária, respectivamente.

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores são um sério problema de saúde pública. No mundo todo, a cada ano, cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças graves causadas por organismos patogênicos veiculados por insetos vetores, dentre elas a dengue. No Brasil, as condições socioambientais favorecem o desenvolvimento de *Aedes aegypti*, vetor da doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido eficientes. Isto pode ser constatado pelos surtos da doença divulgados pela imprensa todos os anos. Pesquisas vêm sendo realizadas em diversos países para compreender melhor a doença e até mesmo já existem vacinas em desenvolvimento. 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.

O controle de insetos agrícolas e de vetores de doenças nos países em desenvolvimento é realizado, na sua maioria, por inseticidas químicos, mesmo com as diversas desvantagens advindas de seu emprego, que incluem a toxicidade aos animais, a resistência fisiológica dos vetores e os impactos ambientais negativos causados, como a contaminação de alimentos e o efeito prejudicial sobre insetos que possuem um papel benéfico para o homem.

A formulação de inseticidas com linhagens de *Bacillus thuringiensis* apresenta diversas vantagens sobre os inseticidas químicos, principalmente pelo fato de que essa bactéria atua apenas sobre a forma larval do inseto, sendo uma alternativa em relação ao problema do desenvolvimento de resistência por parte desses insetos.

Porém, a difusão do uso de bioinseticida empregando *Bacillus thuringiensis* apresenta alguns desafios como o custo da produção e a formulação. Matérias-primas de baixo custo têm sido avaliadas como fontes alternativas de nutrientes para o processo fermentativo, dentre as quais o glicerol residual e o levedo de cerveja.

A busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nos últimos anos. A substituição dos combustíveis fósseis tem sido motivada por fatores ambientais,

econômicos e sociais. Nesse contexto, destaca-se o uso de biocombustíveis, principalmente o biodiesel. Devido aos incentivos governamentais tal combustível está sendo produzido largamente, e um fator preocupante é o destino do glicerol, resíduo de sua fabricação, que constitui 10% do volume total do biodiesel produzido. O glicerol proveniente da fabricação do biodiesel tem aplicação limitada nas indústrias que tradicionalmente utilizam glicerol, devido ao custo elevado de sua purificação. Estudos estão sendo desenvolvidos para buscar alternativas para a utilização deste volume excedente de glicerol. Neste contexto, seu uso como substrato para o crescimento de microrganismos em processos fermentativos tem sido muito estudado. No caso de *Bacillus thuringiensis*, seu uso pode contribuir para tornar a produção do bioinseticida economicamente viável, além de ser uma alternativa promissora para a sua disposição sem danos ao meio ambiente.

Outro excedente com potencial para ser utilizado em processos fermentativos é o levedo de cerveja. O Brasil é um grande produtor e consumidor de cerveja. A crescente produção desta bebida gera uma grande quantidade de células de leveduras. Devido ao seu alto teor de proteínas, este subproduto é utilizado como suplemento alimentar, mas grande parte ainda é considerada lixo industrial. Estudos têm sido realizados utilizando a levedura residual cervejeira como fonte de nutrientes em processos fermentativos, principalmente fonte de nitrogênio orgânico.

A escolha adequada dos componentes do meio de cultivo é essencial para o sucesso de um produto e deve ser realizada buscando-se obter uma alta produtividade com o menor custo. No caso de *Bacillus thuringiensis*, os meios devem conter uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio orgânico, uma fonte de nitrogênio inorgânico e sais minerais, em concentrações adequadas para a síntese do cristal proteico, responsável pela atividade larvicida dos meios fermentados.

Neste contexto, no presente trabalho visou-se a formulação de um meio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando-se dois resíduos industriais: glicerol, proveniente da fabricação de biodiesel, e levedo de cerveja, resíduo da indústria cervejeira. Avaliando-se a influência dos componentes utilizados no meio de cultivo no crescimento da bactéria, consumo de substrato e principalmente atividade larvicida do meio fermentado, pretendeu-se determinar as melhores condições para o processo, contribuindo para o desenvolvimento de um bioinseticida que apresente elevada toxicidade e menor custo comparado aos empregados atualmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

A crescente preocupação com o esgotamento das reservas de petróleo e com o impacto ambiental gerado pela utilização dos combustíveis fósseis tem tornado os biocombustíveis cada vez mais atrativos. Dentre estes está o biodiesel, um combustível produzido pela transesterificação de lipídeos (Figura 2.1) como óleos vegetais, gorduras animais e óleos reciclados, com etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico (RAMOS; WILHELM, 2005).

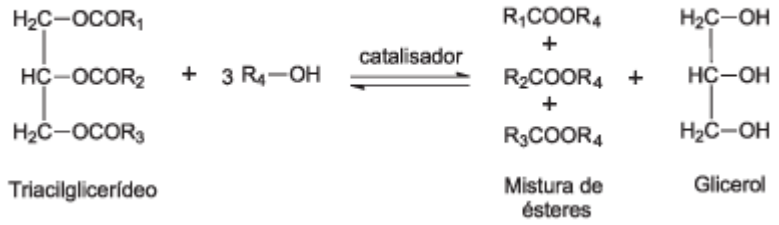

Figura 2.1- Reação de transesterificação para a produção de biodiesel (GERIS, 2007).

No Brasil, os primeiros testes de combustíveis alternativos e renováveis foram realizados na década de 1920, com base nos óleos de palma, algodão e amendoim. Na década de 1970, devido à primeira crise do petróleo, a Universidade Federal do Ceará passou a realizar pesquisas sobre o biodiesel (GOES; ARAÚJO; MARRA, 2010). Em 1980 foi criado o Programa Nacional de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Proóleo), que pretendia, entre outros objetivos, incentivar a pesquisa tecnológica para promover a produção de óleos vegetais nas diferentes regiões do país e substituir óleo diesel por óleos vegetais em mistura de até 30% em volume, com perspectivas para sua substituição integral em longo prazo. Porém, a estabilização dos preços do petróleo e a criação do Proálcool proporcionaram a desaceleração das pesquisas.

O avanço mais significativo na produção e implantação do biodiesel no país deu-se com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), criado em 2004, e que tem como proposta estimular, de forma sustentável, a produção de biodiesel de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas, com garantia de preços competitivos,

qualidade e suprimento. A lei 11.097 publicada em 13 de janeiro de 2005 estabeleceu que todo óleo diesel comercializado no Brasil a partir de 2008 deveria conter 2% de biodiesel. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel, meta prevista para ser alcançada em 2013, mas que foi antecipada devido ao sucesso do PNPB.

Observa-se um aumento da produção de biodiesel no Brasil desde o lançamento do PNPB (Figura 2.2). Segundo o Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis, de junho de 2011, apenas seis anos após o lançamento do PNPB, o Brasil se consolidou como o segundo maior produtor de biodiesel do mundo, atrás apenas da Alemanha. A produção brasileira no ano de 2010 foi de 2,4 milhões de metros cúbicos, enquanto que a Alemanha produziu 2,6 milhões de m³ (uma diferença de 8%). Além disso, deve ser ressaltado que, em 2011, o Brasil se tornou o principal mercado consumidor de biodiesel no mundo. Atualmente existem 67 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 21.397,06 m^3/dia (ANP, 2013).

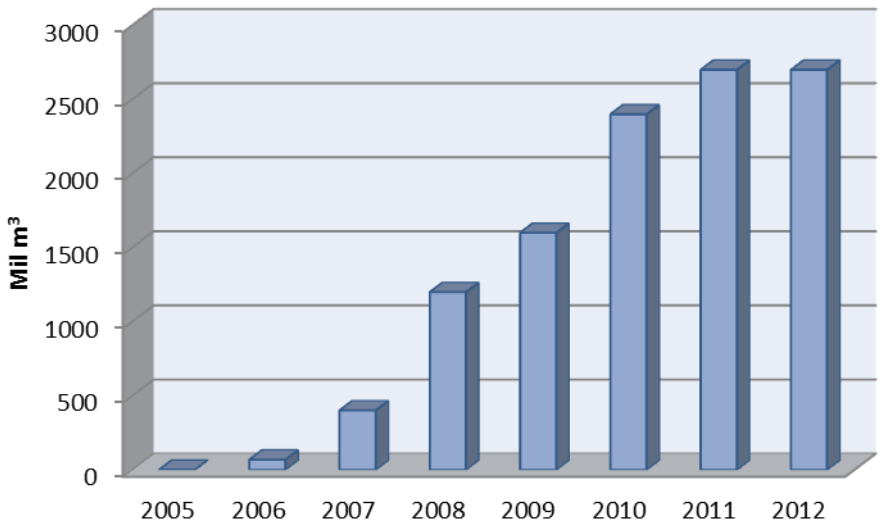

Figura 2.2 - Evolução anual da produção de biodiesel no Brasil (Adaptado de ANP, 2013 e UBRABIO; FGV, 2013).

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

óleo diesel. A ampla área territorial e clima favorável ao cultivo de grande variedade de matérias-primas favorece a competitividade brasileira, já que em outros países o preço do biodiesel é susceptível às variações de preço de uma gama restrita de produtos agrícolas (CÉSAR; BATALHA, 2010).

Segundo o Boletim Mensal do Biodiesel, em abril de 2013 as matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel foram: óleo de soja (73,04%), gordura bovina (19,6%), óleo de algodão (3,02%), outros materiais graxos (2,49%), óleo de fritura usado (0,96%), gordura de porco (0,44%) e óleo de nabo-forrageiro (0,09%) (ANP, 2013). Como pode ser observado, o óleo de soja é a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel no Brasil. Porém, segundo Mendes e Costa (2010), para que a produção de biodiesel no país possa aumentar e se tornar competitiva em relação ao diesel, é necessário ampliar o uso de outras matérias-primas com custo menor, produtividade maior e não alimentícias, diminuindo a possibilidade da produção de biodiesel afetar, de alguma forma, os preços dos óleos vegetais (ou grãos) utilizados como alimento.

2.2 Glicerol

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, foi descoberto em 1779 por Scheele, um químico sueco, durante o processo de saponificação de azeite de oliva (REHM, 1988). É um álcool que se apresenta como um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e de sabor adocicado. É solúvel em água e álcool, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano, e insolúvel em hidrocarbonetos (APPLEBY, 2006).

Devido às características como não toxicidade e ausência de cor e odor, o glicerol tem uma ampla aplicação na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e antissépticos. É reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também reconhecido como substância “GRAS” (Generally Recognized as Safe) desde 1959, sendo utilizado na indústria alimentícia em preparações de molhos e sobremesas geladas, como umectante e conservante de alimentos e bebidas (MORRINSON, 1994; NAE, 2005). Outras aplicações incluem seu emprego em componentes de cimento, solda, asfalto, como lubrificante de máquinas, na fabricação de

dinamite e no processamento de tabaco (MORRISON, 1994; BRISSON et al., 2001; NAE, 2005; PINHEIRO, 2011).

A crescente produção de biodiesel tem causado um acúmulo de glicerol bruto e um colapso em seu valor de mercado, que diminuiu mais de 10 vezes em poucos anos (GHOSH; TOURIGNY; HALLENBECK, 2012). Cerca de 10% do volume total do biodiesel produzido corresponde ao glicerol bruto. Porém, esse valor é correspondente ao glicerol puro. A pureza do glicerol proveniente do biodiesel varia de 55 a 90% (AMARAL et al., 2009). As impurezas variam de acordo com a matéria-prima utilizada na obtenção do biodiesel, porém, de forma geral, pode-se citar NaOH, metanol, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais (THOMPSON; HE, 2006).

Com o aumento da produção de biodiesel o estudo de novas aplicações para esse resíduo faz-se cada vez mais necessário. O custo elevado de purificação do glicerol torna a sua aplicação limitada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química e não é possível depositar o glicerol residual em aterros devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (LOFRANO, 2008).

O glicerol bruto constitui uma fonte de carbono versátil, com muitas aplicações possíveis em fermentações industriais. Devido ao seu baixo custo e sua ampla disponibilidade, tem sido utilizado como fonte de substrato para a produção de 1,3-propanodiol, etanol, hidrogênio, carotenóides, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos e ácidos graxos poliinsaturados (ABAD; TURON, 2012). Porém, para que esse material possa ser utilizado como substrato em processos fermentativos é necessário que ele seja tratado, de forma que compostos tóxicos para as células sejam removidos. Thompson e He (2006) caracterizaram o glicerol proveniente da fabricação de biodiesel de diferentes matérias-primas. Em todos os resíduos estudados, 60 a 70% em massa correspondiam a glicerol. Os autores também observaram a presença de metais como cálcio, potássio, magnésio, fósforo e enxofre em pequenas quantidades, e sódio em quantidades um pouco maiores devido ao catalisador utilizado na reação de transesterificação. Entre os problemas em se utilizar o glicerol bruto em fermentações, estão a alta concentração de sais e o metanol. Pyle (2008) relatou que a presença de metanol e sabão influenciou negativamente a produção de ácido docosahexaenóico pela microalga *Schizochytrium limacinu*. Porém, após a remoção do metanol por evaporação e do sabão por meio de precipitação por ajuste de pH, os resultados obtidos foram similares e, em alguns parâmetros, até melhores que os obtidos com glicerol puro. Rehman et al.

(2008) avaliaram a influência do tratamento do glicerol bruto obtido da fabricação de biodiesel de óleo de girassol sobre a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum*. As impurezas como o metanol e os ácidos graxos livres inibiram o crescimento da bactéria. Acidificação com ácido fosfórico seguida de decantação foi utilizada para a remoção do sabão e parte dos ácidos graxos. Com o tratamento, os resultados obtidos foram próximos aos obtidos com glicerol puro. Segundo Furusawa e Koyama (2004), os ácidos graxos saturados, presentes em maior quantidade no glicerol derivado da produção de biodiesel com gordura animal, geralmente não interferem no crescimento bacteriano, entretanto, ácidos graxos insaturados (particularmente ácido oleico e linoleico) exercem profunda influência no desenvolvimento de bactérias. Barbosa (2009) utilizou glicerol proveniente da fabricação de biodiesel de sebo bovino no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. As impurezas foram retiradas por meio de decantação, acidificação até pH 7,0 e aquecimento a 70 ºC. Rossi (2012) e Chagas (2012) também realizaram o cultivo da bactéria em glicerol, porém proveniente da fabricação de óleo de soja. Para este resíduo, o tratamento consistiu de abaixamento do pH até 4,0 seguido de decantação.

2.3 Levedo de cerveja

Em 2010 o Brasil apresentou um consumo de 12,3 bilhões de litros de cerveja (SINDICERV, 2012) e atualmente é o quarto maior consumidor mundial, com volume menor apenas que China, Estados Unidos e Alemanha. A crescente produção de cerveja gera um excedente de células de leveduras (SHOTIPRUK et al., 2005). A cada hectolitro de cerveja produzida acumulam-se 2,8 litros de biomassa (MARTINS, 2008). A maior parte desse subproduto industrial é utilizada como suplemento alimentar devido ao seu alto teor de proteínas (45 – 60%) (CHAE; JOO; IN, 2001), e uma grande quantidade é considerada lixo industrial (SHOTIPRUK et al., 2005). Além de proteínas, o levedo de cerveja possui lipídeos, RNA, vitaminas, principalmente do complexo B, e minerais (YAMADA et al., 2003), sendo uma fonte barata de nitrogênio (CHAE; JOO; IN, 2001). Visando o aproveitamento dessas leveduras na obtenção de um produto de maior valor, o extrato de levedura tem grande importância (SHOTIPRUK et al., 2005).

O extrato de levedura tem sido utilizado como um agente aromatizante em sopa, molhos, ensopados, lanches e alimentos enlatados. Outras aplicações incluem suplementos

vitamínicos e como fonte de nutrientes em meios microbiológicos (GHOSH; TOURIGNY; HALLENBECK, 2012). A produção de extrato de levedura envolve rompimento celular, seguido pela separação, por centrifugação ou filtração, dos detritos celulares dos produtos solúveis. O rompimento celular pode ser realizado por autólise, plasmólise ou por meios químicos, tais como as hidrólises ácida, alcalina e enzimática (SHOTIPRUK et al., 2005).

Alguns trabalhos foram realizados visando à obtenção de um extrato de levedura a partir de levedo de cerveja e diferentes métodos foram utilizados para a remoção dos restos celulares. Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) e Chae, Joo e In (2001) utilizaram centrifugação. Para Shotipruk et al. (2005), a filtração de fluxo cruzado, realizada por meio da passagem do fluxo de massa tangencialmente a uma superfície de membrana microporosa, mostrou ser mais eficiente que a centrifugação na separação dos compostos insolúveis das proteínas. A microfiltração com fluxo tangencial é utilizada na clarificação e esterilização de bebidas como sucos, vinhos e cervejas, devido ao baixo custo operacional e de investimento, diminuição do tempo de processamento e garantia de estabilidade físico-química e microbiológica do alimento (NETA; HABERT; BORGES, 2005).

Devido ao seu alto valor nutritivo alguns estudos têm sido realizados utilizando a levedura residual da produção de cerveja no cultivo de bactérias. Martins (2008) utilizou levedura residual cervejeira na produção de bioinseticida por *Bacillus sphaericus*. Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) avaliaram o crescimento e a esporulação de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em um meio de fermentação no qual foi utilizado um extrato de levedura produzido a partir de levedo de cerveja. O extrato de levedo de cerveja produzido apresentou menos nitrogênio total e mais carboidrato, resultando uma relação C:N maior que a apresentada pelo extrato de levedura comercial (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Análise química do extrato de levedo de cerveja e extrato de levedura comercial (Difco, USA). Os valores estão expressos em % (m/m) de massa seca (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001).

Componente	**Extrato de levedo de cerveja**	**Extrato de levedura comercial**
Nitrogênio total	8,2 ±0,1	10,7 ±0,1
Nitrogênio como amônio livre	1,0 ±0,1	0,9 ±0,1
Nitrogênio amino	4,5 ±0,2	5,4 ±0,2
Carboidrato total (como glicose)	26,8 ±0,3	15,2 ±0,2
Cinzas	13,3 ±0,7	11,6 ±0,6
Proporção estimada C:N	4,2	3,6

Os autores observaram uma baixa produção de biomassa no meio no qual foi utilizado extrato de levedo de cerveja, quando comparado com o meio no qual se utilizou extrato de levedura, e incompleta utilização do substrato (glicose). Porém, o ferro foi identificado como fator limitante e, com a adição de $FeSO_4.7H_2O$ ao meio, a concentração celular máxima passou de 4,6 g/L para 12,6 g/L e todo o substrato foi consumido.

2.4 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

2.4.1 Características

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo que pode ser encontrada também em insetos mortos, na água e em algumas plantas (MONNERAT; BRAVO, 2000). É gram-positiva, formadora de esporos, anaeróbia facultativa, e se destaca por sua habilidade de formar cristais proteicos durante a sua esporulação (HONGYU; ZINIU; WANGXI, 2000). Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1911 por Berliner, quando este pesquisador a isolou da lagarta *Anagasta kuehniella*. Posteriormente ele a nomeou em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (POLANCZYC, 2004). Anteriormente, em 1902, o pesquisador japonês Ishiwata já havia isolado *Bacillus thuringiensis* do bicho-da-seda.

O ciclo completo de crescimento da bactéria inicia-se com a germinação dos esporos e, na fase vegetativa ocorre a sua propagação por fissão binária. Ao final da fase de divisão celular e durante a fase estacionária, inicia-se a fase de esporulação, durante a qual são produzidas as proteínas que compõem os cristais proteicos (XIAOYAN et al., 2005). A capacidade de formação destas inclusões citoplasmáticas confere a esta espécie uma característica entomopatogênica que a diferencia de todas as demais espécies de *Bacillus* (ANDREWS; KANDA; BULLA et al., 1982; BULLA et al., 1985), tendo sido constatada sua ação tóxica sobre diversas espécies de insetos, incluindo pragas agrícolas (LACEY; KAYA; VAIL, 2001).

Bacillus thuringiensis apresenta um amplo complexo enzimático que lhe permite utilizar uma variedade de substratos (ANGELO; VILLAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). A bactéria metaboliza glicose pela via Embden-Meyerhof-Parnas, produzindo

principalmente piruvato e acetato (LUTHY; CORIER; FISCHER, 1982; NICKERSON; JULIAN; BULLA, 1974). Acetato é formado durante o crescimento vegetativo, sendo utilizado para a produção de poli-β-hidroxibutirato (PHB), componente de reserva de energia celular, requerido na fase de esporulação, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (BENOIT; WILSON; BAUGH, 1990; LIU; BAJPAI; BIHARI, 1994).

A faixa de temperatura para crescimento de diversas linhagens de *Bacillus thuringiensis* encontra-se, segundo Bernhard e Utz (1993), de 15 a 30 ^{o}C, sendo consideradas ideais para o cultivo, temperaturas entre 26 e 30 ^{o}C. Gonzáles e Carlton (1984) observaram que em fermentação à temperatura de 43 °C, com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, é verificada a perda de plasmídeos que carregam a informação que codifica a síntese do cristal tóxico. Com relação ao pH, a faixa de 6,5 a 7,5 é considerada ideal para o crescimento, mas a bactéria pode crescer em valores entre 5,5 e 8,5 (BERNHARD; UTZ, 1993). Como pH inicial para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, em meio contendo glicerol residual como substrato, Chagas (2012) encontrou o valor de 6,5. Esta foi a condição que proporcionou a maior atividade larvicida do meio fermentado, assim como maior crescimento celular e consumo de substrato pela bactéria.

2.4.2 Atividade entomopatogênica

A atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* é atribuída aos cristais paraesporais que produz e, devido à estrutura cristalina destes, eles são chamados proteínas cristalinas (Cry) ou δ-endotoxinas. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, *Bacillus thuringiensis* entra em processo de esporulação durante a fase estacionária (PRAMATHA, 2000).

A ação tóxica das proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis* é específica contra larvas de certos insetos e não exerce qualquer atividade sobre plantas, seres humanos e outros animais (HOFTE; WHITELEY, 1989; MILNER, 1994, ARONSON; SHAI, 2001). O cristal proteico é, na verdade, uma pró-toxina, que necessita ser ativada para exercer efeito tóxico no intestino da larva do inseto (AVIGNONE-ROSSA; MIGNONE, 1993). Para esta ativação, é necessário que o cristal seja primeiramente ingerido pela larva. O pH alcalino do seu trato intestinal, assim como a atuação de

proteases, proporciona a solubilização do cristal e a consequente liberação das toxinas na sua forma ativa (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Os cristais de *Bacillus thuringiensis* são formados principalmente pelas proteínas Cry ou δ-endotoxinas. Atualmente, existem mais de 500 proteínas Cry descritas, classificadas em 70 classes. Uma proteína é considerada Cry quando apresenta sequência semelhante a uma ou mais toxinas já descritas ou quando é uma inclusão paraesporal de *Bacillus thuringiensis* que exibe algum efeito tóxico a um organismo alvo (CRICKMORE et al., 2012). As proteínas Cyt, são proteínas hemolíticas, que, diferentemente das proteínas Cry, que se ligam a receptores específicos da membrana celular, se ligam diretamente aos lipídeos da membrana. Além das proteínas Cry e Cyt outras toxinas são sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*, como as proteínas Vip, assim denominadas por serem produzidas na fase vegetativa de crescimento da bactéria, e a thuringiensina, que, embora não possua especificidade, contribui para a toxicidade das linhagens que a expressam (ANGELO; VILLAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

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

A ação da toxina acontece quando um inseto susceptível ingere cristais da proteína, os quais, após a solubilização, resultam peptídeos que formam poros na membrana do epitélio intestinal e desestabilizam os gradientes osmótico e iônico deste (Figura 2.3). Os primeiros sintomas de intoxicação observados após a ingestão dos cristais e esporos de *Bacillus thuringiensis* pela larva são: perda gradual da mobilidade, interrupção da alimentação, convulsões progressivas, que indicam comprometimento do sistema neuromuscular, encurvamento do corpo, permanência por períodos mais prolongados no fundo do recipiente e escurecimento do tegumento (HABIB; ANDRADE, 1998; MONNERAT; BRAVO, 2000; MÉLO, 2009). A maioria das pró-toxinas conhecidas precisa ser clivada por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos, estes fragmentos ligam-se a receptores específicos do epitélio do intestino médio da

larva do inseto. Como consequência, ocorre a deformação das células epiteliais e a desintegração da membrana microvilar, o que acarreta danos irreversíveis no intestino, culminando com a morte da larva (KNOWLES, 1994; ARONSON; SHAI, 2001). Uma vez que o funcionamento do intestino médio é interrompido, ocorre uma redução do pH do fluído intestinal, conjuntamente com uma liberação de nutrientes, o que cria condições para a germinação de esporos de *Bacillus thuringiensis* e para a multiplicação de suas células vegetativas. A bactéria invade os tecidos larvais, e então a larva interrompe sua alimentação e morre. Devido ao processo infeccioso, o inseto se torna mais suscetível a invasões microbianas secundárias que podem acelerar a sua morte. O ciclo infeccioso é concluído quando o cadáver da larva é consumido e *Bacillus thuringiensis* garante a sua perpetuação no ambiente na forma de esporo (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; ARONSON; SHAI, 2001).

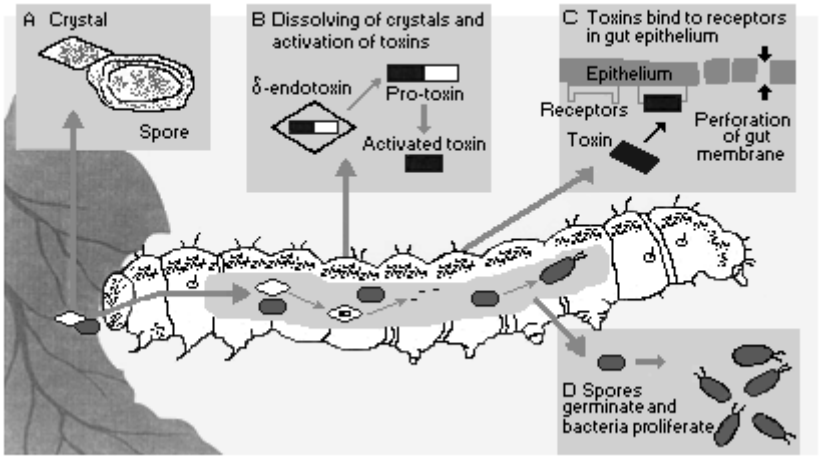

Figura 2.3 - Ação da toxina de *Bacillus thuringiensis* produzida por *Bacillus thuringiensis* em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2013).

2.5 A dengue e seu combate

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores são um sério problema de saúde pública (TAUIL, 2002). No mundo todo, a cada ano, cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças graves causadas por organismos patogênicos veiculados por insetos vetores (POOPATHI et al., 2002). A dengue é uma dessas doenças, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que de 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países de todos os continentes, exceto

a Europa (WHO, 2013). Porém, segundo um estudo da Universidade de Oxford, publicado recentemente, esse número pode ser mais de três vezes maior do que a OMS estima, atingindo 390 milhões de pessoas infectadas por ano (BHATT, 2013).

No Brasil, as condições socioambientais favorecem o desenvolvimento de *Aedes aegypti*, vetor da doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido eficientes. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde mostram que o número de casos de dengue no início de 2013 quase triplicou em relação ao mesmo período de 2012. Foram registrados, até o dia 16 de fevereiro, 204.650 mil casos, contra 70.489 notificados em 2012, o que representa um aumento de 190% (COMBATE..., 2013).

O vírus da dengue vem se espalhando rapidamente pelo mundo, principalmente pelo seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Devido a isso, pesquisas vêm sendo realizadas em diversos países para compreender melhor a doença e a resposta imunológica a esta. Já existem vacinas em desenvolvimento e até em fase de estudo pré-clínico, porém o grande desafio da vacina é produzir de forma simultânea e eficiente anticorpos contra os quatro sorotipos do vírus da dengue por um longo período de tempo (TRENT et al., 2010). Tendo em vista a amplitude da doença e o potencial econômico de uma futura vacina, estudos têm mobilizado pesquisadores acadêmicos e indústrias farmacêuticas no mundo todo. No início de 2013, o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos anunciou que a vacina criada por eles obteve excelentes resultados, protegendo 90% dos participantes dos testes contra os subtipos 1, 3, e 4 e fornecendo bons resultados contra os quatro subtipos em 45% dos voluntários (TARANTINO, 2013). No Brasil, órgãos como o Instituto Butantan, em São Paulo, e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, também estão com vacinas em fase de testes. 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).

O controle de insetos agrícolas e de vetores de doenças nos países em desenvolvimento é realizado, na sua maioria, por inseticidas químicos, mesmo com as diversas desvantagens advindas de seu emprego, que incluem a toxicidade aos animais (KARALLIEDDE, 1999; BROWN et al., 2000), a resistência fisiológica dos vetores (BROOKE et al., 2000) e os impactos ambientais negativos causados, como a contaminação de alimentos e o efeito prejudicial sobre insetos que possuem um papel benéfico para o homem (BROWN et al., 2000).

Segundo pesquisa realizada por Macoris (2011), o emprego excessivo de inseticidas induziram os mosquitos da dengue a desenvolver resistência genética maior ao veneno. Ovos do mosquito de sete cidades do Estado de São Paulo foram coletados e foi possível verificar que os mosquitos oriundos de cidades com maior número de casos da doença apresentaram maior resistência. Em Marília, com poucos registros de dengue, os inseticidas públicos matavam ao menos 80% dos mosquitos e em Santos a taxa de sucesso chegava à 50% em alguns casos. 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).

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

As proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis* distinguem-se de todas as toxinas das demais variedades já isoladas, apresentando os melhores resultados no combate às larvas de dípteros de importância sanitária, especialmente culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, insetos vetores de doenças como a dengue, a elefantíase, e a malária, respectivamente, e simulídeos do gênero *Simulium*, transmissores de vírus, protozoários e filárias (GILL et al., 1992; RUAS NETO; OLIVEIRA, 1985; ARONSON; SHAI, 2001). Porém, a difusão do uso de bioinseticida empregando *Bacillus thuringiensis* apresenta alguns desafios como o custo da produção e da formulação. A produção passa por diversas etapas como a seleção de linhagem geneticamente estável, tóxica ao inseto alvo e que não apresente necessidades nutricionais exigentes e escolha de um meio de cultivo que proporcione a máxima produção com o mínimo custo (ANGELO; VILLAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Já a formulação tem por objetivo conferir estabilidade ao produto durante estocagem e aplicação, facilitar a aplicação e protegê-lo das condições adversas do meio ambiente, como por exemplo: radiação ultravioleta, chuva, pH e temperatura. De modo geral, as formulações podem ser sólidas (pó seco, grânulos, tabletes e pó umedecidos) ou líquidas (suspensões e emulsões). A escolha da formulação mais

adequada depende do alvo da aplicação e dos efeitos do meio ambiente que devem ser superados (BRAR et al., 2006).

O primeiro produto à base de *Bacillus thuringiensis* foi comercializado na França, em 1938, com o nome de *Sporeine* (ANGELO; VILLAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Desde 1980 a bactéria vem sendo utilizada para o controle de mosquitos vetores de doenças (MALDONADO-BLANCO; SOLIS-ROMERO; GALAN-WONG, 2003), sendo atualmente o patógeno de maior sucesso no controle de insetos, correspondendo a 2% do mercado total de inseticidas (BRAVO et al., 2011).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa e a empresa Bthek Biotecnologia lançaram em 2005 o Bt-horus SC, um inseticida biológico capaz de controlar as larvas do mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti*) e as larvas dos borrachudos (*Simulium* spp.). O produto foi desenvolvido com estirpes de *Bacillus thuringiensis* isoladas de amostras de solo brasileiro e que fazem parte do Banco de Bacilos Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que hoje conta com mais de 2.300 estirpes de bactérias com potencial para o controle biológico de pragas (MONNERAT, 2013). Como tanto a produção quanto a formulação do produto são nacionais, o bioinseticida foi desenvolvido para competir com os produtos até então importados. O Bt-horus SC, foi o primeiro inseticida biológico a ser usado em uma campanha de saúde pública no Brasil. A iniciativa foi desenvolvida em parceria entre a Embrapa, o Governo do Distrito Federal e a Bthek Biotecnologia, no período de janeiro a junho de 2007, na cidade de São Sebastião. A cidade possuía alto grau de infestação de dengue, beirando taxas que consideravam a cidade como epidêmica. O bioinseticida foi distribuído e aplicado nas cerca de 20 mil residências da cidade, com resultados acima do esperado: o índice de infestação, que era de 4,6%, caiu para 0,6%, índice considerado satisfatório pela Organização Mundial de Saúde (EMBRAPA, 2013).

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

A escolha adequada dos componentes do meio de cultivo é essencial para o sucesso de um produto e deve ser realizada buscando-se obter uma alta produtividade com o menor custo. Segundo Prabakaran e Balamaran (2006) a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* ainda possui custo elevado devido ao alto custo do meio de

fermentação. O meio utilizado no cultivo de *Bacillus thuringiensis* geralmente possui fonte de carbono, fonte de nitrogênio (orgânico e inorgânico) e sais minerais (MARTINS, 2008). Apesar dos fabricantes de bioinseticidas não revelarem a composição de seus meios, Couch (2000) cita os principais componentes e concentrações utilizadas no cultivo da bactéria (Tabela 2.2).

Várias matérias-primas de baixo custo têm sido avaliadas como fontes alternativas de nutrientes para o processo fermentativo com *Bacillus thuringiensis*, dentre as quais são citadas farinha de soja (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990; VIDYARTHI et al., 2002; PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006), água de maceração de milho (LIU; BAJPAI, 1995; MALDONADO-BLANCO; SOLIS-ROMERO; GALAN-WONG, 2003), levedura de cervejaria (SAKSINCHAI; SUPHANTHARIKA; VERDUYN, 2001), soro de queijo (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990), extrato de batata (POOPATHI et al., 2002), melaço de cana-de-açúcar (ABDELL-HAMEED; CARLBERG; EL-TAYEB, 1990; MALDONADO-BLANCO; SOLIS-ROMERO; GALAN-WONG, 2003) e glicerol residual (BARBOSA, 2009; ROSSI, 2012, CHAGAS, 2012).

Tabela 2.2 - Principais componentes, e suas concentrações, utilizados no meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* (COUCH, 2000).

Ingrediente	**Concentração (g/L)**
Farinha de soja	20-40
Farinha de semente de algodão	14-30
Proteína da batata	15-40
Licor de milho ou sólidos derivados de milho	15-30
Glicose	10-30
Peptona	2-5
Xarope de milho	20-45
Melaço	1,0-18,6
Glicerol	2,0-10
Amido de milho	10-15
Extrato de levedura	2.0
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,0
$FeSO_4$	0,02
$FeSO_4.7H_2O$	0,0005-0,02
$MgSO_4.7H_2O$	0,3
$MnSO_4.H_2O$	0,02
$ZnSO_4.7H_2O$	0,02
$(NH_4)_2SO_4$	2
$CuSO_4.5H_2O$	0,005
$CaCO_3$	1,0-1,5

A fonte de nitrogênio tem grande influência na síntese do cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* (IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGIZ, 2002). A existência de fontes de nitrogênio no meio é essencial para o crescimento da bactéria e a formação da toxina (ANDERSON; JAYARAMAN, 2003). Estudos realizados por alguns autores mostram que é necessário o uso tanto de fonte orgânica como de fonte inorgânica de nitrogênio. Içgen, Içgen e Özcengiz (2002) e Özkan et al. (2003) constataram que em meios nos quais apenas nitrogênio inorgânico foi utilizado no cultivo de *Bacillus thuringiensis* houve diminuição de crescimento, esporulação e biossíntese da toxina, quando comparados com meios com fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico, o sulfato de amônio é um dos mais utilizados (SIKDAR et al., 1991; MIGNONE; AVIGNONE-ROSSA, 1996). Entretanto, Özkan et al. (2003) obtiveram maior rendimento quando utilizaram o sal $(NH_4)_2HPO_4$. Barbosa (2009) relata que, em meio contendo glicerol proveniente da produção de biodiesel de sebo bovino, o sulfato de amônio, na concentração de 6 g/L, embora tenha favorecido a esporulação, não influenciou a síntese de proteínas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Porém, em grandes concentrações o nitrogênio pode prejudicar a produção de toxina pela bactéria. A presença de íon amônio em altas concentrações faz com que haja pouca formação de esporos, pois reprime a formação de exoprotease durante a fase de crescimento exponencial (LIU; TZENG, 1998). A fonte orgânica de nitrogênio mais utilizada para a formulação de meios de fermentação utilizando o *Bacillus thuringiensis* é o extrato de levedura. Segundo Prabakaran e Hoti (2008), elevando-se o teor de nitrogênio proveniente de aminoácidos (orgânico) no meio de cultura de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, aumenta-se a biomassa, o número de esporos e a toxicidade.

Os íons metálicos também são importantes para o crescimento do microrganismo e a produção de toxinas. O balanço adequado dos íons auxilia no equilíbrio do pH do meio de fermentação, e muitos deles são cofatores de enzimas que catalisam as reações do processo fermentativo (DULMAGE, 1970). Segundo Özkan et al. (2003) Mn^{2+} foi o elemento mais crítico na produção das toxinas, favorecendo a sua produção em concentração de 10^{-6} mol/L. Para Yao et al. (2002), concentrações de Mn^{2+}de 0,8 a 1,6 g/mL promoveram o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio com extrato de carne como substrato. O íon Mg^{2+} influencia o metabolismo secundário, com efeito na produção das proteínas Cry e é favorável à produção de toxinas na concentração de 8 mmol/L (ÖZKAN et al., 2003). A presença de cálcio é essencial no processo de esporulação, sendo este um integrante da parede do esporo. Segundo Özkan et al. (2003)

Ca^{2+} favoreceu a produção de toxinas quando em concentrações de 0,55 mmol/L. Utilizando glicerol proveniente de sebo bovino como fonte de carbono, Barbosa (2009) observou que na concentração de 0,24 g/L, o cloreto de cálcio favorece a síntese de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, mas em concentrações acima deste valor não influencia este parâmetro. Fe^{2+} e Cu^{2+} são importantes para a produção do cristal proteico por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (SIKDAR et al., 1991). Em um estudo realizado por Yao et al. (2002), utilizando extrato de carne, concentrações de Zn^{2+} até 50 μg/mL promoveram o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, enquanto concentrações maiores inibiram. A influência de Cu^{2+} foi também observada por Yao et al. (2003). Em concentrações até 30 μg/mL este favoreceu o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, porém valores acima de 130 μg/mL prejudicaram o crescimento da bactéria. Para Özkan et al. (2003) Fe^{2+}, Cu^{2+}e Zn^{2+} influenciaram negativamente a biossíntese da toxina por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

3. OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral desse trabalho foi contribuir para a formulação de um meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para obtenção de bioinseticida que apresente elevada toxicidade e menor custo comparado aos empregados atualmente, com foco na substituição de extrato de levedura por extrato de levedo de cerveja.

Específicos

- Definir o procedimento para o preparo do extrato de levedo de cerveja;
- Determinar a faixa de concentração do extrato de levedo de cerveja que possibilita a obtenção de meio com atividade larvicida;
- Avaliar a influência dos componentes utilizados no meio de fermentação sobre a síntese de toxinas pela bactéria;
- Definir a composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio;
- Testar, em biorreator, as condições do meio que apresentou melhor resultado quanto à atividade larvicida no estudo em frascos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sorotipo H-14 IPS 82, obtida do Instituto Pasteur de Paris, foi utilizada em todos os experimentos.

As culturas estoque foram obtidas por semeadura por estria simples em superfície Ágar Nutriente em tubos inclinados, os quais foram incubados a 30 ºC por 72 h, tempo suficiente para garantir a total esporulação das células. Os tubos foram armazenados a 4 ºC e utilizados, por no máximo, 6 meses. Foi empregado o meio nutriente composto por extrato de carne (3 g/L), peptona de carne (5 g/L) e ágar-ágar (18 g/L).

4.2 Componentes do meio

4.2.1 Substrato

Foi empregado como substrato o glicerol bruto fornecido pela BIOVERDE – Indústria e Comércio de Biocombustíveis – Ltda. – Taubaté – SP, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja. O glicerol bruto foi tratado para a retirada de impurezas que poderiam prejudicar o crescimento do microrganismo. O procedimento utilizado no tratamento foi definido por Rossi (2012), e envolve acidificação com H_3PO_4 (80%) até pH igual a 4 e posterior decantação por um período de 24 horas.

4.2.2 Fonte de Nitrogênio

No meio utilizado para o preparo do inóculo foi utilizado extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio orgânico e $(NH_4)_2SO_4$ como fonte de nitrogênio

inorgânico de acordo com meio GYS descrito por Rogoff e Yousten (1969). No meio de fermentação foi utilizado extrato de levedo de cerveja como fonte de nitrogênio orgânico e KNO_3 como fonte de nitrogênio inorgânico. A escolha dessas fontes de nitrogênio foi baseada em um trabalho realizado anteriormente (TABUCHI et al., 2010), no qual avaliou-se diferentes fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico. Nesse estudo, os melhores resultados em relação à atividade larvicida foram obtidos utilizando-se levedo de cerveja e KNO_3.

4.2.3 Sais

Os seguintes sais foram utilizados como fonte de íons minerais: $CaCl_2.2H_2O$; $MgSO_4.7H_2O$; $MnSO_4.H_2O$; K_2HPO_4; KH_2PO_4.

4.3 Meios de cultivo

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio denominado GLYS, com a seguinte composição (em g/L): glicerol, 10; extrato de levedura, 12; $(NH_4)_2SO_4$, 3; $CaCl_2.2H_2O$, 0,12; $MgSO_4.7H_2O$, 1,5; $MnSO_4.H_2O$, 0,09; K_2HPO_4, 1,5; KH_2PO_4, 1,5.

O meio de fermentação continha glicerol (proveniente do resíduo tratado), extrato de levedo de cerveja; KNO_3; $CaCl_2.2H_2O$; $MgSO_4.7H_2O$; $MnSO_4.H_2O$; K_2HPO_4 e KH_2PO_4, em concentrações que variaram de acordo com o planejamento experimental.

Para o preparo tanto do inóculo quanto do meio de fermentação, os componentes glicerol, extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$ e $MnSO_4.H_2O$ foram pesados de acordo com a quantidade de meio que se desejava preparar e foram, com exceção do glicerol, dissolvidos em uma quantidade de água deionizada referente ao volume total de meio. O meio e o glicerol foram esterilizados a 121 ºC por 20 minutos. Para os demais sais foram utilizadas alíquotas de soluções concentradas destes. Após a mistura das soluções o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de KOH 10 mol/L.

4.4 Condições de cultivo

4.4.1 Preparo do inóculo

Uma alíquota de esporos da cultura estoque foi transferida para um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL com 50 mL de meio GLYS, coberto com manta de algodão e gaze. O frasco foi colocado em incubadora de movimento recíproco (SOLAB, Modelo SHAKER SL 222) a 30 ºC, sob agitação de 96 rpm, por 10 horas.

4.4.2 Ensaios de fermentação em frascos

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1,0 L, contendo 200 mL de meio, cobertos com manta de algodão e gaze. Estes foram inoculados com o *pellet* resultante da centrifugação de 10 mL de inóculo (5%, v/v) a 3800 rpm por 30 minutos (centrífuga clínica marca Sppencer), o qual foi ressuspenso com 10 mL do próprio meio de fermentação, e incubados em incubadora/agitadora de movimento recíproco (SOLAB, Modelo SHAKER SL 222) a 30 ºC e 96 rpm.

Em todos os ensaios o final da fermentação correspondeu ao tempo de 2 horas após a completa dissociação dos grumos de células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, comportamento característico da bactéria. Este fenômeno foi monitorado por observações periódicas de lâminas à fresco de amostras do meio.

4.4.3 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 de volume útil, com controle de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, agitação e aeração. A inoculação foi realizada da mesma forma que para os ensaios em incubadora de movimento recíproco. O processo foi

operado em sistema descontínuo, empregando-se um volume de meio de 1,0 L, temperatura de 30 ^{o}C e pH inicial igual a 7,0. A agitação inicial foi de 300 rpm e a aeração de 1,25 vvm. Durante a fermentação a agitação foi ajustada de modo a se manter a concentração de oxigênio dissolvido em 45% da saturação durante todo o processo (ROSSI, 2012), ou seja, quando esta atingia o valor desejado, era mantida pela variação automática da frequência de agitação da turbina, mantendo-se constante a vazão específica de ar (1,25 vvm). A adição de antiespumante foi realizada manualmente, de acordo com a necessidade, verificada por análise visual do nível de espuma do meio. O final da fermentação, assim como nos ensaios realizados em frascos, correspondeu ao tempo de 2 horas após a completa dissociação dos grumos de células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

4.5 Sequência Experimental

4.5.1 Definição da condição de filtração tangencial da suspensão de levedo de cerveja

Uma suspensão de levedo de cerveja foi preparada dissolvendo-se 20 gramas do produto comercializado em pó em 1 litro de água deionizada. A suspensão foi então filtrada em filtro qualitativo para remover o excesso de partículas sólidas em suspensão.

Em seguida, com o extrato obtido, foi avaliado o sistema de filtração tangencial, sendo testadas três vazões de meio (5,7, 10,3 e 14,5 mL/min) e três condições de vácuo (8, 10 e 12 pol Hg), de forma a se obter o maior fluxo de permeado.

4.5.2 Avaliação da concentração do levedo de cerveja

Um estudo inicial foi realizado, nas condições descritas no item 4.4.2, para se definir a faixa de concentração de levedo de cerveja que seria utilizada no estudo da composição do meio de fermentação. As concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/L foram testadas em ensaios realizados em frasco, empregando-se 2 métodos diferentes de preparo

do extrato de levedo de cerveja. Em função dos resultados obtidos, um terceiro método foi testado, com o objetivo de confirmar a necessidade de se realizar a etapa de aquecimento antes da filtração para que o meio obtido apresentasse atividade larvicida.

Os métodos de preparo foram aqueles apresentados no esquema da Figura 4.1, sendo que em todos os casos a primeira etapa foi a preparação da suspensão de levedo de cerveja, misturando-se o levedo de cerveja comercial em pó com água deionizada, de acordo com a concentração desejada. A filtração qualitativa correspondeu à passagem, por gravidade, da suspensão de levedo de cerveja por um papel de filtro qualitativo. A esterilização foi realizada em autoclave a 121 ºC por 20 minutos. Para o Método 1, em que a filtração qualitativa foi realizada após a esterilização, o processo foi realizado no interior de uma câmara de fluxo laminar para garantir a assepsia do procedimento. A filtração tangencial foi realizada passando-se o extrato por um sistema constituído por uma bomba peristáltica, sistema de membranas capilares de 0,45 µm de diâmetro de poro e uma bomba de vácuo. A operação do sistema consistiu na circulação do extrato obtido após a filtração qualitativa, com o auxílio da bomba peristáltica, pelo sistema de membranas capilares e recolhimento do permeado por sucção da bomba de vácuo, empregando-se a melhor condição obtida no estudo do item 4.5.1.

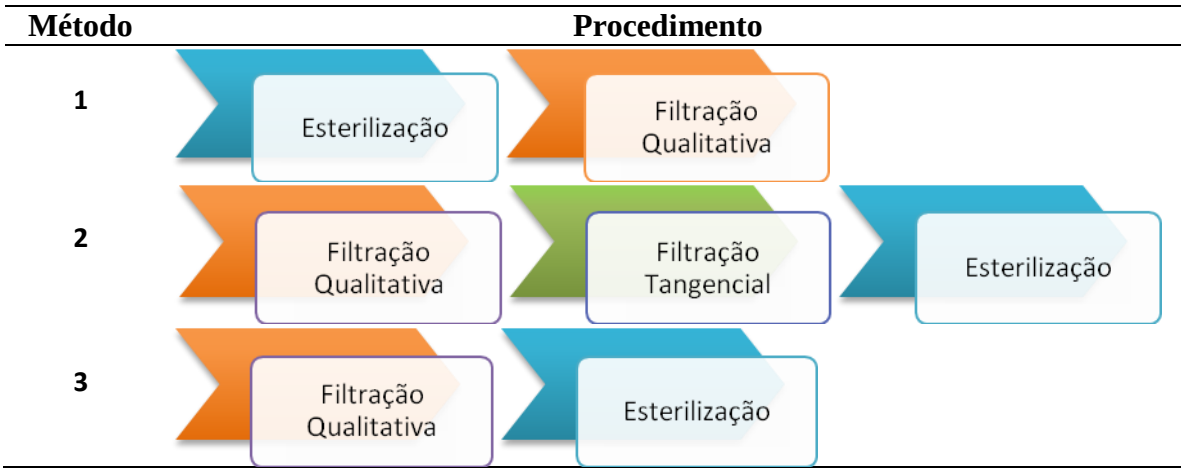

Figura 4.1 - Procedimentos dos métodos de preparo utilizados para a obtenção do extrato de levedo de cerveja.

4.5.3 Definição da composição do meio de fermentação

Tendo-se definido o método de preparo do extrato de levedo de cerveja e a concentração que proporcionou a maior produção de toxinas pela bactéria, avaliou-se a

influência dos componentes utilizados no meio de fermentação sobre o crescimento e síntese de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4}. Os ensaios foram realizados em frascos agitados nas condições descritas no item 4.4.2. Os níveis dos fatores estão descritos na Tabela 4.1 e a respectiva matriz na Tabela 4.2. A atividade larvicida dos meios foi a variável resposta utilizada para a avaliação dos resultados.

Tabela 4.1 - Correspondência entre os valores reais e codificados dos fatores empregados para o planejamento fatorial fracionário 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central.

		Valores reais dos fatores		
Fator	**Símbolo**	**-1**	**0**	**+1**
Glicerol (g/L)	X_1	10,0	20,0	30,0
Extrato de levedo de cerveja (g/L)	X_2	10,0	20,0	30,0
KNO_3 (g/L)	X_3	0	5,0	10,0
$CaCl_2.2H_2O$ (g/L)	X_4	0	0,12	0,24
$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	X_5	0	1,5	3,0
$MnSO_4.H_2O$ (g/L)	X_6	0	0,09	0,18
K_2HPO_4 (g/L)	X_7	1,0	1,5	2,0
KH_2PO_4 (g/L)	X_8	1,0	1,5	2,0

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

Tabela 4.2 - Matriz do planejamento dos ensaios, com os níveis dos fatores codificados, do planejamento fatorial 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central.

Ensaio	**Fatores**							
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0

4.5.4 Definição da composição do meio de cultura em termos de fonte de carbono e nitrogênio

Em função dos resultados obtidos com os ensaios do planejamento fatorial fracionário 2^{8-4}, foi realizado um segundo planejamento fatorial completo 2^2, tendo como variáveis glicerol e extrato de levedo de cerveja, fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os outros componentes do meio de fermentação foram utilizados nas mesmas concentrações do ponto central do planejamento 2^{8-4} (item 4.5.3). Os ensaios foram realizados em frascos agitados (item 4.4.2) e a matriz do planejamento pode ser visualizada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento dos ensaios, com os valores codificados e reais do planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central, para avaliação da influência das variáveis glicerol (A) e extrato de levedo de cerveja (B).

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	A	B	A (g/L)	B (g/L)
1	-1	-1	10,0	10,0
2	+1	-1	30,0	10,0
3	-1	+1	10,0	30,0
4	+1	+1	30,0	30,0
5	0	0	20,0	20,0
6	0	0	20,0	20,0
7	0	0	20,0	20,0

4.5.5 Teste em biorreator

A melhor condição obtida com os experimentos realizados para se determinar a concentração de substrato e a concentração de extrato de levedo de cerveja, conforme descrito no item 4.5.4, cujo critério foi a atividade larvicida do meio fermentado, foi empregada para a realização de um ensaio em biorreator, conforme descrito no item 4.4.3. A avaliação dos resultados foi feita em função do crescimento, consumo de substrato, pH e atividade tóxica do meio.

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Concentração celular

A determinação da concentração celular foi feita de duas formas, segundo Berbert-Molina et al. (2008). Nas primeiras horas de cultivo, durante a fase vegetativa de crescimento, enquanto não se observava a formação de grumos ou inclusões no interior das células, a biomassa foi quantificada indiretamente por turbidimetria. A partir do momento em que se iniciava a formação de grumos no meio, a concentração celular foi determinada diretamente por medida de massa seca (gravimetria).

As amostras de meio fermentado foram centrifugadas (centrífuga clínica marca Sppencer) a 3800 rpm por 30 minutos e ressuspendidas em solução salina (0,9%). Para a análise por turbidimetria, esta lavagem foi realizada duas vezes com a solução salina. Para a análise de massa seca, as lavagens foram realizadas com água deionizada.

Na determinação por turbidimetria, medidas de absorbância (600 nm) de suspensões diluídas das células ressuspendidas 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. Na determinação por massa seca, a suspensão de células foi colocada em cadinho de porcelana e deixada em estufa a 100 °C, sendo pesada periodicamente 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 3 mL, calculando-se, com o resultado, a concentração de células em g/L.

4.6.2 Morfologia celular

As variações da morfologia celular ao longo da fermentação foram acompanhadas pela observação de preparações à fresco do meio fermentado em microscópio ótico (Medilux A150-BP), com objetiva de contraste de fase, com aumento de 400x.

4.6.3 Concentração de glicerol

As concentrações de glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Waters), empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 ^{o}C, eluente ácido sulfúrico 0,005 mol/L, fluxo do eluente 0,6 ml/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Seppak C18 (MILLIPORE) e o eluente, antes do uso, filtrado à vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida desgaseificado com ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

4.6.4 Atividade larvicida dos meios

A atividade larvicida do meio ao final da fermentação foi estimada por meio de bioensaios efetuados segundo metodologia descrita por Misch; Burnside; Cecil (1992), com algumas modificações. Esses testes foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes. O teste consistiu em expor larvas do mosquito *Aedes aegypti*, no 3º ínstar de desenvolvimento, a volumes variados de meio fermentado em um total de 6 mL de mistura (meio + água). Para cada teste foram utilizados 10 tubos, empregando-se o mesmo volume de meio. As larvas foram deixadas expostas a essa mistura por 24 horas. A resposta de cada teste correspondeu ao número de larvas mortas em cada um dos conjuntos de 10 tubos. Os testes foram feitos com volumes de meio fermentado cada vez menores em relação ao volume inicialmente testado, até que se observasse diferença entre as porcentagens de morte das larvas para os diferentes ensaios realizados, possibilitando a comparação entre estes.

Para o ensaio em biorreator foi determinada a concentração letal para a morte de 50% de uma população de larvas (CL_{50}). Para isso, inicialmente foi obtida a faixa de concentração que proporcionasse a morte de no mínimo uma e no máximo nove larvas, de um total de dez. Para esta faixa, foram avaliadas cinco concentrações, com dez tubos de ensaio para cada concentração, em triplicata.

Tanto para a determinação da faixa de concentração mencionada quanto para a avaliação das cinco concentrações visando o cálculo de CL_{50} foi empregado o mesmo procedimento de determinação da atividade larvicida citado anteriormente. Os dados de mortalidade foram obtidos com 24 horas de exposição e a concentração letal (CL_{50}) foi obtida de acordo com a regressão linear log-Probit, utilizando-se o programa EPA PROBIT ANALYSIS versão 1.5.

4.7 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados pelas cinéticas de crescimento celular e de consumo de substrato e pela atividade larvicida do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti*. Foram empregados os programas DESIGN-EXPERT 8.0.7.1 e STATGRAPHICS 16.1.18 para análise das variáveis resposta mencionadas, nos casos em que um planejamento experimental tenha sido empregado. Esses programas forneceram tabelas de análise de variância dos resultados, identificando as variáveis que têm efeito significativo sobre o processo, assim como as superfícies de resposta.

Foi avaliada também a produtividade volumétrica em células (Q_x), obtida conforme a Equação1:

$$Q_x = (X_{máx} - X_i)/ \Delta t \qquad \textbf{(1)}$$

onde:

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

$X_{máx}$ = concentração celular máxima (g/L);

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

Δt = intervalo de tempo correspondente ao valor de $X_{máx}$ (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Definição do procedimento de filtração tangencial

Após o preparo do extrato de levedo de cerveja conforme descrito no item 4.5.1, foram testadas três condições de vácuo e três vazões de meio para filtração tangencial das amostras, de forma a se obter o maior fluxo de permeado, conforme mostrado na Tabela 5.1. O fluxo de permeado foi medido a cada 5 segundos até que ficasse estável.

Tabela 5.1 - Valores de vácuo e de vazão testados para a filtração tangencial do extrato de levedo de cerveja.

Ensaio	Vácuo (pol Hg)	Vazão (mL/min)
A	8	5,7
B	8	10,3
C	8	14,5
D	10	5,7
E	10	10,3
F	10	14,5
G	12	5,7
H	12	10,3
I	12	14,5

No início de todos os ensaios percebeu-se uma queda brusca no fluxo de permeado, que, segundo Marshall e Daufin (1995), deve-se à polarização da concentração, ou seja, aumento da concentração de soluto próximo à superfície da membrana. Após essa queda brusca, o fluxo declinou mais lentamente, até a sua estabilização. Essa diminuição de fluxo pode ser atribuída, também, à deposição e acúmulo de partículas finas no interior dos poros da membrana, conhecido como *fouling*.

Nos ensaios realizados, os maiores fluxos de permeado foram obtidos quando foi utilizado vácuo no maior valor testado (12 pol Hg). Com isso pode-se concluir que o diâmetro médio das partículas do extrato de levedo de cerveja é maior que o diâmetro dos poros da membrana, já que o maior vácuo não causou um *fouling* que inviabilizasse a filtração. A turbulência provocada pela vazão máxima, por sua vez, foi suficiente para evitar um acúmulo excessivo de partículas na superfície da membrana. Portanto, nas condições de filtração empregadas, a concentração de polarização mostrou ter maior influência no fluxo de permeado que o fenômeno de *fouling*. O maior fluxo de permeado foi obtido no ensaio I, realizado com os maiores valores de vazão do extrato e de vácuo.

Esse resultado deve-se à maior velocidade de escoamento da corrente de alimentação, que provoca maior turbulência do fluido próximo à superfície da membrana, arrastando os sólidos acumulados e reduzindo a espessura da camada limite e os efeitos da polarização da concentração (LEWIS, 1996). Na Figura 5.1 está apresentado o fluxo de permeado em função do tempo, para a melhor condição de filtração obtida.

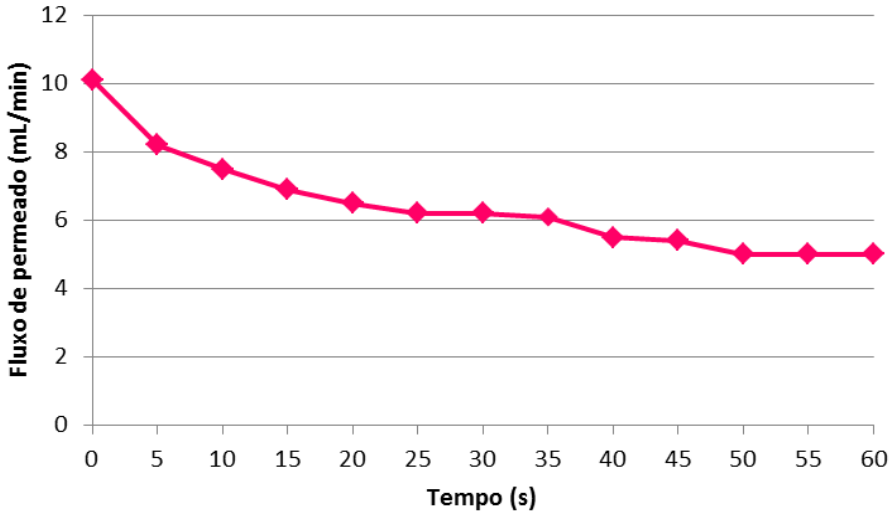

Figura 5.1 - Fluxo de permeado do Ensaio I em função do tempo, durante filtração tangencial de extrato de levedo de cerveja.

O ensaio I apresentou uma queda brusca do fluxo de permeado nos 5 primeiros segundos, seguida pela redução contínua deste até a sua estabilização, que ocorreu após 50 segundos. O perfil do fluxo de permeado em função do tempo foi semelhante ao obtido por outros autores na microfiltração com escoamento tangencial de cerveja maturada (NETA; HABERT; BORGES, 2005) e suco de umbu (USHIKUBO; WATANABE; VIOTTO, 2006). Verificou-se também, por meio de observação microscópica, que os restos celulares presentes na suspensão de levedo de cerveja antes da realização da filtração tangencial foram removidos, comprovando a eficiência do processo empregado.

5.2 Avaliação da concentração de levedo de cerveja

Inicialmente foram testadas as concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de levedo de cerveja, empregando-se 2 métodos diferentes de preparo do extrato (Métodos 1 e 2), como esquematizado na Figura 4.1.

Essas concentrações foram escolhidas com base em um trabalho realizado anteriormente (TABUCHI et al., 2010), no qual utilizou-se um extrato de 20 g/L de levedo de cerveja para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Nesse estudo, observou-se que não houve o consumo total do glicerol presente no meio, fato que foi atribuído a uma falta de nitrogênio orgânico no meio para que a bactéria utilizasse toda a fonte de carbono disponível para o seu crescimento. Dessa forma, no presente trabalho, concentrações maiores de levedo de cerveja foram utilizadas, com o objetivo de determinar a concentração que proporcionasse um maior consumo da fonte de carbono, maior crescimento e maior produção de toxinas pela bactéria.

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.4.2. O acompanhamento foi feito por meio de observações periódicas de preparações à fresco do meio fermentado em microscópio ótico.

Verificou-se que em todos os ensaios houve crescimento e esporulação, e foram observadas as fases características de crescimento da bactéria descritas por Berbert-Molina et al. (2008). Os ensaios foram encerrados com 21 horas de fermentação.

Para se definir o melhor método a ser utilizado para o preparo da solução de levedo de cerveja, foram realizados testes de atividade larvicida, conforme descrito no item 4.6.4. Foram testados os volumes de 1,0 mL e 0,2 mL de meio fermentado. Apenas o ensaio no qual se utilizou 20 g/L de levedo de cerveja, o qual foi preparado pelo Método 1, apresentou atividade larvicida, como mostrado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Porcentagens de Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes volumes de meio fermentado.

Concentração do extrato de levedo de cerveja	**Mortalidade das larvas (%)**			
	Método 1		**Método 2**	
	1,0 mL	**0,2 mL**	**1,0 mL**	**0,2 mL**
20 g/L	100	100	0	0
40 g/L	0	0	0	0
60 g/L	0	0	0	0
80 g/L	0	0	0	0
100 g/L	0	0	0	0

Como o ensaio no qual se utilizou 20 g/L de levedo de cerveja preparado pelo Método 1 apresentou atividade larvicida de 100% nos volumes utilizados, volumes menores de meio fermentado foram testados, e os resultados estão apresentados na Figura 5.2.

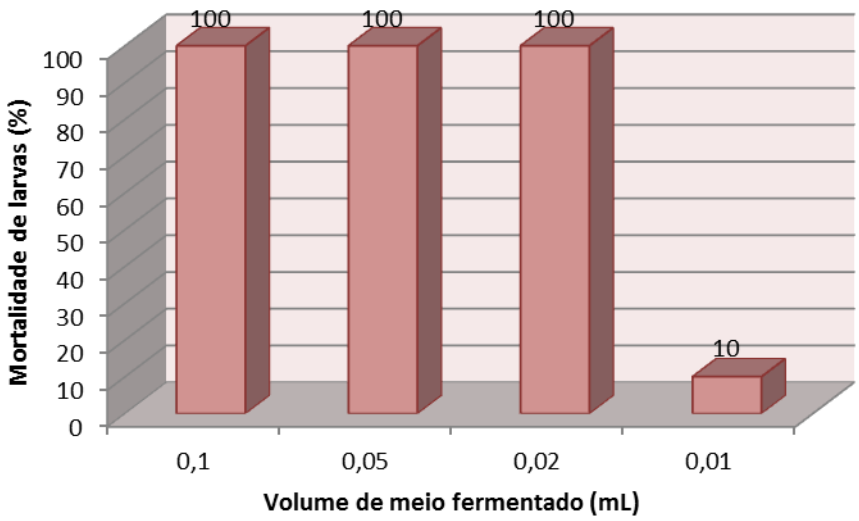

Figura 5.2 - Porcentagens de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes volumes do meio fermentado no qual se utilizou 20 g/L de levedo de cerveja preparado pelo Método 1.

Tendo em vista os ensaios já realizados, decidiu-se realizar um ensaio adicional, utilizando um terceiro método para a obtenção do extrato de levedo de cerveja, denominado Método 3 (Figura 4.1), no qual a suspensão de levedo foi primeiramente filtrada qualitativamente e depois esterilizada em autoclave. Nesse ensaio foi utilizada a concentração de 20 g/L de levedo de cerveja, a mesma do ensaio realizado com a solução de levedo de cerveja preparada pelo Método 1 e que apresentou atividade larvicida. Porém, o meio proveniente deste ensaio não apresentou atividade larvicida.

Com isso, concluiu-se que é fundamental que a etapa de aquecimento, no caso esterilização, seja realizada antes da filtração. O levedo é fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, ácidos nucléicos, e minerais (FERREIRA et al., 2010) e o aquecimento provoca o rompimento celular, liberando esses nutrientes intracelulares (ROEPCKE, 2007), necessários para o crescimento da bactéria e a produção de toxinas. Quando a filtração é realizada antes da esterilização, há grande perda de levedo, que fica retido no filtro. Essas células retidas não passam pela etapa de aquecimento e não são rompidas. Com isso, o extrato produzido por esse método possui menos nutrientes do que o extrato produzido pelo método no qual a esterilização acontece antes da filtração.

Lamoolphak et al. (2006) estudaram a decomposição hidrotérmica de células de levedura de panificação em proteínas e aminoácidos. As reações foram realizadas em reator descontínuo fechado por tempos diferentes e temperaturas de 100 a 250 ºC. O produto da hidrólise a 200 ºC por 5 minutos foi testado como fonte de nutriente para o crescimento de levedura e o resultado foi muito semelhante ao obtido com o ensaio

realizado com extrato de levedura comercial, demonstrando a viabilidade do uso desse produto como componente de meio de cultivo de microrganismos.

Como não era possível realizar a filtração tangencial em condições assépticas e como não é recomendável realizar uma segunda esterilização do meio devido a perda de nutrientes, optou-se por utilizar o Método 1 para o preparo do extrato de levedo de cerveja para os ensaios subsequentes.

5.3 Definição da composição do meio de fermentação

A influência dos componentes utilizados no meio de fermentação sobre a síntese de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* foi avaliada de acordo com um planejamento fatorial fracionário 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central. Este planejamento foi escolhido por ser adequado para estimar os efeitos principais e selecionar as variáveis mais importantes. Além disso, este é um estudo de formulação de meio e, por ser uma primeira avaliação, há pouco conhecimento das condições otimizadas do processo.

Os ensaios foram realizados em frascos agitados e o acompanhamento foi feito por meio de observações periódicas de preparações à fresco do meio fermentado em microscópio ótico. Como o objetivo principal deste estudo foi o aumento da toxicidade do meio, não foram retiradas amostras durante a fermentação, sendo apenas realizado o teste de atividade larvicida do meio fermentado.

A matriz do planejamento, contendo os valores reais das variáveis testadas, assim como o resultado obtido, encontram-se na Tabela 5.3. O volume de 0,1 mL de meio fermentado foi escolhido como resposta por ser o volume no qual apenas uma composição de meio (ponto central) apresentou mortalidade de 100% das larvas.

Os ensaios do ponto central (ensaios 17, 18 e 19) foram os que apresentaram os melhores resultados quanto à atividade larvicida. Os ensaios 3, 10 e 12 apresentaram 90% de mortalidade das larvas e têm em comum a ausência de KNO_3 e $MgSO_4$. Como esses compostos são necessários para o crescimento e produção de toxinas pela bactéria, esse resultado sugere que o extrato de levedo de cerveja pode ser uma fonte de nitrogênio inorgânico e de íon Mg^{2+} em concentrações adequadas para a síntese de toxinas.

Verifica-se também que, de forma geral, os ensaios nos quais o KNO_3 não foi adicionado ao meio apresentaram melhores resultados quando comparados aos ensaios nos

quais ele foi utilizado em seu nível superior (10,0 g/L), confirmando que a fonte de nitrogênio inorgânico em altas concentrações pode prejudicar a produção de toxina pela bactéria, conforme relatado por Liu; Tzeng (2008).

Os valores de % mortalidade de larvas foram utilizados para calcular os efeitos dos diferentes fatores, utilizando-se o *software* STATGRAPHICS 16.1.11. No gráfico de Pareto (Figura 5.3) está representada a estimativa dos efeitos de cada fator sobre a variável resposta. Neste tipo de gráfico são considerados significativos os termos cujos valores de $t_{calculado}$ (representado pelas barras horizontais) são maiores que o valor de $t_{tabelado}$ (representado pela linha azul).

Pela análise do gráfico, pode-se observar que nenhuma variável foi estatisticamente significativa, a 95% de confiança, para a resposta mortalidade de larvas.

Tabela 5.3 - Matriz do planejamento fatorial 2^{8-4}, com 3 repetições do ponto central, para avaliação da influência das variáveis glicerol (X_1), Extrato de levedo de cerveja (X_2), KNO_3 (X_3), $CaCl_2.2H_2O$ (X_4), $MgSO_4.7H_2O$ (X_5), $MnSO_4.H_2O$ (X_6), K_2HPO_4 (X_7), KH_2PO_4 (X_8) sobre a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*.

Ensaio	**Valores reais dos fatores (g/L)**								**% de Mortalidade (com 0,1 mL de meio)**
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	
1	10	10	0	0	0	0	1,0	1,0	10
2	30	10	0	0	0	0,18	2,0	2,0	0
3	10	30	0	0	3,0	0	2,0	2,0	90
4	30	30	0	0	3,0	0,18	1,0	1,0	40
5	10	10	10,0	0	3,0	0,18	2,0	1,0	0
6	30	10	10,0	0	3,0	0	1,0	2,0	0
7	10	30	10,0	0	0	0,18	1,0	2,0	0
8	30	30	10,0	0	0	0	2,0	1,0	0
9	10	10	0	0,24	3,0	0,18	1,0	2,0	60
10	30	10	0	0,24	3,0	0	2,0	1,0	90
11	10	30	0	0,24	0	0,18	2,0	1,0	70
12	30	30	0	0,24	0	0	1,0	2,0	90
13	10	10	10,0	0,24	0	0	2,0	2,0	0
14	30	10	10,0	0,24	0	0,18	1,0	1,0	10
15	10	30	10,0	0,24	3,0	0	1,0	1,0	0
16	30	30	10,0	0,24	3,0	0,18	2,0	2,0	20
17	20	20	5,0	0,12	1,5	0,09	1,5	1,5	100
18	20	20	5,0	0,12	1,5	0,09	1,5	1,5	100
19	20	20	5,0	0,12	1,5	0,09	1,5	1,5	100

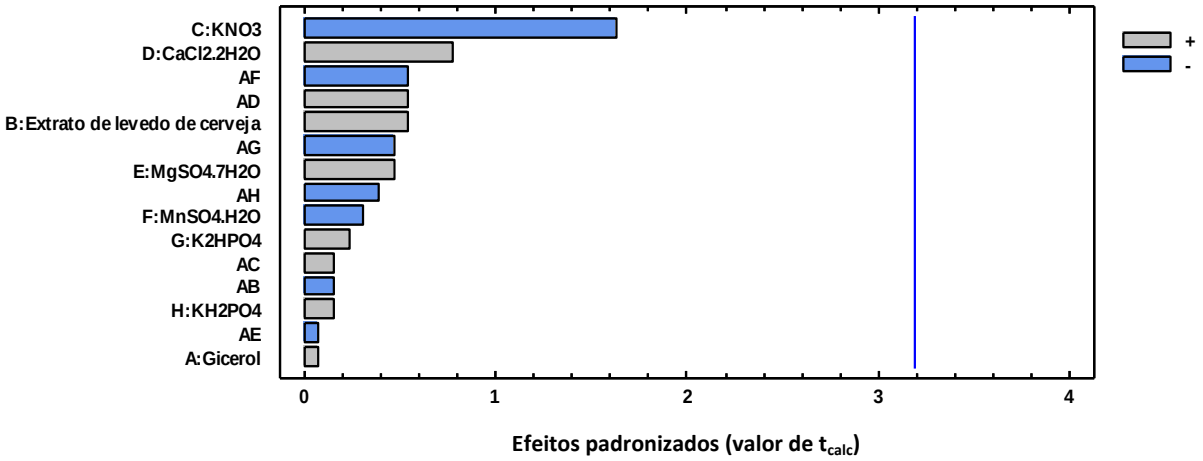

Figura 5.3 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos, ao nível de confiança de 95%, sobre a resposta % de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*.

A análise de variância para variável resposta foi realizada e está apresentada na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Análise de variância dos efeitos principais e interações dos fatores estudados sobre a variável resposta atividade larvicida, obtida com os ensaios do planejamento 2^{8-4}.

Fonte	Soma dos Quadrados	G.L.	Quadrado Médio	F_{calc}	p - valor
X_1:Gicerol	25,0	1	25,0	0,01	0,9429
X_2:Extrato de levedo	1225,0	1	1225,0	0,30	0,6237
X_3:KNO_3	11025,0	1	11025,0	2,67	0,2006
X_4:$CaCl_2.2H_2O$	2500,0	1	2500,0	0,61	0,4931
X_5:$MgSO_4.7H_2O$	900,0	1	900,0	0,22	0,6723
X_6:$MnSO_4.H_2O$	400,0	1	400,0	0,10	0,7759
X_7:K_2HPO_4	225,0	1	225,0	0,05	0,8304
X_8:KH_2PO_4	100,0	1	100,0	0,02	0,8862
X_1X_2	100,0	1	100,0	0,02	0,8862
X_1X_3	100,0	1	100,0	0,02	0,8862
X_1X_4	1225,0	1	1225,0	0,30	0,6237
X_1X_5	25,0	1	25,0	0,01	0,9429
X_1X_6	1225,0	1	1225,0	0,30	0,6237
X_1X_7	900,0	1	900,0	0,22	0,6723
X_1X_8	625,0	1	625,0	0,15	0,7231
Total error	12378,9	3	4126,32		
Total (corr.)	32978,9	18			

G.L. - Graus de liberdade

Os resultados observados na análise de variância confirmam que nenhum dos componentes do meio de fermentação, bem como suas interações, apresentou efeito significativo para a variável resposta analisada, uma vez que os valores de *p* foram superiores a 0,05 (95% de confiança). Ou seja, não foi possível estabelecer um modelo

para esta resposta em função das variáveis estudadas. Com base nisso, optou-se por realizar um segundo planejamento, tendo como referência os valores do ponto central do planejamento 2^{8-4} e com foco apenas nas fontes de carbono e nitrogênio.

5.4 Definição da composição do meio de cultura em termos de fonte de carbono e nitrogênio

Este estudo foi realizado de acordo com um planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central, tendo como variáveis a concentração de glicerol e a concentração de extrato de levedo de cerveja, fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. Os outros componentes do meio de fermentação foram utilizados nas mesmas concentrações do ponto central do planejamento 2^{8-4}, cujo meio fermentado apresentou a maior porcentagem de mortalidade de larvas (Tabela 5.3). Os ensaios foram realizados em frascos agitados (item 4.4.2) e a matriz do planejamento pode ser visualizada no item 4.5.4. Os resultados de concentração celular e de consumo de substrato obtidos em cada ensaio do planejamento 2^2 estão apresentados na Figura 5.4.

Em todos os ensaios foi verificado baixo crescimento celular quando comparado com outros experimentos com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando diferentes meios de cultivo. Rossi (2012) obteve uma concentração celular máxima de 17,70 g/L e Chagas (2012) de 10,5 g/L, ambos utilizando extrato de levedura comercial e glicerol residual.

Os ensaios nos quais foram utilizados extrato de levedo de cerveja no nível superior, 30 g/L, foram os que apresentaram maior crescimento celular (ensaios 3 e 4). O ensaio 3 foi o que apresentou maior concentração celular máxima (4,93 g/L), próxima a de 5,5 g/L encontrada por Rossi (2012), utilizando glicerol residual proveniente da fabricação de biodiesel e levedo de cerveja, e a de 4,6 g/L obtida por Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001), utilizando glicose e extrato de levedo de cerveja 1% (m/v). O fato de o ensaio 3 ter apresentado o maior crescimento celular pode ser atribuído à sua menor relação C:N dentre todos os ensaios realizados, possibilitando uma maior utilização da fonte de carbono pela bactéria. Barbosa (2009) também observou que uma menor relação C:N levou a um maior crescimento celular, durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var.

israelensis em meio contendo glicerol residual como substrato e extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico.

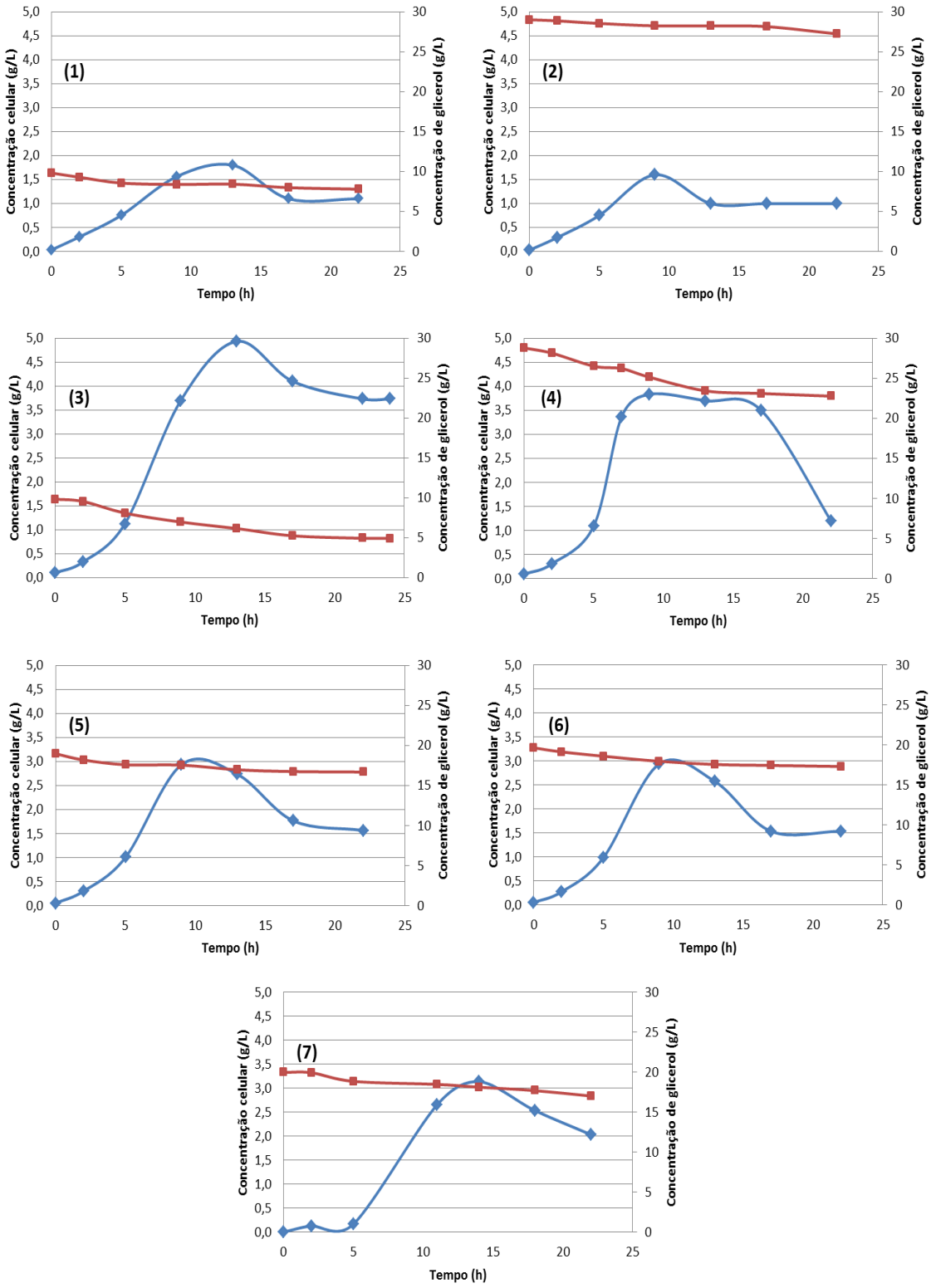

Figura 5.4 - Concentração celular (-♦-) e concentração de glicerol (-■-), em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central.

Observa-se também que em todos os ensaios houve baixo consumo de glicerol. Porém, o maior consumo, cerca de 5,0 g/L, ocorreu nos ensaios 3 e 4, os quais tiveram a concentração da fonte de nitrogênio em seu nível superior.Comparando-se estes ensaios com os ensaios 1 e 2, que continham extrato de levedo de cerveja no nível inferior, observa-se que o aumento da concentração de nitrogênio orgânico no meio proporcionou um aumento do consumo de substrato pela bactéria. Contudo, observou-se anteriormente que concentrações elevadas de levedo de cerveja prejudicaram a produção de toxinas pela bactéria (item 5.2), provavelmente devido ao maior abaixamento do pH. Martins (2008), utilizando meio de cultura formulado com levedura residual cervejeira para a produção de toxinas por *Bacillus sphaericus*, também observou baixo consumo de carbono. Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) avaliaram o crescimento de *Bacillus thurinigiensis* var. *kusrtaki* com 2,5% (m/v) de glicose e extrato de levedo de cerveja 1% (m/v) comparado com extrato de levedura comercial. Quando empregado levedo de cerveja, também foi observada baixa concentração celular e incompleta utilização da glicose. Já no ensaio empregando extrato de levedura comercial os autores verificaram consumo total de glicose, assim como maior concentração celular. Segundo os autores, o meio composto com levedo de cerveja possivelmente contém ferro em baixas concentrações, o que ocasionaria limitação do crescimento celular e ineficiente consumo do substrato.

Com relação ao perfil de pH (resultados apresentados na Figura 5.5) observa-se que quanto maior a concentração da fonte de nitrogênio orgânico, maior a variação de pH, independente da concentração da fonte de carbono.

Os ensaios 1, 2, 5, 6 e 7 apresentaram perfis semelhantes, nos quais se observa uma redução do pH nas primeiras horas de cultivo, aumento até atingir valor máximo, seguido de ligeira queda. O abaixamento de pH inicialmente é devido à produção de ácidos orgânicos, como acético, succínico e lático (KRAEMER-SCHAFHALTER; MOSER, 1996), e, o aumento, possivelmente pelo consumo desses ácidos. Esse mesmo comportamento foi constatado por vários outros autores quando foi empregada glicose (MORRIS et al., 1996; ROWE; MARGARITIS; WEI, 2003; PESSANHA, 2008) e glicerol residual (BARBOSA, 2009; ROSSI, 2012; CHAGAS, 2012) como substrato. O consumo de ácido acético pela bactéria empregada no presente trabalho foi comprovado por Chagas (2012) por meio da sua dosagem, em uma condição em que este foi adicionado ao meio tanto no início quanto durante a fermentação.

Já os ensaios 3 e 4, que apresentaram maior produção de biomassa e maior consumo de substrato, foram os que apresentaram a maior variação de pH (Figuras 5.4 e

5.5). Ambos os ensaios não apresentaram aumento no valor de pH durante o processo e finalizaram com pH consideravelmente inferior ao valor inicial.

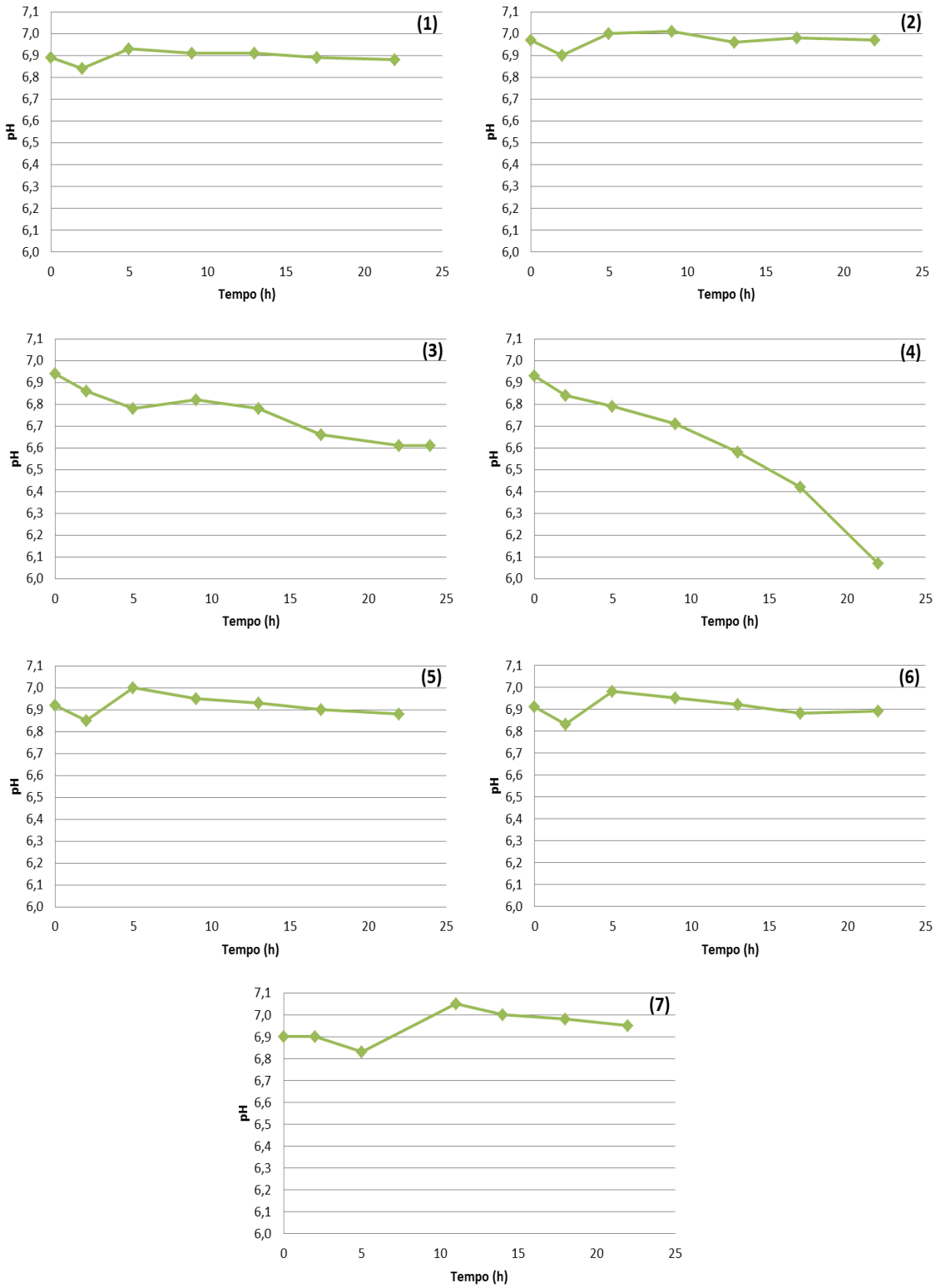

Figura 5.5 - Valores de pH, em função do tempo de fermentação, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2, com 3 repetições do ponto central.

Saksinchai, Suphantharika 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. Utilizando glicerol residual como substrato e levedo de cerveja como fonte de nitrogênio orgânico, Rossi (2012) obteve um perfil de pH no qual só houve a queda deste, que terminou em cerca de 6,3, semelhante ao ocorrido no presente trabalho.

Na Tabela 5.5 estão apresentados os valores de concentração máxima de células ($X_{máx}$) e de produtividade volumétrica em células (Q_x).

Tabela 5.5 - Concentração máxima de células ($X_{máx}$) e produtividade volumétrica em células (Q_x), referentes aos ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.

Ensaio	$X_{máx}$ (g/L)	Q_x (g/L.h)
1	1,80	0,14
2	1,60	0,17
3	4,93	0,37
4	3,83	0,29
5	2,93	0,32
6	2,93	0,32
7	3,13	0,22

Os valores de $X_{máx}$ demonstram que as menores concentrações celulares foram alcançadas quando foi utilizado o levedo de cerveja no nível inferior (10 g/L). Isto se reflete nos baixos valores de Q_x dos ensaios 1 e 2, comparados com os valores obtidos para os demais ensaios. Com isso pode-se concluir que para se obter maiores concentrações celulares e maiores produtividades volumétricas, parâmetros importantes na produção industrial, é necessário utilizar o extrato de levedo de cerveja no nível superior.

Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) realizaram um estudo comparando a composição do levedo de cerveja e do extrato de levedura comercial e constataram que o conteúdo de carboidrato total (como glicose) do extrato de levedo de cerveja (26,85%, m/m) foi significativamente superior ao encontrado no extrato de levedura (15,2%, m/m). A presença de uma maior quantidade de carboidrato, principalmente glicose, no extrato de levedo de cerveja também pode ter influenciado o baixo consumo de glicerol observado em todos os ensaios já que, em outros trabalhos em que glicerol foi utilizado como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (BARBOSA, 2009; ROSSI, 2012; CHAGAS, 2012), houve consumo total da fonte de carbono pela bactéria.

Com relação à toxicidade, na Figura 5.6 encontram-se os resultados dos bioensaios realizados com 0,01 mL de meio fermentado proveniente de cada ensaio do planejamento 2^2. Salienta-se que, inicialmente, o volume de 0,1 mL também foi testado, porém, todos os meios apresentaram atividade larvicida correspondente a 100% de morte das larvas.

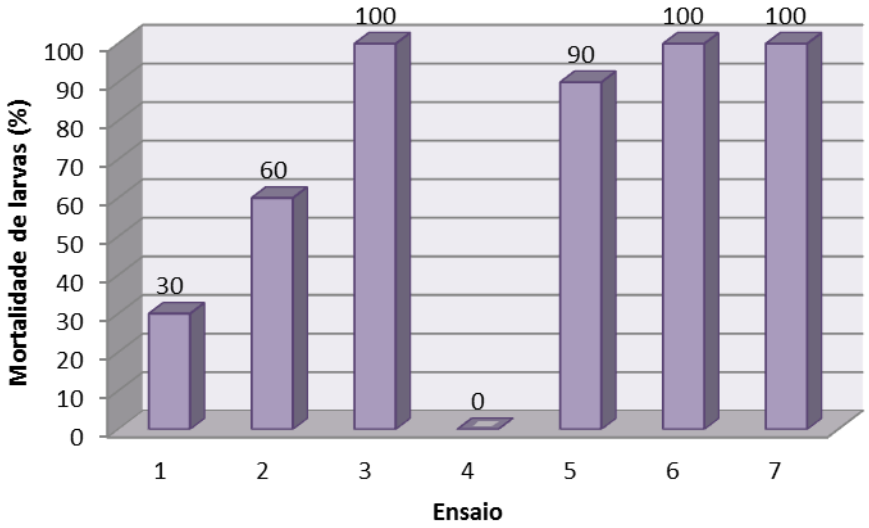

Figura 5.6 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a 0,01 mL de meio fermentado, proveniente dos ensaios do planejamento fatorial 2^2.

O ensaio 4, que apresentou a maior variação de pH, foi o que apresentou o pior resultado de atividade larvicida, não causando a morte de nenhuma larva. Segundo Finkler e Luna-Finkler (2011), meios com níveis elevados de substrato, sem o ajuste apropriado de nitrogênio, podem causar uma queda do pH que levaria à inibição da esporulação da bactéria. Como é nessa fase que ocorre a síntese das endotoxinas pela bactéria, essa inibição da esporulação pode ser a causa da ausência de atividade do meio do ensaio 4.

Como praticamente não houve diferença de atividade larvicida entre o ensaio 3 e os ensaios do ponto central, realizou-se um teste com um volume menor de meio fermentado, de forma a se evidenciar a diferença entre estes ensaios em termos de toxicidade. Os resultados estão apresentados na Figura 5.7.

Ao se utilizar 0,005 mL de meio fermentado, verificou-se que o ensaio 3 apresentou uma mortalidade igual a 80%, enquanto os ensaios do ponto central (5, 6 e 7) apresentaram resultado inferior. Com isso, constatou-se que a condição do ensaio 3 é a que mais favorece a síntese de toxinas pela bactéria, dentre todas as avaliadas no presente trabalho.

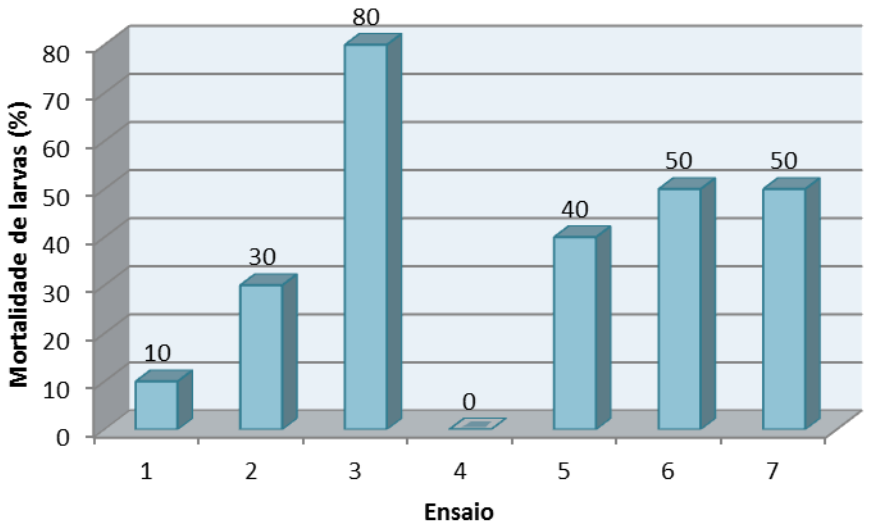

Figura 5.7 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* submetidas a 0,005 mL de meio fermentado, proveniente dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^2.

Para a realização das análises estatísticas dos ensaios do planejamento 2^2, foram empregados os resultados apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Variáveis resposta referentes aos ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.

	Variáveis resposta		
Ensaio	**Concentração máxima de células (g/L)**	**Consumo de substrato (%)**	**Mortalidade de larvas – 0,005mL de meio (%)**
1	1,8	20,55	10
2	1,6	6,09	30
3	4,93	49,66	80
4	3,83	18,61	0
5	2,93	12,00	40
6	2,93	11,89	50
7	3,13	14,80	50

A análise da estimativa dos efeitos para a variável concentração máxima de células foi realizada empregando-se o gráfico de Pareto (Figura 5.8), sendo considerados significativos os termos cujos valores de $t_{calculado}$ foram superiores ao valor de $t_{tabelado}$ (representado pela linha azul), para a distribuição de *Student* ao nível de 95% de confiança.

Verifica-se que, com relação à concentração máxima de células, os fatores concentração de glicerol e concentração do extrato de levedo de cerveja foram estatisticamente significativos, assim como a interação entre eles. O aumento da

concentração de fonte de carbono apresentou efeito negativo sobre a concentração celular máxima, enquanto o aumento da fonte de nitrogênio apresentou efeito positivo.

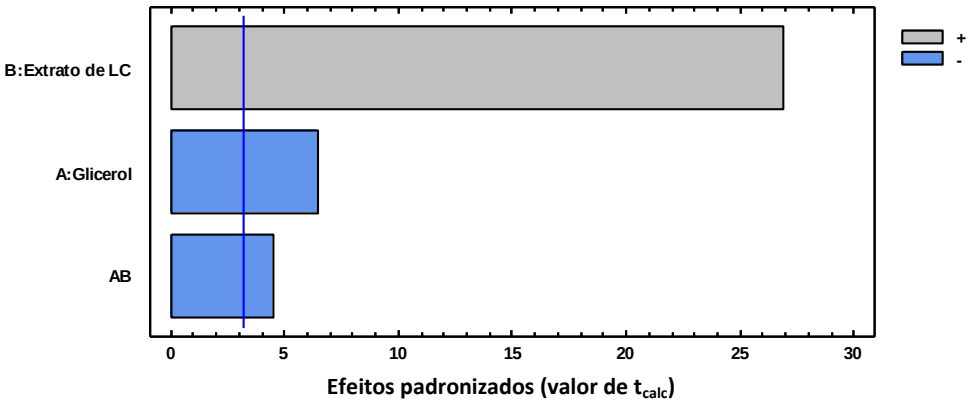

Figura 5.8 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos, ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta concentração máxima de células, para os ensaios do planejamento fatorial 2^2.

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 5.7.

Tabela 5.7- Critérios para validação de diferentes modelos (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).

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
	$R^2<0,7$	----------	Não
$p>0,05$	----------	----------	Não

Na Tabela 5.8 encontra-se a análise da variância dos efeitos e da interação entre estes para a variável concentração celular máxima.

Tabela 5.8 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta concentração celular máxima, obtida com os ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.

Fonte	**Soma dos quadrados**	**G.L.**	**Quadrado Médio**	**F_{calc}**	**p - valor**
Modelo	7,81	3	2,60	261,24	**0,0004**
A:Glicerol	0,4225	1	0,4225	42,41	**0,0074**
B:Extrato de levedo	7,1824	1	7,1824	720,99	**0,0001**
AB	0,2025	1	0,2025	20,33	**0,0204**
Falta de ajuste	0,003219	1	0,003219	0,24	0,6718
Total error	0,0298857	3	0,0099619		
Total (corr.)	7,83729	6			

R^2 = 0,996
G.L. - Graus de liberdade

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 ($p>0,05$). De acordo com Moldavsky e Cohen (1996), o valor de R^2 sendo maior que 0,9 é suficiente para validar o modelo. Assim, considerando o valor de R^2 igual a 0,99 obtido para a resposta concentração celular máxima e como a falta de ajuste não foi significativa, conclui-se que o comportamento estudado pode ser representado por um modelo linear (Equação 2), no qual A e B são os valores codificados das variáveis glicerol e extrato de levedo de cerveja, respectivamente.

$$X_{máx} = 3,02143 - 0.32500*A + 1,34000*B – 0,22500*A*B \qquad \textbf{(2)}$$

A Figura 5.9 apresenta a superfície de resposta e as curvas de nível que mostram a influência das duas variáveis mencionadas sobre a variável resposta concentração celular máxima.

Pela superfície de resposta, nota-se que o aumento da concentração de levedo de cerveja e a diminuição da concentração de glicerol proporcionam um aumento da concentração celular máxima.

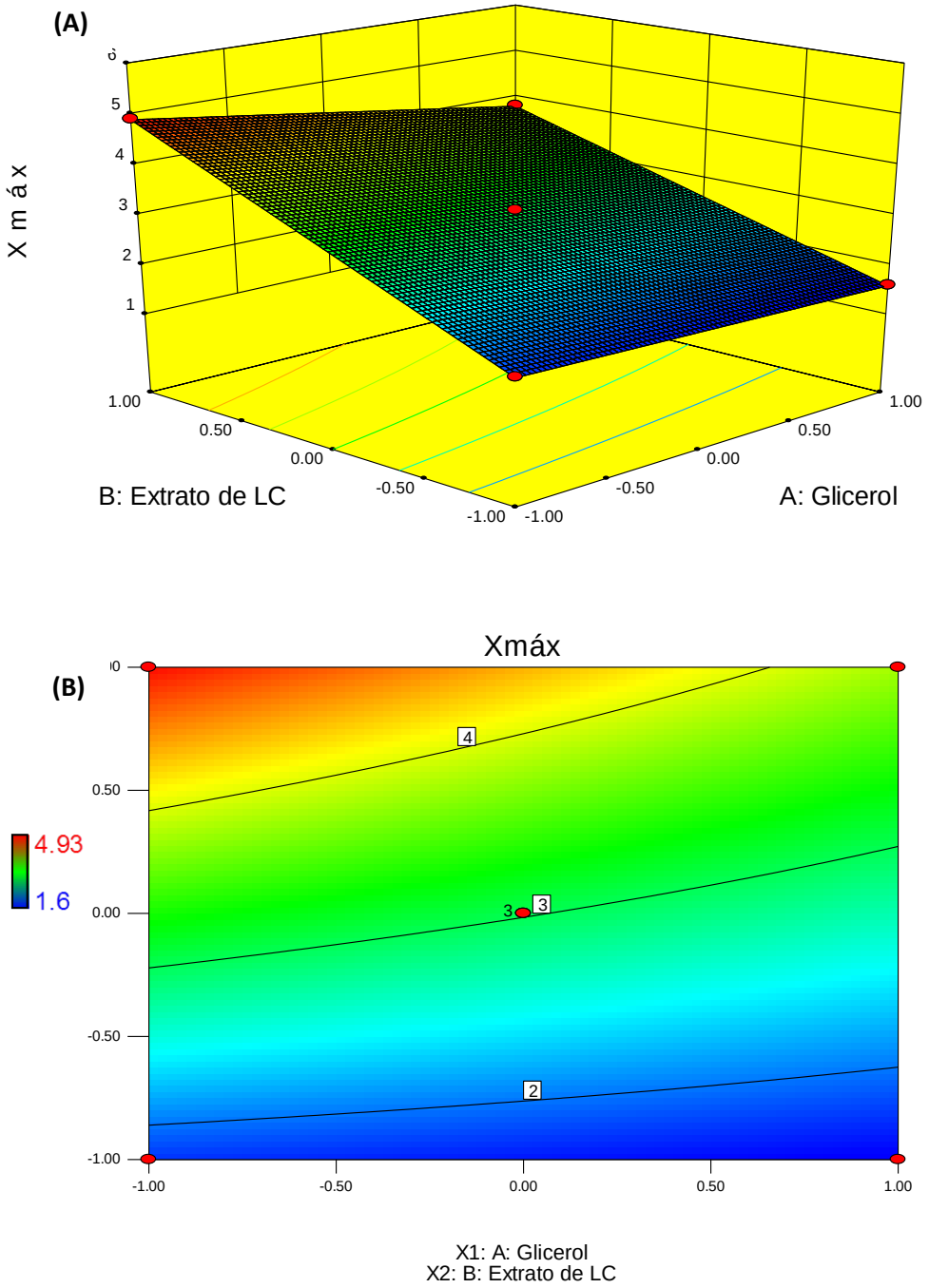

Figura 5.9 - Superfície de resposta (A) e curvas de nível (B) referentes à concentração celular máxima ($X_{máx}$) em função dos fatores investigados, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2.

Quanto à variável resposta consumo de substrato, pelo gráfico de Pareto (Figura 5.10) verifica-se que nenhuma variável teve efeito significativo ao nível de 95% de confiança.

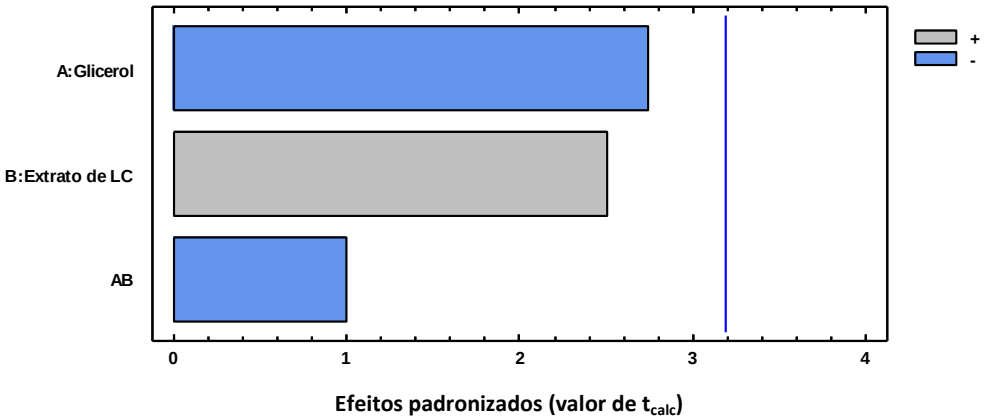

Figura 5.10 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta consumo de substrato, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2.

Na Tabela 5.9, encontra-se a análise de variância dos efeitos e da interação entre estes, para a variável resposta consumo de substrato.

Tabela 5.9 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta consumo de substrato, obtida com os ensaios do planejamento 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.

Fonte	Soma dos Quadrados	G.L.	Quadrado Médio	F_{calc}	p - valor
Modelo	1019,86	3	339,95	4,94	0,1112
A:Glicerol	517,79	1	517,79	7,52	0,0712
B:Extrato de levedo	433,264	1	433,264	6,29	0,0870
AB	68,807	1	68,807	1,00	0,3911
Falta de ajuste	201,1	1	201,1	73,93	0,0133
Total error	206,538	3	68,8459		
Total (corr.)	1226,4	6			

R^2 = 0,832
G.L. – Graus de liberdade

De acordo com a análise apresentada, o modelo não foi significativo e o coeficiente de correlação encontrado foi menor que 0,9. Como a falta de ajuste do modelo proposto para o consumo de substrato apresentou p>0,05, o mesmo não pode ser validado para expressar o comportamento da variável resposta, apesar do valor de R^2 ser maior que 0,7 (MOLDAVSKY; COHEN, 1996).

Vale salientar que os fatores concentração de glicerol e concentração de extrato de levedo de cerveja apresentaram p<0,1, portanto, seriam significativos ao nível de 90%. Porém, neste estudo optou-se por adotar o nível de significância de 95% para que houvesse uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

A Figura 5.11 apresenta o Gráfico de Pareto para a resposta atividade larvicida ao nível de confiança de 95%.

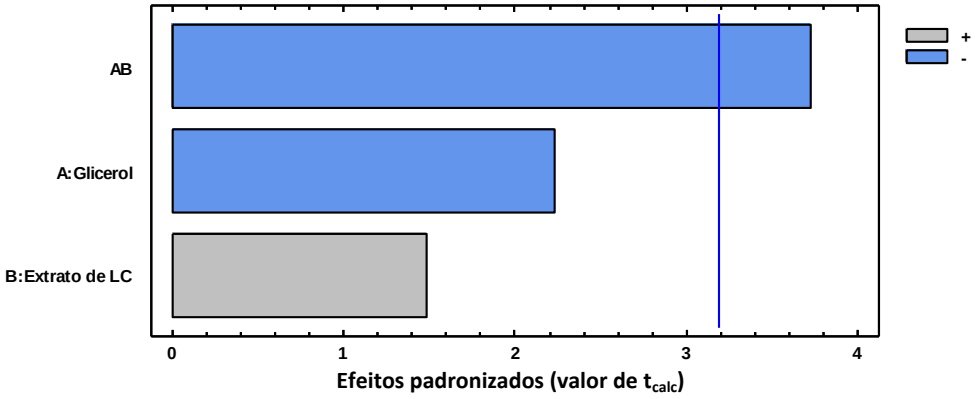

Figura 5.11 - Gráfico de Pareto representando a estimativa dos efeitos ao nível de 95% de confiança, sobre a resposta atividade larvicida, para os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2.

Embora os fatores não tenham sido significativos para a atividade larvicida, a interação entre eles foi significativa em seu nível negativo, ou seja, quando aumenta-se simultaneamente os níveis dos 2 fatores (concentração de glicerol e concentração de extrato de levedo de cerveja) há uma redução da atividade larvicida. Este é um exemplo de efeito de interação antagônico, no qual a variação dos fatores, individualmente, do nível inferior para o superior aumenta o valor da resposta, enquanto que uma variação simultânea dos fatores provoca redução na resposta (AOUADA et al., 2008). Esse antagonismo é comprovado considerando-se que o ensaio 4, que possui as duas variáveis no nível superior, apresentou, dentre os ensaios realizados, o pior resultado de atividade larvicida do meio, enquanto o ensaio 3, que continha glicerol no nível inferior e extrato de levedo de cerveja no nível superior, apresentou o melhor resultado.

Pela análise de variância (Tabela 5.10), verificou-se que o $R^2<0,7$. Sendo assim, o modelo não pode ser utilizado para expressar o comportamento da variável resposta.

Tabela 5.10 - Análise de variância dos efeitos principais e interação dos fatores estudados sobre a variável resposta atividade larvicida, obtida com os ensaios do planejamento fatorial completo 2^2 para definição da composição do meio de fermentação em termos de fonte de carbono e nitrogênio.

Fonte	Soma dos Quadrados	G.L.	Quadrado Médio	F_{calc}	p - valor
Modelo	3800,0	3	1266,67	7,00	0,0721
A:Glicerol	900,0	1	900,0	4,97	0,1120
B:Extrato de LC	400,0	1	400,0	2,21	0,2338
AB	2500,0	1	2500,0	13,82	0,0339
Falta de ajuste	4144,05	1	4144,05	124,32	**0,0079**
Total error	542,86	3	180,95		
Total (corr.)	4342,87	6			

R^2 = 0,565
G.L. – Graus de liberdade

5.5 Avaliação, em biorreator, do meio definido em frascos agitados

O ensaio 3 do planejamento fatorial completo 2^2 apresentou o melhor resultado quanto à atividade larvicida do meio, sendo, portanto, a composição do respectivo meio empregada para se testar a fermentação em biorreator. A fermentação foi realizada conforme descrito no item 4.4.3, sendo que a cada 2 horas coletou-se uma amostra do meio fermentado e observou-se a morfologia celular por microscopia. Os dados obtidos de concentração celular, concentração de glicerol e pH deste ensaio em biorreator estão apresentados nas Figuras 5.12 e 5.13.

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida em 45% da saturação durante todo o processo fermentativo, o que, segundo estudo realizado por Rossi (2012), é a melhor condição de fornecimento de oxigênio para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerol como substrato.

Observaram-se todas as fases de crescimento microbiano e os respectivos perfis de consumo de substrato, no caso, glicerol, e concentração celular, conforme descrito por Berbert-Molina et al. (2008).

Segundo os autores, utilizando-se glicose como substrato, o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pode ser dividido em quatro fases, a saber: (I) Crescimento Vegetativo: apresenta rápido decréscimo de pH, intenso consumo de oxigênio e são observadas as fases lag e crescimento exponencial e linear; (II) Transição para esporulação: inicia-se com 5 horas de fermentação e são observados aumento de pH, perda de mobilidade, início da formação de grumos e drástica redução na velocidade de consumo de oxigênio; (III) Esporulação: caracterizada pelo início da formação de esporos, inicia-se com 13 horas e são observados grandes grumos de células, diminuição da biomassa e aumento da concentração de oxigênio. Esta fase finaliza com 20 horas de fermentação onde se observa a dissociação dos grumos; (IV) Maturação: é observada a maturação dos esporos, diminuição dos grumos, consecutivamente lise celular e liberação dos esporos.

Como pode ser observado, o ensaio realizado apresentou uma fase lag de crescimento de aproximadamente 3 horas, semelhante ao relatado por Berbert-Molina et al. (2008), uma vez que, segundo estes autores, com 3 horas de fermentação já se observava fase exponencial de crescimento.

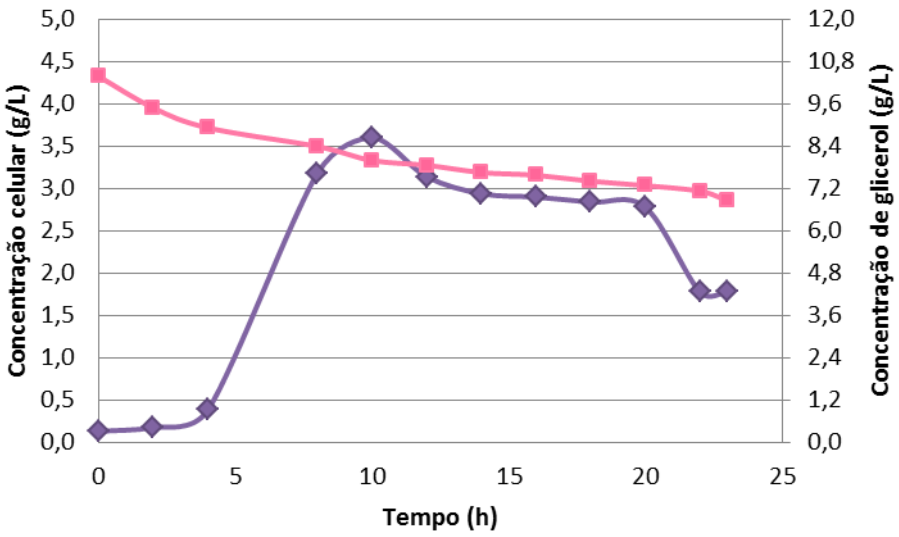

Figura 5.12 - Concentração celular (-♦-) e concentração de glicerol (-■-), em função do tempo, durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados.

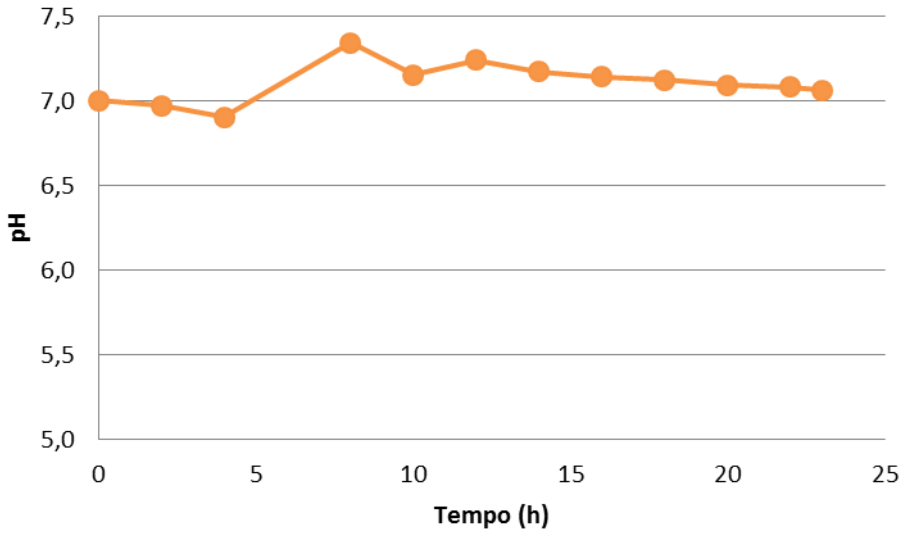

Figura 5.13 - Valores de pH, em função do tempo, durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados.

Na fase I houve intenso consumo de oxigênio, o que causou a queda de sua concentração para cerca de 40% da saturação, nas primeiras 4 horas do processo. Observa-se que o valor de pH apresentou apenas uma ligeira variação neste mesmo período, conforme pode-se observar pelo gráfico da Figura 5.13.

A fase II, caracterizada pelo início da formação de grumos, iniciou-se com 8 horas de fermentação, e foi observado o maior valor de pH dentre todos os ensaios já realizados nesse trabalho, embora esteja-se comparando o ensaio em biorreator com os ensaios em frasco. O aumento do pH é ocasionado pelo consumo de ácidos orgânicos presentes no

meio ou daqueles sintetizados pela bactéria. De acordo com Chagas (2012), em meio contendo glicerol como substrato, a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* consome o ácido acético que produz e também o ácido acético adicionado ao meio durante a fermentação. A concentração celular máxima (3,6 g/L) foi alcançada nessa fase, com 10 horas de fermentação (Figura 5.12).

A fase III iniciou-se com 12 horas de fermentação, tempo no qual foram observados grumos maiores de células. Porém, o aumento da concentração de OD no meio deu-se somente a partir de 16 horas de fermentação, diferente do descrito por Berbert-Molina et al. (2008). O fato de a fase III do presente trabalho ser mais prolongada pode ser atribuído à maior sensibilidade da bactéria aos componentes do meio, retardando seu metabolismo. Por outro lado, tal fato pode estar relacionado com uma melhor condição de transferência de oxigênio durante a fase de esporulação e síntese de toxina pela bactéria, fazendo com que esta seja estendida. A necessidade de um adequado fornecimento de oxigênio durante a produção de bioinseticida pela bactéria empregada no presente trabalho já foi relatada por diversos autores. Pode-se destacar o trabalho de Boniolo et al. (2012), no qual foi estudado o fornecimento de oxigênio durante as quatro fases características do crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Vale ressaltar que a estratégia de fornecimento de oxigênio empregada no presente trabalho (manutenção da concentração de OD em 45% da saturação durante toda a fermentação) foi a melhor condição para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerol residual como substrato, de acordo com Rossi (2012). Apesar disso, deve-se ressaltar que no trabalho de Berbert-Molina et al. (2008) não foi determinada a atividade larvicida do meio, o que impossibilita comparação para confirmação da hipótese levantada.

O início da dissociação dos grumos, fase IV, ocorreu com 21 horas de fermentação, com praticamente todas as células esporuladas. Com 23 horas, 2 horas após o término da dissociação dos grumos, a fermentação foi finalizada.

Comparando o ensaio realizado em biorreator com o realizado em frasco agitado (Ensaio 3), observou-se uma queda no consumo de substrato (de 49,7% para 33,9%). Esta diferença se deve ao menor crescimento verificado em biorreator. A concentração celular máxima obtida em frasco agitado foi de 4,93 g/L enquanto que no biorreator foi de 3,6 g/L. Destaca-se também que, em biorreator, a fermentação teve menor tempo de duração.

Na Figura 5.13 estão apresentadas as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) e as velocidades de agitação da turbina em função do tempo, durante a fermentação em biorreator. Observa-se uma queda da concentração de OD nas primeiras horas de cultivo e,

com 4 horas de fermentação, esta atingiu um valor abaixo do mínimo estipulado (45% da saturação). O controle da concentração de oxigênio foi então acionado, o que pode ser verificado pelo aumento da agitação. Com 8 horas a agitação atingiu o valor máximo de 560 rpm, com a finalidade de manter a concentração de OD em 45%. Em seguida observou-se que, no intervalo de 8 a 16 horas, a concentração de OD permaneceu em 45 % enquanto a frequência de agitação diminuiu, indicando um decréscimo da demanda de oxigênio. Após esse período, o fornecimento de oxigênio foi superior à demanda, levando a um aumento da concentração de OD no meio. Com 20 horas de cultivo a agitação voltou para seu valor inicial de 300 rpm, o qual permaneceu até a fermentação ser encerrada, com 23 horas.

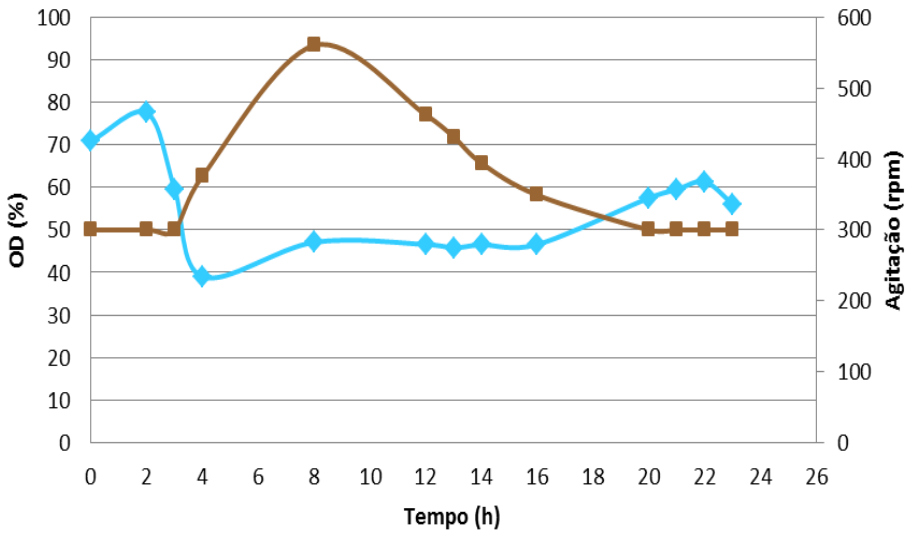

Figura 5.14 - Concentração de OD (-♦-), em % da saturação, e frequência de agitação (-■-), em função do tempo, durante a fermentação realizada em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados.

Os resultados de atividade larvicida do meio proveniente do ensaio realizado em biorreator estão apresentados na Figura 5.15. Observa-se que o meio produzido em biorreator proporcionou 100% de morte com um volume de até 0,005 mL, resultado melhor que o obtido com o meio de mesma composição produzido em frasco agitado (ensaio 3) que, com o mesmo volume, proporcionou a morte de 80% das larvas. Conclui-se, portanto, que foi possível obter um meio fermentado em biorreator mais eficiente que o ensaio realizado em incubadora. Este resultado também foi melhor que o encontrado por Chagas (2012) que, utilizando glicerol residual como substrato e extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico, obteve como melhor resultado a morte de 80% de larvas utilizando 0,005 mL de meio fermentado.

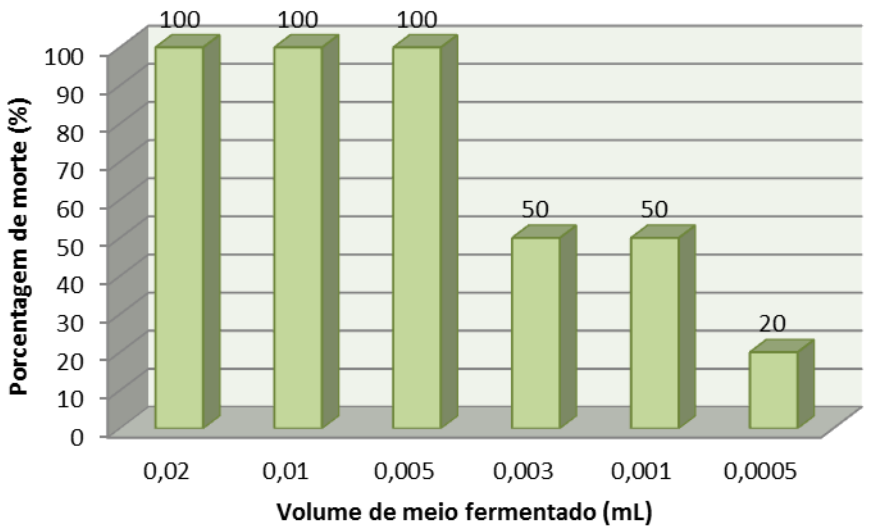

Figura 5.15 - Porcentagem de morte de larvas de *Aedes aegypti* em função de diferentes volumes de meio fermentado empregado no teste de atividade larvicida do meio obtido no ensaio em biorreator para teste do meio definido em ensaios em frascos agitados.

A melhora na produção de toxina obtida foi ainda mais evidente comparando-se o ensaio realizado em biorreator com a melhor condição do estudo preliminar deste trabalho, utilizado para a determinação da faixa de concentração de levedo de cerveja utilizada nos ensaios subsequentes (item 5.2). O volume de 0,01 mL de meio fermentado do ensaio preliminar proporcionou a morte de 10% das larvas enquanto o mesmo volume de meio fermentado em biorreator proporcionou a morte de 100% de larvas. Destaca-se ainda que a condição de fornecimento de oxigênio empregada no presente trabalho (manutenção da concentração de OD em 45% da saturação durante toda a fermentação) foi a mesma utilizada por Rossi (2012) para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* em meio contendo glicerol residual como substrato, porém com fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico diferentes. Como o fornecimento de oxigênio é um fator que influencia a produção de toxinas pela bactéria, a otimização de sua condição, em biorreator, para o meio proposto (que contém extrato de levedo de cerveja como fonte de nitrogênio orgânico e KNO_3 como fonte de nitrogênio inorgânico) poderá aumentar ainda mais a toxicidade do meio fermentado.

Por fim, com base nos valores obtidos determinou-se a Concentração Mínima Letal necessária para matar 50% de uma população de larvas (CL_{50}) e foi encontrado um volume de 0,00243 mL. Esse valor é superior ao volume de 0,0006 mL obtido por Rossi (2012) utilizando extrato de levedura, porém, é importante ressaltar que o meio empregado no presente trabalho apresenta um custo consideravelmente inferior.

6. CONCLUSÕES

- O extrato de levedo de cerveja é uma fonte de nitrogênio adequada para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com vistas à produção de bioinseticida.

- O melhor método para o preparo do extrato de levedo de cerveja consiste da esterilização da suspensão de levedo de cerveja (121 ºC por 20 minutos) seguida de sua filtração qualitativa.

- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* é capaz de crescer em meio contendo extrato de levedo de cerveja na faixa de concentração de 20 g/L a 100 g/L, porém só produz toxinas quando as concentrações estão na faixa de 10 g/L a 30 g/L.

- Nas condições estudadas, os nutrientes do meio de cultivo: glicerol residual, extrato de levedo de cerveja, KNO_3, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4$, K_2HPO_4 e KH_2PO_4, isoladamente, não exercem influência significativa sobre a produção de toxinas.

- O aumento da concentração de fonte de carbono, glicerol, apresenta efeito negativo sobre a concentração celular máxima, enquanto o aumento da fonte de nitrogênio, extrato de levedo de cerveja, apresenta efeito positivo.

- Para a resposta atividade larvicida, a interação entre a concentração de glicerol e a concentração de extrato de levedo de cerveja foi significativa em seu nível negativo.

- Em biorreator é possível obter um meio fermentado mais eficiente que o obtido em frasco.

REFERÊNCIAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-741, 2012.

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

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

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

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

ANGELO, E. A.; VILLAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *B. thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ANP. **Boletim Mensal do Biodiesel**, abr. de 2013. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em: 25 de maio de 2013.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.;GIROTTO, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CAMPESE, G. M. Caracterização de hidrogéis condutores constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de planejamento fatorial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 126-131, 2008.

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

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

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

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

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

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

BERNHARD, K.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis,* an environmental biopesticide:** theory and practice. New York: Jonh Wiley, 1993, p. 255-267.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M, BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, n. 7446. p. 504–507, 2013.

BONIOLO, F. S.; RODRIGUES, R. C.; PRATA, A. M. R.; LÓPEZ, M. L.; JACINTO, T.; SILVEIRA, M. M.; BERBERT-MOLINA, M. A. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ-endotoxin production. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., n. 94, p. 625-636, 2012.

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.

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 socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. **ActaTropica**. 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 *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 323-342, 2006.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

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

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

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

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

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O.; Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, p. 4031-4039, 2010.

CHAE, H. J.; JOO, H.; IN, M. Utilization of brewer´s yeast cells for the production of food grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 253-258, 2001.

CHAGAS, M. H. R. **Efeito do pH e do ácido acético sobre a produção de bioenseticida por *Bacillus thuringiensis* a partir de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel**. 2012, 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena – USP, Lorena, 2012.

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

COMBATE À DENGUE. **Número de casos de dengue quase triplica no país**. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/numero-de-casos-de-dengue-quase-triplica-nopais/>. Acesso em: 26 de maio de 2013.

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

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org). ***Entomopathogenic bacteria:*** from laboratory to field applications. New York: Kluwer Academic Publishes, 2000, p. 297-316.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 28 de mar. de 2012.

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

EMBRAPA. Bioinseticida Bt-Horus SC para controle da larva do mosquito transmissor da Dengue. Relatório de avaliação dos impactos das tecnologias geradas pela Embrapa. Disponível em: <http://bs.sede.embrapa.br/2011/relatorios/recursosgenetbio_2011_bioinseticidabthorus.pd>. Acesso em: 26 de maio de 2013.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O; PINHO, O; VIEIRA, E; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010.

FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to insect control: process development of small scale production to pilot-plant-fermenters. In: Farzana Perveen. (Org.). **Insecticides;** advances in integrated pest management. Croatia: INTECH, 2011, p. 613-626.

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

GHOSH, D.; TOURIGNY, A.; HALLENBECK, P. C. Near stoichiometric reforming of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen by photofermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2273-2277, 2012.

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

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

GOES, T.; ARAÚJO, M.; MARRA, R. **Biodiesel e sua sustentabilidade**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/Trabalho_biodiesel_11_de_janeiro_de_2010 versao_final.pdf>. Acesso em: 20 de mar. de 2012.

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

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

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 383-446.

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

HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. **Crop Protection**, v. 19, p. 449-454, 2000.

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

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria 217**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>. Acesso em: 07 jun. 2013.

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

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

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

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.

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

LAMOOLPHAK, W.; GOTO, M.; SASAKI, M.; SUPHANTHARIKA, M.; MUANGNAPOH, C.; PROMMUAG, C.; SHOTIPRUK, A. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and aminoacids, **Journal of Hazardous Materials**, B 137, p. 1643-1648, 2006.

LEWIS, M. J. Ultrafiltration of protein. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.) **Developments in food protein;** London: Applied Science Publishers, 1982, v. 1, p. 91-130.

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

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

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

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural: Revista Científica do Unifae**, v. 2, n. 2, p. 83-89, 2008.

LUTHY, P.; CORIER, J.; FISCHER, H. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application, In: KURSTAK, E. **Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982, p. 35-74.

MACORIS, M. L. G. **Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas**, 2011. 72 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

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

MARSHALL, A. D.; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. In: FOULING and cleaning in pressure driven membrane processes. Brussels: International Dairy Federation, 1995, p. 8-35.

MARTINS, C. D. C. **Desenvolvimento de meios de cultivo alternativos para produção de *Bacillus sphaericus* tóxicos contra larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** 2008, 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

MÉLO, M. E. B. **Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sínteticos utilizados para o controle de *Aedes aegypti***. 2009. 128 p. Tese (Doutorado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MENDES, A. P. A.; COSTA, R. C. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. Biocombustíveis, BNDES Setorial 31, p. 253-280, 2010.

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

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

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 Invetebrate Pathology**, v. 59, p. 286-289, 1992.

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

MONNERAT, R. Desenvolvimento de biolarvicidas a base de *Bacillus thuringiensis* para controle de pragas. **Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/eventos/inovaecria/comunicacoes/181_bioinseticidas_monnerat_cenargen_0903_1530.pdf >. Acesso em: 26 de maio de 2013.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bacteria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds). **Controle Biológico**, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, v. 3, p. 163-200.

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.

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

NETA, L. S. F.; HABERT, A. C.; BORGES, C. P. Cerveja Microfiltrada: Processo e Qualidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 130-137, 2005. Publicação do 5º SIPAL.

NICKERSON, K. W., JULIAN G., BULLA Jr., L. A. Physiology of spore-forming bacteria associated with Insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 Serotypes of *B. thuringiensis.* **Applied Microbiology,** v. 28, n. 1, p. 129-132, 1974.

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

PESSANHA, L. G. **Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis***. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Centro de Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2008.

PINHEIRO, R. S. **Processos de inovação tecnológica para a glicerina produzida no processo de obtenção de biodiesel no Brasil**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda***. 2004. 144p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.

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

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

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

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

PYLE, D. J. **Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for the Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids by the Microalga *Schizochytrium limacinum***. 2008, 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Biológicos) - Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg - USA, 2008.

RAMOS, L. P.WILHELM, H. M. Current Status of Biodiesel Development in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 807-819, 2005.

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. In: **BIOTECHNOLOGY**, Special microbial process. Weinheim: VCH, v.6B, p. 52-64, 1988.

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

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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

ROSSI, A. A. **Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel**. 2012. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena - USP, Lorena, 2012.

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

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.

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

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

SHOTIPRUK, A.; KITTIANONG, P.; SUPHANTHARIKA, M.; MUANGNAPOH, C. Application of rotary microfiltration in debittering process of spent brewer's yeast. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1851-1859, 2005.

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

SINDICERV. **Indústrias fazem corrida pela cerveja "premim"**. Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/clipping/12/sindicerv0112.pdf>. Acesso em: 27 de mar. de 2012.

TARANTINO, M. A vacina da dengue está mais próxima. **ISTOÉ Independente**. Medicina & Bem-estar, n. 2256, 7 fev. 2013. Disponível em: <http://www.istoe.com.br/reportagens/274196_A+VACINA+DA+DENGUE+ESTA+MAIS+PROXIMA>. Acesso em: 24 de maio de 2013.

TABUCHI, S. C. T., FERNANDES, A. M., ROSSI, A. A., PRATA, A. M. R. Influência de diferentes fontes de nitrogênio orgânico sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* visando à produção de bioinseticida a partir de glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2010, Foz do Iguaçu. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química 18., Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada 5., e Encontro Brasileiro de Adsorção 8., v. 1. p. 6901-6909. 2010.

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

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

TRENT, D.; SHIN, J.; HOMBACH, J.; KNEZEVIK, I.; MINOR, P.; WHO WORKING GROUP. WHO Working Group on technical specifications for manufacture and evaluation of dengue vaccines. **Vaccine**, v. 28, p. 8246-8255, 2010.

UBRABIO; FGV. **O Biodiesel e sua contribuição ao desenvolvimento brasileiro**. Disponível em: < http://www.ubrabio.com.br/sites/1700/1729/00000201.pdf>. Acesso em: 25 de maio de 2013.

USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A.; Efeito da pressão transmembrana e da velocidade tangencial durante a microfiltração de suco de umbu (Spondiastuberosa arr. cam.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA 16., 2006, Santos.

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. **WaterResearch**, v. 36, n. 19, p. 4850-4860, 2002.

WHO, World Health Organization. **Dengue Control**. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/en/index.html>. Acesso em: 30 de maio de 2013.

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.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 423-432, 2003.

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

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