UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena

MARTA HELOISA DOS REIS CHAGAS

Efeito do pH e do ácido acético sobre a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* a partir de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel

Lorena – SP

2012

MARTA HELOISA DOS REIS CHAGAS

Efeito do pH e do ácido acético sobre a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*
a partir de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel

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

Orientador: Prof. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Versão Original

Lorena – SP

2012

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Chagas, Marta Heloisa dos Reis

Efeito do pH e do ácido acético sobre a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* a partir de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel. / Marta Heloisa dos Reis Chagas. – 2012.
74 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. 2012.

Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata

1. Bioinseticidas 2. Glicerol 3. Ácido acético 4. *Bacillus thuringiensis* 5. Biodiesel. I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orient.

661.164.2 - CDU

*Dedico esta dissertação à minha mãe, por todos os esforços feitos ao longo desses anos,
sempre me instruindo, orando por mim e me dedicando amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Como já dizia Fernando Antinelli: “Sonho parece verdade quando a gente esquece de acordar (...)”. Hoje vivo a realidade que parece um sonho, o qual requereu muito esforço, determinação, paciência e perseverança para que se pudesse concretizar. Sonho esse que não teria conseguido se estivesse sozinha. Por esse motivo deixo expressa aqui a minha eterna gratidão a todos aqueles que me acompanharam nessa jornada, de maneira direta ou indireta.

Agradeço ao meu eterno amigo e orientador, Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, às suas preciosas críticas e sugestões e por ter compartilhado comigo parte dos seus conhecimentos.

À minha família, especialmente minha mãe Vilma H. P. R. Chagas, por todas as orações em meu favor, toda preocupação, todo carinho e cuidado.

À irmã que a vida me deu, Adriana A. Rossi, pelo companheirismo, pela cumplicidade, pela amizade de todos esses anos e por estar presente mesmo que à distância.

Agradeço às minhas queridas alunas de iniciação científica Júlia Fernandes e Thaís Rodrigues, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava, pelo apoio, pelo incentivo e pela grande amizade que se construiu.

Obrigada à minha afilhada Ana Beatriz e aos amigos Thiago Vieira, Guilherme Lopes e Wagner Freitas.

Enfim, obrigada a todos pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço. Essa caminhada não teria sido a mesma sem vocês.

RESUMO

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

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo, gram-positiva, que se destaca pela capacidade de sintetizar um cristal protéico, adjacente ao esporo, responsável pela ação tóxica contra diversas espécies de dípteros, como a larva do mosquito *Aedes aegypti*, o qual é o principal vetor da dengue. A dengue hoje é uma das doenças de maior preocupação para as agências de saúde brasileiras, uma vez que o Brasil possui temperatura e condições socio-econômicas que favorecem proliferação do mosquito transmissor. O Brasil se destaca por desenvolver combustíveis alternativos aos combustíveis de origem petrolífera, como etanol e biodiesel. Porém, durante a reação de transesterificação de óleos/gorduras para a produção de biodiesel é gerado também glicerina e, por não haver uma demanda deste sub-produto no mercado mundial, seu destino se tornou um problema e um desafio para as indústrias de biodiesel. Logo, desenvolver um bioinseticida para o combate da dengue empregando a glicerina como fonte de carbono é uma forma de encontrar novas aplicações para a glicerina e contribuir para o controle de uma doença de impacto nacional. Estudos realizados comprovaram que o ácido acético é um composto produzido e consumido pelas células de *Bacillus thuringiensis* durante seu crescimento. Além disso, apresenta papel fundamental para a produção de um composto chamado poli- β -hidroxibutirato (PHB), que é fundamental no fornecimento de energia para a síntese da toxina. No presente trabalho estudou-se o efeito do ácido acético sobre o crescimento de *Bacillus thuringiensis* e sobre a atividade larvicida do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti*. Foram avaliadas as concentrações de 1 g/L, 3 g/L e 5 g/L de ácido acético nas seguintes fases: (i) início da fermentação, (ii) ponto de valor mínimo de pH e (iii) ponto de desaceleração do aumento do pH. Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1000 mL em incubadora de movimento recíproco. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de ácido acético no início e no tempo igual a 10 horas de fermentação favorece o crescimento celular e a produção de toxinas. O resultado mais expressivo de produção de toxinas foi obtido com adição de 5 g/L de ácido no início da fermentação. Neste ensaio o resultado de porcentagem de morte de larvas foi 8 superior ao resultado encontrado no ensaio sem adição de ácido (ensaio controle). Já no ensaio com adição de ácido com 20 horas de fermentação foi observada a maior concentração celular máxima, porém, obteve-se uma menor atividade larvicida do meio fermentado, comparado com o ensaio controle.

Palavras-chave: Bioinseticidas. Glicerol. Ácido acético. *Bacillus thuringiensis*. Biodiesel

ABSTRACT

CHAGAS, M. H. R. **Effect of pH and acetic acid on bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis* using glycerol from biodiesel synthesis**. 2012. 74 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2012.

Bacillus thuringiensis is a gram-positive soil bacterium that is distinguished by the ability of synthesizing a protein crystal adjacent to the spore. This protein is responsible for the toxic action against several species of *Diptera*, as the larvae of the *Aedes aegypti* mosquito, which is the main vector of dengue. As Brazil possesses temperature and socioeconomic conditions that favors proliferation of the dengue transmitting mosquito, it is one of the major concerns to health agencies in Brazil. Brazil stands out for developing alternative fuel sources to petroleum fuels such as ethanol and biodiesel. However, during the transesterification reaction of oils/fats for the production of biodiesel glycerin is also generated. As there is no demand for this sub-product in the global market, its fate has become a problem and a challenge for the biodiesel industry. Therefore the development of an insecticide for fighting dengue using glycerol as the carbon source is a way to find new applications for glycerin and to contribute to the control of a disease with nationwide impact, considered a public health problem. Studies have shown that acetic acid is a compound produced and consumed by *Bacillus thuringiensis*' cells during their growth. Moreover, it presents a major role in the production of a compound called poly- β -hydroxybutyrate (PHB), which is critical for providing energy for the toxin synthesis. In the present study, it was studied the effect of acetic acid on the growth of *Bacillus thuringiensis* and on the larvicidal activity of the fermented broth on the larvae of *Aedes aegypti*. The concentrations tested were 1 g/L, 3 g/L and 5 g/L of acetic acid, added in the following stages: (i) beginning of the fermentation, (ii) time of minimum pH value and (iii) time of deceleration of the increasing pH value. The assays were performed in 1000 mL *Erlenmeyer* flasks in a reciprocating motion shaker. The results showed that the addition of acetic acid at the beginning and at 10 hours of fermentation improves cell growth and toxin production. The most significant result regarding toxin production was achieved with the addition of 5 g/L of acid at the beginning of the fermentation. In this assay the net percentage of killing of the larvae was eight times higher than the results found in the test without the addition of acid (control test). For the test in which acetic acid was added at 20 hours of fermentation it was observed a higher cellular concentration, however, there was a lower larvicidal activity of the fermented broth, compared to the control test.

Keywords: Bioinsecticides. Glycerol. Acetic acid. *Bacillus thuringiensis*. Biodiesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Vias metabólicas de carboidrato (glicólise, pentose fosfato, EMP, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo de ácido graxo e de PHB) na fase estacionária. As cores das enzimas indicam aumento (vermelho), diminuição (verde) e não alteração (preto) das suas concentrações, na transição da fase de crescimento para a estacionária (GONG et al., 2012).	19
Figura 2.2 - Diagrama integrado das vias metabólicas e produção de cristal proteico por <i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1520 na fase estacionária (GONG et al., 2012).	21
Figura 2.3 - Ação da toxina em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2011).	23
Figura 2.4 - Condições correlacionadas com a biossíntese de PHB (KOMINEK; HALVORSON, 1965).	28
Figura 2.5 - Ciclo do 2,3-butanediol por <i>Bacillus cereus</i> segundo Juni et al.(1956a apud BENOIT 1987)	29
Figura 2.6 - Via de síntese de PHB em <i>Bacillus cereus</i> (BENOIT, 1987).	30
Figura 2.7 - Utilização do acetato durante a esporulação de <i>Bacillus thuringiensis</i> (BENOIT, 1987)	30
Figura 2.8 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto.	31
Figura 5.1 - Concentração de células e glicerol e curva de pH, em função do tempo de fermentação, para diferentes valores de pH inicial.	44
Figura 5.2 – Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvícida obtido nos ensaios com diferentes valores de pH inicial.	46
Figura 5.3 - Curva característica para pH durante o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> utilizando glicerol como fonte de carbono.	47
Figura 5.4 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) no início da fermentação.	50
Figura 5.5 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) após 10 horas de fermentação.	53

Figura 5.6 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) após 20 horas de fermentação.56

Figura 5.7 - Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvicida obtido nos ensaios com adição de ácido acético nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 g/L no início da fermentação, após 10 e 20 horas.60

Figura 5.8 - Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvicida obtido nos ensaios com adição de ácido acético nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 g/L no início da fermentação e com adição de 5 g/L após 10 horas de fermentação.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição do meio GLYS baseado no meio GYS de Rogoff e Yousten (1969).37

Tabela 5.1 - Identificação dos ensaios com adição de diferentes concentrações.....48

Tabela 5.2 - Parâmetros cinéticos $Y_{x/s}$ e Q_x e valores de X_m para os ensaios com diferentes58

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Dengue	16
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	17
2.2.1	Características e metabolismo	17
2.2.2	Atividade entomopatogênica	21
2.3	Bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
2.4	Formulações de meio para o cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
2.5	Ácido acético	27
2.6	Biodiesel	31
2.7	Glicerol	32
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Microrganismo	36
4.2	Matéria-prima	36
4.3	Meios de cultivo	36
4.4	Condições de Cultivo	37
4.4.1	Preparo da cultura estoque	37
4.4.2	Preparo de inóculo	37
4.4.3	Ensaio de fermentações em frascos	38
4.5	Sequência Experimental	38
4.5.1	Avaliação do pH inicial	38
4.5.2	Obtenção da curva de pH característica	39
4.5.3	Avaliação da adição de ácido acético durante a fermentação	39
4.6	Métodos Analíticos	40
4.6.1	Concentração celular	40
4.6.2	Morfologia celular	41
4.6.3	Concentração de glicerol e ácido acético	41
4.6.4	Determinação da atividade larvicida dos meios	41
4.7	Forma de análise dos resultados	42

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Avaliação do pH inicial	43
5.2	Obtenção da curva de pH característica da fermentação.....	46
5.3	Avaliação da adição de ácido acético ao meio de fermentação	48
5.3.1	Adição de ácido acético no início da fermentação	49
5.3.2	Adição de ácido acético no tempo de valor mínimo de pH	52
5.3.3	Adição de ácido acético no tempo de desaceleração do aumento do pH	55
5.4	Avaliação da adição de ácido acético sobre a atividade larvícida do meio.....	59
6.	CONCLUSÃO	64
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

Em muitos países em desenvolvimento as doenças causadas por insetos vetores, como a dengue, a malária e a elefantíase, ainda são um sério problema de saúde pública. No caso da dengue, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países de todos os continentes, exceto Europa.

A Dengue é uma doença febril aguda, que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente: infecção inaparente, dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD) (BRASIL, 2005). Os primeiros relatos dessa doença no Brasil datam de 1916, em São Paulo, e 1923 no Rio. Em 2007, segundo Câmara et al. (2007), encontrava-se presente em todos os 27 estados da Federação, distribuída por 3.794 municípios. Hoje, de acordo com o Levantamento de Infestação do *Aedes aegypti* (LIRAA), 356 municípios têm alta incidência do mosquito, estando 91 deles em situação de risco de surto e 256, em alerta.

A proliferação da dengue, na qual o *Aedes aegypti* é a principal espécie responsável pela transmissão do vírus, depende de condições ecológicas e sócio-ambientais que facilitam a dispersão do vetor. Entretanto, o desenvolvimento de resistência de populações de insetos aos inseticidas químicos afeta positivamente a reemergência de doenças transmitidas por vetores.

No Brasil, o controle tem sido feito, principalmente, por pesticidas químicos. Porém, tais substâncias acarretam sérios problemas, incluindo poluição ambiental e prejuízo para a saúde humana. Além disso, esse tipo de controle tem sido ineficiente em conter o mosquito, o qual apresenta altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada (BRASIL, 2007), tornando o seu combate uma tarefa difícil (COSTA et al., 2010). Desse modo, se fazem necessários estudos que propiciem métodos alternativos para o seu controle.

Os chamados bioinseticidas são uma alternativa para os pesticidas químicos. No gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos-praga, como *Lepidoptera*, *Coleoptera* e *Diptera*, além de dípteros vetores de doenças humanas. *Bacillus thuringiensis* produz, durante sua esporulação, inclusões cristalinas, compostas por proteínas denominadas δ -

endotoxinas, as quais são tóxicas contra diferentes vetores (COSTA et al., 2010). As vantagens que os inseticidas obtidos da linhagem de *Bacillus thuringiensis* apresentam sobre os inseticidas químicos são diversas, como ausência do desenvolvimento de resistência pelos insetos, especificidade contra insetos-alvo, inocuidade aos animais e seres humanos e ausência de poluição ambiental (CAPALBO; MORAES, 1987).

Entretanto, o custo do cultivo de *Bacillus thuringiensis* por meio das tecnologias de fermentações já existentes é alto. Isso devido ao alto custo do meio de fermentação. Um meio de cultura de menor custo diminui, portanto, a relação custo/benefício da produção do bioinseticida (PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006). Alternativas para solucionar o problema do alto custo da fermentação com *Bacillus thuringiensis* têm sido avaliadas, dentre as quais se podem citar o uso de glicerol, um subproduto da produção do biodiesel, como fonte de carbono na composição do meio.

Devido à possibilidade de escassez das reservas de petróleo, aos preços flutuantes dos combustíveis fósseis e a poluição ambiental causada pelo emprego destes combustíveis, as fontes renováveis de energia assumem importante papel no mundo contemporâneo (CHI et al., 2007). O biodiesel é um substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser obtido de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e óleos utilizados para a fritura de alimentos (KUCEK et al., 2007).

A implantação do biodiesel na matriz energética brasileira como fonte alternativa de combustível foi uma consequência da busca por fontes de energia renováveis e que assegurem o desenvolvimento sustentável do país. De maneira geral, 10% do volume total do biodiesel produzido é constituído por glicerol, o qual é impuro e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007). No Brasil, o volume de glicerol produzido no ano de 2008 alcançou mais de 100 milhões de litros, em consequência da produção de 1,2 bilhões de litros de biodiesel, quantidade necessária para cumprir a legislação que estabelecia a obrigatoriedade de adição de 2% do biocombustível ao diesel comum (FREITAS; NACHILUK, 2009). Hoje, essa legislação exige a adição de 5%, o que leva a uma produção muito maior de glicerol.

A via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas é a utilizada por *Bacillus thuringiensis* para a degradação de glicose, produzindo principalmente piruvato e acetato. Parte do acetato formado durante o crescimento vegetativo de bacilos é convertida em grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB).

Algumas publicações têm discutido, então, a importância da produção e do consumo de ácido acético, uma vez que o PHB é produzido durante a transição para a fase

de esporulação e utilizado para a produção de energia neste processo. Logo, para uma eficiente esporulação e produção de toxina, uma quantidade mínima de PHB é requerida e o ácido acético é o principal precursor para a formação deste composto.

Assim, no presente trabalho, foi empregado glicerol proveniente da fabricação do biodiesel a partir de óleo de soja como fonte de carbono do meio de fermentação para a produção de bioinseticida com *B. thuringiensis* var. *israelensis* e foi avaliado o efeito do ácido acético quando adicionado em determinados tempos da fermentação, definidos em função do pH do meio. Avaliando-se a cinética de consumo de substrato e de crescimento da bactéria, assim como a toxicidade do meio contra larvas de *Aedes aegypti*, pretendeu-se determinar a melhor concentração de ácido acético e o melhor momento para sua adição, de forma a obter um meio fermentado com maior toxicidade, comparado com aquele sem adição do ácido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dengue

A gravidade das infecções causadas pelo vírus da dengue, bem como a força da sua reemergência em vários continentes, colocou essa doença como prioridade na agenda das instituições nacionais e internacionais responsáveis pela proteção à saúde das populações (MELO et al., 2010).

Segundo Tauil (2002), a campanha de saúde pública do Brasil se concentra no controle do mosquito *Aedes aegypti*, único vetor reconhecido como transmissor do vírus causador da doença em nosso meio. *Aedes aegypti* é um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos e se desenvolver.

A transmissão do vírus se faz pela picada do mosquito no ciclo ser humano-*Aedes aegypti*-ser humano, desde que o ser humano, inicialmente picado, já esteja infectado. Portanto, a progressão da dengue depende de condições ecológicas e sócio-ambientais que facilitam a dispersão do vetor. Esta é mais comum nos núcleos urbanos, onde é maior a quantidade de criadouros naturais ou resultantes da ação humana. Tem sido observado, também um padrão sazonal de incidência da doença coincidente com o verão, devido à maior ocorrência de chuvas e aumento da temperatura nessa estação. Além disso, é sabido que o ciclo reprodutivo de *Aedes aegypti* é sensível a variações de temperatura, o que diminui a incidência nos meses de temperaturas mais baixas (CÂMARA et al., 2007). Contudo, a doença pode ocorrer em qualquer localidade desde que exista população humana susceptível, presença do vetor e o vírus seja introduzido.

Os primeiros relatos no Brasil se deram em 1916 em São Paulo e em 1923 em Niterói-RJ, porém sem diagnóstico laboratorial. Nas décadas de 1950 e 1960, o Brasil, e mais 17 países das Américas, conseguiram eliminar o mosquito transmissor de seus territórios, utilizando a estratégia de uma campanha nacional, centralizada, verticalizada, com estruturação militar, onde a disciplina e a hierarquia foram características marcantes (TAUIL, 2002). Em 1976 foi registrada uma infestação que não pode ser eliminada. Em 1981-1982 ocorreu a primeira grande epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, em Boa Vista-RR. A partir daí o mosquito re-infestou o país, e desde então a dengue vem

ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes (BRASIL, 2005).

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde, em 2011, 155.613 casos foram notificados e 51 mortes por dengue foram registradas. A região Norte foi a que apresentou uma pior situação, concentrando cerca de 31,6% de todos os casos - 49 mil notificações. Amazonas e Acre, com 19.951 e 17.626 notificações, respectivamente, foram os estados em que a doença fez mais vítimas. A segunda região com mais casos suspeitos foi o Sudeste, com 42 mil notificações. Na sequência aparecem o Nordeste, com 28 mil, Centro-oeste com 19 mil e o Sul com 16 mil casos (DENGUE, 2011).

Segundo levantamento feito pelo Ministério da Saúde (NÚMERO, 2012), nos primeiros 63 dias do ano de 2012, o Brasil teve redução de 61% nos casos de dengue, em comparação com a mesma época de 2011. Entre 1º de janeiro e 3 de março, foram registrados 76.906 casos da doença no País, contra 195.894 no mesmo período do ano passado. Os casos graves reduziram, assim como os casos de óbitos, em 96%, quando comparado com a mesma época de 2011. Naquele ano, foram registrados 147 óbitos, contra seis em 2012. Porém, de acordo com o Levantamento de Infestação do *Aedes aegypti* (LIRAA), 356 municípios têm alta incidência do mosquito, sendo 91 em situação de risco de surto e 265 em alerta.

Um dos motivos para a frequente reemergência de doenças transmitidas por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal para garantir a proteção da população humana, é o desenvolvimento de resistência de populações de insetos aos inseticidas químicos. Sendo assim, o controle da transmissão do vírus da dengue requer, além do esforço conjunto de toda a sociedade no combate ao vetor, novos estudos que propiciem métodos alternativos para o seu controle (COSTA, 2010).

2.2 *Bacillus thuringiensis*

2.2.1 Características e metabolismo

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo, gram-positiva, em forma de bastonete, formadora de esporos, anaeróbia facultativa, que se destaca pela capacidade de sintetizar um cristal proteico adjacente ao esporo durante a sua esporulação e (STAHLY; ANDREWS; YOUSTEN, 1991). Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1915 por Berliner, quando este a isolou da lagarta *Anagasta kuehniella*, e a nomeou em homenagem a província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (POLANCZYK, 2004).

A atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* é atribuída aos cristais paraesporais que produz, e, devido à estrutura cristalina destes, eles são chamados de proteínas cristalinas e classificam-se como Cry e Cyt ou δ -endotoxina, e apresentam um amplo espectro seletivo de atividade tóxica para uma série de insetos (JAMES, 2009). São esses cristais que fazem com que, apesar da grande similaridade genética, o *Bacillus thuringiensis* se diferencie em relação a duas outras espécies de *Bacillus* patogênicos para humanos, *B. cereus* e *B. anthracis* (ARONSON; SHAI, 2001)

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

A bactéria metaboliza diferentes carboidratos como fonte de carbono, como, por exemplo, glicose, frutose, galactose, maltose (STAHLY et al., 1991; (SACHIDANANDHAM et al., 1997) e glicerol (BARBOSA, 2009), entre outros. Na maior parte dos trabalhos já realizados com a bactéria, glicose foi empregada como única fonte de carbono e energia, ou associada a outras matérias-primas complexas (AVIGNONE-ROSSA; MIGNONE, 1993). De acordo com Arnaud e Guiraud (1985) os bacilos têm a capacidade de assimilar glicerol, o qual entra na via glicolítica na forma de diidroxiketona-fosfato. O metabolismo da glicose pelo *Bacillus* é feito pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), produzindo principalmente piruvato (Figura 2.1), mas uma pequena parcela do carboidrato é direcionada para a produção de energia pela via das pentoses-fosfato (LUTHY; CORIER; FISCHER, 1982; NICKERSON; JULIAN; BULLA,

1974). Acetato é formado durante o crescimento vegetativo, sendo utilizado para a produção de 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).

Figura 2.1 - Vias metabólicas de carboidrato (glicólise, pentose fosfato, EMP, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo de ácido graxo e de PHB) na fase estacionária. As cores das enzimas indicam aumento (vermelho), diminuição (verde) e não alteração (preto) das suas concentrações, na transição da fase de crescimento para a estacionária (GONG et al., 2012).

Gong et al. (2012) estudaram as principais proteínas envolvidas no metabolismo de *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 em diferentes fase do crescimento da bactéria e sugeriram um metabolismo integrado para a mesma (Figura 2.1). De acordo com os autores, a glicose é intensamente consumida, por meio da via glicolítica, na fase de crescimento vegetativo. Porém, no início da fase estacionária foi evidenciada baixa quantidade da enzima fosfofrutoquinase (PfkA), enzima chave da via. Por outro lado a enzima transaldolase (Tal) teve sua concentração duplicada, indicando que a glicose, na fase estacionária, é metabolizada pela via das pentoses fosfato. Por essa via, gliceraldeído-3-fosfato (GADP) é

formado, o qual provavelmente volta para a glicólise formando 1,3-bifosfoglicerato (1,3 BPG), que é utilizado para sintetizar serina. Isso se baseia no fato de que as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GapA) e D-3-fosfoglicerato desidrogenase (SerA) estão presentes em alta concentração e a piruvato quinase (PykA) está severamente reprimida.

O ciclo de Krebs é uma importante via oxidativa utilizada para obtenção de energia pelo metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Durante a fase estacionária foi observado que as principais enzimas envolvidas nessa via (CitZ, AcnA, CitC, SucA e SucB) foram inibidas, indicando que nessa fase de crescimento a bactéria necessita de uma via alternativa para obter energia. Ácidos graxos são elementos fundamentais para a formação dos lipídeos bacterianos. Observou-se que, do crescimento vegetativo até a fase estacionária, esses são sintetizados, enquanto que na fase estacionária enzimas responsáveis pela degradação destes estão presentes em altas concentrações. Outro composto produzido na fase estacionária é o PHB, que é sintetizado por duas vias de metabolismo distintas, porém ambas partindo de acetil-CoA (GONG et al., 2012).

Chen et al. (2012) estudaram a composição de proteínas de mutantes de *Bacillus thuringiensis* que tiveram a síntese de PHB danificada devido a deleção dos genes responsáveis pela síntese da enzima PhaC (hidroxibutiril-CoA), responsável pela polimerização do PHB. De acordo com esse estudo, as cepas deficientes na produção de PHB apresentaram crescimento tardio, menor rendimento celular (acompanhado de alto consumo de oxigênio), produção excessiva de ácidos orgânicos, maior decaimento da densidade celular na fase estacionária (sugerindo maior morte celular e decomposição), e esporulação deficiente. Logo, o trabalho em questão concluiu que a síntese de PHB apresenta papel importante na regulação do metabolismo, uma vez que as células passam a utilizar de modo ineficiente as fontes de carbono e apresentam maior vulnerabilidade às condições ambientais.

Segundo Gong et al. (2012), a eficiente síntese de cristais proteicos depende da disponibilidade de aminoácidos precursores, ribossomo e fonte de energia.

Os aminoácidos podem ser obtidos por biossíntese, reciclo de proteínas ou, ainda, podem estar presentes no meio de cultura, no entanto a primeira e a última possibilidades não garantem quantidade de aminoácidos suficiente. Portanto, a degradação de proteínas é a forma mais importante de obtenção de aminoácido para a síntese dos cristais. A síntese de proteína requer um alto fornecimento de energia para garantir uma correta transferência de informação do DNA. As principais vias geradoras de energia são a glicolítica, ciclo de

Krebs e a oxidação de ácidos graxos. Porém, conforme relatado no estudo, essas vias, na fase estacionária, têm várias enzimas chave suprimidas, não sendo capazes de fornecer energia necessária para a síntese de proteínas. Logo, a energia requerida é fornecida pela via de degradação de PHB a acetil-CoA (Figura 2.2).

A faixa de temperatura para crescimento de diversas linhagens de *Bacillus thuringiensis* é, segundo Bernhard e Utz (1993), de 15 a 30 °C, sendo consideradas ideais para o cultivo, temperaturas de 26 a 30 °C. 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 de 5,5 a 8,5 (ROWE; MARGARITIS, 1987; BERNHAD; UTZ, 1993) e valores abaixo de 5,0 podem impedir a esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* (MURRELL, 1967).

Figura 2.2 - Diagrama integrado das vias metabólicas e produção de cristal proteico por *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 na fase estacionária (GONG et al., 2012).

2.2.2 Atividade entomopatogênica

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).

As proteínas que constituem o cristal apresentam massas moleculares que variam de 60 a 160 kDa. Elas são constituídas de duas partes distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e associada à toxicidade, e uma porção carboxiterminal, geralmente associada 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).

De acordo com Margalith e Ben-Dov¹ (2000 apud BRAVO et al., 2011), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* produz quatro endotoxinas denominadas Cry4A (125 kDa), Cry4B (134 kDa), Cry11A (67 kDa) e Cyt1A (27 kDa). Uma característica interessante dessas toxinas é a ação sinérgica entre elas. Segundo alguns autores (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005) a atividade tóxica delas é muito maior quando em conjunto do que quando isoladas. Sendo assim, todas estas toxinas atuando sinergicamente reduzem a probabilidade do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos-alvos (BECKER, 2000; BRAVO et al., 2011)

A ação da toxina acontece quando uma larva do inseto susceptível ingere cristais da proteína produzida, juntamente com esporos de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que estes podem ser encontrados em diversos ambientes como solo, raízes de plantas, água, partículas de poeira e insetos mortos (BIZZARRI; BISHOP, 2008; BALARAMAN, 2005). Esses cristais, após solubilização, resultam peptídeos que formam poros na membrana do epitélio intestinal e desestabilizam os gradientes osmótico e iônico da larva. A maioria das pró-toxinas conhecidas precisa ser hidrolisada por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos, esses 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

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

interrompido, ocorre uma redução do pH do fluido intestinal, conjuntamente com uma liberação de nutrientes, o que cria condições para a germinação de esporos de *B. thuringiensis* e para a multiplicação de suas células vegetativas (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Ação da toxina em lagartas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2011).

A bactéria invade os tecidos larvais, e então a larva interrompe sua alimentação e morre. Devido ao processo infeccioso, o inseto se torna mais suscetível a invasões microbianas secundárias que podem acelerar a sua morte. O ciclo infeccioso é concluído quando o cadáver é consumido e a bactéria garante a sua perpetuação no ambiente na forma de esporo (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; ARONSON; SHAI, 2001).

2.3 Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*

No Brasil, e em países em desenvolvimento, as condições sócio-ambientais favorecem o desenvolvimento de vetores de doenças, como *Aedes aegypti* (vetor da dengue), e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no combate a esses vetores não são mais eficientes (BRASIL, 2007). Os inseticidas químicos ainda são os mais utilizados nesses países (NÚMERO, 2012), mesmo com as diversas desvantagens advindas de seu emprego, que incluem a toxicidade aos animais (KARALLIEDDE, 1999; BROWN et al., 2000), a resistência fisiológica dos vetores (BROOKE; HUNT;

COETZEE, 2000) e os impactos ambientais negativos causados, como a contaminação de alimentos e o efeito prejudicial sobre insetos que possuem um papel benéfico para o homem (BROWN et al., 2000). Sendo assim, inseticidas produzidos por microrganismos têm sido propostos como substitutos dos pesticidas químicos.

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

A OMS (Organização Mundial de Saúde), juntamente com outros organismos internacionais e numerosos laboratórios de pesquisa, desenvolveram, a partir de 1980, programas de utilização de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra insetos vetores (MALDONADO-BLANCO et al., 2003; PETRY et al., 2004). Um exemplo de sucesso desse programa aconteceu na África, onde aplicações de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* compreenderam 50% do total de inseticidas usados no controle de oncocercose (FEDERICI et al., 2005; ROH et al., 2007). Outro exemplo de utilização de bioinseticida é o emprego de *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 para o controle de *Lepidopteras* no sul da China (GONG et al., 2012).

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

As proteínas produzidas pela bactéria distinguem-se de todas as toxinas das demais variedades já isoladas, apresentando os melhores resultados no combate às larvas de dípteros de importância sanitária, especialmente culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, insetos vetores de doenças como a dengue, a elefantíase, e a malária, respectivamente, e simuliídeos do gênero *Simulium*, transmissores de vírus, protozoários e filárias (GILL; COWLES; PIENSTRANTONIO, 1992; RUAS NETO; OLIVEIRA, 1985; ARONSON; SHAI, 2001).

De acordo com Lacey; Kaya; Vail (2001), o aprimoramento das linhagens já descobertas, dos processos de produção e a formulação dos meios de cultivo são

indispensáveis para o desenvolvimento futuro do mercado de inseticidas com *Bacillus thuringiensis*. Embora o custo final de formulações com esse microrganismo ainda seja mais elevado que o dos inseticidas químicos (VIMALA DEVI et al., 2005), aspectos relacionados à segurança e ao meio ambiente favorecem o contínuo aumento da utilização destes produtos no controle de pragas e vetores. Segundo Whalon et al. (2003), a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD) estima que até 2020 ocorrerá um crescimento de até 20% do mercado de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, que hoje constitui cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas comerciais.

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

A composição do meio de cultivo é um dos fatores mais importantes para a otimização do processo fermentativo de produção de biomassa com *Bacillus thuringiensis*. De acordo com Bernhard e Utz (1993), os meios para crescimento de *Bacillus* devem conter em sua composição uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de δ -endotoxinas.

Segundo Prabakaran e Balaraman (2006) a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em larga escala ainda é um processo caro devido ao alto custo do meio de fermentação. Sendo assim, várias matérias-primas de baixo custo têm sido avaliadas como fontes alternativas de nutrientes para o processo fermentativo com a referida bactéria, dentre as quais podem ser 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 et al., 2001), soro de queijo (ABDELLHAMEED; 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), farinha de peixe (SALAMA, 1983), farinha desengordurada de semente de algodão, linho e amendoim (VORA; SHETHNA, 1999), água de coco (PRABAKARAN; HOTI, 2008b) e glicerol (BARBOSA,

2009; ROSSI, 2012). Segundo Özkan et al. (2003), que avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento, a taxa de esporulação e a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a quantidade de toxinas produzidas ao se utilizar o glicerol como fonte de carbono foi similar àquela obtida quando se utilizaram os açúcares maltose e inulina. Por outro lado, houve maior produção de toxinas com glicerol que com glicose, sacarose, melão e amido, e menor produção com dextrina, lactose e soro de leite.

As fontes de nitrogênio mais utilizadas em meios para a fermentação com *Bacillus thuringiensis* são o extrato de levedura (SIKDAR; MAJUMBAR; MAJUMDAR, 1991; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003; GHRIBI et al., 2007) e a peptona (IÇGEN, et al., 2002; PRABAKARAN; HOTI, 2008a; PRABAKARAN; HOTI, 2008b), sendo que o extrato de levedura é considerado uma fonte adequada de nutrientes para o processo, independente da variedade da bactéria (SAKSINCHAI et al., 2001; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003; PESSANHA, 2008). Porém, o emprego dessa fonte de carbono em processos industriais de fermentação é limitado devido ao seu alto custo.

Além de uma fonte de nitrogênio orgânico, alguns autores relatam em seus trabalhos que é essencial a presença de uma fonte de nitrogênio inorgânico para o desenvolvimento deste processo fermentativo (SAKSINCHAI et al., 2001; ANDERSON; JAYARAMAN, 2003; GHRIBI et al., 2007). O sal sulfato de amônio é utilizado na composição da maioria dos meios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (SIKDAR; MAJUMBAR; MAJUMDAR, 1991; MIGNONE; AVIGNONE-ROSSA, 1996; GHRIBI et al., 2007). Entretanto, Ozkan et al. (2003) obtiveram maior rendimento na produção das endotoxinas quando utilizaram o sal $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio. Segundo Barbosa (2009), embora favoreça a esporulação, o sulfato de amônio não influencia a síntese de toxinas, não sendo necessário adicioná-lo ao meio, quando se emprega glicerol proveniente da fabricação de biodiesel como substrato.

São também necessários íons metálicos para o crescimento do microrganismo tais como cálcio, zinco, manganês e magnésio. O balanço adequado dos sais minerais auxilia no equilíbrio do pH do caldo de fermentação, e muitos íons são cofatores de enzimas que catalisam as reações do processo de fermentação (DULMAGE et al., 1970). Segundo Bernhard e Utz (1993), quando substratos complexos são utilizados para a síntese do cristal proteico é necessário um balanço cuidadoso dos íons no meio. Yao et al. (2002) destacam a importância da concentração de Mn^{2+} para o metabolismo e crescimento de *Bacillus thuringiensis*. Concentrações deste íon entre 0,8-1,6 mg/mL promovem o crescimento de

Bacillus thuringiensis, sendo que concentrações abaixo de 0,8 mg/mL inibem o crescimento da bactéria. A influência de Cu^{2+} foi observada por Yao et al. (2003). Em concentrações até 30 $\mu\text{g/mL}$ este favorece o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, mas quando essa concentração é elevada para valores de 40 a 120 $\mu\text{g/mL}$ o crescimento da bactéria pode ser inibido, e valores acima de 130 $\mu\text{g/mL}$ prejudicam significativamente o crescimento. O Mn^{2+} foi o elemento mais crítico para a produção das toxinas e não deve estar em concentrações inferiores a 10^{-6} M no meio. Os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} favoreceram a produção quando em concentrações de 8 mM e 0,55 mM, respectivamente, enquanto que Fe^{2+} e Zn^{2+} influenciaram negativamente a biossíntese. 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, porém, valores acima dessa concentração não exercem influencia. Metais pesados como Hg, Cr, Cd e Co foram testados em meios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* por Hassen et al. (1998). Os autores mostraram que o uso de Hg, Cr, Cd, em concentrações de 0,2, 0,5 e 1 mM, respectivamente, não afetou a biossíntese de toxina pela bactéria, mas o uso de Co a uma concentração de 0,1 mM levou a uma inibição significativa da síntese da proteína tóxica.

2.5 Ácido acético

Algumas publicações têm discutido a importância da produção e do consumo de ácido acético no processo de esporulação de bactérias (MIGNONE; AVIGNONE-ROSA, 1996). Sabe-se que há uma estreita relação temporal entre a síntese do cristal e a esporulação de *Bacillus thuringiensis*: ambas ocorrem após a fase exponencial de crescimento ter cessado (YOUSTEN; ROGOFF, 1969).

Durante o crescimento vegetativo, *Bacillus thuringiensis* produz e excreta para o meio piruvato e acetato, provenientes da fermentação de carboidratos (CHEN et al., 2012). Ao final do crescimento vegetativo, se inicia a síntese de poli- β -hidroxibutirato (PHB), o qual serve como reserva intracelular de carbono e energia para esporulação em muitas espécies de *Bacillus* (GONG et al., 2012). Segundo alguns autores, um nível mínimo de PHB é requerido nas células no começo da esporulação para eficiência desta e da produção de endotoxina, sob condições de crescimento limitado pela fonte de carbono (LIU et al., 1994; STARZAK; BAJPAI, 1991). Liu e Tzeng (1998) sugeriram que acetato e PHB em

altas concentrações estimulam a produção de δ -endotoxina e Rowe e Margaritis (1987) propuseram que PHB é necessário como fonte de energia para a síntese da toxina em questão.

Nakata² (1966 apud HICKERSON, 1984), usando *Bacillus cereus* em meio quimicamente definido contendo acetato-2-C¹⁴, demonstrou a incorporação deste na molécula de PHB. Seguindo a degradação do PHB, o autor verificou que de 20 a 25% da radioatividade foi perdida na forma de CO₂ e a porção maior foi incorporada no endoesporo, mais que 50% como proteína e 17% como ácido dipicolínico.

Conforme mencionado por Benoit (1987) *Bacillus cereus* apresenta um metabolismo muito semelhante a *Bacillus thuringiensis*. Kominek e Halvorson (1965) descreveram os fenômenos que se correlacionam com a síntese de PHB em *Bacillus cereus*, as quais estão mostradas na Figura 2.4. Os autores observaram uma queda do pH durante crescimento vegetativo, em meio com glicose. A causa para essa mudança de pH se deve ao acúmulo dos ácidos acético e pirúvico, conforme relatado por Nakata e Halvorson³ (1960 apud HICKERSON, 1984). Quando um valor mínimo de pH é atingido, a síntese de PHB se inicia e se prolonga por algumas horas, até atingir uma concentração máxima juntamente com o início da esporulação.

Figura 2.4 - Condições correlacionadas com a biossíntese de PHB (KOMINEK; HALVORSON, 1965).

² NAKATA, H. M., 1966. Role in acetate sporogenesis of *Bacillus cereus*. **J Bacteriol.**, v.90, p.1251-1259.

³ NAKATA, H. M; HALVORSON, H. 1960. Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. **J. Bacteriol.**, v.80, p.801-810.

O ácido acético é utilizado como fonte de carbono no primeiro estágio da biossíntese de PHB e a acetoina, proveniente do ácido pirúvico, serve como fonte de carbono para o segundo estágio da síntese, via ciclo do 2,3-butanodiol (KOMINEK; HALVORSON, 1965). A utilização desses ácidos faz com que o pH aumente novamente para valores perto da neutralidade. Para cada volta do ciclo do 2,3-butanodiol, duas moléculas de acetoina são produzidas, regenerando uma molécula de acetoina e cedendo duas moléculas de acetato (Figura 2.5). O acetato é usado para a síntese de PHB, conforme mostrado na Figura 2.6, ou pode ser oxidado a CO_2 via ciclo do ácido tricarboxílico. Finalmente, durante a esporulação, PHB é metabolizado a acetato, o qual serve como fonte de carbono e energia para produção dos compostos necessários para a esporulação, conforme mostrado na Figura 2.7. O acetato é utilizado via ciclo do glioxilato em *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* (BENOIT, 1987).

Figura 2.5 - Ciclo do 2,3-butanodiol por *Bacillus cereus* segundo Juni⁴ et al.(1956a apud BENOIT 1987)

⁴ JUNI, E.; HEYM, G. A. 1956. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetyl-methylcarbinol and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. **J. Bacteriol.**, v.70, p.425-432.

2.6 Biodiesel

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

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

O biodiesel desponta como uma das tecnologias verdes mais promissoras e com mais investimentos nos últimos anos. Ele constitui um combustível alternativo que pode ser obtido pela reação de transesterificação de óleos vegetais como soja e palma, e de gorduras animais como sebo bovino, suíno e de aves, com metanol ou etanol (MAA; HANNA, 1999; MARCHETTI; ERRAZU, 2008), na presença de um catalisador, com a formação de um único subproduto da reação, o glicerol, conforme mostrado na Figura 2.8 (APOSTOLAKOU et al., 2009).

Figura 2.8 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, formando glicerol como subproduto.

Como o biodiesel é obtido a partir de fontes renováveis, ele apresenta vantagens como o fato de ser biodegradável, não tóxico e seguro de manusear, além de produzir menos monóxido de carbono e emissões de dióxido de enxofre, proporcionando uma redução de cerca de 70% no ciclo de emissões de dióxido de carbono, comparado ao óleo diesel convencional (BOURNAY et al., 2005).

A atual produção mundial de biodiesel, empregando-se diferentes matérias-primas, é de cerca de 6 milhões de litros por ano, representando 10% de todo o biocombustível produzido. Essa produção mundial distribui-se da seguinte forma: 48% na Alemanha, 30% nos outros países europeus, 15% nos Estados Unidos e o restante dividido entre outros países como Brasil, China, Índia, Canadá, Colômbia e Malásia, sendo a maioria produzida a partir de óleos de sementes (NOGUEIRA, 2011).

No Brasil, de acordo com a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, criada pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que começou a vigorar em 1º de janeiro de 2008, o óleo diesel comercializado em todo o país deveria conter, nesse mesmo ano, obrigatoriamente, 2% de biodiesel (B2). Atualmente essa porcentagem é de 5%, porém, segundo o anúncio feito na Folha.com no dia 16/02/2011 pelo diretor da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, o Brasil pretende aumentar, ainda em 2012, a mistura obrigatória do biodiesel ao diesel convencional para 7%.

2.7 Glicerol

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

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

(MORRISON, 1994; NAE, 2010). O glicerol é um importante agente crioprotetor, uma vez que impede a formação de cristais de gelo em meio aquoso e o consequente rompimento de células, mantendo a viabilidade destes durante os processos de congelamento (TSURUTA; ISHIMOTO; MASUOKA, 1998). Outras aplicações incluem o emprego como lubrificante de máquinas processadoras de alimentos, na fabricação de dinamite, no processamento de tabaco e como lubrificante na indústria têxtil (MORRISON, 1994; BRISSON et al., 2001; NAE, 2010).

A produção de glicerol por fermentação predominou até que a síntese química, a partir do propileno, foi estabelecida em 1950. Entretanto, em 2005, 90% da produção global do glicerol foi proveniente de glicerídeos naturais, obtido como subproduto da reação de saponificação de óleos e gorduras, da reação de transesterificação para produção de biodiesel e da reação para produção de ácidos graxos (APPLEBY, 2006). Em geral, para cada 100 kg de biodiesel produzidos obtém-se 10 kg de glicerina, a qual é impura e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007).

Levando em conta que o Brasil, ao longo de 2008, produziu cerca de 1,16 bilhões de litros de biodiesel para atender o mercado interno, a oferta de glicerina chegou a 146 mil toneladas. De acordo com um levantamento da Associação Brasileira da Indústria Química (Abiquim), a capacidade de produção das indústrias químicas é de 35,8 mil toneladas de glicerol ao ano, para um consumo anual de 13,5 mil toneladas (OS MERCADOS, 2009).

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

Não há legislação específica no Brasil para o descarte da glicerina, somente para efluentes industriais em geral. As duas formas de descarte possíveis são o despejo nos rios e a queima, mas, de modo geral, essas duas formas de descarte geram problemas ambientais, uma vez que o resíduo apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a sua queima libera compostos cancerígenos como a cloreína (BATISTA, 2008). Algumas indústrias a queimam para produzir energia e, em locais com alta concentração de usinas de biodiesel, algumas empresas estocam o material, sem dar um destino específico para este (BATISTA, 2008; OS MERCADOS, 2009).

Torna-se necessário, então, converter o glicerol em produtos de alto valor econômico para que o biodiesel se torne competitivo no mercado de biocombustíveis e também para que não haja impactos ambientais negativos devido ao seu acúmulo

(YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Várias estratégias baseadas em transformações químicas e biológicas têm sido propostas para converter o glicerol em produtos de valor econômico. O glicerol oriundo da fabricação do biodiesel apresenta-se como um substrato promissor para aplicação em processos biotecnológicos, destacando-se a produção de 1,3-propanodiol (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003; MU et al., 2006; PAPANIKOLAOU et al., 2008; REHMAN et al., 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002; PAPANIKOLAOU et al., 2008), etanol e hidrogênio (ITO et al., 2005). Também foi comprovada sua influência como substrato para processo fermentativo no cultivo de *Bacillus thuringiensis* para a produção de bioinseticida, não exercendo influência negativa independente de ser proveniente da produção de biodiesel de sebo bovino (BARBOSA, 2009) ou de óleo de soja (ROSSI, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do ácido acético sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, em meio preparado com glicerol proveniente da fabricação de biodiesel de óleo de soja, visando obter um meio com atividade larvicida superior a encontrada quando não se adiciona o referido ácido.

3.2 Específicos

- Avaliar a influência do pH inicial de fermentação sobre o crescimento, consumo de substrato e atividade larvicida do meio fermentado, em ensaios realizados em frascos agitados;
- Avaliar o efeito da adição de ácido acético ao meio em diferentes tempos do processo fermentativo, quais sejam, início do cultivo (pH inicial), valor mínimo de pH e desaceleração do aumento do pH, em ensaios realizados em frascos agitados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (sorotipo H-14) IPS 82, obtida no Instituto Pasteur de Paris, foi utilizada em todos os experimentos.

4.2 Matéria-prima

Neste trabalho foi empregada como substrato a glicerina fornecida pela indústria BIOVERDE – Indústria e Comércio de Biocombustíveis – Ltda – Taubaté – SP, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja. A glicerina foi tratada de acordo com o procedimento definido por Rossi (2012), que envolve acidificação com H_3PO_4 (80%) até pH igual a 4 e posterior decantação por um período de 24 horas.

4.3 Meios de cultivo

O meio denominado GLYS, cuja composição está apresentada na Tabela 4.1, foi utilizado para o preparo de inóculo e para preparo dos meios utilizados nos ensaios de fermentação (neste caso, com concentração de 20 g/L de glicerol). Este meio foi formulado com base no meio GYS (YOUSTEN; ROGOFF, 1969) substituindo-se glicose por glicerol.

Para o preparo do meio GLYS, os componentes glicerol, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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 °C por 20 minutos. Para os demais sais foram utilizadas alíquotas de soluções concentradas destes, conforme apresentado na Tabela 4.1. Após a mistura das soluções e

do glicerol, o pH foi ajustado, pela adição de hidróxido de potássio ou ácido clorídrico, para valores específicos, de acordo com a fermentação a ser realizada.

Tabela 4.1 - Composição do meio GLYS, baseado no meio GYS de Rogoff; Yousten (1969).

Componente	Concentração no meio de fermentação (g/L)	Concentração da solução original (g/L)
Glicerol	10,0	-
Extrato de levedura	12,0	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0	333,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,12	100,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	90,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,09	10,0
K ₂ HPO ₄	1,5	150,0
KH ₂ PO ₄	1,5	150,0
pH = 6,5		

4.4 Condições de Cultivo

4.4.1 Preparo da cultura estoque

As culturas estoque foram obtidas por semeadura (estria simples) em superfície de Agar inclinado em tubos de ensaio, que foram incubados a 30 °C por 72 h, tempo suficiente para garantir a total esporulação das células. Os tubos foram armazenados a 4 °C. O meio nutriente empregado foi composto por: extrato de carne (3,0 g/L), peptona de carne (5 g/L) e Agar-agar (18 g/L).

4.4.2 Preparo de 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 CIENTÍFICA SL 222), a 30 °C, sob agitação de 96 rpm, por um tempo de 10 horas.

4.4.3 Ensaios de fermentações em frascos

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL, contendo 200 mL de meio, cobertos com fina manta de algodão e gaze presa com elástico. Os frascos foram inoculados com o *pellet* resultante da centrifugação de 10 mL do inóculo, o qual foi ressuspensão no próprio meio de fermentação. Os frascos foram colocados em incubadora/agitadora de movimento recíproco (SOLAB CIENTÍFICA SL 222) a 30 °C e 96 rpm. O final da fermentação correspondeu ao tempo de total dissociação dos grumos de células e esporos formados durante a esporulação, comportamento característico da bactéria. Este fenômeno foi monitorado por observações periódicas de lâminas à fresco de amostras do meio, em microscópio óptico com objetiva de contraste de fase (Medilux/modelo MDL -150).

4.5 Sequência Experimental

4.5.1 Avaliação do pH inicial

As fermentações foram realizadas em diferentes valores de pH, com base no relatado por Bernhard; Utz (1993), quais sejam: 6; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0. A influência de cada um dos valores foi analisada em função dos parâmetros crescimento do microrganismo, consumo de substrato e atividade larvívora do meio fermentado. Estes ensaios foram realizados em frascos, conforme descrito no item 4.4.3. O pH que forneceu o melhor resultado foi usado para a realização das próximas etapas.

4.5.2 Obtenção da curva de pH característica

Para a obtenção da curva de pH foi realizada uma fermentação em frasco, conforme descrito no item 4.4.3. Amostras foram retiradas de hora em hora e o pH foi então medido. Em seguida, os dados foram registrados em gráfico utilizando-se o programa OriginPro 8.

4.5.3 Avaliação da adição de ácido acético durante a fermentação

Estes ensaios foram realizados em frascos, conforme descrito no item 4.4.3. As fermentações foram realizadas em meios com o valor de pH inicial igual ao determinado pelo procedimento descrito no item 4.5.1. Durante a realização destas, ácido acético foi adicionado em diferentes concentrações e em três tempos específicos da curva de pH característica do processo, a qual foi determinada conforme descrito no item 4.5.2. Estes tempos foram:

4.5.3.1 Início da fermentação: três diferentes concentrações de ácido acético, no caso, 1,0; 3,0 e 5,0 g/L, foram testadas, sendo o ácido adicionado no início da fermentação. Após adição do ácido, o pH do meio foi ajustado para o valor estabelecido como sendo o melhor para início da fermentação, determinado conforme descrito no item 4.5.1. O ajuste do pH foi feito com solução de KOH 5M.

4.5.3.2 Tempo de valor mínimo de pH: nas mesmas três diferentes concentrações, o ácido acético foi adicionado no tempo no qual o pH do meio atingiu o seu valor mínimo, tempo esse estipulado com base na curva de pH característica da fermentação, obtida conforme descrito no item 4.5.2. Após a adição do ácido, o pH foi ajustado para o mesmo valor medido antes da adição. O ajuste foi feito com solução de KOH 5M.

4.5.3.3 Tempo de desaceleração do aumento do pH: o ácido acético, nas mesmas três diferentes concentrações, foi adicionado ao meio no tempo correspondente à desaceleração do aumento do pH, ou seja, quando este começou a se estabilizar. Esse tempo foi estabelecido com base na curva de pH característica da fermentação, obtida conforme descrito no item 4.5.2. Após a adição do ácido, o pH foi ajustado para o mesmo valor medido antes da adição. O ajuste foi feito com solução de KOH 5M.

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 observou a formação de grumos ou inclusões no interior das células, a biomassa foi quantificada indiretamente por turbidimetria. A partir do momento em que se observou o início da formação de grumos no meio, a concentração celular foi determinada por medidas de massa seca.

As amostras de meio fermentado foram centrifugadas (CENTRIBIO/Modelo TDL80-2B) a 4000 rpm por 30 minutos e ressuspendidas em solução salina (0,9%). Para a análise por turbidimetria, esta lavagem foi realizada duas vezes. Para a análise de massa seca, a primeira lavagem foi realizada com solução salina e a segunda foi feita com água.

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 até que a pesagem das massas fosse 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 de cada fermentação foram acompanhadas por observação de preparações à fresco do meio fermentado em microscópio ótico com objetiva de contraste de fase (Medilux, A150-BP), com aumento de 400x.

4.6.3 Concentração de glicerol e ácido acético

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

4.6.4 Determinação da atividade larvícida dos meios

A atividade larvícida 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 de *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 (1,0 mL), até que se observasse diferença entre as porcentagens de morte das larvas para os diferentes ensaios realizados, possibilitando a comparação entre estes.

4.7 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados pelas cinéticas de crescimento celular e de consumo de substrato e pela atividade larvica do meio fermentado contra larvas de *Aedes aegypti*. Além disso, foram avaliados os parâmetros fermentativos concentração celular máxima, fator de conversão de substrato em células e produtividade volumétrica em células, conforme as equações 1 e 2:

- *Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$)*

$$Y_{x/s} = (X_m - X_i) / (S_i - S_f) \quad \text{equação 1}$$

onde: $Y_{x/s}$ = fator de conversão de glicerol em células (g_{cél}/g_{subst});

X_m = concentração celular máxima (g/L);

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

S_f = concentração final de glicerol no tempo correspondente ao X_m (g/L);

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

- *Produtividade volumétrica em células (Q_x)*

$$Q_x = (X_m - X_i) / \Delta t \quad \text{equação 2}$$

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

X_m = concentração celular máxima (g/L);

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

Δt = intervalo de tempo correspondente ao valor de X_m (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do pH inicial

Sabe-se, segundo Bernhard; Utz (1993) e Rowe; Margaritis (1987), que a faixa de pH na qual o crescimento de *Bacillus thuringiensis* não sofre significativa influência, é de 5,5 a 8,0. Sendo assim, foram realizados, primeiramente, ensaios com diferentes valores de pH inicial, 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0, afim de verificar a influência desta variável sobre os parâmetros crescimento do microrganismo, consumo de substrato e atividade larvicida do meio. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.1.

Nota-se que o consumo de glicerol foi total para todos os diferentes valores de pH inicial, exceto para o ensaio com pH inicial igual a 9, onde uma pequena quantidade de glicerol remanescente foi detectada ao final da fermentação (0,8 g/L). Além disso, a assimilação de glicerol nesse valor de pH ocorreu de forma mais lenta. Somente para o pH inicial igual a 6,0 o consumo foi mais intenso nas primeiras 5 horas (42,5% de glicerol consumido). Para os demais valores a concentração de substrato apresentou oscilações nas primeiras 5 horas. Verifica-se que, para esses ensaios, o glicerol foi consumido totalmente com 25-35 horas de fermentação. No entanto, para pH inicial igual a 7,0 o consumo total do substrato ocorreu por volta de 28-30 horas de fermentação e a sua assimilação pela bactéria se deu de forma mais rápida. Observa-se, também, que em todos os ensaios, nas primeiras 5 horas, um leve aumento na concentração de glicerol ocorreu. Isso pode ser explicado pela presença de alguns triglicerídeos não removidos da glicerina, apesar de tratada, e pela produção de lipases pela bactéria, que são capazes de degradar moléculas de lipídeos em glicerol e ácido graxo (ARNAUD; GUIRAUD, 1985). Este fenômeno também foi observado nos trabalhos realizados por Barbosa (2009) e Rossi (2012).

Observa-se que em todos os ensaios houve crescimento celular. Nos ensaios com valores de pH iguais a 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 esse crescimento foi semelhante e caracterizado pelo aumento da massa celular até o tempo de 25-30 horas. Após esse tempo, ainda para os mesmos ensaios, foi observada queda da concentração de biomassa. Esses perfis se assemelham ao encontrado por Berbet-Molina et al. (2008) em estudo feito com glicose. Em pH inicial igual a 6,5 a queda da massa celular foi, no entanto, mais evidente que as demais, se aproximando ainda mais do perfil característico definido pelos referidos

autores. Em pH inicial igual a 9,0 verifica-se que o crescimento celular foi comprometido, tendo ocorrido uma extensa fase lag.

Figura 5.1 - Concentração de células e glicerol e curva de pH, em função do tempo de fermentação, para diferentes valores de pH inicial.

Além disso, a fase de formação de grumos, característica da bactéria, não foi observada. Isso pode ser justificado pelo valor do pH, o qual não se encontra na faixa considerada ideal, de acordo com Bernhard e Utz (1993) e Rowe e Margaritis (1987).

No final das fermentações os ensaios apresentaram praticamente a mesma concentração celular (cerca de 5,0 g/L), exceto na fermentação realizada com pH inicial igual a 9,0 (7,0 g/L, aproximadamente).

Ainda na Figura 5.1 está apresentada a variação de pH para cada um dos ensaios realizados. Observa-se que um decréscimo de pH no meio ocorreu em todos os ensaios. Segundo Yezza et al. (2005) em cultivo em sistema descontínuo, na fase de crescimento vegetativo a fonte de carbono é metabolizada principalmente via EMP, com formação de intermediários como acetato, o que explica o abaixamento do pH. Para o pH inicial igual a 6,0 essa queda ocorreu nas primeiras 5 horas de fermentação, coincidindo com o intenso consumo de glicerol nesse período de tempo, e atingiu valor mínimo igual a 5,9. Para os demais valores de pH inicial (6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) a queda foi observada nas primeiras 10 horas de fermentação e não atingiu valores menores que 6,0. No ensaio realizado com pH inicial igual a 9,0 a queda ocorreu mais lentamente, atingindo o valor mínimo com 27 horas de fermentação. Isso coincide com a assimilação mais lenta do glicerol e a extensa fase lag observada nesse ensaio. Após atingir o valor mínimo, observa-se que em todos os ensaios o pH começa a aumentar, com certa oscilação, chegando a valores superiores aos iniciais. O perfil de variação do pH verificado em todos os ensaios apresentou um comportamento característico, conforme relatado por outros autores (YEZZA et al., 2005; BERBERT-MOLINA et al., 2008; BARBOSA, 2009). No entanto, o pH só não atingiu valor superior ao inicial no ensaio com pH inicial igual a 9,0.

O comportamento diferenciado para o ensaio com pH inicial igual a 9,0 pode ser explicado pelo próprio valor do pH do meio. Conforme mencionado anteriormente, esse valor de pH não é o mais favorável para o cultivo de *Bacillus thuringiensis*.

Para se definir o melhor valor de pH a ser utilizado para o início da fermentação, foram realizados testes de atividade larvívora, conforme descrito no item 4.6.4. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.2.

O melhor resultado em porcentagem de morte ocorreu no meio fermentado obtido do ensaio com pH inicial igual 6,5, o qual apresentou 100% de morte das larvas de *Aedes aegypti* mesmo quando se utilizou um volume de 30 µL, comparado com os demais ensaios. Esse resultado está de acordo com İçgen et al. (2002) e Rowe et al. (2003) que verificaram que pH com valor de 6,5 favoreceu a produção de δ -endotoxinas por *Bacillus*

thuringiensis var. *israelensis* e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, respectivamente. Cabe salientar que, nesta etapa, não foram realizados testes com menores volumes de meio fermentado para o ensaio com pH inicial igual a 6,5. Isto se deve ao fato de ter havido uma nítida diferença de atividade larvívora deste ensaio quando comparado aos demais, com os volumes de meio empregados (50, 40 e 30 µL), conforme estabelecido no item 4.6.4.

O meio obtido do ensaio com pH inicial igual a 9,0 não apresentou atividade larvívora, o que pode ser atribuído ao fato de não ter ocorrido o crescimento da bactéria com as características que levam à produção da toxina. Isso pode ser evidenciado pelas variações atípicas das concentrações de substrato e de células e do pH (Figura 5.1).

Figura 5.2 – Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvívora obtido nos ensaios com diferentes valores de pH inicial.

5.2 Obtenção da curva de pH característica da fermentação

Conforme descrito no item 4.5.3, ácido acético foi adicionado em três tempos diferentes do processo de fermentação: início, tempo de mínimo valor de pH e tempo de desaceleração do aumento do pH. Para se determinar os tempos de mínimo e de

desaceleração do aumento de pH, a curva característica do processo foi obtida e está representada na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Curva característica para pH durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

De acordo com Arnaud; Guiraud (1985) bactérias do gênero *Bacillus* têm a capacidade de assimilar glicerol, o qual entra na via glicolítica na forma de diidroxicetona-fosfato. O metabolismo por essa via leva à produção de piruvato. O acetato é produzido pela oxidação do piruvato formado, em reação catalisada pela enzima piruvato desidrogenase, levando à queda do pH do meio. No final do crescimento vegetativo e o início da esporulação, acetato é consumido para síntese de PHB, levando ao aumento do pH do meio (YOUSTEN; ROGOFF, 1969; LÜTHY et al., 1982).

Com relação ao perfil de pH encontrado (Figura 5.3) foi observada uma redução deste nas primeiras 10 horas, seguida de um aumento no seu valor até atingir valores próximos ao inicial, com cerca de 20 horas. 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 (BARBOSA, 2009; ROSSI, 2012) como substrato.

No trabalho de Gong et al. (2012) é apresentada uma curva de variação do pH durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meio contendo glicose como substrato. O perfil obtido no presente trabalho se assemelha ao apresentado pelos referidos autores, embora estes não tenham registrado o pH desde o início do cultivo. As principais diferenças foram o tempo de valor mínimo do pH (18 horas) e o valor máximo deste (8,1) nos tempos finais do cultivo, consideravelmente maior que o valor inicial (7,2).

O tempo de valor mínimo de pH foi estabelecido como sendo 10 horas de fermentação e o tempo de desaceleração do aumento do pH como sendo 20 horas após iniciada a fermentação.

5.3 Avaliação da adição de ácido acético ao meio de fermentação

Para facilitar a discussão dos resultados, os ensaios em que ácido acético foi adicionado nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 g/L foram denominados conforme descrito na Tabela 5.1. O ensaio em que não foi adicionado ácido foi denominado ensaio controle.

Tabela 5.1 - Identificação dos ensaios com adição de ácido acético em diferentes concentrações e em diferentes tempos da fermentação.

Etapas de adição do ácido acético	Concentração de ácido	Ensaio
Início	1 g/L	1
	3 g/L	2
	5 g/L	3
Com 10 horas	1 g/L	4
	3 g/L	5
	5 g/L	6
Com 20 horas	1 g/L	7
	3 g/L	8
	5 g/L	9

5.3.1 Adição de ácido acético no início da fermentação

Segundo Berbert-Molina et al. (2008), 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 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 e início da formação de grumos; (III) Esporulação: caracterizada pelo início da formação de esporos, inicia-se com 13 horas e são observados grandes grumos de células e diminuição da biomassa, 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.

Nos ensaios onde ácido acético foi adicionado no início da fermentação (ensaios 1, 2 e 3), foi observado, por microscopia, que as fases descritas acima não se apresentaram de forma bem definidas, sendo mais difícil determiná-las quanto maior a concentração de ácido. A principal fase afetada foi a fase II, pois não se observou claramente a evolução da formação de grumos (grumos pequenos, grumos grandes e bem definidos e dissociação destes). No ensaio 3, onde se verificou maior diferença com relação ao ensaio controle, foi observada uma alternância entre grumos grandes e uma aparente dissociação desses grumos, comportamento não observado em nenhum dos ensaios anteriores, realizados no presente trabalho.

Os resultados de concentração celular, concentração de substrato, concentração de ácido acético e perfil de pH em função do tempo de fermentação para os ensaios 1, 2, 3 e controle estão apresentados na Figura 5.4.

Observa-se que a adição de ácido acético no início da fermentação favorece o crescimento celular, uma vez que as curvas correspondentes aos ensaios em que o ácido foi adicionado apresentaram maior concentração celular comparados com o ensaio controle (Figura 5.4a). No entanto, o aumento do crescimento não foi proporcional à concentração de ácido adicionada. Nos ensaios 1 e 2 foi observada uma diferença quanto ao valor máximo de concentração de células. Apesar de no ensaio 2 haver uma menor concentração inicial de glicerol (Figura 5.4b), este apresentou uma maior concentração máxima de células, o que evidencia a assimilação de ácido acético para a produção de células. Porém, o ensaio 3 não apresentou uma maior concentração de células comparado com o ensaio 2,

mesmo com concentração de glicerol similar. Provavelmente, o excedente de ácido acético adicionado foi desviado para outras vias como, por exemplo, para a formação de PHB e não para a formação de biomassa.

Figura 5.4 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) no início da fermentação.

Com relação à concentração final de células, observa-se que o valor obtido foi maior para o ensaio 3 comparado aos ensaios 1 e 2. Isso pode ser explicado por uma maior disponibilidade de uma fonte de carbono extra, no caso, ácido acético. Pela Figura 5.4a verifica-se que os ensaios tiveram duração de 55 horas, exceto o controle. Por outro lado a concentração de ácido esgota-se com 32, 38 e 52,5 horas, para os ensaios com 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 5.4c). Logo, a menor lise celular observada no ensaio 3 pode ser explicada por uma maior disponibilidade de uma fonte de carbono extra.

Com relação à fase lag, observa-se que houve um período de adaptação celular relativamente curto (3 horas) nos ensaios com adição de ácido. No entanto, essa fase de adaptação não se mostrou muito expressiva comparada com o controle. Assim, pode-se inferir que a adição de ácido acético no tempo inicial não interfere no crescimento da bactéria nas primeiras 7 horas de fermentação. A influência do ácido é nítida a partir deste tempo até o final do processo (Figura 5.4a).

Pela Figura 5.4b, verifica-se que os perfis de consumo de substrato são semelhantes, sugerindo que a adição de ácido acético até 5,0 g/L tem pouca influência sobre o consumo de glicerol pela bactéria. Apenas o ensaio 2 apresentou, aparentemente, um maior consumo de glicerol nas primeiras horas de fermentação comparado com os demais ensaios. Porém, para todos os ensaios, incluindo o controle, ocorreu esgotamento do substrato por volta de 32,5 horas de fermentação. De acordo com Lüthy et al. (1982), a esporulação é acionada por condições de estresse do meio, nas quais o crescimento vegetativo não pode ser mantido. Sendo assim, os ensaios 1 e 2 apresentavam cerca de 0,1 e 1,0 g/L de ácido acético, respectivamente, no tempo referente ao esgotamento do substrato (Figura 5.4c). Já o ensaio 3, nesse mesmo tempo, apresentava uma concentração de ácido acético em torno de 3,0 g/L. Essa disponibilidade de outra fonte de carbono além do glicerol pode explicar o diferente comportamento da bactéria com relação às fases descritas por Berbet-Molina (2008), causando assim, a dificuldade na diferenciação dessas fases, assim como a sua ocorrência em tempos diferentes entre os ensaios em questão.

Na Figura 5.4c, verifica-se que no ensaio 1 houve uma produção expressiva de ácido acético (cerca de 1,5 g/L) nas primeiras 7 horas comparada aos demais ensaios. Sabe-se que durante o crescimento vegetativo, *Bacillus thuringiensis* produz e excreta no meio piruvato e acetato, provenientes da fermentação de carboidratos (CHEN et al., 2012). Consequente a isso, ácido acético é utilizado como fonte de carbono no primeiro estágio da biossíntese de PHB (KOMINEK; HALVORSON, 1965). Tais fatos indicam que a adição de ácido na concentração de 1,0 g/L não foi suficiente para atender as necessidades da bactéria, sendo requerida uma quantidade superior a 1,0 g/L para que ocorra a síntese de PHB. Nos ensaios 2 e 3, observou-se um aumento de apenas 0,5 g/L de ácido acético, indicando que essas concentrações suprimam a necessidade da bactéria em questão.

Com relação ao perfil de pH (Figura 5.4d), observa-se que o comportamento deste para os ensaios com adição de ácido apresentou um perfil diferente comparado com o perfil do ensaio controle. O controle apresenta um pico de mínimo de pH com 10 horas de fermentação. O ensaio 1 apresentou uma leve queda de pH devido à produção de ácido,

conforme mencionado anteriormente. No ensaio 2 o pH se manteve constante e no ensaio 3 observou-se um leve aumento deste nas primeiras horas de fermentação. Segundo Rogoff; Yousten (1969), quando glicose é utilizada como substrato, durante a fase de crescimento exponencial, ácido acético é acumulado no meio de cultura, causando abaixamento no pH. O mesmo comportamento foi observado por Barbosa (2009) e Rossi (2012) em estudos com glicerol proveniente da fabricação de biodiesel. Conforme observado na Figura 5.4c, os ensaios 2 e 3 não apresentaram expressiva produção de ácido, o que pode explicar o perfil de pH encontrado (não ocorrência do abaixamento característico). O pH tem seu valor aumentado após as primeiras 10 horas devido ao consumo de ácido para a produção de PHB (KOMINEK; HALVORSON, 1965), voltando gradativamente a um valor próximo da neutralidade. Além disso, segundo Yezza et al. (2005), durante a fase de esporulação, aminoácidos são consumidos para que ocorra a formação e a maturação dos esporos e, também, a síntese do cristal proteico. A desaminação de aminoácidos contribui para que o pH do meio aumente gradativamente até um valor próximo da neutralidade. Observa-se que para uma maior quantidade de ácido adicionada, supostamente, uma menor lise celular ocorre. Sugere-se que isso é devido ao fato de haver ainda, no meio, fonte de carbono extra, em quantidade suficiente para que as células não entrem, intensamente, nessa fase, comparado com os outros ensaios.

5.3.2 Adição de ácido acético no tempo de valor mínimo de pH

Neste grupo de ensaios o ácido acético foi adicionado no tempo de 10 horas, estipulado como sendo o tempo de valor mínimo de pH, a partir da curva característica obtida (Figura 5.3).

Até as primeiras 10 horas de fermentação, as fases de crescimento (observadas por microscopia) ocorreram de modo similar e bem definido para os ensaios 4, 5, 6 e controle. Após a adição de ácido, novamente as fases não puderam ser claramente caracterizadas, o que reforça que a perturbação ocorrida nos ensaios nos quais o ácido acético foi adicionado no início se deu por conta da presença deste.

Os resultados de concentração celular, concentração de substrato, concentração de ácido acético e perfil de pH em função do tempo de fermentação, para os ensaios com diferentes concentrações de ácido acético estão apresentados na Figura 5.5.

Observa-se que o crescimento celular nos três ensaios teve o comportamento semelhante ao ensaio controle, caracterizado por um aumento de massa celular, sem prévia fase lag. A partir de 10 horas, tempo no qual ácido acético foi adicionado, até o final da fermentação, verifica-se que as curvas de crescimento celular para os ensaios 4, 5 e 6 se diferenciam do ensaio controle, sugerindo, novamente, que a adição de ácido acético favorece o crescimento celular. Entretanto esse crescimento não foi proporcional à concentração de ácido adicionada. Os ensaios continham, praticamente, a mesma concentração inicial de glicerol (Figura 5.5b) e, no entanto, o ensaio 5 foi o que apresentou maior concentração celular máxima, indicando novamente que o ácido acético é assimilado para a produção de células, mas também é utilizado em outras vias, uma vez que o excedente de ácido no ensaio 6 não proporcionou maior concentração de biomassa.

Figura 5.5 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) após 10 horas de fermentação.

Com relação à concentração final de células, observa-se um maior valor para os ensaios 6 e 5 comparado com o ensaio 4. Pela Figura 5.5a, constata-se que o final da fermentação se deu por volta de 55 – 57,5 horas, exceto o controle. Nesse mesmo tempo, pela Figura 5.5c, verifica-se o esgotamento do ácido acético nos ensaios 5 e 6, enquanto que para o ensaio 4 este já havia se esgotado por volta de 47 horas. Logo, os ensaios 5 e 6 apresentaram por mais tempo uma fonte de carbono extra, o que pode explicar a maior concentração de células desses ensaios ao final da fermentação.

Comparando-se as Figuras 5.4a e 5.5a constata-se que a adição de ácido acético no tempo correspondente ao menor valor de pH causa uma diminuição da concentração celular máxima quando comparada com a adição no início da fermentação (cerca de 10,5 g/L para cerca de 9,4 g/L). Porém, a adição do ácido neste momento (mínimo valor de pH) provoca um aumento de cerca de 10 horas no tempo em que ocorre a concentração celular máxima. Contudo, a adição do ácido acético proporciona maior crescimento da bactéria, em relação ao controle.

Pela Figura 5.5b, verifica-se que os perfis de consumo de substrato são semelhantes entre os ensaios com adição de ácido, diferenciando-se ligeiramente do perfil do ensaio controle. Para todos os ensaios ocorreu esgotamento do substrato em torno de 40 horas de fermentação, exceto o controle, no qual o esgotamento ocorreu por volta de 30 horas. Além disso, para o ensaio 4, 5 e 6, no tempo referente ao esgotamento de substrato, ácido acético ainda se apresentava no meio em concentração de aproximadamente 0,5; 1,7 e 3,25 g/L. A maior quantidade de ácido presente no ensaio 6, pode explicar a menor taxa de lise celular para esse ensaio no tempo final de fermentação.

Nas primeiras 10 horas de fermentação, em todos os 3 ensaios, a concentração de ácido acético aumentou (Figura 5.5c). Conforme já mencionado, ácido acético é produzido durante a fase de crescimento vegetativo e, portanto, este fato está de acordo com o comportamento característico da bactéria. Essa produção de ácido acético foi em média de 2,25 g/L, uma vez que quando se adicionou 1,0; 3,0 e 5,0 g/L, as concentrações determinadas nesse tempo foram de 3,0; 5,75 e 7,0 g/L de ácido, respectivamente. Após as 10 horas verifica-se queda na concentração de ácido, corroborando com vários trabalhos da literatura, segundo os quais ácido acético é precursor para produção de PHB e, portanto, é consumido pela bactéria (KOMINEK; HALVORSON, 1965; POPOVIC et al., 2001; GONG et al., 2012)

Com relação ao perfil de pH (Figura 5.5d), constata-se que o comportamento deste para os ensaios 4, 5 e 6 assemelhou-se ao perfil do ensaio controle, com abaixamento até às

primeiras 10 horas de fermentação e posterior aumento até o final do processo. Nota-se que com a adição de ácido acético o pH não caiu para valores inferiores a 6,0, uma vez que este foi reajustado, conforme descrito no item 4.5.3.2. De acordo com Bernhard; Utz (1993) valores abaixo de 5,0 influenciam negativamente o cultivo de *Bacillus thuringiensis*. O aumento do pH após as 10 horas de fermentação ocorreu devido ao fato de que ácido acético é consumido para síntese de compostos necessários para a esporulação, estando de acordo com o constatado e citado anteriormente.

5.3.3 Adição de ácido acético no tempo de desaceleração do aumento do pH

Nesta etapa, o ácido acético foi adicionado no tempo de 20 horas, estipulado como sendo o tempo de desaceleração do aumento do pH, a partir da curva característica (Figura 5.3) obtida conforme descrito no item 4.5.2.

Foi verificado que durante as primeiras 20 horas de fermentação, as fases de crescimento observadas por microscopia se apresentaram de modo similar e definido para os ensaios 7, 8, 9 e controle. Após esse tempo, quando ácido acético foi adicionado, novamente as fases não puderam ser claramente determinadas, reforçando que, quando adicionado ao meio, ácido acético provoca alteração do crescimento característico da bactéria. Nesse caso, no momento da adição do ácido eram observados grumos pequenos e médios (fase II da fermentação) e, após esse tempo, foi observado, conforme no grupo de ensaios anterior, alternância entre grumos grandes e aparente dissociação desses grumos.

A Figura 5.6 apresenta os resultados de concentração celular, concentração de substrato, concentração de ácido acético e perfil de pH em função do tempo de fermentação, para os ensaios com diferentes concentrações de ácido acético.

Com relação ao crescimento celular, observa-se pela Figura 5.6a que nos 3 ensaios este foi semelhante ao controle até cerca de 15 horas de fermentação e semelhante entre si até 20 horas. Novamente foi verificado que a adição de ácido acético favoreceu o crescimento celular, visto que foi observado um maior valor para concentrações máximas de células para os respectivos ensaios comparados com o ensaio controle. O crescimento não foi proporcional à concentração do ácido adicionado, uma vez que no ensaio 8 obteve-se maior valor para concentração celular máxima, confirmando que o ácido acético é utilizado para a formação de biomassa.

O final das fermentações, exceto para o controle, ocorreu com 57,5 horas. Nesse tempo as concentrações finais de células foram aproximadamente iguais a 5,3; 6,5 e 7,8 g/L para os ensaios 7, 8 e 9, respectivamente, ou seja, a maior diferença observada no presente estudo. Observa-se pela Figura 5.6a que a lise celular passa a ser mais intensa após o tempo de 35 horas. Nesse mesmo tempo as concentrações de ácido no meio foram de 1,0; 2,0 e 3,5 g/L para os ensaios 7, 8 e 9, respectivamente (Figura 5.6c), o que confirma o fato de que quanto maior a disponibilidade de ácido no meio, menor a velocidade de lise celular, ocasionando maior concentração celular no final da fermentação (dentro da faixa de concentração de ácido acético estudada no presente trabalho). Sugere-se que esse ácido remanescente tenha sido utilizado para manutenção celular e/ou síntese de compostos necessários para a esporulação.

Figura 5.6 - Concentração celular (a), concentração de glicerol (b), concentração de ácido acético (c) e perfil de pH (d) em função do tempo de fermentação para os ensaios realizados adicionando-se ácido acético em diferentes concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 g/L) após 20 horas de fermentação.

A Figura 5.6b mostra os perfis de consumo de substrato. Verifica-se que houve semelhança entre os perfis dos ensaios com adição de ácido e o do controle. O esgotamento de substrato ocorreu com 30 horas para o controle e com 35 horas para os demais ensaios. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que não existe um consumo preferencial de substrato, sendo as duas fontes de carbono presentes no meio (glicerol e ácido acético) consumidas durante todo o processo de fermentação (Figura 5.6b e 5.6c). Nesse caso a presença do ácido diminuiu a velocidade de consumo de substrato, pois uma mesma quantidade de substrato foi consumida em maior tempo, comparando-se com o controle.

Verifica-se ainda que a cinética de crescimento e de consumo de ácido acético foi semelhante, independentemente da adição deste no tempo de pH mínimo ou no tempo de desaceleração do aumento do pH (Figuras 5.5a e 5.5c e 5.6a e 5.6c). Os valores de pH no final da fermentação para todos os ensaios com adição de ácido foram iguais ou superiores a 7,5, ou seja, tiveram um aumento de uma unidade de pH ou mais, em relação ao valor inicial (Figuras 5.4d, 5.5d e 5.6d). Comportamento semelhante foi observado por Gong et al. (2012), para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cultivado em glicose como substrato.

Após obtidos os dados de crescimento celular e consumo de substrato, foram determinados os parâmetros cinéticos Q_x e $Y_{x/s}$, sendo os valores apresentados na Tabela 5.2. Para facilitar a discussão dos resultados os valores de concentração celular máxima também foram incluídos na referida Tabela.

Constata-se, pelos dados apresentados, que para o ensaio controle a conversão de substrato em células se mostrou baixa (0,46 g/g). Isso pode ser explicado pelo fato de que, de acordo com (BENOIT, 1987), durante crescimento vegetativo, *Bacillus thuringiensis* produz e excreta para o meio acetato e piruvato. Logo, fica evidente que o substrato glicerol não foi utilizado simples e unicamente para produção de células, mas também para a síntese desses metabólitos intermediários. Quando este ácido é adicionado no início da fermentação, proporciona um aumento do fator de conversão de substrato em células. Essa influência foi semelhante no caso de 1,0 e 3,0 g/L (0,83 e 0,80 g_{cél}/g_{subst}, respectivamente) e decresceu com 5,0 g/L. Isso indica que o substrato não é utilizado para acúmulo de ácido acético, uma vez que este já está presente no meio. O menor efeito ocorrido no caso do ensaio 3, no qual se obteve um valor de $Y_{x/s} = 0,64$ g_{cél}/g_{subst}, pode ser explicado pela utilização dessa fonte de carbono extra em outras vias metabólicas, além da manutenção celular.

Tabela 5.2 - Parâmetros cinéticos $Y_{x/s}$ e Q_x e valores de X_m para os ensaios com diferentes concentrações de ácido acético sendo adicionadas em diferentes tempos de fermentação.

Etapa de adição do ácido acético	Concentração de ácido	Parâmetros cinéticos		
		$X_{m\max}$	$Y_{x/s}$	$Q_{x_{m\max}}$
Controle	controle	7,60	0,46	0,26
Início	1 g/L (ensaio 1)	10,40	0,83	0,44
	3 g/L (ensaio 2)	11,20	0,80	0,38
	5 g/L (ensaio 3)	10,00	0,64	0,32
Com 10 horas	1 g/L (ensaio 4)	9,45	0,58	0,26
	3 g/L (ensaio 5)	9,90	0,58	0,24
	5 g/L (ensaio 6)	8,90	0,53	0,20
Com 20 horas	1 g/L (ensaio 7)	9,45	0,57	0,28
	3 g/L (ensaio 8)	10,50	0,72	0,29
	5 g/L (ensaio 9)	10,00	0,72	0,27

Com os resultados da Tabela 5.2, para os ensaios em que o ácido acético foi adicionado com 10 horas de fermentação, verifica-se que os valores de $Y_{x/s}$ obtidos foram menores que quando o ácido foi adicionado no início (0,58; 0,58 e 0,53 $g_{cél}/g_{subst}$ para os ensaios 4, 5 e 6, respectivamente). Isso sugere que parte do glicerol assimilado foi utilizada para acúmulo de acetato e piruvato, conforme citado anteriormente. De acordo com Kominek; Halvorson (1965), quando o pH atinge seu valor mínimo, a síntese de PHB se inicia. Levando isso em consideração, e o fato de que 10 horas de fermentação foi o tempo correspondente ao valor mínimo de pH atingido nesses ensaios, conclui-se que uma menor quantidade de ácido acético adicionado também foi direcionada para a síntese de PHB, justificando os valores de $Y_{x/s}$ obtidos.

Com relação aos ensaios em que o ácido foi adicionado com 20 horas de fermentação, sugere-se que o ácido não foi utilizado para síntese de PHB, podendo ter sido, entretanto, direcionado para produção de células ou manutenção celular. Pelos valores obtidos de $Y_{x/s}$ (0,57; 0,72 e 0,72 $g_{cél}/g_{subst}$ para os ensaios 7, 8 e 9, respectivamente) constata-se que a concentração de 1 g/L influenciou menos a conversão que as concentrações de 3,0 e 5,0 g/L de ácido. A hipótese de que o ácido adicionado em 20 horas de fermentação não é utilizado para síntese de PHB se baseia no fato de que quando ocorre a desaceleração do aumento do pH, a síntese de PHB cessa e se inicia a fase de esporulação (HICKERSON, 1984). Além disso, para esses ensaios (7, 8 e 9), os valores de $Y_{x/s}$ obtidos podem ter sido influenciados pela segunda fonte de carbono presente no

meio (ácido acético), o que resultou um maior valor de ΔX e não uma melhor conversão de glicerol em células.

Os valores de produtividade em células demonstram que as máximas concentrações celulares são atingidas em menor tempo quando o ácido acético é adicionado no início da fermentação. Isto pode ser comprovado pelos valores de $Q_{X_{\text{máx}}}$ nitidamente superiores para os ensaios 1, 2 e 3, comparados com os valores obtidos para os demais ensaios. Mesmo o menor valor deste parâmetro (ensaio 3) foi superior a todos os valores obtidos nos ensaios de 4 a 9 (Tabela 5.2). Cabe salientar que produtividades mais elevadas são interessantes para a condução de processos fermentativos, sobretudo quando se trata de escala de produção.

5.4 Avaliação da adição de ácido acético sobre a atividade larvícida do meio

Os resultados de atividade larvícida obtidos nos ensaios de 1 a 9 estão apresentados nas Figuras 5.7 e 5.8.

Pela Figura 5.7 verifica-se que a adição de ácido acético no início da fermentação favorece a produção de toxinas, uma vez que ao se utilizar 10 μL de meio fermentado no ensaio de atividade larvícida obtém-se morte igual ou superior a 90%, enquanto que o controle apresentou um resultado de 70% de morte das larvas.

Para a adição de ácido acético com 10 horas de fermentação, não foi observada diferença em relação ao controle, ao se adicionar 1 g/L e 3 g/L de ácido acético. Porém, observou-se uma maior atividade larvícida foi obtida no ensaio em que 5 g/L de ácido foram adicionados.

Para os ensaios com adição de ácido com 20 horas de fermentação, verifica-se uma expressiva queda na atividade larvícida ao se adicionar 5 g/L deste. Como se pode observar na Figura 5.7, no ensaio de atividade larvícida utilizando 10 μL de meio fermentado não foi observada morte de larvas para essa concentração de ácido, enquanto que o controle apresentou 70% de morte. Referente às adições de 1,0 e 3,0 g/L foi observada morte com a utilização de 10 μL , porém, menor que o controle. Isto indica que a adição de ácido prejudicou a síntese da toxina, sendo esse feito maior, quanto maior a concentração do ácido.

Figura 5.7 - Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvicida obtido nos ensaios com adição de ácido acético nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 g/L no início da fermentação, com 10 e com 20 horas.

De acordo com Liu e Tzeng (2000), uma elevada concentração de acetato ou PHB estimula a produção de α -endotoxinas e Liu; Bihari; Bajpai (1994) verificaram que um mínimo de PHB é requerido pela célula no começo da esporulação para que esta, e a produção de toxinas, sejam eficientes em condições limitantes de fonte de carbono.

Sabe-se que durante o crescimento vegetativo piruvato e acetato são produzidos pela bactéria e excretados para o meio de fermentação. Piruvato e acetato servem como precursores para a síntese de PHB. Acetato é utilizado primeiramente, seguido do piruvato (BENOIT, 1987).

Hickenson (1984) descreveu as condições de síntese de PBH para *Bacillus cereus*. Foi verificado que durante a fase de crescimento exponencial o pH do meio de fermentação decai devido ao acúmulo de ácido acético e ácido pirúvico e quando o mínimo de pH é atingido, a síntese de PHB inicia-se, conforme mostrado na Figura 2.3. O PHB continua a ser sintetizado por horas até o esgotamento do ácido acético produzido. Em seguida uma nova produção de PHB é observada, a qual ocorre devido ao consumo de acetoína produzida a partir ácido pirúvico. O acúmulo deste polímero, segundo constatado no estudo, ocorre até o esgotamento das fontes de carbono do meio de fermentação. Conforme mencionado por Benoit (1987) *Bacillus cereus* apresenta um metabolismo muito semelhante a *Bacillus thuringiensis*. Por isso, as considerações descritas anteriormente,

com base no trabalho de Hickenson (1984), foram utilizadas como base para explicar o ocorrido no presente trabalho.

De acordo com Gong et al. (2012) a síntese dos cristais proteicos requer uma elevada quantidade de energia. Segundo os autores, o ciclo de Krebs, a glicólise e a completa oxidação de ácidos graxos são meios utilizados pelas células para obtenção de energia. Entretanto, essas vias, na fase estacionária, não produzem energia suficiente. A degradação de PHB ocorre por hidrólise deste a acetil-CoA, liberando energia na forma de NADH. Devido a isso, é considerado que a energia para a síntese dos cristais proteicos é, principalmente, fornecida por essa hidrólise. Provavelmente o ácido acético adicionado no início da fermentação foi consumido na primeira fase de síntese de PHB, conforme relatado por Hickenson (1984), tendo maior influencia quanto maior a concentração do ácido adicionado, dentro da faixa estudada no presente trabalho, e, conseqüentemente, maior fornecimento de energia para a síntese das proteínas do cristal (Figura 5.7, 10 µL de meio fermentado).

Para os ensaios com adição de ácido acético no tempo de 10 horas de fermentação, apesar de ser o tempo de mínimo de pH e, segundo Hickenson (1984), a síntese de PHB se iniciar nesse momento, não foi observada uma melhora na porcentagem de morte de larvas para os ensaios 4 e 5. Esse fato sugere que o ácido acético adicional presente no meio não foi utilizado intensamente na via de síntese de PHB, proporcionando maior acúmulo deste e, conseqüentemente, maior produção de toxina, mas, sim, foi utilizado para a biossíntese celular ou em vias para síntese de outros metabólitos. Porém, no ensaio 6, a verificação de maior potencial larvicida comparado com os ensaios 4, 5 e controle, indica que o excedente de ácido acético foi utilizado na via para síntese de PHB.

Bacillus cereus só é capaz de produzir PHB devido à presença de acetoacetil CoA redutase. O nível desta enzima é baixo durante a fase vegetativa de crescimento, porém aumenta rapidamente até o início da esporulação (HICKERSON, 1984). Analisando o ensaio controle, o início da esporulação foi observado em torno de 24 horas (observação microscópica). Isto pode auxiliar na explicação de não ter sido observada influência positiva da adição do ácido com 20 horas de fermentação. Provavelmente, nesta fase a enzima acetoacetil CoA redutase estava ausente ou em baixa concentração, e a adição tardia de ácido acético não contribuiu para a síntese de PHB e, conseqüentemente, aumento de toxina.

Gong et al. (2012), avaliando o metabolismo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* na fase estacionária, verificaram a presença da enzima aldeído-desidrogenase, responsável

por transformar acetato em acetoaldeído e este em etanol, o que pode explicar o intenso consumo de ácido acético. Tal fato permite inferir que neste caso o ácido acético foi usado para a produção de etanol e não para a síntese de PHB.

Yezza et al. (2005) e Ikeda et al. (1974) observaram, em seus estudos com *Bacillus thuringiensis*, que o uso do ácido acético favorece a produção de proteases. Logo, o ácido adicionado com 20 horas de fermentação pode ter ocasionado maior produção dessas proteases, ocasionando diminuição da atividade larvívora.

Em função da similaridade de porcentagens de morte de larvas verificada para os ensaios 1, 2 e 3 (90, 100 e 100%, respectivamente) uma nova determinação de atividade larvívora destes meios foi realizada, visando definir a melhor condição entre as avaliadas no presente trabalho. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.8.

Figura 5.8 - Porcentagem de morte de larvas em função do volume de meio fermentado empregado no teste de atividade larvívora obtido nos ensaios com adição de ácido acético nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 g/L no início da fermentação e com adição de 5 g/L do ácido com 10 horas de fermentação.

Nesse ensaio de atividade larvívora foram utilizados 5 µL de meio fermentado, sendo também reavaliados o ensaio com adição de 5 g/L de ácido com 10 horas de fermentação e o ensaio controle, para fins de comparação.

Constatou-se que a adição de 5 g/L de ácido acético no início da fermentação proporcionou uma porcentagem de morte de larvas de 80%, contra 10%, 0%, 20% e 40% do controle, ensaio 1, ensaio 2 e ensaio 6, respectivamente. Portanto, para uma maior produção de toxina, foi demonstrado que a adição de 5 g/L de ácido no início da fermentação leva a um melhor resultado de porcentagem de morte de larvas. No entanto, não se sabe se concentrações maiores influenciariam positivamente ou negativamente a atividade larvívora do meio, indicando que estudos mais detalhados são necessários.

6. CONCLUSÃO

- *Bacillus thuringiensis* apresenta melhores resultados de crescimento celular, consumo de substrato e atividade larvicida quando cultivado em valores de pH inicial igual a 6,5 e tendo glicerol proveniente da fabricação de biodiesel como fonte de carbono.
- A adição de ácido acético exerce influência positiva sobre o crescimento celular, uma vez que ensaios com adição do ácido apresentaram perfil de massa com valores superiores aos sem adição.
- Quanto ao consumo de substrato, ácido acético sendo adicionado ao meio não influencia na sua assimilação em termos quantitativos, porém o tempo para consumo total da fonte de carbono se prolonga.
- A atividade larvicida, do mesmo modo que os demais parâmetros, é influenciada pelo ácido. Para esse parâmetro, no entanto, o melhor resultado é obtido quando o ácido é adicionado no início do processo de fermentação e é maior quanto maior a concentração utilizada, dentro da faixa estudada.
- A adição de ácido acético do tempo de valor mínimo de pH ou de desaceleração deste, não melhora a síntese do cristal proteico. Por outro lado, o ácido prejudica a produção de toxina quando adicionado no tempo de desaceleração do pH, na concentração de 5 g/L.
- Para se aumentar a atividade larvicida do meio fermentado por *Bacillus thuringiensis*, cujo substrato é o glicerol proveniente da fabricação de biodiesel com óleo de soja, deve-se adicionar ácido acético no início da fermentação, na concentração de 5,0 g/L.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação de uma faixa de concentração de ácido acético maior do que a estudada.
- ✓ Análise, por planejamento estatístico, da influencia do ácido acético.
- ✓ Estudos que envolvam a quantificação de ácido acético juntamente com a de PHB.

REFERÊNCIAS

- ABDELL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – III. Selection of media for delta-endotoxin production. **W. J. Microbiol. Biotechnol**, v.6, p.313-317, 1990.
- ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. **Chemical and Biochem. Engineering Quarterly**, v.17, n.3, p.225-231, 2003
- ANDREWS Jr, R. E.; KANDA, K.; BULLA Jr., L.A. In vitro translation of the entomocidal toxin of *B. thuringiensis* In: GANESAN, A. T.; CHANG, S.; HOCH, J. A. **Molecular cloning and gene regulation in bacilli**. New York: Academic Press, 1982. p.121–130
- APPLEBY, D.B. Glicerol. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Blucher, 2006. cap.11, p. 295-300.
- APOSTOLAKOU, A. A.; KOOKOS, I. K.; MARAZIOTI, C.; ANGELOPOULOS, K. C. Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetables oils. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.1023-1031, 2009
- ARNAUD, A.; GUIRAUD, J-P. Bioquímica Microbiana. In: SCRIBAN, R. coord., **Biotecnologia**. São Paulo: Manole Ltda., 1985. p. 47-102.
- 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.
- BALARAMAN, K. Occurrence and diversity of mosquitocidal strains of *Bacillus thuringiensis*. **J. Vect. Borne Dis.**, v.42, p. 81-86, 2005.
- BARBOSA, C.R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2009.
- BATISTA , F. **Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-eradabiodiesel-05-06-07.htm>>. Acesso em 10 de junho 2008.
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J. F.; Delécluse, A.; LeRoux, C. N. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to field Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-398.
- BENOIT, T.G. Metabolism of the fermentation products by *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. 1987.96f Tese (Doctor of Philosophy) – Faculty of Texas Tech University, 1987.

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

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

BERNHARD, K., UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. New York: John Wiley Sons Ltd., p.255-267, 1993.

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

HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. New York: John Wiley, 1993. p.255-267.

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

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

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**. Guia de vigilância epidemiológica, 6^a edição, 2005.

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

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

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

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

BULLA J.R., 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.

CÂMARA, F. P.; THEOFILO, R.L.G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C.. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.2, p.192-196, mar-abr, 2007.

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

CHEN, D.; LI, M.; HE, J.; GONG, Y.; WU, D.; SUN, M.; YU, Z. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* ΔphaC mutant BMB171/PHB⁻¹ reveals that the PHB synthetic pathway warrants normal carbon metabolism. **Jornal of Proteomics**, In press, DOI: 10.1016. (2012).

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

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

COSTA, J. R. V., ROSSI, J. R., MARUCCI, S. C., ALVES, E. C. da C., VOLPE, H. X. L., FERRAUDO, A. S., LEMOS, M. V. F., DESIDÉRIO, J.. Atividade Tóxica de Isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, n.5, p.757-766, 2010.

DENGUE já matou 51 pessoas no Brasil em apenas dois meses. Portal de Paulínia. Disponível em: <<http://www.portaldepaulinia.com.br/saude/noticias/10300-dengue-jamatou-51-pessoas-o-brasil-em-apenas-dois-meses.html>> Acesso em: 26 março 2011.

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

FEDERICI, B. A.. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. **J. Invert. Pathol.**, v.89, p.30-38, 2005.

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

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

GILL, S. S.; COWLES, E. A., PIENSTRANTONIO, 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.

GONG, Y.; MINGSHUN, L.; XU, D.; WANG, H.; HE, J.; WU, D.; CHEN, D.; QIU, N.; BAO, Q.; SUN, M.; YU, Z. Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. **Jornal of Proteomics**, v.75, p. 1235-1246, 2012.

HICKERSON, S. L. Factors affecting poli- β -hydroxybutirate synthesis and crystal formation in *Bacillus cereus*. 1984.68f Dissertation (Master of Science) – Faculty of Texas Tech University, 1984.

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

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; OZCEENGİZ, 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.

IKEDA, S.; TOBE, S.; NIWA, K.; ISHIZAKI, A.; HIROSE, Y. Production of alkaline protease from acetic acid. **Agr. Biol. Chem**, v.38, p.2317-2322, 1974.

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

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

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

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.

KOMINEK, L.; HALVORSON, H. Metabolism of poli- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. **J. Bacteriol.**, v.90, p.1252-1259, 1965.

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.

KUCEK, K. T.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Ethanolysis of Refined Soybean Oil Assisted by Sodium and Potassium Hydroxides. **J Amer Oil Chem Soc**, v. 84, p. 385-392, 2007.

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.

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.

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

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.

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

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

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

MELO, M. S. S.; BARRETO, F. R.; COSTA, M. C. N.; MORATO, V. C.; TEIXEIRA, M. G. Progressão da circulação do vírus da dengue no Estado da Bahia, 1994-2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 139-144, 2010.

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

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

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

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

MUREL, W. G. The biochemistry of the bacterial endospore. **Adv. Microbiol. Phisiol.**, v. 1, p. 133-251, 1967.

NAE (Núcleos de Assuntos Estratégicos da Presidência da República). Glicerol: mercados e perspectivas. In: **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.sae.gov.br/site/wp-content/uploads/02biocombustiveis.pdf>>. Acesso em: dez 2010.

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.

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

NÚMERO de casos de dengue cai 61% no primeiro bimestre, segundo dados da saúde. Portal Brasil. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/03/07/numero-de-casos-de-dengue-cai-61-no-primeiro-bimestre>> Acesso em: 01 jul 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of d-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, 2008b

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

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; JE, Y. H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.547-559, 2007.

ROSSI, A. A. **Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel**. 2012. 164f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

ROWE, G. E.; MARGARITIS, A. Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.** v.6, p. 87-127, 1987.

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

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

SACHIDANANDHAM, R.; JENNY, K.; FIECHTER, A.; JAYARAMAN, K. Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady- and transient-state continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 12-17, 22 jan 1997.

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.

SALAMA, H.S., FODA, M.S., SELIM, M.H., EL-SHARABY, A. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active andotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Zbl. Mikrobiol.**, v. 138, p. 553-563, 1983.

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.

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.

STARZAK, M.; BAJPAI, R. K., A Structured Model for Vegetative Growth and Sporulation in *Bacillus thuringiensis*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.28/ 29, p. 699-718, 1991.

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

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

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

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

VIMALA DEVI, P.S., RAVINDER, T., JAIDEV, C.. Berley-based medium for the cost-effective production of *Bacillus thuringiensis*. **World J. Microbiology Biotechnology**, v.21, p. 173-178, 2005.

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

VORA, D., SHETNA, Y.I. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in seed meal extract media containing cystine. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.15, p. 747-749, 1999.

WHALON, M.E., WINGERD, B.A. *Bacillus thuringiensis*: mode of action and use. **Arch. Microbiol.**, v.188, n.1, p. 81-88, 2007.

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.

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 Cu²⁺ on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, n.6, p. 576-580, 2003.

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

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

YOUSTEN, A. A., ROGOFF, M. H. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in Relation to Spore and Crystal Formation. **Journal of Bacteriology**, v.100, p.1229-1236, 1969.