

**APROVEITAMENTO DE XAROPE RESIDUAL DA DESIDRATAÇÃO
OSMÓTICA DE ABACAXI PARA O CULTIVO DE
Bacillus thuringiensis var. *israelensis***

RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2009**

**APROVEITAMENTO DE XAROPE RESIDUAL DA DESIDRATAÇÃO
OSMÓTICA DE ABACAXI PARA O CULTIVO DE
Bacillus thuringiensis var. *israelensis***

RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Pedro Amorim Berbert

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2009

**APROVEITAMENTO DE XAROPE RESIDUAL DA DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA
DE ABACAXI PARA O CULTIVO DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***

RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Pedro Amorim Berbert

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2009

Comissão examinadora:

Professor Arnaldo Márcio Ramalho Prata D.S., Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. EEL / USP

Professor Francisco José Alves Lemos Ph.D., Ciências Biológicas (Bioquímica). UENF

Professora Marília Amorim Berbert de Molina D.S., Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. UENF

Professor Pedro Amorim Berbert (Orientador) Ph.D., Engenharia Agrícola. UENF

Ao meu pai Paulo (*in memoriam*); à
minha mãe Helena, meus irmãos
Paula, Guilherme e Matheus e
minha amada Natalia.

Agradecimentos

Agradeço a UENF, pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho, a FAPERJ e FINEP, pelo suporte financeiro, e à empresa SANTELISAVALE, pelo fornecimento do xarope de açúcar invertido para a realização dos experimentos;

Agradeço ao Professor Pedro Amorim Berbert e à Professora Marília Amorim Berbert de Molina pela oportunidade, pelos ensinamentos, conselhos e orientação nessa dissertação e pela amizade. Vocês são especiais;

Aos Professores Arnaldo Marcio Ramalho Prata e Francisco José Alves Lemos por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Agradeço a Deus por me ajudar a completar mais essa etapa da minha vida;
Ao meu pai Paulo (*in memoriam*), à minha mãe Helena, minha irmã Paulinha, meus irmãos Guilherme e Matheus, minha afilhada Mell e minha prima Cristiane, por acreditarem em mim, pelos ensinamentos e por todo amor. Obrigado mesmo! Mesmo distante vocês estarão sempre no meu coração e sem a força de vocês eu não teria conseguido;

À minha amada Natalia, por tudo que você tem feito por mim. Você me deu força, me fez crescer e me ajudou sempre quando eu mais precisava e estava

sempre pronta para me escutar. Sempre do meu lado, em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins. Te amo!

Aos meus amigos Fabrízio, Lara, Maria Clara, Juliani, Ireni, Márcia e Vinicius. Obrigado pela ajuda, sempre disponíveis nas horas em que precisei. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês;

Aos amigos de sempre, meus tios, primos e especial Catarina e José Francisco, que sempre estarão presentes na minha vida;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 - Desidratação Osmótica de Frutas.....	5
2.2 - O Fruto do Abacaxizeiro.....	12
2.3 - <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2.3.1 – Atividade entomopatogênica.....	15
2.3.2 - Formulações de meios para cultivo de <i>B. thuringiensis</i>	17
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 – Obtenção da Solução Osmótica Residual.....	22
3.1.1 – Obtenção dos frutos.....	22
3.1.2 – Preparo dos frutos para a desidratação osmótica.....	23
3.1.3 – Branqueamento dos frutos.....	23
3.1.4 – Desidratação osmótica dos frutos.....	23

3.2 – Ensaio de Fermentação.....	24
3.2.1 - Microrganismo.....	24
3.2.2 - Meio de Cultivo.....	24
3.2.3 - Condições de Cultivo.....	26
3.2.3.1 - Preparo da cultura estoque.....	26
3.2.3.2 - Preparo do inóculo.....	27
3.2.3.3 - Ensaio de fermentação.....	27
3.3 - Métodos Analíticos.....	28
3.3.1 – Coleta de Amostras.....	28
3.3.2 - Morfologia celular.....	29
3.3.3 - Concentração celular.....	30
3.3.4 - Contagem de Células e Esporos.....	31
3.3.5 - Concentração de açúcares redutores totais.....	31
3.3.6 – Bioensaios.....	33
3.3.7 - Obtenção da suspensão de esporos-cristais para bioensaios..	33
3.3.8 – Cálculos de parâmetros fermentativos.....	34
3.3.8.1 – Produtividade em células.....	34
3.3.8.2 – Fator de conversão de substrato em células.....	34
3.3.8.3 – Máxima Velocidade específica de crescimento.....	35
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 – Obtenção da solução osmótica residual.....	36
4.2 – Avaliação da fermentação em meio formulado com solução osmótica residual.....	40
4.3 – Fermentação de meios formulados com concentrações crescentes de solução osmótica.....	45
4.4 – Avaliação da fermentação com pulso de nutrientes durante o processo.....	60
5 - CONCLUSÕES.....	73
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMO

RODRIGUES, Raphael Cardoso; M.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2009; Aproveitamento de xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; Professor Orientador: Pedro Amorim Berbert. Co-orientadora: Professora Marília Amorim Berbert de Molina.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Agrícola do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, em conjunto com o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo foi avaliar a viabilidade de emprego do xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), visando sua aplicação na produção de bioinseticidas para o controle de *Aedes aegypti*, vetor da dengue. Neste tipo de desidratação, frações do alimento são imersas em soluções concentradas de solutos, sob condições controladas de temperatura, tempo e agitação, havendo remoção parcial de água e incorporação limitada de solutos pelo alimento. O processo foi feito utilizando-se solução de açúcar invertido a 40%, relação xarope:fruta 1:5, incubação a 50 °C e 60 min⁻¹, por 2 h, com 5 ciclos consecutivos de reaproveitamento da solução osmótica. Os ensaios de fermentação foram realizados em frascos agitados (30 °C e 110 min⁻¹), empregando-se concentração inicial (S_0) de açúcares redutores totais (ART) de 30 g/L. Constatou-

se que, desde que suplementada com nutrientes, a solução residual apresenta potencial para o cultivo de *Bti*. Sem nutrientes adicionais, os números totais de células (CT) e de esporos (ET) foram inferiores (2,5 e 3 vezes) aos alcançados no meio suplementado. Em ensaios realizados em biorreator de bancada (1,0 vvm, 600 min⁻¹, 30 °C) foi avaliada a influência de concentrações crescentes de ART (31,0; 54,7; 74,9 e 106,2 g/L; meios SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅, SOR₁₀₀; respectivamente) sobre o processo, buscando aumentar a contribuição nutricional do xarope residual. Cinéticas de crescimento similares foram verificadas, com máximas velocidades específicas de crescimento análogas, indicando ausência de inibição pelo substrato. Valores crescentes de S₀ implicaram em valores similares das máximas concentrações celulares (X_m de 14,7 a 16,6 g/L), apesar do maior tempo de crescimento observado nos meios com maiores S₀, o que levou a uma queda na produtividade em SOR₁₀₀. Não houve consumo total de substrato em nenhum dos meios avaliados, embora este tenha aumentado gradativamente com o aumento de S₀, resultando em valores decrescentes (0,70 a 0,42 g/g) do fator de conversão de substrato em célula (Y_{X/S}). Em SOR₃₀, a concentração residual de ART foi de 1,3 g/L, correspondendo a 95,6% de consumo (ΔS_f). Menores valores de CT e ET foram verificados com o aumento de S₀, apesar de taxas de esporulação semelhantes. Os valores de atividade tóxica (LC₅₀) não apresentaram diferença significativa, mostrando que as diferentes concentrações de ART não afetaram a produção de δ-endotoxinas. Finalmente, foram testados os meios SOR_{50P} e SOR_{75P}, nos quais foi feita uma adição de nutrientes durante a fermentação. Verificou-se, em ambos os casos, um prolongamento da fase de crescimento e maior consumo de substrato, sendo obtidos valores de X_m superiores (41,7 e 78%, respectivamente) aos obtidos com SOR₅₀ e SOR₇₅. Os valores de CT e ET foram duas vezes maiores, mas os valores de LC₅₀ foram inferiores, evidenciando o efeito negativo da maior concentração de nutrientes para a síntese de toxinas. Concluiu-se que a solução residual da desidratação osmótica de abacaxi, diluída para S₀ de 30 g/L e sem pulso de nutrientes na fermentação, pode ser utilizada no cultivo de *Bti*, sendo ainda possível otimizar as condições de processo para aumentar a toxicidade do meio.

ABSTRACT

RODRIGUES, Raphael Cardoso; M.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro [Northern Rio de Janeiro state University]; February 2009. Use of the residual syrup from the osmotic dehydration of pineapple to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cultivation. Supervised by Pedro Amorim Berbert, Ph.D., and co-supervised by Dr. Marília Amorim Berbert de Molina.

This work was carried out at the Agricultural Engineering Laboratory of the Animal and Agricultural Sciences and Technology Centre, and at the Biotechnology Laboratory of the Biosciences and Biotechnology Centre, *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro state, Brazil. The aim of the study was to evaluate the feasibility of using the residual syrup obtained from the osmotic dehydration of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) for bioinsecticide production, using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), for the control of dengue's vector *Aedes aegypti*. Osmotic dehydration consists in the immersion of fruit fractions in hypertonic sugar solutions, under controlled conditions of temperature, time and stirring rate, resulting in partial water removal and solutes impregnation in the food matrix. The experiment was performed in incubators using a 40% invert syrup solution, at 50 °C and 60 min⁻¹, employing a single fruit to syrup ratio, 1:5, and one level of immersion time, 2 h, reusing the osmotic solution in 5 successive dehydration cycles. The fermentation assays were performed in shaken flasks (30 °C and 110 min⁻¹) containing media with 30 g/L of reducing sugars (TRS;

S_0). It was previously verified that, since supplemented with nutrients, the residual solution has a good potential for the cultivation of *Bti*. Without additional nutrients the total numbers of cells (TC) and spores (TE) were lower than those achieved in the supplemented medium (2.5 and 3.0 times lower, respectively). In order to improve the nutritional contribution of the residual syrup for growth parameters, media with increasing TRS concentrations (31.0, 54.7, 74.9, 106.2 g/L; SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅, SOR₁₀₀ media, respectively) were tested in a bioreactor (1.0 vvm, 600 min⁻¹, 30 °C). Similar growth profiles, with an analogous μ_m (maximum specific growth rate) value, were obtained, indicating lack of inhibition by the substrate. Increasing S_0 values resulted in similar X_m (maximum cell concentration) values (14.7 to 16.6 g/L), despite the longer growth time observed in media with higher S_0 , which led to a drop in productivity in SOR₁₀₀. Substrate was not totally consumed in any fermentation medium, although gradual substrate utilization has been observed with increasing S_0 , leading to decreasing $Y_{X/S}$ (cell yield) values (0.70 to 0.42 g/g). A residual TRS concentration of 1.3 g/L, corresponding to 95.6% consumption, was observed in SOR₃₀. Increasing values of S_0 led also to lower TC and TE values, despite similar sporulation rates. Toxic activity (LC₅₀) values had no significant difference, showing that the different TRS concentrations did not affect δ -endotoxins production. The fermentation of the SOR_{50P} and SOR_{75P} media, which were supplemented with nutrients along the process, showed in both cases a longer growth phase and higher substrate consumption, with higher X_m values (41.7 and 78.0%, respectively). Values of TC and TE were 2 times larger, but LC₅₀ values were significantly lower, showing the negative effect of higher nutrient concentrations for toxins synthesis. The overall results demonstrated that the residual syrup from the osmotic dehydration of pineapple, diluted to an S_0 value of 30 g/L, without a pulse of nutrients during the fermentation process, can be used as a medium for the cultivation of *Bti*. The fermentation conditions may be further optimized to increase the toxicity of the culture medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amostra dos abacaxis escolhidos para a realização da desidratação osmótica.....	36
Figura 2 – Etapas da desidratação osmótica: (A) abacaxis cortados em forma de arco de coroa; (B) reatores (1.000 mL) com os frutos cortados imersos na solução de açúcar invertido a 40 °Brix, na proporção fruta:xarope de 1:5; (C e D) reatores dispostos em incubadora/agitadora a 50 °C com agitação de 60 min ⁻¹ por 2 h.....	37
Figura 3 – Características dimensionais dos abacaxis escolhidos para a desidratação osmótica.....	38
Figura 4 – Cinética de crescimento celular em função do tempo nos diferentes meios de cultivo até o momento da formação de grumos: GYS (□), SOR ₃₀ (□), SOR-Y ₃₀ (Δ).....	44
Figura 5 – Concentração de células (□) e de ART (Δ), em função do tempo, na fermentação dos meios SOR ₃₀ (A), SOR ₅₀ (B), SOR ₇₅ (C) e SOR ₁₀₀ (D) em biorreator de bancada.....	46
Figura 6 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios SOR ₃₀ (□)SOR ₅₀ (Δ)SOR ₇₅ (○)SOR ₁₀₀ (☆) em biorreator de bancada.....	47
Figura 7 – Velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), em função do tempo, na fermentação dos meios SOR ₃₀ (■), SOR ₅₀ (●), SOR ₇₅ (▲) e SOR ₁₀₀ (★) em biorreator de bancada.....	48
Figura 8 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios SOR ₃₀ (□)SOR ₅₀ (Δ)SOR ₇₅ (○)SOR ₁₀₀ (◇) em biorreator	

de bancada.....	50
Figura 9 – Variação do pH em função do tempo nos meios SOR ₃₀ (□)SOR ₅₀ (△)SOR ₇₅ (○)SOR ₁₀₀ (◇) em biorreator de bancada.....	54
Figura 10 – Valores de LC ₅₀ para larvas de <i>Aedes aegypti</i> obtidos nos meios SOR ₃₀ , SOR ₅₀ , SOR ₇₅ , SOR ₁₀₀ em biorreator de bancada. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente em nível de significância de 5% no teste Tukey.....	58
Figura 11 – Concentração de células (□) e de ART (△), em função do tempo, na fermentação do meio SOR _{50P} em biorreator de bancada. A seta indica o momento de adição da solução nutriente.....	62
Figura 12 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios SOR ₅₀ e SOR _{50P} . ES - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.....	64
Figura 13 – Valores de LC ₅₀ obtidos para larvas de <i>Aedes aegypti</i> obtidos na fermentação dos meios SOR ₅₀ e SOR _{50P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.....	66
Figura 14 – Concentração de células (□) e de ART (△), em função do tempo, na fermentação dos meios SOR _{75P} em biorreator de bancada. A seta indica o momento de adição da solução nutriente.....	67
Figura 15 - Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios SOR ₇₅ e SOR _{75P} . ES - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.....	69
Figura 16 - Valores de LC ₅₀ para larvas de <i>Aedes aegypti</i> obtidos na fermentação dos meios SOR ₇₅ e SOR _{75P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.....	70
Figura 17 - Valores de LC ₅₀ obtidos na fermentação dos meios SOR ₃₀ , SOR ₅₀ , SOR ₇₅ , SOR ₁₀₀ , SOR _{50P} e SOR _{75P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.....	71

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Valor nutricional, em macrocomponentes, de abacaxi.....	13
Tabela 2: Valor nutricional, em minerais, de abacaxi.....	14
Tabela 3: Valor nutricional, em vitaminas, de abacaxi.....	14
Tabela 4: Composição do meio de cultivo Agar Nutriente.....	25
Tabela 5: Composição do meio de cultivo GYS modificado.....	26
Tabela 6: °Brix de xarope após os ciclos de desidratação osmótica.....	40
Tabela 7: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. t. var. israelensis</i> nos meios GYS, SOR ₃₀ e SOR-Y ₃₀	41
Tabela 8: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. t. var. israelensis</i> nos meios SOR ₃₀ , SOR ₅₀ , SOR ₇₅ e SOR ₁₀₀	51
Tabela 9: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. t. var. israelensis</i> nos meios SOR _{50P} e SOR ₅₀	63
Tabela 10: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. t. var. israelensis</i> nos meios SOR ₇₅ com pulso e SOR ₇₅	68

LISTA DE ABREVIações

<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
DII	Desidratação por Imersão e Impregnação
SOR-Y ₃₀	Solução Osmótica Residual (30 g/L) com apenas Extrato de Levedura
SOR ₃₀	Solução Osmótica Residual a 31,6 g/L
SOR ₅₀	Solução Osmótica Residual a 54,7 g/L
SOR ₇₅	Solução Osmótica Residual a 74,9 g/L
SOR ₁₀₀	Solução Osmótica Residual a 106,2 g/L
ES	Esporos livres
CV	Células Vegetativas
CE	Células Esporuladas
ET	Esporos Totais
CT	Células Totais
T _{SP}	Taxa de Esporulação (%)

t_f	Tempo Final de Fermentação
DNS	Método ácido 3,5 di-nitrosalicílico
ART	Açúcares Redutores Totais
t_{gr}	Tempo de formação de grumos
X_0	Concentração inicial de células (g/L)
X_m	Máxima concentração celular (g/L)
ΔX	Diferença entre a concentração celular em $t_{x,m}$ e no início do cultivo (g/L)
$t_{x,m}$	Tempo necessário para obtenção da máxima concentração celular (h)
S_0	Concentração inicial de Substrato (g/L)
$S_{x,m}$	Concentração de substrato em $t_{x,m}$ (g/L)
$\Delta S_{x,m}$	Substrato consumido até $t_{x,m}$ (g/L)
ΔS_f	Substrato consumido até o final do cultivo (g/L)
ΔS_f (%)	Substrato consumido até o final do cultivo (%)
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em células (g/g), calculado em $t_{x,m}$
p_x	Produtividade em células, calculada em $t_{x,m}$ (g/L.h)
μ_m	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de frutas e hortaliças, dentre as frutas, as mais produzidas são uva, manga, banana, abacaxi e mamão. O consumo, embora ainda menor que em muitos países, também cresceu nos últimos anos, registrando-se, além disso, aumento no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) nos principais pólos de fruticultura do País (Gomes et al., 2007).

Dados de 1993, (Palou et al., 1993), mostram que as perdas pós-colheita são elevadas no País, podendo chegar a 40%. No caso do abacaxi, estas perdas são estimadas em 20% (Peres, 2005). Além disto, as frutas e hortaliças são, caracteristicamente, alimentos de fácil deterioração, devido, principalmente, ao seu elevado conteúdo de água livre (Gomes et al., 2007). O manuseio inadequado, o uso de técnicas impróprias de preservação, somados ao despreparo dos profissionais do ramo da agroindústria e dos consumidores, contribui para o aumento dos prejuízos no setor (Dias, 2003).

O desenvolvimento de técnicas de preservação que mantenham o máximo dos componentes nutricionais e das propriedades sensoriais de alimentos é considerado uma forma de viabilizar o seu aproveitamento racional. A industrialização é uma das alternativas para reduzir as perdas pós-colheita, principalmente no pico da safra, quando os alimentos alcançam menores preços pelo excesso de oferta (Andrade et al., 2003). Além disso, a demanda por alimentos

processados que mantenham suas características mais próximas possíveis do produto original tem aumentado sensivelmente nas últimas décadas (Lima et al., 2004).

Uma técnica de conservação de alimentos que tem sido muito estudada é a desidratação osmótica (Azeredo e Jardine, 2000; Sousa et al., 2003; Souza-Neto et al., 2004; Andrade et al., 2003; Mota, 2005; Dionello et al., 2007; Queiroz et al., 2007; Queiroz et al., 2008), também chamada de desidratação por imersão e impregnação (Torreggiani, 1993). Neste processo ocorre a remoção parcial de água do alimento por meio de seu contato direto com uma solução hipertônica, com incorporação limitada e controlada de solutos (Lazarides et al., 1994). É considerada como uma etapa de pré-tratamento, uma vez que é seguida por processos complementares, como secagem com ar quente ou congelamento (Torreggiani, 1993).

A desidratação osmótica favorece a obtenção de produtos com qualidade sensorial e nutricional superior à de produtos desidratados unicamente por secagem por convecção, uma vez que as mudanças físicas, químicas e biológicas provocadas pelas altas temperaturas empregadas nos secadores ocorrerão em menor intensidade (Torreggiani, 1993; Raoult-Wack, 1994; Lenart, 1996). A técnica viabiliza, também, a utilização de frutas que apresentam acidez elevada, como o abacaxi, tornando o produto mais aceitável sensorialmente (Magalhães e Queiroz, 2001).

A grande limitação do processo de desidratação osmótica têm sido, no entanto, a de estabelecer uma tecnologia que não gere resíduos e sim co-produtos. Embora a solução hipertônica possa ser reciclada algumas vezes no processo, esta é considerada, na maioria das vezes, um resíduo industrial, representando um dos maiores entraves para a maior aplicação do processo em escala comercial (Gomes et al., 2007). O resíduo gerado é rico em carboidratos e seu descarte no ambiente, além de inviabilizar o processo em termos econômicos, teria um impacto ambiental negativo.

Algumas alternativas para o aproveitamento do xarope residual da desidratação osmótica têm sido citadas, como seu emprego em processos fermentativos para produção de vinagres e bebidas alcoólicas, o que aumenta

também o valor agregado final do alimento (Gomes et al., 2007). Sendo rico em carboidratos e minerais, o resíduo pode vir a representar uma excelente fonte de nutrientes para outros tipos de fermentação. A produção de inseticidas biológicos, por exemplo, pode se tornar uma alternativa biotecnológica para o uso da solução osmótica. Bactérias como *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que produzem toxinas com efeito letal sobre larvas de certos insetos, sendo usadas na formulação de bioinseticidas para controle de pragas e vetores, podem ser uma destas candidatas.

A variedade de *Bt* denominada *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) constitui o agente microbiano mais importante e mais amplamente utilizado no controle de vetores de doenças em todo o mundo (Yang e Wang, 1998; Lacey et al., 2001). Esta variedade apresenta os melhores resultados no combate às larvas de dípteros como *Aedes aegypti*, vetor da dengue, *Anopheles sp*, transmissor da malária e espécies de simulídeos responsáveis pela oncocercose (Poopathi et al., 2002). Doenças como dengue e malária representam um dos principais problemas de saúde pública no mundo, principalmente em países tropicais, devido às condições climáticas favoráveis à proliferação dos mosquitos vetores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 milhões e 100 milhões de pessoas se infectem anualmente. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (WHO, 1999). Até Abril de 2008, último boletim do ministério da saúde, no Brasil, no ano de 2007, foram registrados 559.954 casos de dengue, com inúmeros casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e óbitos. Os Estados de Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio de Janeiro notificaram grande aumento no número de casos (SVS/MS, 2008).

A composição do meio de cultivo é um dos fatores mais importantes para a otimização do processo fermentativo com *Bti*. Os meios devem conter em sua composição uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de δ -endotoxinas (Maldonado-Blanco et al., 2003). Como o custo do processo é ainda considerado elevado, o emprego de resíduos agroindustriais para a formulação do meio de cultivo tem sido uma das alternativas

mais indicadas para viabilizar economicamente a produção (Vimala Devi et al., 2005). Diversas matérias-primas naturais têm sido avaliadas, como fonte de nutrientes para a bactéria (Yang e Wang, 1998; Poopathi et al., 2002, Pessanha, 2008, Ramada, 2008).

Neste contexto, propôs-se, neste trabalho, avaliar o resíduo gerado após a desidratação osmótica de abacaxi como base para a formulação de meios de cultivo para a produção de biomassa de *Bti* e toxina. O xarope apresenta as vantagens de constituir uma fonte de carbono assimilável pela bactéria e possuir minerais como ferro, cálcio, cobre e potássio (Peiró et al., 2006), os quais são importantes para o metabolismo da bactéria (Yao, 2002 e 2003 e Anderson e Jayaraman, 2003). Além de representar uma opção para a produção de um bioinseticida economicamente viável, o aproveitamento da solução osmótica residual neste processo fermentativo pode vir a se tornar uma alternativa à viabilização da própria tecnologia de desidratação osmótica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Desidratação osmótica de frutas

A alta perecibilidade dos frutos associada às dificuldades de armazenamento nos meses de safra contribui para uma grande perda da produção nacional, gerando a necessidade do desenvolvimento de processos de preservação (Neves Filho, 1994). Dados de 1993 mostram que no Brasil o desperdício de alimentos está em torno de 40% (Palou et al., 1993). As maiores perdas ocorrem durante o manuseio e o transporte dos alimentos.

O Brasil é grande produtor de frutas e hortaliças e o desenvolvimento de técnicas de preservação, com a manutenção do máximo de componentes nutricionais e propriedades sensoriais, é uma forma de viabilizar o seu aproveitamento e maior consumo. A industrialização é uma alternativa para reduzir as perdas, principalmente no pico da safra, quando as frutas alcançam menores preços pelo excesso de oferta (Andrade et al., 2003). Os processos de conservação dos alimentos são baseados na eliminação total ou parcial dos agentes que causam alterações nos produtos, na modificação ou supressão de um ou mais fatores essenciais ao seu desenvolvimento, de modo que o meio se torne não propício a qualquer manifestação vital (Gomes et al., 2007).

Nos últimos anos, a desidratação de alimentos vem sendo tema de inúmeros trabalhos de pesquisa, com foco em métodos que sejam de baixo custo e conservem, ao máximo, as características sensoriais e nutritivas do produto (Mota, 2005). A preservação de alimentos por secagem, utilizada desde a antiguidade (Greensmith, 1998), baseia-se no fato de que a atividade de água dos produtos afeta de maneira decisiva o seu período de conservação e influencia diretamente a sua qualidade (Lenart, 1996). A remoção, parcial ou total, de água de um alimento inibe o crescimento de microrganismos contaminantes, previne reações bioquímicas responsáveis pela deterioração e implica em menores custos de transporte, embalagem e estocagem, constituindo um método importante para prolongar a vida útil de diversos produtos (Park et al., 2002).

Um método que está ganhando interesse como alternativa à redução das perdas pós-colheita é a desidratação osmótica. O processo tem baixo custo energético, comparado ao de outros métodos de desidratação, além de adequar-se a todas as escalas de produção (Sousa et al., 2003a; 2003b). Também denominada desidratação por imersão e impregnação (DII), esta técnica consiste em desidratar frações do alimento pela sua imersão em soluções concentradas de solutos, geralmente açúcares, sob condições controladas de temperatura, tempo e agitação (Torreggiani, 1993). O processo gera produtos com melhores características sensoriais, nutritivas e funcionais, quando comparados com os obtidos por secagem convencional (Brandão et al., 2003) e tem se apresentado como uma prática tecnológica para a obtenção de produtos derivados de frutas com maior valor agregado (Torreggiani e Bertolo, 2001).

O método de desidratação osmótica promove a remoção parcial de água do alimento por diferença de potencial osmótico (Mota, 2005). É geralmente usado como um pré-tratamento para alguns processos convencionais, a fim de melhorar a qualidade do produto final, reduzir custos de energia ou mesmo formular novos produtos (Serenio et al. 2001; Souza-Neto et al., 2004; Gomes et al., 2007). É empregado como etapa anterior a processos de liofilização, secagem em microondas, secagem a vácuo, secagem com ar quente e na obtenção de frutas

tropicais com alta umidade (Mastrangelo et al., 2000; Sereno et al., 2001). Como a redução da disponibilidade de água no alimento não é, na maioria dos casos, suficiente para garantir a estabilidade do produto durante a estocagem, há a necessidade de emprego de um processo subsequente de estabilização.

Durante a imersão do alimento na solução concentrada de soluto, três tipos de transferência de massa, são verificados: (1) fluxo de água do produto para a solução; (2) transferência de soluto da solução para o produto; (3) saída de solutos do próprio alimento para a solução. Este último tipo é caracterizado pela perda de compostos como açúcares, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas e outros para a solução osmótica. No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados na tentativa de identificar e quantificar aqueles que, efetivamente, são lixiviados para a solução durante o tratamento osmótico (Dalla Rosa e Giroux, 2001; Dionelo et al., 2007; Queiroz et al., 2007).

Durante o processo de desidratação osmótica, a complexa estrutura da parede celular dos alimentos age como uma membrana semipermeável, não completamente seletiva aos íons e compostos presentes tanto na solução osmótica quanto no interior do alimento. Diferentes mecanismos de transporte estão envolvidos na desidratação osmótica, como osmose, difusão, mecanismos hidrodinâmicos (HDM), penetração e outros fenômenos específicos. O resultado desse processo é a redução do teor de água do alimento, com concomitante aumento de sua massa seca e mudança na composição química (Lenart e Piotrowski, 2001).

Em uma situação osmótica ideal, uma membrana semipermeável é permeável às moléculas do solvente, mas não às do soluto. Em frutas ou vegetais, as membranas adjacentes às paredes celulares são unidades biológicas vivas, compostas principalmente por células do parênquima, as quais podem encolher ou expandir-se sob a influência do crescimento da planta e da pressão de turgor geradas no interior das células. Estas membranas permitem que as moléculas do solvente migrem livremente para o interior da célula, mas limitam a passagem das

moléculas do soluto. Este tipo de membrana pode ser classificado como de permeabilidade diferenciada, ao invés de semipermeável (Torreggiani, 1993).

O fenômeno de transferência de massa que acontece entre o produto e o meio osmótico é amplamente afetado pelas variáveis do processo, as quais estão associadas tanto à natureza da matéria-prima quanto às condições operacionais empregadas. Interferem no desempenho da desidratação a espécie utilizada, a variedade, o grau de maturação e a forma e tamanho do alimento a ser seco. O processo também é afetado pela composição e concentração da solução osmótica, temperatura e tempo de contato da fração sólida com o xarope, razão massa de meio/produto e utilização ou não de pré-tratamentos (Torreggiani, 1993; Lenart e Pietrowsk, 2001; Queiroz et al., 2007).

A composição e a concentração da solução osmótica empregada na desidratação osmótica é, segundo Torreggiani (1993), um dos fatores chave para o sucesso do processo. As principais exigências para que um soluto possa ser usado como agente osmótico são as seguintes: apresentar alta solubilidade em água, baixo custo e efeito positivo sobre as propriedades sensoriais e a estabilidade final do produto. Durante a desidratação, a cinética de remoção de água, o ganho de sólidos e o teor de água na condição de equilíbrio são fortemente afetados pelo tipo de agente osmótico, sua concentração, massa molecular e comportamento iônico (Singh et al., 2007). Segundo Queiroz et al. (2007), o tipo de açúcar utilizado no preparo do xarope afeta expressivamente a cinética de remoção de água e o ganho de sólidos pela fruta. Sacarose e cloreto de sódio têm sido os agentes osmóticos mais utilizados nos estudos sobre este processo de desidratação, mas qualquer soluto com alta solubilidade, como glicose, ou solvente miscível em água, como etanol, pode ser destinado ao preparo da solução de imersão (Raoult-Wack, 1994). Além de sacarose, tanto a glicose quanto os xaropes de amido (mistura de glicose, maltose e maltooligosacarídeos) destacam-se como substâncias com grande potencial para o processo. São citados também os xaropes de glicose ricos em frutose, o açúcar invertido, a frutose, a lactose e polióis como sorbitol, manitol e xilitol (Souza-Neto et al., 2004). De acordo com Torreggiani (1993), o aumento da massa

molecular do agente osmótico leva a uma diminuição no ganho de sólidos e um aumento na perda de água, favorecendo, assim, a redução de massa e o processo de desidratação. A impregnação do alimento com o soluto é, de forma contrária, favorecida com o uso de açúcares com menor massa molecular, como glicose, frutose e sorbitol, em função da maior velocidade de penetração das moléculas no produto (Torreggiani, 1993; Raoult-Wack, 1994). Agnelli et al. (2005), ao estudar a desidratação osmótica de peras e maçãs utilizando sacarose e glicose como agentes osmóticos (69 e 47 °Brix, respectivamente), observaram que a penetração de glicose foi maior que a da sacarose, apesar da maior concentração da solução de sacarose. Portanto, O ganho de sólidos é altamente favorecido pela diminuição do tamanho das partículas (Lenart e Grodecka, 1989).

Com relação à concentração da solução, a transferência de massa é favorecida pelo uso de xaropes altamente concentrados (Souza-Neto et al., 2004), e até certo ponto, pela redução do tamanho das frações da fruta a ser desidratada. Por outro lado, soluções de sacarose, por exemplo, com concentrações maiores que 75 °Brix são difíceis de serem preparadas. A menor solubilidade e a alta viscosidade dificultam sua manipulação e o processo de agitação (Sousa et al., 2003a). O aumento da concentração da solução proporciona uma maior perda de água e, desse modo, uma maior perda de massa pela fruta (Fito et al., 1998). Lima et al. (2004) mostraram que o aumento da concentração da solução de 55 para 60 e 65 °Brix, na desidratação de melão, promoveu um aumento na taxa de perda de água durante o processo, devido ao aumento na pressão osmótica no exterior da fruta. O uso de soluções osmóticas concentradas pode reduzir as perdas de solutos hidrossolúveis, como o ácido ascórbico, mediante formação de uma camada periférica concentrada em soluto, prevenindo o arraste dos mesmos (Raoult-Wack, 1994). No entanto, em baixas concentrações, o ganho de soluto (impregnação) é maior que a perda de água, atingindo um valor máximo antes de diminuir e tornar-se consideravelmente inferior à perda de água (desidratação), para concentrações elevadas (Dionello et al., 2007).

A razão produto:solução (p:p) representa também uma importante variável do processo de desidratação osmótica. De modo geral, a fim de assegurar uma taxa constante de troca de água/soluto é preferível trabalhar com alta razão alimento:solução, por exemplo 1:5 (Dalla Rosa e Giroux, 2001). Proporções mais baixas, na faixa de 1:10 a 1:20, são utilizadas na maioria dos trabalhos em laboratório, de forma a minimizar a variação da composição da solução, mas para aplicações industriais esta razão deve ser a mais alta possível, a fim de reduzir os custos de produção (Raoult-Wack, 1994). A proporção produto:solução está também relacionada à eficiência do processo e interfere na perda de água e ganho de sólidos (Sousa et al., 2003a, 2003b; Souza-Neto et al., 2004; Lima et al., 2004).

As temperaturas mais comumente utilizadas para a desidratação osmótica estão compreendidas no intervalo de 25 a 60 °C (García-Martínez et al., 2002; Peiró et al., 2006; Dionello et al., 2007; Peiró-Mena et al., 2007; Queiroz et al., 2007, 2008; Singh et al., 2007). As taxas de transferência de massa (perda de água e ganho de sólidos) aumentam com o aumento da temperatura (Raoult-Wack, 1994) e quanto mais alta a temperatura, maiores serão as perdas dos componentes nutricionais, as alterações da cor e da estrutura do alimento (Dhingra et al., 2008). Segundo Torreggiani (1993), temperaturas acima de 45 °C podem implicar em escurecimento enzimático e deterioração do sabor do alimento, enquanto temperaturas acima de 60 °C levam a modificação no tecido da fruta, favorecendo a impregnação e o ganho de sólidos.

Ao estudar a cinética de desidratação osmótica em cubos de pêra, em soluções de sacarose de 40, 55 e 70 °Brix e temperaturas de 40, 50 e 60 °C, Park et al. (2002) observaram que a perda de água e o ganho de sólidos aumentaram com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração da solução de sacarose, em experimentos independentes. No entanto, ao utilizar a temperatura mais elevada (60 °C), o aumento da concentração da solução osmótica não influenciou a taxa de transferência de massa. Ramallo e Mascheroni (2005) analisaram o efeito da temperatura (30, 40 e 50 °C) sobre a perda hídrica, o ganho de soluto e a perda de sacarose, glicose e frutose, especificamente, durante a desidratação osmótica de

abacaxi. Quando a temperatura foi aumentada de 30 para 50 °C houve um aumento de 3,8 e 2,8 vezes, respectivamente, na perda de água e de sacarose da fruta para a solução. As perdas de glicose e frutose também aumentaram com o aumento da temperatura.

A maior limitação para a prática da desidratação osmótica em escala industrial é a grande quantidade de solução osmótica liberada após o processamento, a qual é geralmente descartada, aumentando assim o custo dos produtos osmo-desidratados (Peiró et al., 2006). No entanto, este resíduo possui elevado valor energético, além dos nutrientes nobres lixiviados do alimento imerso na solução, tais como vitaminas e minerais (Queiroz et al., 2008). Diferentes alternativas têm sido propostas para contornar esta situação, incluindo a reutilização do xarope residual, sem qualquer tipo de tratamento, em ciclos sucessivos de desidratação ou a sua utilização como ingrediente na formulação de outros produtos (García-Martínez et al., 2002; Peiró et al., 2006; Peiró-Meina et al., 2007).

Queiroz et al. (2008) mostraram que na desidratação osmótica de goiabas houve redução significativa no teor da maioria dos minerais analisados. Os autores testaram xarope de açúcar invertido e de sacarose, em diferentes concentrações (0,3, 0,4 e 0,5 g.mL⁻¹), verificando que o primeiro foi menos eficiente na manutenção dos minerais na fruta, com exceção de K⁺. A solução de sacarose a 0,5 g.mL⁻¹ provocou maior redução nos teores de K⁺ e Mg²⁺ que a solução a 0,3 g.mL⁻¹ e maior redução no teor de K⁺ e menor no de Zn²⁺ que a diluição a 0,4 g.mL⁻¹. Peiró et al. (2006), trabalhando com desidratação osmótica de *grapefruit*, mostraram que há perda dos ácidos ascórbico, cítrico e galactônico, além de minerais, da fruta para a solução osmótica residual. Em trabalho com desidratação osmótica de abacaxi, Peiró-Meina et al. (2007) observaram que Mg²⁺, P⁵⁻ e Ca²⁺ foram encontrados na solução osmótica residual após 15 ciclos de desidratação utilizando a mesma solução.

2.2 - O fruto do abacaxizeiro

O abacaxi [*Ananas comosus* (L) Merrill] é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae (Cunha e Cabral, 1999). Constitui uma fruta das regiões tropicais e subtropicais, mas é consumida em praticamente todo o mundo, tanto ao natural quanto na forma de produtos industrializados (Antoniali e Sanches, 2008).

Em 2006, a produção mundial de abacaxi foi próxima de 18,2 milhões de toneladas, com 60% deste total concentrados em seis principais países: Tailândia (15%), Brasil (14%), Filipinas (10%), China (8%), Índia (7%) e Costa Rica (7%). No Brasil, a cultura é economicamente explorada na maioria dos Estados, onde encontra excelentes condições para o seu desenvolvimento e produção, contribuindo de maneira importante para a geração de renda e emprego (Antoniali e Sanches, 2008).

No mercado nacional, o abacaxi respondeu, em 2006, por 5,2% do valor da produção de frutíferas. As regiões Nordeste e Sudeste destacaram-se como as principais produtoras. Entre os estados, o Pará foi o primeiro colocado, com 20,8% da produção nacional da fruta (IBGE, 2007). O Pará também manteve a liderança em 2007, seguido dos estados de Paraíba, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Rio Grande do Norte e Tocantins (IBGE, 2007). O Rio de Janeiro é o oitavo colocado na produção do fruto, com destaque para a região Norte Fluminense. O Município de São Francisco do Itabapoana responde por 90% do cultivo no estado.

As cultivares Smooth Cayenne e Pérola lideram o mercado brasileiro, sendo esta última muito apreciada para o consumo tanto in natura como industrializada, em função da ótima qualidade sensorial. Há, no entanto, um amplo predomínio da cultivar Pérola, variedade quase que exclusivamente brasileira e que representa aproximadamente 80% da produção nacional. A cultivar Smooth Cayenne, conhecido também por abacaxi havaiano, é o mais plantado no mundo, correspondendo a 70% da produção mundial. Suas características de sabor e aroma, com um bom equilíbrio entre acidez e açúcar, a tornam muito apreciada nas regiões produtoras e nos países importadores (Antoniali e Sanches, 2008).

O fruto do abacaxizeiro fornece uma grande diversidade de sais minerais e vitaminas, e um teor considerável de fibras dietéticas, por volta de 1,4%. Entre os sais minerais, destaca-se o potássio. Com relação às vitaminas, uma fatia de 150 g fornece mais do que 7% do recomendado internacionalmente para ingestão diária das vitaminas B1 e B2 (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006). O teor de vitamina C é, no entanto, pequeno em relação a outras fontes, e as concentrações de proteína e de matéria graxa são inferiores a 0,5%. Porém, em função de sua atividade proteolítica, o abacaxi se constitui em coadjuvante da digestão dos alimentos, ao mesmo tempo em que é matéria-prima para a extração da enzima bromelina, de larga aplicação na indústria de alimentos (Matsuura e Rolim, 2002).

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram dados do valor nutricional do abacaxi variedade Pérola em termos de macronutrientes, minerais e vitaminas, respectivamente, segundo a Tabela TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, de 2006, publicada pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da UNICAMP (NEPA, 2007).

Tabela 1 - Valor nutricional, em macrocomponentes, de abacaxi.

Nutriente	Quantidade (g por 100 g de porção comestível)
Água	86,3
Proteína	0,9
Lipídeos (total)	0,1
Carboidratos por diferença	12,3
Fibra dietética (total)	1,0
Cinzas	0,4

Fonte: TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006.

Tabela 2 - Valor nutricional, em minerais, de abacaxi.

Nutriente	Quantidade (mg por 100 g de porção comestível)
Cálcio, Ca	15
Ferro, Fe	0,5
Magnésio, Mg	18
Fósforo, P	8
Potássio, K	104,1
Sódio, Na	10,6
Zinco, Zn	0,08
Cobre, Cu	0,15
Manganês, Mn	1,23

Fonte: TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006.

Tabela 3 - Valor nutricional, em vitaminas, de abacaxi.

Nutriente	Quantidade (µg por 100 g de porção comestível)
Vitamina C, Ácido Ascórbico	27,2
Tiamina (B-1)	80
Riboflavina (B-2)	128
Niacina	0,82
Retinol	5

Fonte: TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006

2.3 - *Bacillus thuringiensis*

2.3.1 – Atividade entomopatogênica

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria de solo, gram-positiva, em forma de bastonete, formadora de esporos, anaeróbica facultativa, que se destaca pela capacidade de sintetizar um cristal protéico, adjacente ao esporo, responsável pela ação tóxica contra insetos susceptíveis (Stahly et al., 1990; Xiaoyan et al., 2005). Esta particularidade confere a esta espécie uma característica entomopatogênica que a diferencia de todas as demais espécies de *Bacillus* (Bulla et al., 1985; Yang e Wang, 1998), tendo sido constatada toxicidade sobre diversas espécies de insetos, incluindo pragas agrícolas e vetores de doenças em seres humanos (Lacey et al., 2001).

O cristal protéico depositado nas células de *Bt* durante a esporulação é composto por distintas proteínas, denominadas coletivamente δ -endotoxinas ou proteínas Cry, sendo, na verdade, uma pró-toxina. Ao ser ingerido pela larva é solubilizado pelas proteases do seu intestino, com conseqüente liberação das toxinas na sua forma ativa (Schnepf et al., 1998). As proteínas que constituem este cristal apresentam massas moleculares que variam entre 60 e 160 kDa. São constituídas de duas partes distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal, mais conservada entre as proteínas, associada geralmente à formação do cristal (Cooper, 1994; Schnepf et al., 1998). Cada variedade de *Bt* produz um tipo de toxina que é ativo contra um limitado grupo de insetos e esta especificidade deve-se, principalmente, à sua estrutura química formada por diferentes polipeptídeos (Höfte e Whiteley, 1989). Ressalta-se que a especificidade das proteínas é o resultado da eficiência de várias etapas envolvidas na produção das toxinas ativas e suas subseqüentes interações com as células do epitélio do trato digestivo dos insetos alvos (Koziel et al., 1993). Esta característica foi um fator determinante para a exploração desta bactéria como agente de controle biológico (Knowles, 1994).

A ação das δ -endotoxinas é iniciada quando um inseto suscetível ingere cristais de *Bt*, os quais, após a solubilização, resultam peptídeos que formam poros na membrana do epitélio intestinal e desestabilizam o gradiente osmótico e iônico. A maioria das pró-toxinas conhecidas precisa ser clivada por proteases intestinais para tornarem-se fragmentos ativos. Uma vez ativos estes fragmentos ligam-se a receptores específicos do epitélio do intestino médio do inseto. Como consequência, ocorre a deformação das células epiteliais e a desintegração da membrana microvilar, o que acarreta danos irreversíveis no intestino, culminando com a morte do inseto poucas horas após a ingestão (Gill et al., 1992; Knowles, 1994; Glare e O'Callaghan, 2000).

As doenças causadas por mosquitos vetores, dentre elas malária e dengue, constituem doenças epidêmicas em várias partes do mundo, levando as autoridades de Saúde Pública a adotar diversas estratégias para o seu controle. Algumas pragas agrícolas também causam prejuízos anuais severos em várias partes do mundo (Polanczyk et al., 2003). O controle destes vetores e pragas vem sendo feito há algumas décadas com a utilização de inseticidas químicos sintéticos, proporcionando a redução das populações nas áreas tratadas. No entanto, o uso intensivo deste tipo de inseticida tornou-se problemático devido a diversos fatores, incluindo a resistência fisiológica dos vetores, a poluição ambiental que resulta na contaminação de alimentos e o efeito prejudicial sobre insetos que possuem um papel benéfico para o homem (Poopathi et al., 2002). O mercado mundial de inseticidas chega a gastar 6 a 8 bilhões de dólares anuais para controlar diversos vetores de doenças tropicais e para controlar as pragas na agricultura. Os bioinseticidas representam apenas 2 a 2,5 % deste total (Petry et al., 2004), o que têm impulsionado os investimentos em pesquisa científica nos últimos anos para o desenvolvimento e o emprego de agentes biológicos como alternativa para o controle de vetores (Polanczyk, 2003).

A formulação de inseticidas com linhagens de *B. thuringiensis* apresenta diversas vantagens sobre os inseticidas químicos, destacando-se a enorme especificidade contra larvas dos insetos alvos, não havendo risco de intoxicação para insetos benéficos, plantas e animais vertebrados, incluindo seres humanos. (Höfte e

Whiteley, 1989; Aronson, 1993; Polanczyk, 2003). Além disso, *Bt* atua apenas sobre a forma larval do inseto, sendo uma alternativa para resolver o problema do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos susceptíveis (Schnepf et al., 1998).

A descoberta de *B. thuringiensis*, no início do século XX, representou uma alternativa importante para o controle de insetos prejudiciais. As primeiras tentativas de sua utilização como bioinseticida surgiram na década de 30, primordialmente para controle de pragas agrícolas (Stahly et al., 1990). *B. thuringiensis*. var. *israelensis* foi isolado em Israel, em 1976, e a descoberta teve grande repercussão no meio científico. Esta variedade era distinta de todas as demais já isoladas, uma vez que apresentava toxicidade para espécies de dípteros de importância sanitária (De Barjac, 1978; Glare e O'Callaghan, 1998). A ação tóxica é altamente específica contra culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, vetores de doenças como a dengue, a elefantíase e a malária, respectivamente, e simulídeos do gênero *Simulium*, transmissores de vírus, protozoários e filárias (Gill et al., 1992; Polanczyk, 2003). Dentre estas, a dengue ameaça bilhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo (Tauil, 2002, Poophathi et al., 2002; Petry et al., 2004).

Apesar do emprego dos inseticidas biológicos ser ainda muito inferior ao dos inseticidas químicos sintéticos, produtos à base de *Bt* constituem cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas comerciais. A segurança para o meio ambiente e os menores custos para o desenvolvimento e registro destes produtos favorecem, também, o contínuo aumento de sua utilização para o controle de pragas e vetores (Petry et al., 2004). O custo de desenvolvimento de formulações baseadas em *Bti*, por exemplo, é de 1/40 daquele necessário para formular um novo inseticida químico sintético (Schnepf et al., 1998).

2.3.2 - Formulações de meios para cultivo de *B. thuringiensis*

A composição do meio de cultivo é um dos fatores mais importantes para a otimização do processo fermentativo de produção de bioinseticidas à base de *Bt*. Os

meios devem conter uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais específicos, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de δ -endotoxina (Bernhard e Utz, 1993). Embora a síntese do cristal protéico esteja intrinsecamente ligada ao processo de esporulação, diversos autores sustentam que elevadas concentrações de esporos não implicam necessariamente em alta atividade tóxica do meio fermentado (Morris et al., 1996; Schnepf et al., 1998; Lacey et al., 2001). De acordo com Yang e Wang (1998), para aperfeiçoar a composição dos meios de cultivo é preciso investigar separadamente as três fases gerais do desenvolvimento da bactéria: o crescimento vegetativo, a esporulação e a lise celular.

A maioria dos meios de cultivo testados para a produção de *Bt* em escala laboratorial permite obter concentrações de células entre 1×10^8 e 1×10^9 ufc/mL, com taxas de esporulação variáveis. Em formulações de meio empregadas para a produção em larga escala são obtidas, entretanto, concentrações celulares de até 5×10^9 ufc/mL e taxas de esporulação superiores a 90% (Bernhard e Utz, 1993).

O uso de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo pode influenciar o crescimento de *Bt* (Maldonado-Blanco et al., 2003), assim como a produção de endotoxinas (Yang e Wang, 1998; Sachidanandham et al., 1997; Özkan et al., 2003; Panarotto, 2006).

Na maior parte dos trabalhos já realizados com a bactéria, glicose foi empregada como fonte de carbono e energia, mesmo quando polissacarídeos oriundos de resíduos agroindustriais foram utilizados no processo (Salama et al., 1983; Avignone-Rossa e Mignone, 1993; Saksinchai et al., 2001; Khuzhamshukurov et al., 2001; Chen et al., 2003). Segundo Stahly et al. (1990), além de glicose, algumas linhagens de *Bt* podem metabolizar outros carboidratos, incluindo sacarose, frutose, lactose, galactose e maltose. Ao avaliar o desempenho de *Bti* em meios contendo glicose, sacarose ou maltose, nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L, Panarotto (2006) verificou que as maiores concentrações celulares foram obtidas nos meios com glicose, mas a concentração de esporos foi semelhante em todas as demais condições. No meio com lactose não houve uma expressão favorável das

endotoxinas, ao contrário do verificado para glicose e sacarose. Sachidanandham et al. (1997) realizaram ensaios em sistema descontínuo, em biorreator de bancada, a fim de selecionar a fonte de carbono mais apropriada para o cultivo de *Bt* var. *galleriae*, sendo testados glicose, maltose, frutose, galactose, lactose e sacarose. Glicose foi o carboidrato mais eficiente para o cultivo, seguido de maltose, frutose, galactose, sacarose e lactose. Pessanha (2008) verificou maiores concentrações de células e de esporos no cultivo de *Bti* em meios com glicose ou frutose, mas em meios com sacarose foram obtidas taxas de esporulação elevadas e análogas às obtidas com estes carboidratos.

Arcas et al. (1987) relatam que, em muitos casos, elevadas concentrações de nutrientes são necessárias para a obtenção de altas concentrações de esporos e do cristal protéico. Ao avaliar a influência de diferentes concentrações de açúcar no crescimento e na esporulação de *Bt* var. *kurstaki* estes autores concluíram que a produção de biomassa foi comprometida quando se aumentou a concentração de açúcar de 10 para 56 g/L. Berbert-Molina et al. (2008) verificaram, por outro lado, que concentrações de glicose de até 75 g/L não afetam as máximas velocidades específicas ($\mu_{x,m}$) de crescimento de *Bti*. Com concentrações mais elevadas (100 e 150 g/L), os valores de $\mu_{x,m}$ foram reduzidos e grande parte do açúcar não foi consumido, mas as concentrações celulares finais não foram afetadas. Ao realizar um pulso de nutrientes no curso do processo, o crescimento foi retomado e toda a glicose foi consumida, levando a uma concentração muito superior de biomassa.

A fonte de nitrogênio mais utilizada em meios para a fermentação com *Bt* é o extrato de levedura (Sikdar et al., 1991; Vallejo et al., 1999, Anderson e Jayaraman, 2003). Este subproduto é composto por material protéico (73-75%), aminoácidos livres e oligopeptídeos de diferentes massas moleculares, além de vitaminas, sais minerais e polissacarídeos, predominantemente mananas e glicanas (Sommer, 1996; Sacksinchai et al., 2001). Porém, o emprego de extrato de levedura em processos industriais de fermentação é limitado devido ao seu alto custo.

Alguns autores relatam que, além de uma fonte de nitrogênio orgânico, a presença de uma fonte de nitrogênio inorgânico é essencial para o desenvolvimento

do processo (Farrera et al., 1998; Saksinchai et al., 2001; Anderson e Jayraman, 2003). O sal sulfato de amônio é utilizado na composição da maioria dos meios de cultivo em estudo das diferentes variedades de *Bt*: *Bt* var. *kurstaki* (Kang et al., 1992; Saksinchai et al., 2001), *Bt* var. *israelensis* (Mignone e Avignone-Rossa, 1996), *Bt* var. *galleriae* (Anderson e Jayraman, 2003), *Bt* var. *darmstadiensis* (Wu e Chen, 2001). Rodrigues (2006) demonstrou que nitrato de amônio interfere negativamente no crescimento de *Bti*, enquanto citrato de amônio e ferro III favorecem a produção de biomassa e a esporulação da bactéria. A esporulação foi inibida quando cloreto de amônio foi usado como fonte inorgânica de nitrogênio.

Íons metálicos como Ca^{+2} , Mn^{+2} , K^+ e Mg^{+2} são considerados importantes e essenciais no cultivo de *Bt* (Yang e Wang, 1998). Bernhard e Utz (1993) destacam a importância dos íons Ca^{+2} e Mn^{+2} na esporulação da bactéria, mas, de acordo com dados de Pessanha (2005), estes íons influenciaram negativamente o crescimento de *Bti* em meios formulados com caldo de cana-de-açúcar. De acordo com Yao et al. (2002, 2003), os íons Mn^{+2} e Cu^{+2} atuam como elementos-traço essenciais, podendo estimular ou inibir o crescimento de *Bt* de acordo com as concentrações empregadas. İçgen et al. (2002a) mostraram que a presença de Zn^{+2} e Ca^{+2} no meio de cultivo auxilia a produção de toxina. Sikdar et al. (1991) destacam que, para a produção de toxinas, a concentração ideal dos sais K_2HPO_4 , MgSO_4 e CaCO_3 é de 1g/L, 0,3g/L e 1g/L, respectivamente. Obeta e Okafor (1984) relatam que a presença de íons K^+ é essencial para a formação do cristal protéico. Wakisaka et al. (1982) destacam também que este íon desempenha um papel fundamental na esporulação da bactéria.

Hassen et al. (1998) testaram metais pesados como Hg, Cr, Cd e Co em meios de cultivo para *Bti* e mostraram que o uso de concentrações de 0,2, 0,5 e 1 mM não afetou a biossíntese de toxina pela bactéria. Por outro lado, o uso de 0,1 mM de Co levou a uma inibição significativa da síntese de toxinas. Rodrigues (2006) verificou que a presença de íons Fe^{+2} no meio favorece claramente o crescimento e a esporulação de *Bti*, sendo o cátion férrico mais adequado que o cátion ferroso para a obtenção de maiores concentrações finais de células e esporos. Altas concentrações

de Cl^- , segundo o autor, interferem negativamente na produção de esporos e íons Mo^{+6} , ao contrário, afetou de forma negativa o crescimento e não a esporulação. Sikdar et al. (1991) mostraram, no entanto, que o Mo^{+6} exerce um papel inibidor na síntese de toxina.

A produção comercial de bioinseticidas à base de *Bt* é feita em fermentação submersa conduzida em sistema descontínuo, utilizando-se meios complexos (Rowe e Margaritis, 2003). De acordo com Winkler (1983), os custos do meio de cultivo podem representar até $\frac{3}{4}$ dos custos operacionais dos processos fermentativos industriais, o que leva as indústrias de fermentação a investigarem continuamente fontes alternativas de nutrientes que, além de satisfazer as necessidades nutricionais do microrganismo empregado, faz com que sejam as mais baratas possíveis.

Diversas matérias-primas e substratos não refinados e de baixo custo têm sido avaliados como fontes alternativas de nutrientes para este processo fermentativo, principalmente resíduos da agroindústria (Saksinchai et al., 2001). Dentre estes, são citados farelo e farinha de soja (Abdell-Hameed et al., 1990; Farrera et al., 1998; Vidyarathi et al., 2002), água de maceração de milho (*corn steep liquor*) (Liu e Bajpai, 1995; Abdell-Hameed et al., 1990; Maldonado-Blanco et al., 2003), levedura de cervejaria (Saksinchai et al., 2001), soro de queijo (Alves et al., 1997; Abdell-Hameed et al., 1990), extrato de batata (Salama et al., 1983; Poopathi et al., 2002), batata-doce (Salama et al., 1983), melaço de cana-de-açúcar (Abdell-Hameed et al., 2001; Maldonado-Blanco et al., 2003; Ramada, 2008), farinha de peixe (Salama, 1983), farinha desengordurada de semente de algodão, linho e amendoim (Vora e Shetna, 1999) e trigo (Vimala Devi et al., 2005). Caldo de cana-de-açúcar foi testado por Pessanha (2005, 2008) demonstrando grande potencial para o cultivo de *Bti*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Agrícola (LEAG), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), com a colaboração do Laboratório de Biotecnologia (LBT), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

3.1 – Obtenção da solução osmótica residual

3.1.1 – Obtenção dos frutos

Para a realização dos experimentos de desidratação, foram utilizados abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) da variedade Smooth Cayenne comercializados no município de Campos dos Goytacazes. Ao chegar ao laboratório, os frutos foram selecionados e separados a fim de homogeneizar o lote de acordo com atributos de qualidade, como cor, grau de maturação e ausência de injúrias ou doenças. Os frutos foram caracterizados quanto à massa, altura e diâmetro. Depois de selecionados, os frutos foram armazenados em câmaras do tipo BOD, a 8 °C por um dia, sendo retirados apenas no momento da realização dos experimentos.

3.1.2 – Preparo dos frutos para a desidratação osmótica

Após a retirada das coroas, os frutos foram higienizados por lavagem em água corrente, imersos em solução de detergente comercial neutro por 15 min, sanitizados em água clorada (8 a 10 ppm de cloro ativo) por 10 min e enxaguados com água destilada.

Depois de serem descascados, os frutos foram cortados manualmente em formato de coroa circular com 10 mm de espessura. Amostras representativas do lote foram trituradas para análise de pH e sólidos totais (° Brix).

3.1.3 – Branqueamento dos frutos

A fim de evitar o escurecimento enzimático, as amostras foram submetidas ao processo de branqueamento, por exposição das fatias ao vapor d'água por 1 min. Para a realização do processo, um béquer de 1.000 mL, contendo cerca de 400 mL de água destilada, foi colocado sobre uma chapa aquecedora/agitadora (VELP SCIENTIFIC modelo ARE) com temperatura controlada para permitir a fervura da água. As fatias de fruta foram colocadas sobre tela de alumínio e estas sobre a parte superior do béquer, permitindo o contato da fruta com o vapor. Após o aquecimento, as fatias foram colocadas em sacos plásticos e resfriadas em banho de gelo por 1 min, sendo, em seguida, colocadas em solução de ácido ascórbico a 1%, por 5 min, para evitar o escurecimento não enzimático.

Embora não tenha sido objetivo do trabalho avaliar o produto final da desidratação, a etapa de branqueamento foi feita para simular as condições operacionais em uma eventual escala industrial. A finalidade foi evitar que produtos relacionados às reações de escurecimento da fruta interferissem na composição da solução osmótica.

3.1.4 – Desidratação osmótica dos frutos

A desidratação foi feita pela imersão das fatias de fruta branqueadas na solução osmótica, em béqueres de vidro de 1.000 mL, dispostos em duas agitadoras-incubadoras de bancada de movimento orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB), com

controle automático de temperatura e frequência de agitação. A solução osmótica, com concentração de 40%, foi preparada com açúcar invertido com grau de inversão maior que 99%. Foi utilizada relação fruta:xarope de 1:5 (p/p), temperatura de 50 °C, frequência de agitação de 60 min⁻¹ e tempo de incubação de 2 h (Queiroz, 2006). O açúcar invertido, com nome comercial Pólen T4, foi fornecido pela empresa SANTELISAVALE[®].

O processo de desidratação foi realizado de uma só vez, em escala adequada para gerar o volume de solução osmótica necessário para a realização de todos os ensaios de fermentação. A solução osmótica residual obtida em cada reator foi colocada em um recipiente plástico, homogeneizada com auxílio de uma colher de aço inox e distribuída em garrafas plásticas de 0,5 L, as quais foram armazenadas a - 20°C até o momento de sua utilização. Os recipientes plásticos foram lavados com detergente neutro e enxaguados com água destilada. Para a realização dos ensaios, uma das garrafas era descongelada, em seguida filtrada e diluída para a concentração a ser aplicada. Após a diluição, a solução osmótica foi autoclavada, separada do meio de cultivo, a 0,5 atm por 15 min.

3.2 – Ensaios de Fermentação

3.2.1 - Microrganismo

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (sorotipo H-14) IPS 82, foi utilizada em todos os experimentos. A cultura foi mantida em superfície de meio sólido inclinado em tubos de ensaio sob refrigeração a 4 °C, repicadas semestralmente.

3.2.2 - Meio de Cultivo

Para manutenção das culturas foi utilizado o meio Agar Nutriente, cuja composição é mostrada na Tabela 4. Os componentes foram dissolvidos em água destilada e levados ao forno de microondas para fusão do agar-agar, sendo o meio acondicionado em tubos de ensaio com rolha de algodão e gaze e autoclavados a

121 °C por 20 min. Os tubos foram resfriados à temperatura próxima a 50 °C, inclinados em ângulo de cerca de 30 °C e deixados em temperatura ambiente até completa solidificação, sendo acondicionados sob refrigeração a 4 °C até o momento da repicagem.

Tabela 4 - Composição do meio de cultivo Agar Nutriente.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne	5,0
Agar-agar	18,0

A composição dos meios de fermentação variou de acordo com o objetivo do ensaio (Item 3.2.3.3). Nos ensaios preliminares (Grupo 1) foram testados os meios SOR₃₀ e SOR-Y₃₀, preparados com solução osmótica diluída para uma concentração inicial de substrato (S_0), expressa como concentração de açúcares redutores totais (ART), de 30 g/L. Para o preparo do Meio SOR₃₀ a solução osmótica foi suplementada com os nutrientes do meio GYS (Rogoff et al., 1969), nas mesmas concentrações previstas em sua formulação original (Tabela 5). O Meio SOR-Y₃₀ foi preparado apenas com a solução osmótica e extrato de levedura (12 g/L).

Nos ensaios do Grupo 2, além do meio SOR₃₀, foram testados os meios SOR₅₀, SOR₇₅ e SOR₁₀₀, nos quais a solução osmótica foi diluída de modo a se obter valores de S_0 de, aproximadamente, 30, 50, 75 e 100 g/L, sendo suplementada com todos os nutrientes de GYS.

No Grupo 3 avaliaram os meios SOR₅₀ e SOR₇₅ com pulso de nutriente no curso do processo, sendo este pulso realizado com uma solução com a mesma composição do meio GYS e concentrações dos nutrientes mais próximos possíveis do meio inicial.

Os inóculos foram preparados com Meio GYS suplementado com 10 g/L de glicose.

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo GYS modificado.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	12,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,12
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
MnSO ₄ .H ₂ O	0,09
K ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	1,5

Nos meios a base de solução osmótica, os componentes de GYS foram autoclavados (1 atm / 20 min) separadamente e adicionados à solução no momento da fermentação.

3.2.3 - Condições de Cultivo

3.2.3.1 - Preparo da cultura estoque

A manutenção das culturas foi feita por semeadura por estria simples em superfície de meio Agar Nutriente em tubos inclinados, incubados a 30 °C por 96 h, tempo suficiente para garantir uma taxa de esporulação superior a 90%. Os tubos foram armazenados a 4 °C.

3.2.3.2 - Preparo do inóculo

Para o preparo de inóculos, frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, cobertos com manta de algodão e gaze, foram inoculados por transferência direta (alçada) com alíquota da cultura estoque. Os frascos foram incubados em incubadora/agitadora de movimento recíproco (NOVA ÉTICA modelo 430 RDB) a 30 °C por 12 h sob agitação de 110 min⁻¹. Uma alíquota desta cultura, correspondente a 5% do volume de meio de fermentação, foi usada para inocular os meios de fermentação.

3.2.3.3 - Ensaios de fermentação

Os ensaios do Grupo 1 foram realizados em frascos agitados, utilizando-se Erlenmeyer de 1.000 mL com 200 mL de meio. Os frascos foram cobertos com manta de algodão e gaze e incubados, após inoculação, em incubadora/agitadora de movimento recíproco (NOVA ÉTICA modelo 430 RDB), a 110 min⁻¹ e 30 °C.

Os ensaios dos Grupos 2 e 3 foram realizados em biorreator de bancada B. BRAUN BIOTECH modelo BIOSTAT B, operado em sistema descontínuo, equipado com controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração, oxigênio dissolvido e nível de espuma. A cuba do fermentador (2 L de volume útil), contendo o meio de fermentação, e já instalados o condensador, os filtros de ar, as sondas para controle no nível de espuma e temperatura e as tubulações de silicone utilizadas para a retirada de amostras e adições de meio, antiespumante e base, foi autoclavada a 121 °C por 20 min. Os eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido foram tratados com álcool etílico 70% (v/v) e enxaguados com água destilada esterilizada antes da instalação na cuba do reator. Utilizou-se volume de meio de 1,5 L. A temperatura foi controlada em 30 °C, a agitação em 600 min⁻¹ e a aeração em 1 vvm. O pH inicial foi corrigido para 7,0 e, durante o processo, foi automaticamente controlado, com adição de KOH 5 M, para não atingir valores inferiores a 5,5. A concentração de oxigênio

dissolvido foi monitorada com o emprego de um eletrodo polarográfico esterilizável (INGOLD, InPro 6000).

O objetivo do primeiro grupo de ensaios foi avaliar o desempenho da bactéria em meios formulados com a solução osmótica residual, suplementada com os nutrientes do meio GYS (meios SOR₃₀ e SOR-Y₃₀), sendo este usado como referência. Os parâmetros para avaliação dos resultados foram as concentrações finais de células e de esporos, além da cinética de crescimento até o início da formação de grumos.

No segundo grupo de ensaios foi avaliada a fermentação dos meios SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅ e SOR₁₀₀, visando estudar o processo em meios com concentrações crescentes de soluto na solução osmótica. Foram quantificadas as concentrações finais de células e de esporos, a taxa de esporulação e a atividade larvicida dos meios fermentados. Foram também analisadas a cinética de crescimento celular e de consumo de substrato e calculados os principais parâmetros de fermentação.

Nos ensaios do Grupo 3 foi avaliada a influência do enriquecimento nutricional do meio de cultivo, feito por um pulso dos nutrientes (meio GYS) ao final da fase de crescimento, tomando-se como base os perfis cinéticos obtidos nos ensaios do Grupo 2. Foram testados, neste caso, os meios SOR₅₀ e SOR₇₅. A solução de nutrientes (extrato de levedura e sais), adicionada automaticamente ao meio de fermentação por meio de uma bomba peristáltica (WATTSON-MARLOW modelo SCI 400), foi preparada de forma que as concentrações de cada componente fossem as mais próximas possíveis daquelas previstas no meio original.

Os ensaios foram realizados em duplicata e o tempo final de fermentação correspondeu ao tempo de 2 h após a total dissociação dos grumos e lise parcial das células esporuladas, parâmetro monitorado por observações de lâminas a fresco de amostras do cultivo em microscópio ótico (JENA, modelo JENAMED 2).

3.3 - Métodos analíticos

3.3.1 - Coleta de amostras

Nos ensaios em frascos agitados, amostras de meio foram coletadas periodicamente, até o início da formação de grumos, para a determinação da concentração celular. Ao final do processo, outra alíquota foi retirada para a contagem do número de células totais e de esporos. Durante todo processo, foram retiradas amostras para a observação da morfologia celular. Os frascos eram retirados da incubadora pelo menor tempo possível e as amostras retiradas com auxílio de um pipetador automático, em cabine de fluxo laminar (PACHANE modelo Classe II – tipo A/B3)

Nos ensaios em biorreator de bancada o sistema utilizado para retirada de amostras consistiu em um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situava-se próxima ao fundo da cuba, conectado a uma mangueira de silicone que, após passagem por uma bomba peristáltica (WATTSON-MARLOW modelo SCI 400), retornava à cuba do biorreator. O meio de fermentação foi circulado por cerca de 2 min por este sistema a fim de remover resíduos de amostras anteriores. As amostras foram retiradas com seringa e agulha descartáveis, através de um septo de silicone adaptado à tubulação. Foram analisadas a concentração celular, o consumo de substrato e a morfologia celular ao longo de todo o processo. Amostras do tempo final de fermentação foram acondicionadas em tubos de plástico e armazenadas sob congelamento para posterior análise da atividade larvicida.

3.3.2 - Morfologia celular

As variações da morfologia celular ao longo da fermentação foram acompanhadas pela observação de preparações a fresco do meio fermentado em microscópio de contraste de fase (JENA modelo Jenamed 2) com aumento de 400x. Neste método, os materiais mais densos aparecem claros, ao passo que parte das células que têm densidade próxima à da água (como o citoplasma) aparecem escuras, tornando possível a análise da estrutura celular sem utilizar corantes ou matar o organismo (Pelczar et al., 1996). As preparações a fresco são especialmente úteis para a observação de aspectos relativos à motilidade do microrganismo e ao processo de esporulação, características inerentes à espécie *Bti*. As células

esporuladas e os esporos de *Bti* são perfeitamente visíveis nas condições utilizadas no preparo das lâminas, o que tornou possível a contagem em Câmara de Neubauer (Item 3.3.4).

3.3.3 - Concentração celular

A concentração celular nas primeiras horas do cultivo foi quantificada indiretamente pela medida da absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, convertida em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por uma equação que descrevia o trecho linear de uma curva de calibração. Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células de *Bti* produzida em meio GYS, nas mesmas condições adotadas para os ensaios de fermentação, conforme o seguinte procedimento (Berbert-Molina, 1998):

- 30 mL do meio fermentado foram centrifugados a 12.000xg por 15 min a 10 °C (Centrífuga Eppendorf modelo 5804R), descartando-se o sobrenadante;
- O *pellet* foi homogeneizado em água destilada e centrifugado nas mesmas condições, sendo esta operação repetida duas vezes;
- As células foram transferidas para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, os quais foram colocados em estufa a 85 °C por 24h;
- Após resfriamento por 20 min em dessecador, os cadinhos foram pesados e a concentração celular foi calculada dividindo-se a massa seca de células pelo volume inicial de meio fermentado;
- Paralelamente às operações de determinação da massa seca de células, a absorbância das amostras, convenientemente diluídas, foi medida a 610 nm em espectrofotômetro MICRONAL modelo B582;
- A absorbância de cada uma das suspensões de células foi correlacionada com a concentração celular correspondente e, com os pontos do trecho linear da reta obtida, foi definida a equação, por regressão linear, a ser utilizada no cálculo da concentração celular das amostras de fermentação durante os diferentes ensaios.

A partir do início da floculação da cultura, a medida da concentração celular foi feita diretamente por gravimetria, seguindo o mesmo procedimento usado nos quatro primeiros passos descritos.

3.3.4 - Contagem de células e esporos

O número de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) ao final da fermentação foram obtidos por contagem em câmara de Neubauer. Alíquotas de 10 μ L de meio fermentado, convenientemente diluídas em solução salina, foram aplicadas sobre a superfície da câmara, cobertas com lamínula e observadas em microscópio de contraste de fase (JENA mod. Jenamed 2) com aumento de 400x. A partir dos valores obtidos na contagem de 16 campos, foram calculados o número total de células (CT), o número total de esporos (ET) e a taxa de esporulação (T_{SP}), levando-se em conta as diluições utilizadas para cada amostra. Para cada amostra, duas ou três diluições independentes foram feitas, de modo a se obter entre 15-40 células vegetativas, células esporuladas ou esporos por campo.

O número total de células (CT) foi obtido pelo somatório do número total de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) ($CT=CV+CE+ES$). O número total de esporos foi calculado pela soma de CE e ES ($ET=CE+ES$). A taxa de esporulação (%) foi calculada dividindo-se o número total de esporos pelo número total de células [$T_{SP}=(ET/CT)\times 100$].

3.3.5 - Concentração de açúcares redutores totais

A medida da concentração de açúcares redutores totais (ART) foi feita pelo método de DNS (ácido 3,5 di-nitrosalicílico) (Miller, 1959). Este método baseia-se na formação de um complexo de cor castanho-alaranjado, por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico pelos açúcares redutores. A concentração desse complexo corado é proporcional à concentração de açúcares redutores na amostra.

Para análise da solução osmótica e das amostras de meios formulados com este xarope foi feito um tratamento prévio para hidrólise da sacarose presente, conforme metodologia descrita por Berbert-Molina e Silveira (2001):

- A 1,0 mL das amostras, previamente diluídas, foi acrescentado 2,0 mL de HCl 2 N;
- As amostras foram aquecidas a 65 °C por 10 min, em banho termostático e, em seguida, resfriadas à temperatura ambiente, adicionando-se 1,5 mL de NaOH 4 N, para neutralização;
- Todo o volume foi transferido para um balão volumétrico apropriado, segundo a diluição final desejada.

A análise de ART foi feita de acordo com o seguinte procedimento:

- A 250 µL de amostra, previamente hidrolisada, foram adicionados 750 µL do reagente DNS, em tubo de ensaio;
- Após breve agitação em agitador tipo vórtex (IKA modelo MS1 Minishaker), os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 10 min;
- A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (MICRONAL, modelo B582) a 545 nm, tendo como branco uma preparação idêntica contendo água destilada em substituição à amostra.

A concentração de ART foi calculada por meio de equações que descreviam curvas de calibração correlacionando a absorbância com a concentração do açúcar na solução. As curvas foram obtidas após a análise de soluções de sacarose de concentrações conhecidas. No preparo da solução-mãe de sacarose foi utilizada sacarose PA (VETEC), previamente seca em estufa a 60 °C por 1 h, resfriada e mantida em dessecador.

3.3.6 - Bioensaios

Para avaliar a atividade larvívora do meio fermentado foi empregada a metodologia de bioensaios proposta por Misch et al. (1992), com algumas modificações. Para cada formulação de meio de cultivo a ser testada, foram necessárias 160 larvas, acondicionadas individualmente em tubos de ensaio de vidro contendo 6 mL de água desclorada. A cada tubo foi adicionado um volume adequado da suspensão de esporo-cristal (Item 3.3.7), de modo a obter 4 diferentes concentrações (em mg/L).

Para determinar as concentrações a serem empregadas, foram realizados testes para verificar a concentração que leva a uma mortalidade que atinja, no máximo, 99% das larvas (maior concentração) e a que leva à morte de um número reduzido (diferente de zero) de larvas (menor concentração). Encontrados os valores mínimo e máximo, as concentrações intermediárias foram calculadas. Foram utilizadas 10 larvas para cada concentração e cada concentração foi testada em triplicata (30 larvas/concentração). O controle foi feito com 10 larvas colocadas em água sem a adição do produto. As concentrações da suspensão de esporo/cristal aplicadas nos tubos foram obtidas após análise da massa seca dos meios fermentados ao final do processo. A avaliação do número de larvas mortas foi feita após 24 h e a concentração necessária para matar 50% das larvas (LC_{50}) foi calculada pelo método Probit (Finney, 1972).

3.3.7 - Obtenção da suspensão de esporos-cristais para bioensaios

Para calcular as concentrações que foram utilizadas nos bioensaios, foi utilizado como base o valor da massa seca (concentração celular) obtida por gravimetria (Item 3.3.3).

O preparo da suspensão foi feito conforme metodologia proposta por Dulmage (1982), com modificações. Uma alíquota de 2 mL da amostra de meio fermentado foi centrifugada a 14.000 x g por 10 min, o sobrenadante descartado e o sedimentado lavado duas vezes com água destilada e centrifugado a 14.000 rpm para remover resíduos do meio de cultura. Foi adicionada ao sedimento uma solução de lactose

5%, correspondente a 1/10 do volume inicial (200 µL), agitando-se a mistura por 10 min para promover a lise das células esporuladas e conseqüentemente liberar os cristais protéicos. A suspensão foi centrifugada a 14.000 xg por 10 min e o sedimento lavado duas vezes com água destilada para remover os resíduos de lactose. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de água destilada e esta suspensão foi utilizada nos bioensaios.

3.3.8 – Cálculos de parâmetros fermentativos

3.3.8.1 – Produtividade em células

O cálculo da produtividade em células (p_x) foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$p_x = (X_m - X_0) / t_{x,m} \quad (1)$$

Em que:

X_m - concentração celular máxima;

X_0 - concentração celular inicial;

$t_{x,m}$ - tempo necessário para obtenção da máxima concentração celular.

3.3.8.2 – Fator de conversão de substrato em células

O cálculo do fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (2)$$

Em que:

X - concentração celular em um instante t

X_0 - concentração celular inicial

S - concentração de substrato em um instante t

S_0 - concentração inicial de substrato

3.3.8.3 – Máxima velocidade específica de crescimento

Para o cálculo das máximas velocidades específicas de crescimento (μ_m), primeiramente os valores experimentais correlacionando as concentrações celulares (X) com o tempo foram ajustadas graficamente, utilizando-se o programa computacional ORIGIN 8.0 (Microcal Software Inc., EUA). Com os novos valores de concentração celular e de tempo, obtidos a partir da curva ajustada, construiu-se uma curva relacionando o logaritmo neperiano de X (lnX) com o tempo. Este tipo de gráfico apresenta logo após a fase *lag* um trecho linear, com inclinação máxima, que corresponde à fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular deste trecho linear corresponde ao valor de μ_m .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Obtenção da solução osmótica residual

A fim de obter a solução residual da desidratação osmótica de abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) a ser utilizada na formulação dos meios de fermentação, os frutos (Figura 1), previamente caracterizados, foram higienizados, cortados, branqueados (itens 3.1.2 e 3.1.3) e desidratados em xarope invertido diluído a 40%, utilizando-se relação fruta:xarope de 1:5 (p/p), temperatura de 50 °C, agitação de 60 min⁻¹ e tempo de incubação de 2 h (Item 3.1.4) (Figura 2). O processo foi realizado de uma só vez e o xarope residual obtido nos vários reatores foi reunido em um único lote de modo a homogeneizar a sua composição.



Figura 1 – Amostra dos abacaxis escolhidos para a realização da desidratação osmótica.

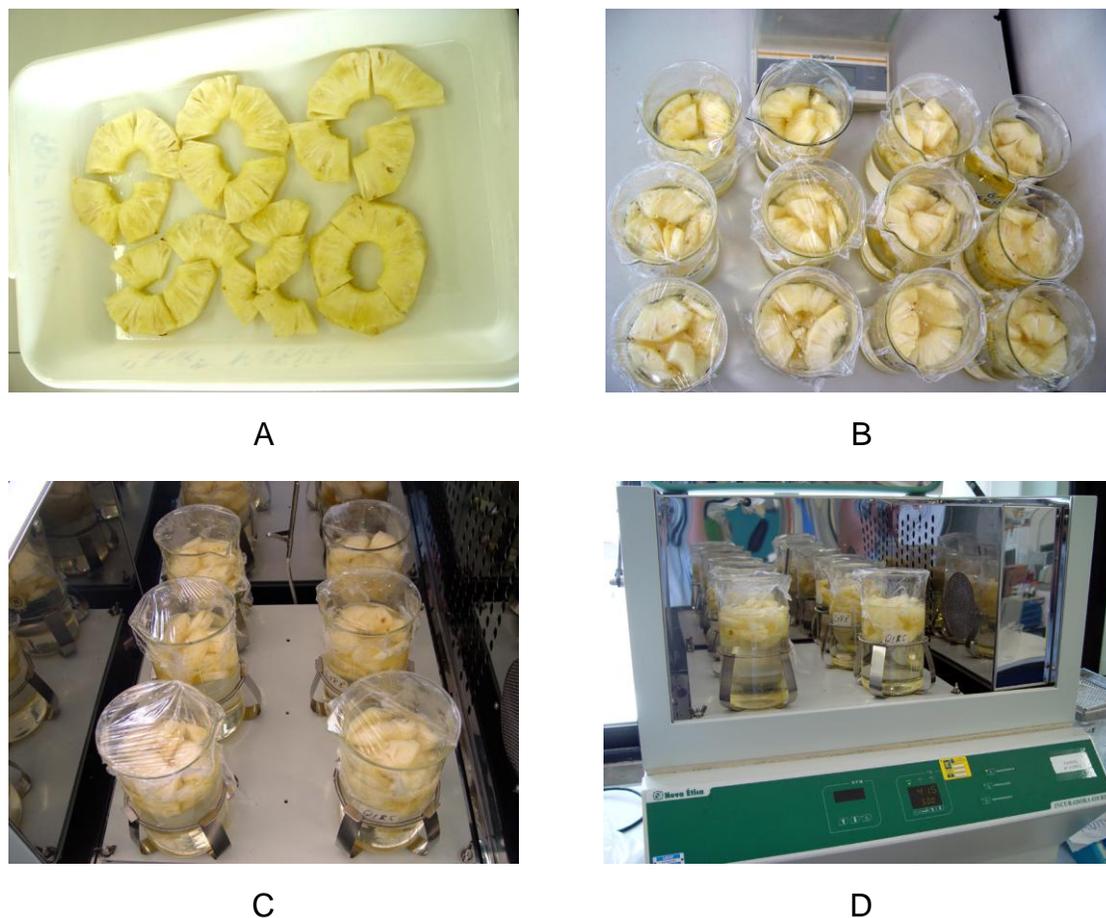


Figura 2 – Etapas da desidratação osmótica: (A) abacaxis cortados em forma de arco de coroa; (B) reatores (1.000 mL) com os frutos cortados imersos na solução de açúcar invertido a 40 °Brix, na proporção fruta: xarope de 1:5; (C e D) reatores dispostos em incubadora/agitadora a 50 °C com agitação de 60 min⁻¹ por 2 h.

Em média, os frutos apresentaram massa de, aproximadamente, 1,5 kg, diâmetro de 14 cm e altura de 20 cm (Figura 3). O valor médio do pH da polpa foi de 3,26 e o teor de sólidos totais igual a 12,8 °Brix. Dados da literatura mostram que esses valores podem variar de acordo com a região do cultivo, tipo de solo e adubação empregada (Spironello et al., 2004). Brito et al. (2005) encontraram valores de pH próximo a 3,8 e teor de sólidos totais de 15,7 °Brix na caracterização de *Ananas comosus* (L.) Merrill.



Figura 3 – Características dimensionais de abacaxi utilizado para a desidratação osmótica.

No presente trabalho, optou-se pelo emprego de uma relação fruta:xarope de 1:5, visando simular condições operacionais mais próximas daquelas empregadas em escala industrial. Alguns autores afirmam que o emprego de uma relação fruta:xarope de 1:10 (Raoult-Wack, 1994), 1:20 (Corzo e Gomez, 2004) e 1:25 (Rastogi e Raghavarao, 2004) são adequados para minimizar alterações significativas na concentração da solução durante a desidratação por imersão impregnação. Ao contrário, uma relação fruta:xarope de 1:5, geralmente utilizada em processos industriais, asseguram uma taxa constante de troca de água/soluto (Dalla Rosa e Giroux, 2001), além de implicar em menores custos de produção (Raoult-Wack, 1994).

As demais variáveis de processo empregadas na desidratação (temperatura de 50 °C, agitação de 60 min⁻¹ e tempo de imersão de 2h) foram baseadas em trabalhos prévios realizados no Laboratório de Engenharia Agrícola da UENF (Dionello et al., 2007; Queiroz et al., 2007). Dionello et al. (2007) verificaram que na desidratação de abacaxi a 50 °C ocorreu um maior ganho de sólidos em contrapartida à saída mais intensa de água, que em temperaturas de 40 e 50 °C.

Pokharkar e Prasad (1998) também observaram uma maior perda de água e maior ganho de sólidos com o aumento da temperatura de 30, 40 e 50 ° C na desidratação osmótica de cortes banana. Segundo Raoult-Wack et al. (1991) o aumento da temperatura favorece tanto a perda de água quanto o ganho de sólidos, devido, provavelmente, ao seu efeito positivo sobre a difusividade aparente das moléculas de água e do soluto no interior do produto. A maior temperatura utilizada para o processo de desidratação osmótica de frutos na maioria dos trabalhos foi de 50 °C (Barat et al. 2001; Alves et al. 2005; Ramallo e Mascheroni, 2005; Peiró et al., 2006; Dionello et al., 2007; Queiroz et al., 2007; Peiró-Mena et al., 2007; Queiroz et al. 2008).

Na desidratação osmótica, o aumento do tempo de incubação leva a uma maior perda de massa, mas a velocidade com que essa perda ocorre é menor à medida que o processo se realiza, tendendo a estabilidade (Dhingra et al., 2008). Singh et al. (2007) estudando a transferência de massa e a cinética do processo de desidratação osmótica de cubos de cenoura, no intervalo de tempo entre 0-240 min, observaram que com aumento do tempo de imersão, ocorreu uma maior perda hídrica e maior ganho de sólidos. Prinzivalli et al. (2007) variaram o tempo de imersão (1, 2, 4 e 6 h) na desidratação de morangos e observaram que o ganho de sólidos foi equivalente em 4 e 6 h, enquanto a perda hídrica aumentou progressivamente até 6 h. Na desidratação osmótica de goiabas, Queiroz et al. (2007) verificaram que o teor de sólidos solúveis totais aumentou linearmente com o tempo de incubação da fruta.

Além das variáveis de processo citadas, optou-se, neste trabalho, pela realização da desidratação em cinco ciclos consecutivos, empregando-se a mesma solução osmótica em todos eles. Verificou-se uma redução do teor de sólidos totais do xarope após cada ciclo (Tabela 6). Entre o primeiro e o segundo ciclos a perda foi de 7,6%, e nos ciclos seguintes as perdas foram de 4,8, 4,2 e 3,8%.

Tabela 6 – Teor de sólidos totais (° Brix) do xarope após os ciclos de desidratação osmótica.

Ciclo	Sólidos Totais (° Brix)
1º Ciclo	40,7
2º Ciclo	37,6
3º Ciclo	35,8
4º Ciclo	34,3
5º Ciclo	33,0

O reaproveitamento do xarope residual para ciclos consecutivos de desidratação é citado na literatura como uma forma de reduzir os custos do processo. Peiró et al. (2006) mostraram que a solução osmótica pode ser reutilizada em pelo menos oito ciclos na desidratação de *grapefruit*, sem alterações significativas na atividade de água final dos frutos. Peiró-Mena et al. (2007) verificaram que no caso da desidratação osmótica de abacaxi foi possível a realização de 15 ciclos, sem quaisquer problemas em nível de desidratação das frutas. Os autores não mencionam se foi feita a correção do teor de sólidos do xarope entre cada ciclo, nem apresentam dados sobre sua composição após cada etapa.

4.2 – Avaliação da fermentação em meio formulado com solução osmótica residual

A fim de avaliar o desempenho de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio de cultivo formulado com o xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi, foi realizado um primeiro grupo de ensaios em agitadora/incubadora de bancada, empregando-se os meios SOR₃₀ e SOR-Y₃₀, com concentração inicial de substrato (S₀) de cerca de 30 g/L. A composição destes meios teve como base a formulação do meio GYS, o qual foi usado como referência. O meio SOR₃₀ foi composto com a solução osmótica e todos os nutrientes de GYS, enquanto o meio SOR-Y₃₀ continha

apenas a fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) e a solução osmótica residual. O valor de S_0 foi escolhido com base nos dados de Berbert-Molina et al. (2008), que mostraram que *Bti* é capaz de metabolizar todo o açúcar, em fermentação de meio GYS com 12 g/L de extrato de levedura e 30 g/L de glicose.

Os resultados obtidos na fermentação dos meios, GYS, SOR₃₀ e SOR-Y₃₀ são mostrados na Tabela 7. Observa-se que o tempo de fermentação do meio SOR₃₀ foi idêntico ao obtido com o meio GYS, enquanto que com o meio SOR-Y₃₀ este tempo se estendeu por mais 8 h. A ausência de alguns minerais pode ter contribuído para esta diferença, conforme será discutido a seguir.

Tabela 7: Resultados gerais obtidos no cultivo de *Bt var. israelensis* nos meios GYS, SOR₃₀ e SOR-Y₃₀.

	GYS	SOR ₃₀	SOR-Y ₃₀
t_f (h)	46	46	54
ES (ufc/mL)	$1,81 \cdot 10^9$	$1,28 \cdot 10^9$	$8,25 \cdot 10^7$
CV (ufc/mL)	$2,16 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$1,96 \cdot 10^8$
CE (ufc/mL)	$1,82 \cdot 10^8$	$1,63 \cdot 10^8$	$3,81 \cdot 10^8$
ET (ufc/mL)	$1,99 \cdot 10^9$	$1,44 \cdot 10^9$	$4,64 \cdot 10^8$
CT (ufc/mL)	$2,21 \cdot 10^9$	$1,64 \cdot 10^9$	$6,60 \cdot 10^8$
T _{SP} (%)	90,2	87,8	70,3

t_f - tempo de fermentação; ES - número total de esporos livres; CV- número de células vegetativas; CE- número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT- número total de células (CT= CV+ET); T_{SP} - taxa de esporulação [T_{SP} = (ET/CT)100]

Em comparação com os dados obtidos em GYS, o número total de células e de esporos foi 27,6 e 25,6 % menores, respectivamente, em SOR₃₀, embora a taxa de esporulação tenha sido similar em ambos os meios (90,2 e 87,8%, respectivamente). Por outro lado, o crescimento celular e a esporulação foram sensivelmente prejudicados em SOR-Y₃₀, sendo encontrados valores de CT e ET 2,5

e 3 vezes menores, respectivamente, que os alcançados em SOR₃₀. A taxa de esporulação também foi inferior neste meio (70,3%).

Estes resultados sugerem que a composição nutricional do meio SOR₃₀, que contém, adicionalmente aos nutrientes de GYS, os micronutrientes lixiviados da fruta, afetou de forma negativa o crescimento celular, ao contrário do esperado. Em princípio, este efeito poderia ser resultante de uma concentração inibidora de determinados íons ou mesmo da interação entre íons provenientes da fruta com aqueles já presentes no meio. Por outro lado, no meio SOR-Y₃₀, que contém apenas extrato de levedura e os nutrientes oriundos da fruta, o menor crescimento pode ser explicado por uma carência nutricional do meio. Neste caso, apenas o extrato de levedura não foi suficiente para sustentar o mesmo nível de crescimento verificado em SOR₃₀. Além disso, a concentração de determinados íons parece ter ficado aquém daquela exigida para o adequado desenvolvimento microbiano, seja pela sua ausência no xarope concentrado ou pela diminuição da concentração em virtude da diluição empregada.

O extrato de levedura é composto por material protéico (73-75%), aminoácidos livres e oligopeptídeos de diferentes massas moleculares, além de vitaminas, sais minerais e polissacarídeos (Saksinchai et al., 2001), constituindo uma fonte nutricional muito utilizada para o cultivo de *Bt* em escala de laboratório (Sikdar et al., 1991; Vallejo et al., 1999; Khuzhamshukurov et al., 2001; Anderson e Jayaraman, 2003). A presença de uma fonte de nitrogênio inorgânico é também considerada essencial para o processo fermentativo com a bactéria (Farrera et al., 1998; Saksinchai et al., 2001; Anderson e Jayaraman, 2003).

Com relação aos micronutrientes, íons metálicos como Ca⁺², Mn⁺², K⁺ e Mg⁺² são também importantes para *Bt*, mas as exigências variam com a variedade utilizada (Yang e Wang, 1998). Segundo Yao et al. (2002, 2003), íons Mn²⁺ e Cu²⁺ podem estimular ou inibir o crescimento, de acordo com as concentrações empregadas. İçgen et al. (2002a) mostraram que a presença de Zn²⁺ e Ca²⁺ no meio auxiliam a produção de toxinas. Rodrigues (2006) demonstrou que nitrato de amônio interfere negativamente no crescimento da variedade *Bti*, enquanto citrato de amônio

e ferro III favorece a produção de biomassa e a esporulação. Este autor também verificou que a esporulação foi inibida quando cloreto de amônio foi usado como fonte inorgânica de nitrogênio, enquanto o uso de molibdato de amônio prejudicou o crescimento celular.

A Figura 4 mostra a variação da concentração celular com o tempo nas primeiras horas de cultivo nos meios GYS, SOR₃₀ e SOR-Y₃₀. Observa-se um perfil cinético muito similar até 6 horas de processo, mas a partir deste momento, as curvas de crescimento passam a apresentar diferenças. Com 8 h, o meio GYS apresentou uma concentração celular 25% maior (4,92 g/L) que o meio SOR₃₀ (3,92 g/L) e quase 40% maior que SOR-Y₃₀ (3,53 g/L). Comparando os meios formulados com a solução osmótica, a concentração de células, neste mesmo tempo, é 15% maior em SOR₃₀. A concentração diferenciada de alguns íons na composição do meio SOR₃₀ e a ausência de outros íons responsáveis pelo crescimento no meio SOR-Y₃₀ podem ter influenciado negativamente no crescimento celular, conforme já discutido.

Com relação ao tempo necessário para o início da formação de grumos, que marca o final da Fase de Crescimento Vegetativo (Fase I) e o início da Fase de Transição para a Esporulação (Fase II), segundo Berbert-Molina et al. (2008), houve diferença entre os meios SOR₃₀ e SOR-Y₃₀. Neste último, a Fase I se estendeu por mais 2 horas, o que, provavelmente, reflete as diferenças na sua composição nutricional. O tempo de formação de grumos (floculação) é coincidente com a paralisação da motilidade celular, que são características visíveis ao microscópio, mas nesta fase ocorre também uma diminuição na velocidade de crescimento, na velocidade específica de respiração e na diminuição do pH do meio (Berbert-Molina et al., 2008). Alguns trabalhos na literatura mostram que o tempo de formação de grumos está relacionado com as condições nutricionais e operacionais empregadas no cultivo dessa bactéria. Kraemer-Schafhalter e Moser (1996), por exemplo, em condição não limitante de transferência de oxigênio, constataram o início da formação de grumos na quarta hora de fermentação com *Bti*, utilizando meios com 10 g/L de glicose. Berbert-Molina et al. (2008) constataram que os tempos para o

início da floculação de *Bti* foram idênticos (5 h) em meios com concentrações crescentes de glicose (10 a 120 g/L) e condições não limitantes de oxigênio, mas ocorreu 1 h mais tarde no meio com S_0 de 150 g/L. Pessanha (2008), estudando o cultivo de *Bti*, em frascos agitados e utilizando sacarose, glicose e frutose ($S_0 = 10,0$ g/L) como fonte de carbono, além de meio com caldo de cana, verificou t_{gr} variáveis.

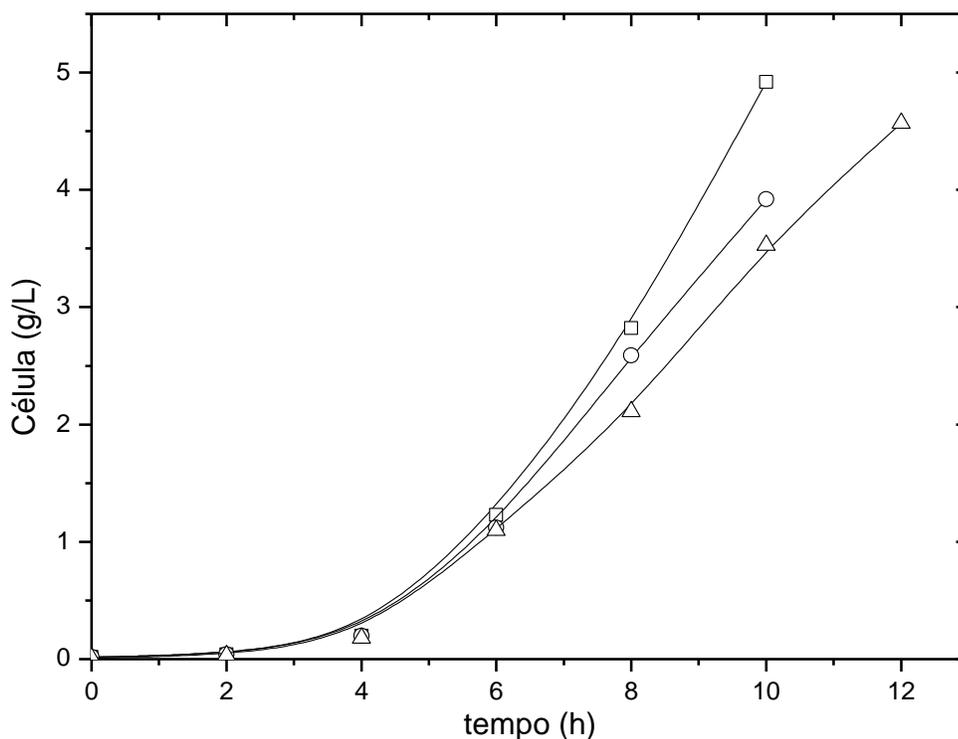


Figura 4 – Cinética de crescimento celular em função do tempo nos diferentes meios de cultivo até o momento da formação de grumos: GYS (□), SOR₃₀ (○), SOR-Y₃₀ (Δ).

Os resultados obtidos nos ensaios discutidos mostraram que, apesar do desempenho inferior verificado no meio SOR₃₀, em comparação com os alcançados no meio de referência (GYS), a solução osmótica resultante da desidratação de abacaxi apresenta potencial para ser utilizada no cultivo de *Bti*. Nestes ensaios, o

xarope foi diluído para um valor de S_0 de 30 g/L, o que parece ter reduzido excessivamente a concentração de alguns nutrientes. Desta forma, visando uma aplicação biotecnológica do resíduo, e com isso apresentar uma alternativa à viabilização da própria tecnologia de desidratação osmótica, optou-se pela continuidade dos estudos, estabelecendo-se como objetivo a avaliação de novas formulações de meio com o xarope.

4.3 – Fermentação de meios formulados com concentrações crescentes de soluto na solução osmótica

O segundo grupo de ensaios visou avaliar o processo fermentativo em meios com concentrações crescentes de solução osmótica, buscando aumentar a contribuição nutricional do xarope para o desenvolvimento microbiano. Esta estratégia visava também identificar a diluição mais conveniente do xarope para um adequado balanço C:N, levando-se em conta o emprego de uma concentração inicial de extrato de levedura de 12 g/L. Diferente dos ensaios anteriores, estes experimentos foram realizados em biorreator de bancada, empregando-se condições de alta disponibilidade de oxigênio (aeração de 1,0 vvm e agitação de 600 min^{-1}). Foram avaliados os seguintes meios: SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅, SOR₁₀₀ (30, 50, 75 e 100 g/L de ART).

A Figura 5 mostra a variação, com o tempo, das concentrações celulares e de ART obtida nestes ensaios. Na Tabela 8 são apresentados os resultados gerais relativos ao crescimento e ao consumo de substrato, bem como os principais parâmetros cinéticos calculados a partir destes.

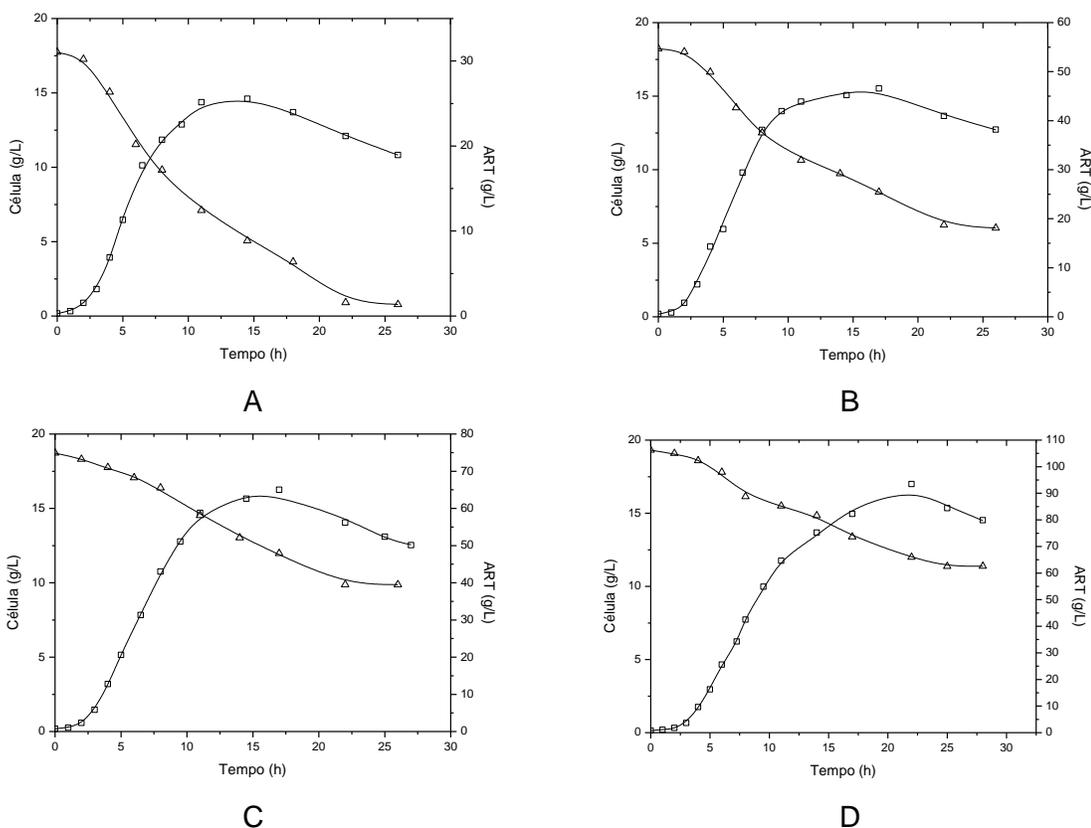


Figura 5 – Concentração de células (\square) e de ART (Δ), em função do tempo, na fermentação dos meios SOR₃₀ (A), SOR₅₀ (B), SOR₇₅ (C) e SOR₁₀₀ (D) em biorreator de bancada.

Observa-se na Figura 5 que perfis cinéticos de crescimento semelhantes foram encontrados na fermentação dos meios com concentração inicial de ART de 31,0, 54,7 e 74,9 g/L (SOR₃₀, SOR₅₀ e SOR₇₅). Na Figura 6, as curvas de crescimento são apresentadas conjuntamente, de modo a permitir uma melhor comparação destes resultados. Verificou-se que, após uma curta fase *lag*, o cultivo apresentou uma fase exponencial de crescimento, seguida de uma fase linear e, finalmente, uma fase estacionária e de declínio. Nos meios SOR₃₀, SOR₅₀ e SOR₇₅, as curvas de crescimento foram particularmente similares nas primeiras 11 horas, enquanto no meio SOR₁₀₀ ($S_0 = 106,2$ g/L) observou-se uma defasagem, em relação às demais, durante todo o processo. Neste caso, além de uma fase *lag* ligeiramente maior, observou-se a ocorrência de um maior período de desaceleração do

crescimento, após o término da fase linear, tendo a produção de biomassa se estendido por um maior período de tempo. Embora as máximas velocidades específicas de crescimento (μ_m) tenham sido similares para todos os valores de S_0 testados (Tabela 8), indicando ausência de inibição pelo substrato, menores velocidades instantâneas de crescimento (dx/dt) foram verificadas nos meios SOR_{75} e SOR_{100} nas primeiras 6 h, conforme mostra a Figura 7. No meio SOR_{100} esta diferença foi mais acentuada. Este comportamento parece refletir uma inadequação da composição nutricional dos meios de cultivo, sobretudo da relação C:N.

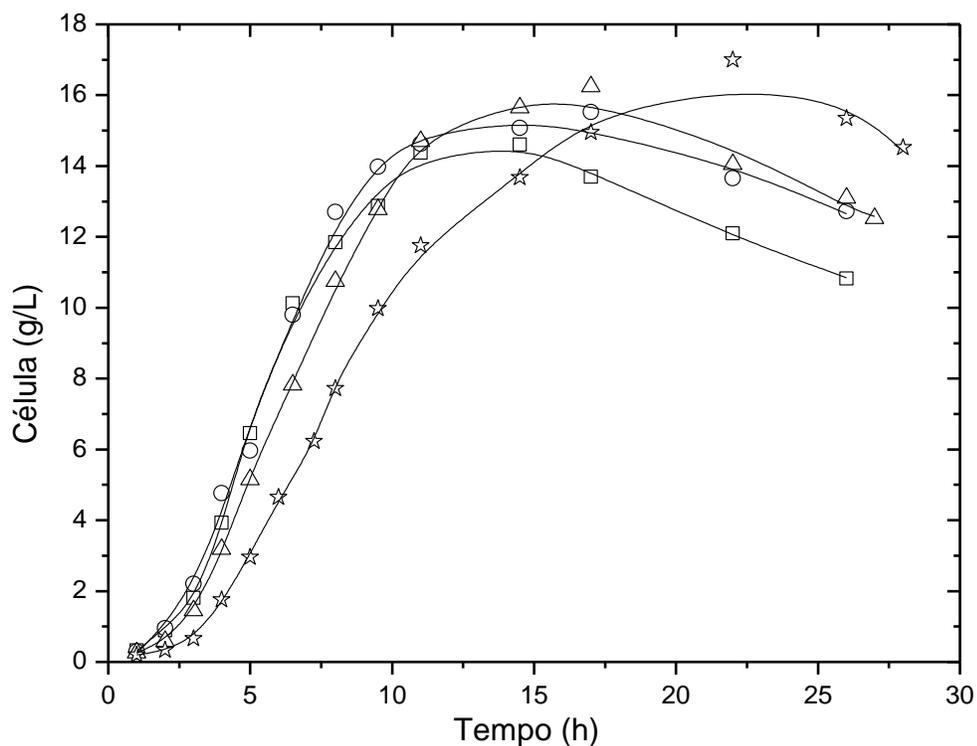


Figura 6 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios SOR_{30} (□) SOR_{50} (△) SOR_{75} (○) SOR_{100} (☆) em biorreator de bancada.

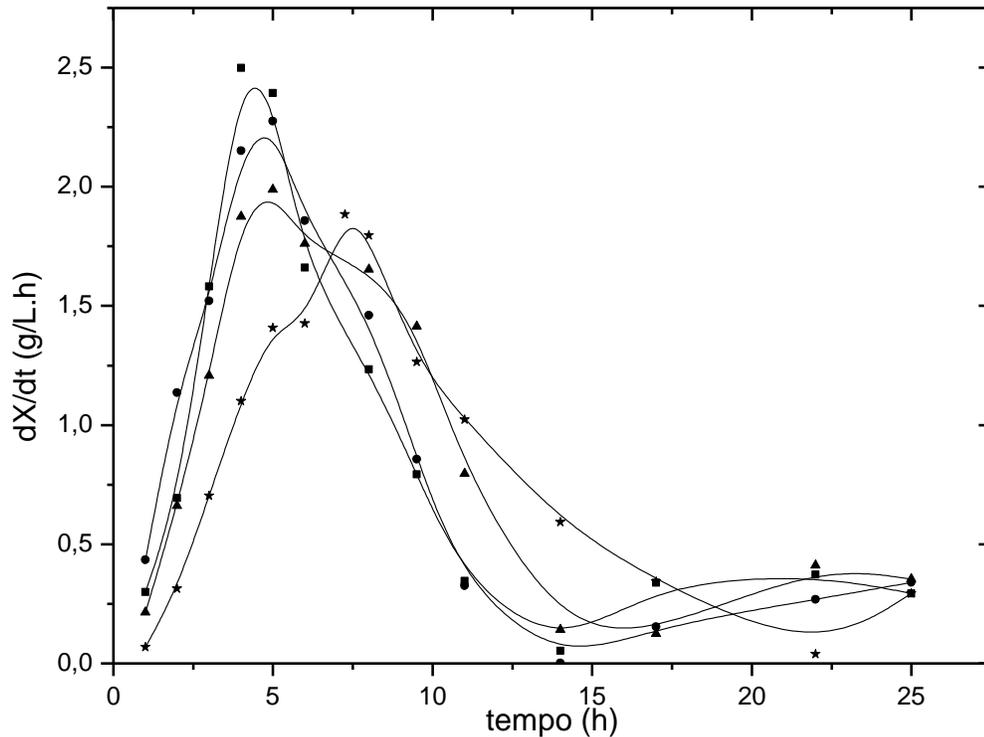


Figura 7 – Velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), em função do tempo, na fermentação dos meios SOR₃₀ (■), SOR₅₀ (●), SOR₇₅ (▲) e SOR₁₀₀ (★) em biorreator de bancada.

Os valores de μ_m encontrados no presente trabalho são inferiores aos descritos por Berbert-Molina et al. (2008) para o cultivo de *Bti* com concentrações iniciais de glicose e condições de processo semelhantes. No entanto, ao contrário dos dados aqui obtidos, os autores verificaram a ocorrência de inibição do cultivo quando os valores de S_0 maiores que 75 g/L foram empregados, evidenciada por uma queda acentuada no valor de μ_m (de 1,1 para 0,79 h⁻¹). Também no cultivo de *Bti* em biorreator de bancada, Pessanha (2008) encontrou valores de μ_m entre 1,0 e 1,18 h⁻¹ para meios compostos com 10 g/L de glicose, frutose ou sacarose oriunda de caldo de cana-de-açúcar, mas em meio com sacarose P.A o valor caiu para 0,79 h⁻¹. Neste mesmo estudo, nos ensaios realizados em frascos agitados e meios com 20 ou 30 g/L de sacarose P.A, os valores de μ_m foram de 0,75 e 0,73 h⁻¹, respectivamente.

Para a variedade *Bt var. galleriae*, Anderson e Jayaraman (2003) verificaram que, independentemente da concentração da fonte de carbono (glicose: 3,4, 18,7 e 34 g/L), o aumento da concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura: 1, 10,5 e 20 g/L) levou a um aumento dos valores de μ_m .

A composição dos meios SOR parece, portanto, ser o fator responsável pelos valores de μ_m encontrados no presente trabalho. Além de conter uma mistura de carboidratos oriunda do xarope invertido utilizado na desidratação do abacaxi, os meios contêm concentrações variadas de nutrientes provenientes da fruta, incluindo açúcares. Em relação às condições de transferência de oxigênio, também fundamental neste processo fermentativo (Flores et al.; 1997, Abdel-Hameed, 2001; Maldonado-Blanco et al.; 2003, Rowe et al., 2003; Sarrafzadeh e Navarro, 2006), verifica-se, pela Figura 8, que o cultivo não estava limitado em oxigênio, em nenhuma das condições, nos intervalos (3 a 10 h) em que os valores de μ_m foram calculados.

Os dados da Tabela 8 mostram que o tempo total de fermentação do meio SOR₃₀ foi ligeiramente inferior ao dos demais meios. Valores crescentes de S_0 também não implicaram em diferenças marcantes nas máximas concentrações celulares (X_m), apesar de ter havido diferença no tempo necessário para alcançar tais concentrações ($t_{x,m}$). Na fermentação dos meios SOR₃₀ e SOR₅₀ foi verificado um valor idêntico de $t_{x,m}$ (12,7h), enquanto com os meios SOR₇₅ e SOR₁₀₀, este tempo foi de 16 e 21 h, respectivamente. A ampliação de $t_{x,m}$ nos meios com maiores concentrações iniciais de ART pode ser consequência dos fatores que afetaram as velocidades de crescimento nestes meios.

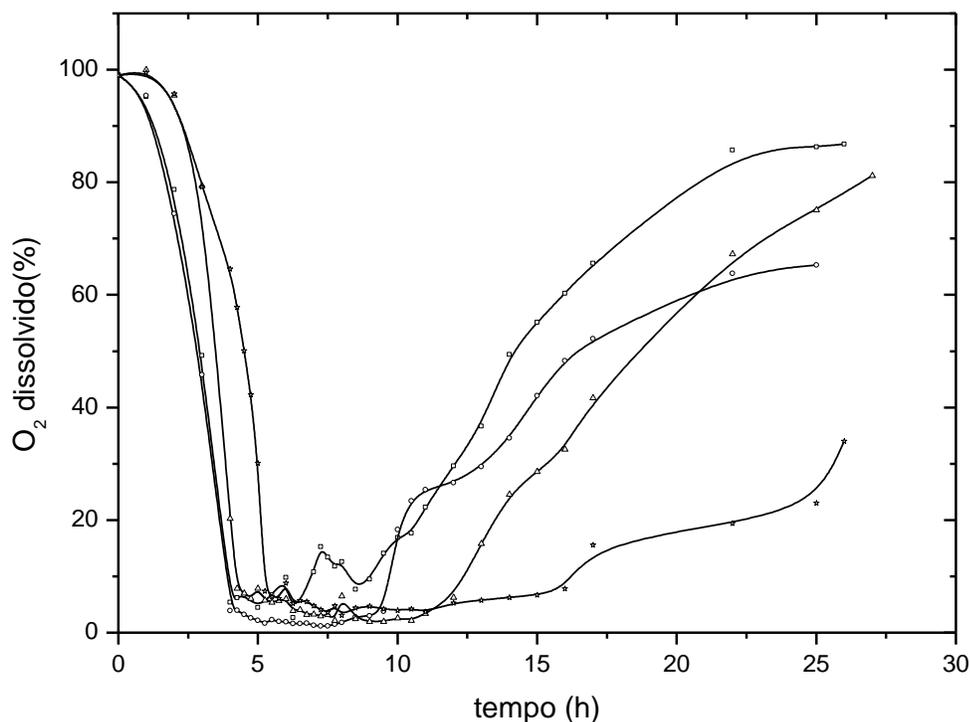


Figura 8 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios SOR₃₀ (□), SOR₅₀ (○), SOR₇₅ (Δ) e SOR₁₀₀ (☆) em biorreator de bancada.

. Além das diferenças nos valores de $t_{x,m}$, houve também variação no tempo de ocorrência de outras mudanças morfofisiológicas que caracterizam o cultivo da bactéria, dividido em quatro fases (Fase I, II, III e IV) por Berbert-Molina et al. (2008). A Fase I (Crescimento Vegetativo) corresponde ao intervalo entre o início do cultivo e o início da floculação da cultura (t_{gr}). O final desta fase também é caracterizado pela perda total da motilidade celular. Nos meios SOR₃₀, SOR₅₀ e SOR₇₅ a duração desta fase foi idêntica (6,5 h), mas em SOR₁₀₀ este tempo foi maior (7,2 h). Ao empregar um valor de S_0 (glicose) de 150 g/L, Berbert-Molina et al. (2008) verificaram o início da formação de grumos com 6 h de processo, uma a mais que nas demais condições testadas (S_0 entre 30 e 120 g/L). Constata-se, pela análise dos poucos trabalhos encontrados na literatura com referência à floculação da cultura de *Bt* (Kraemer-Schafhalter e Moser, 1996; Berbert-Molina et al., 2008; Pessanha, 2008), que tanto a

composição do meio como as condições operacionais podem afetar o tempo para ocorrência deste evento.

Tabela 8: Resultados gerais obtidos no cultivo de *Bt var. israelensis* nos meios SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅ e SOR₁₀₀.

	SOR ₃₀	SOR ₅₀	SOR ₇₅	SOR ₁₀₀
S ₀ (g/L)	31	54,7	74,9	106,2
t _f (h)	26	28	27	28
t _{gr} (h)	6,5	6,5	6,5	7,25
t _{x,m} (h)	12,7	12,7	16	21
ΔS _{x,m} (g/L)	20,6	24,5	26,2	39,2
ΔS _f (g/L)	29,7	36,5	34,9	43,6
ΔS _f (%)	95,6	66,8	46,6	41,1
ΔX (g/L)	14,5	15,1	16,1	16,5
Y _{x/s} (g/g)	0,7	0,62	0,61	0,42
p _x (g/L.h)	1,1	1,2	1,1	0,79
μ _m (h ⁻¹)	0,81	0,80	0,84	0,84
ES (ufc/mL)	2,78. 10 ⁹	2,21. 10 ⁹	2,02. 10 ⁹	1,15. 10 ⁹
CV (ufc/mL)	2,82. 10 ⁸	5,77. 10 ⁸	4,21. 10 ⁸	5,21. 10 ⁸
CE (ufc/mL)	8,22. 10 ⁸	5,55. 10 ⁸	6,78. 10 ⁸	1,13. 10 ⁹
ET (ufc/mL)	3,60. 10 ⁹	2,76. 10 ⁹	2,70. 10 ⁹	2,28. 10 ⁹
CT (ufc/mL)	3,88. 10 ⁹	3,34. 10 ⁹	3,12. 10 ⁹	2,80. 10 ⁹
T _{SP} (%)	92,7	82,7	86,5	81,4
LC ₅₀ (mg/L)	7,60 ^a	8,00 ^a	8,63 ^a	7,53 ^a

S₀ - Concentração inicial de substrato; t_f - tempo de fermentação; t_{gr} - tempo de formação de grumos; t_{x,m} - tempo para obtenção da máxima concentração celular; ΔS_{x,m} - substrato consumido até t_{x,m}; ΔS_f - consumo total de substrato; ΔX - máxima concentração celular; Y_{x/s} - fator de conversão de substrato em células; p_x - produtividade em células; μ_m - máxima velocidade específica de crescimento; ES - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE - número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT - número total de células; T_{SP} - taxa de esporulação.

Com relação à Fase II (Transição para a Esporulação), que consiste no intervalo entre t_{gr} e $t_{x,m}$ (Berbert-Molina et al., 2008), verificou-se, no presente trabalho, que o aumento de S_0 , a partir de 54,7 g/L, também implicou em aumento de sua duração. Em SOR_{100} , por exemplo, a Fase II durou 15,5 horas, mais que o dobro do observado com os meios SOR_{30} , SOR_{50} .

A Tabela 8 mostra também que em nenhum dos meios avaliados houve consumo total de substrato durante as Fases I e II, embora este tenha aumentado gradativamente à medida que maiores concentrações iniciais de ART foram empregadas. Estes resultados mostram, por um lado, que a interrupção da multiplicação celular não foi decorrente da carência da fonte de carbono, mas provavelmente da deficiência de um ou mais nutrientes no meio de fermentação. Por outro lado, o maior consumo de substrato não implicou em um aumento proporcional das máximas concentrações celulares, sendo encontrados, ao contrário, valores de X_m similares em todos os meios. No meio SOR_{100} , por exemplo, houve o consumo de 39,2 g/L de ART até $t_{x,m}$, sendo produzidos 16,5 g/L de células. Comparando-se com o meio com menor S_0 (SOR_{30}), o consumo de substrato neste intervalo foi de 20,6 g/L, quase a metade, para produzir 14% a menos de células.

Considerando-se o tempo total de fermentação, verificou-se, da mesma forma, que não houve a exaustão de todo o substrato nos meios de cultivo (Tabela 8). Em SOR_{30} , a concentração residual de ART foi de apenas 1,3 g/L, o que corresponde a 95,6% de consumo (ΔS_f). Nos demais meios, no entanto, foram observadas concentrações residuais crescentes de ART (18,2, 40 e 62,6 g/L, em SOR_{50} , SOR_{75} e SOR_{100} , respectivamente), resultando em valores de ΔS_f de 66,8, 46,6 e 41,1%, respectivamente.

Os resultados referentes ao consumo de substrato nos diferentes meios testados neste trabalho indicam que parte do substrato foi direcionada para outros processos metabólicos, que não a produção de células, conforme também constatado anteriormente por Berbert-Molina et al. (2008). Perfis de consumo semelhantes foram observados pelos autores com o emprego de meio GYS e concentrações de glicose entre 31 e 124 g/L no cultivo de *Bti*, com produção

crescente de ácidos orgânicos. No meio com maior S_0 , de maneira análoga ao do meio SOR_{100} , o consumo foi de apenas 41% do total. Os autores concluíram que glicose é utilizada predominantemente como fonte de energia, enquanto os compostos presentes no extrato de levedura são utilizados preferencialmente para a produção de massa microbiana. Considerando procedente essa hipótese e que os sais presentes nos meios SOR estavam presentes em concentrações adequadas, a exaustão da fonte de nitrogênio orgânico, neste caso extrato de levedura, pode ter sido o fator determinante para a interrupção do crescimento.

Os dados da Figura 9, que apresenta a variação dos valores de pH com o tempo nos diferentes ensaios, evidencia, indiretamente, a produção de ácidos durante grande parte da fermentação, o que reforça a hipótese de direcionamento de parte do substrato consumido para outros processos metabólicos que não a formação de células. Conforme descrito no item 3.2.3, o pH foi automaticamente controlado para não cair para valores menores que 5,4, mas a sua evolução, acima deste valor, foi livre.

Os perfis mostrados na Figura 9 são distintos, em alguns aspectos, daqueles verificados por outros autores para *Bt* que relataram decréscimo acentuado nas primeiras horas, em função da produção de ácidos orgânicos, e aumento gradativo até valores próximos ao estabelecido no início da fermentação (7,0 a 7,5) (Morris et al., 1996; Kraemer-Schafhalter e Moser, 1996; İçgen et al., 2002a; Rowe e Margaritis, 2003; Pessanha, 2008). Nos meios SOR_{30} , SOR_{50} e SOR_{75} houve uma queda brusca do pH em aproximadamente três horas, mas até cerca de 10 h o aumento não foi muito acentuado, voltando a cair e a subir novamente nos tempos finais. No meio SOR_{100} observou-se o mesmo perfil de queda nas primeiras horas, mas o pH permaneceu aproximadamente constante durante toda a fermentação. Analisando-se os trabalhos citados, verificou-se que a concentração inicial de substrato empregada na fermentação, assim como a fonte de carbono, interferem diretamente no comportamento do pH durante o cultivo. Pessanha (2008) e Ramada (2008), em trabalhos com caldo de cana-de-açúcar e melaço, respectivamente, com S_0 de 10 g/L, observaram elevação constante do pH após a queda inicial. Berbert-Molina et al.

(2008) verificaram esta mesma tendência ao utilizar glicose em concentração idêntica, mas com S_0 de 30 e 75 g/L, os valores de pH sobem após a queda inicial e voltam a cair, permanecendo constantes em torno de 5,6 até o final, contrastando, portanto, com os resultados do presente trabalho. Já no meio SOR_{100} , o perfil de pH foi similar ao dos autores para S_0 de 124 g/L.

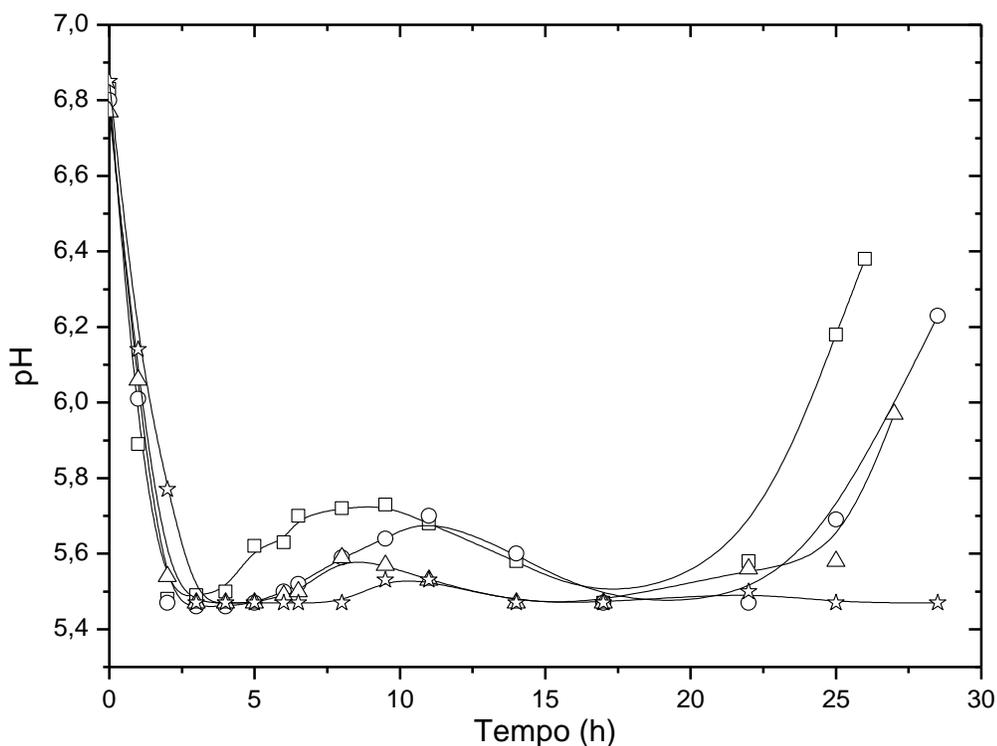


Figura 9 – Variação do pH em função do tempo nos meios SOR_{30} (□), SOR_{50} (△), SOR_{75} (○) e SOR_{100} (☆) em biorreator de bancada.

Dados da literatura mostram que a faixa de pH entre 6,5 e 7,5 é considerada ideal para o crescimento de *Bt*, mas a bactéria pode crescer em pH entre 5,5 e 8,5 (Bernhard e Utz, 1993). Valores de pH abaixo de 5,0 podem impedir a esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* (Murrell, 1967). Kraemer-Schafhalter e Moser (1996) verificaram que ácido acético é o principal ácido orgânico produzido durante todo o crescimento vegetativo de *Bti*, havendo produção também, mas de forma mais

amena, de ácido succínico e láctico. Benoit et al. (1996) descrevem que polímeros de polihidroxibutirato (PHB) são formados internamente nas células bacterianas, a partir do acetato produzido no início, funcionando como reserva de energia para a esporulação, o que justifica o súbito aumento dos valores de pH no processo. De acordo com Saksinchai et al. (2001), em meios formulados com extrato de levedura, o aumento do pH é ocasionado também pela liberação de amônia durante a desaminação de aminoácidos usados no catabolismo.

Com relação aos fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), calculados durante as Fases I e II, a Tabela 8 mostra que os valores foram decrescentes com S_0 de 31,0, 54,7 e 106,2 g/L (0,70, 0,62 e 0,42 g/g, respectivamente), em decorrência do aumento gradativo no consumo de substrato e pequena variação na produção de células. No meio SOR₁₀₀, o valor de $Y_{X/S}$ foi quase 70% menor que o calculado para SOR₃₀, fato justificado pela diferença significativa ($\cong 100\%$) no consumo de substrato em contraste com a pequena diferença entre os valores de X_m . Nos meios SOR₅₀ e SOR₇₅ (74,9 g/L de ART), os valores de $Y_{X/S}$ foram análogos, o que é coerente com os valores encontrados de X_m e $\Delta S_{x,m}$ nestes meios. Avignone-Rossa et al. (1993) e Kraemer-Schafhalter e Moser (1996), em ensaios de fermentação com *Bti*, realizados com 10 g/L de glicose e sem limitação de oxigênio, encontraram valores de $Y_{X/S}$ de 0,68 e 0,73 g/g, respectivamente, que são similares ao encontrado no presente trabalho para um S_0 de 31,0 g/L. Berbert-Molina et al. (2008), por outro lado, encontraram valores de $Y_{X/S}$ de 0,58, 0,51, 0,42, 0,41 e 0,36, ao utilizar concentrações iniciais de glicose de, aproximadamente, 30, 60, 80, 120 e 150 g/L, respectivamente.

A produtividade em células, também calculada nas Fases I e II também não apresentou variação com S_0 até 74,9 g/L (meios SOR₃₀, SOR₅₀ e SOR₇₅), mas foi inferior no meio com 106,2 g/L (SOR₁₀₀), o que é explicado pelo maior tempo de fermentação neste meio e concentração celular semelhante.

A duração da fase de esporulação (Fase III, segundo Berbert-Molina et al., 2008) foi semelhante nos meios SOR₃₀, SOR₅₀ e SOR₇₅ ($\cong 6h$), mas marcadamente

distinta no meio SOR_{100} (3 h), mostrando que a maior concentração inicial de ART influenciou também o processo de esporulação. A Fase III corresponde ao intervalo entre $t_{x,m}$ e o momento em que os grumos começam a ser desfeitos. Estes intervalos ocorreram entre 12,7 e 18 h em SOR_{30} e SOR_{50} , 16 e 22 h em SOR_{75} e 25 e 28 h em SOR_{100} , mostrando que apesar do tempo de duração desta Fase ter sido similar em alguns casos, os tempos de início e fim da fase de esporulação foram distintos. Berbert-Molina et al. (2008) verificaram o mesmo tempo de duração da Fase III com S_0 de 31 g/L, mas para S_0 de 60 e 75 g/L, o tempo médio foi de 3,5 h, enquanto para S_0 de 120 g/L, o intervalo se estendeu por 10 h.

A Fase III é caracterizada no seu início, pela presença de algumas células esporuladas, mas o aumento progressivo do tamanho dos grumos dificulta a visualização do incremento da esporulação, que só fica evidente ao final da Fase. Durante este período a curva de crescimento foi decrescente, como consequência da diminuição da massa celular, e a concentração de oxigênio dissolvido no meio aumentou progressivamente (Figura 8), indicando que a demanda de oxigênio, pelo cultivo, era naquele intervalo, menor que o suprimento proporcionado pelo sistema. A Fase IV, definida como sendo aquela necessária para a completa maturação dos esporos, para total dissociação dos grumos e a autólise de parte da população de células esporuladas, também apresentou variação entre os meios (8, 10, 5 e 3 h, para SOR_{30} , SOR_{50} , SOR_{75} e SOR_{100} , respectivamente). Este comportamento é oposto ao descrito por Berbert-Molina et al. (2008), que verificaram uma maior duração da Fase IV com o emprego de maiores concentrações iniciais de substrato. Novamente, as diferenças encontradas na duração e nos momentos de ocorrência das Fases III e IV, em comparação com os dados de Berbert-Molina et al. (2008), podem ser decorrente das diferenças na composição dos meios de cultivo empregados nestes trabalhos.

Os resultados referentes à contagem de células no tempo final de fermentação mostraram que o valor de CT (células totais) decresceu com o aumento de S_0 (Tabela 8), sendo 16, 24 e 38 % maior em SOR_{30} que em SOR_{50} , SOR_{75} e SOR_{100} , respectivamente. Considerando-se que o comportamento das máximas

concentrações celulares ocorreu de maneira inversa, constata-se que a massa celular foi variável nos diferentes meios.

Com relação à esporulação, o valor de ET (esporos totais) encontrado no meio SOR₃₀ foi cerca de 30% maior que os encontrados nos meios SOR₅₀ e SOR₇₅, mas foi 69% maior que o verificado no meio SOR₁₀₀. Apesar das diferenças nos valores de CT e ET, as taxas de esporulação calculadas para os diferentes meios foram equivalentes (Tabela 8). A diferença mais marcante refere-se à concentração de esporos livres em SOR₁₀₀, que foi, em média, duas vezes menor que nos demais meios, indicando atraso no processo de lise celular.

Bernhard e Utz (1993) afirmaram que a maioria dos meios de cultivo padronizados para a produção de *Bt* em escala laboratorial leva a concentrações de células entre 10^8 e 10^9 ufc/mL, com taxas de esporulação variáveis. No entanto, outros autores têm obtido valores de CT e ET superiores com o uso de matérias-primas naturais na composição do meio de cultivo. López-y-López e de La Torre (2005) obtiveram uma produção máxima de biomassa de $1,7 \cdot 10^{13}$ ufc/mL, com 93% de esporulação, na fermentação de meio contendo farelo de soja e água de maceração de milho com uma cepa recombinante de *Bt*. Em meios formulados com extrato de levedura e peptona de diferentes marcas comerciais, em concentrações variadas, Prabakaran e Hoti (2008) observaram valores de ET entre $3,7 \cdot 10^{10}$ e $3,24 \cdot 10^{11}$ ufc/mL em fermentações com *Bti*. Khuzhamshukurov et al. (2001) relataram valores de ET de $6,4 \cdot 10^9$ ($T_{SP}=95\%$) e $6,3 \cdot 10^9$ ufc/mL ($T_{SP}=91\%$), no cultivo da variedade *Bt var. thuringiensis* em meios formulados com extrato de levedura e melação ou extrato de batata, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho correspondem, portanto, aos valores médios citados por Bernhard e Utz (1993) e também estão de acordo com dados obtidos por outros autores. Saksinchai et al. (2001), em estudos com a finalidade de avaliar a substituição de extrato de levedura comercial por autolisado de levedura de cervejaria na composição do meio de cultivo de *Bt var. kurstaki*, observaram valores de ET de $2,6 \cdot 10^9$ e de $1 \cdot 10^8$ ufc/mL, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Arcas et al. (1987) com a mesma variedade da bactéria. Com *Bti*, Luna et

al. (2004) obtiveram um número máximo de esporos de $2,2 \times 10^9$ ufc/mL utilizando o próprio sobrenadante da fermentação na composição do meio.

Com relação à atividade larvicida para *Aedes aegypti*, parâmetro chave deste processo fermentativo, os resultados obtidos nos bioensaios mostraram que as diferentes concentrações iniciais de ART utilizadas não interferiram nos valores de LC_{50} (Tabela 8). Conforme também ilustrado na Figura 10, para melhor visualização, não houve diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, entre os valores encontrados.

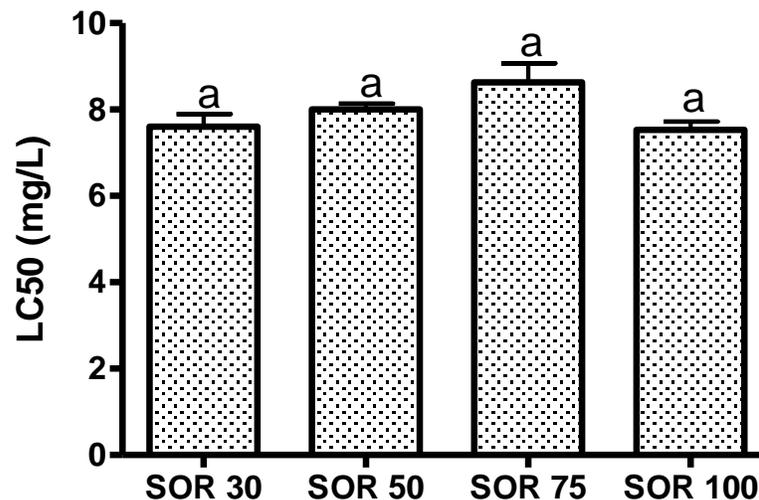


Figura 10 – Valores de LC_{50} para larvas de *Aedes aegypti* obtidos nos meios SOR_{30} , SOR_{50} , SOR_{75} , SOR_{100} em biorreator de bancada. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de significância de 5% no teste Tukey.

Estes resultados evidenciaram que apesar das diferenças encontradas nos valores de CT e ET nos meios avaliados, a produção de δ -endotoxinas parece ter sido similar em todos eles, levando a uma atividade tóxica equivalente. Por outro lado, os resultados são coerentes com os valores de ΔX obtidos, os quais não

apresentaram diferenças acentuadas. O mesmo pode ser dito em relação às taxas de esporulação.

O comportamento verificado em relação à toxicidade dos meios testados está de acordo com resultados obtidos por outros autores, que relatam que meios de cultivo que levam a altas concentrações celulares, não necessariamente levam a altas concentrações de esporos e endotoxinas em fermentações com *Bt*, (Farrera et al., 1998; López y López, 2000). Por outro lado, embora a síntese do cristal protéico esteja intrinsecamente ligada ao processo de esporulação da bactéria, elevados valores de ET não implicam necessariamente em alta atividade tóxica do meio fermentado (Avignone-Rossa e Mignone, 1993; Morris et al., 1996; Schnepf et al., 1998).

A atividade larvicida média verificada nos meios SOR foi melhor que as obtidas por Poncet et al. (1995), que na fermentação com cepas recombinantes de *Bti* obtiveram valores de LC_{50} iguais a 10,0 e 14,0 mg/L, respectivamente, contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*. Comparando-se com os dados obtidos por Ramada (2008), os valores foram equivalentes ao obtido pelo autor ($LC_{50}=7,41$ mg/L) no cultivo de *Bti* em meio formulado com melão e suplementado com sulfato de amônio, mas inferior ao encontrado no mesmo estudo com meio isento deste sal ($LC_{50}=3,22$ mg/L). A atividade tóxica (LC_{50}) também foi inferior àquelas reportadas por outros autores com emprego de diferentes meios: 0,02 mg/L, em meio composto com sobrenadante da própria fermentação (Luna et al., 2004); 0,22 mg/L, com extrato de batata (Poopathi e Kumar, 2003); 0,18 mg/L, em meio suplementado com esterco de galinha (Poopathi e Abidha, 2007); 0,27 mg/L, com farelo de soja e água de maceração de milho (Maldonado-Blanco et al., 2003); 0,27 mg/L, em meio com extrato de levedura e peptona (Prabakaran e Hoti, 2008).

Além da composição do meio de cultivo, o tipo de açúcar utilizado pode influenciar a produção de endotoxinas (Yang e Wang, 1998; Sachidanandham et al., 1997; Özkan et al., 2003; Panarotto, 2006). İçgen et al. (2002b) verificaram, para uma cepa tóxica para lepidópteros, que as mais altas concentrações de toxina foram obtidas em meios com sacarose, lactose e inulina, enquanto nos meios com glicose,

glicerol ou maltose a produção foi muito baixa. Özkan et al. (2003) também verificaram maior produção das frações Cry4Ba e Cry11Aa, por *Bti*, em meios com sacarose, dextrina, lactose, glicerol e inulina. Poopathi e Kumar (2003) também obtiveram alta atividade inseticida na fermentação de meios formulados com sacarose, utilizando *Bti* HD 567. Morris et al. (1996) e Panarotto (2006) verificaram que glicose foi carboidrato mais adequado à produção de endotoxinas por *Bt* var. *aizawa* e *Bti*, respectivamente.

Os resultados globais obtidos na fermentação dos meios SOR levaram à constatação que a relação entre as concentrações de ART e da fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) era desproporcional, em praticamente todos os meios, para o adequado desenvolvimento da bactéria. Apenas no caso do meio SOR₃₀, com S₀ de 31,0 g/L, o balanço C:N e as concentrações dos demais nutrientes parecem ter sido apropriados para o crescimento celular. Isto sugeriu que para diluições menores do xarope da solução osmótica (S₀ maiores, portanto), seria necessário suplementar nutricionalmente o meio de cultivo, a fim de obter uma relação C:N mais conveniente. Este ajuste poderia, eventualmente, influenciar também a atividade larvicida, que foi análoga em todos os meios testados. Desta forma, visando confirmar esta suposição e buscando melhorar os valores de LC₅₀ foram realizados os ensaios discutidos no item 4.4.

4.4 – Fermentação de meios formulados com solução osmótica e pulso de nutrientes durante o processo

Nos ensaios do Grupo 3 buscou-se avaliar de que forma o enriquecimento nutricional do meio de cultivo, feito no curso do processo, alteraria a cinética de crescimento microbiano. Foram avaliados meios com S₀ de 54,7 e 74,9 g/L (Meios SOR_{50P} e SOR_{75P}, respectivamente), mantendo-se inicialmente as mesmas condições dos ensaios com SOR₅₀ e SOR₇₅. Durante o cultivo, tomando-se como base os perfis cinéticos obtidos anteriormente, as condições nutricionais foram

alteradas pela adição de uma mistura de sais e extrato de levedura ao meio em fermentação.

Os resultados obtidos com SOR_{50P} são mostrados na Tabela 9, que inclui também os resultados obtidos em SOR_{50} , a fim de facilitar as comparações. A cinética de crescimento e de consumo de substrato é apresentada na Figura 11, que indica o momento em que foi realizado o pulso de nutrientes.

Na fermentação do meio SOR_{50} verificou-se que a fase linear de crescimento se estendeu até cerca de 8 h, quando as velocidades e crescimento começaram a diminuir (Figuras 5 e 7). Com o meio SOR_{50P} , portanto, este foi o momento escolhido para realizar a alimentação com nutrientes. Observou-se, ao contrário da desaceleração do crescimento verificada em SOR_{50} , que a curva de $X = f(t)$ apresentou tendência crescente e a fase linear prolongou-se até o tempo de 18 h (Figura 11). O tempo necessário para atingir a concentração celular máxima ($t_{x,m}$) foi de 20,5 h (Tabela 9), oito a mais que o de SOR_{50} , sendo obtida uma concentração máxima de células (X_m) de 21,6 g/L, valor 41,7% maior que aquela obtida no meio sem alimentação. Apesar de uma maior produção de biomassa, o prolongamento da Fase II implicou em uma produtividade em célula semelhante (1,1 g/L.h) a de SOR_{50} (1,2 g/L.h). Uma vez que a fase inicial da fermentação de SOR_{50P} pode ser considerada uma repetição de SOR_{50} , o valor encontrado de μ_m ($0,79 \text{ h}^{-1}$) era o esperado.

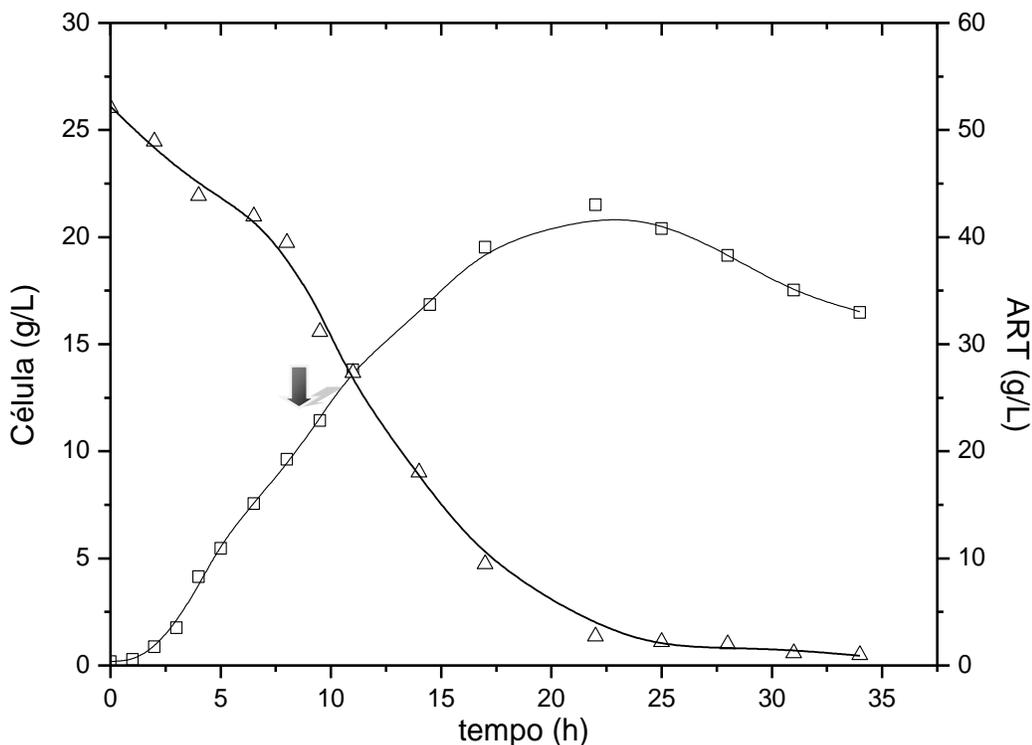


Figura 11 – Concentração de células (□) e de ART (△), em função do tempo, na fermentação do meio SOR_{50P} em biorreator de bancada. A seta indica o momento de adição da solução nutritiva.

Embora as condições nutricionais do meio SOR_{50P} tenham possibilitado o prolongamento da fase de crescimento até 20,5 h, também neste caso não houve o consumo total de substrato nas Fases I e II. A concentração residual de ART em $t_{x,m}$ foi, no entanto, significativamente menor (3,6 g/L) que a verificada em SOR₅₀, correspondendo a um consumo ($\Delta S_{x,m}$) de 93%, quase o dobro do observado naquele meio no mesmo período. Considerando-se o tempo total de processo, apesar do consumo de substrato ter sido muito superior em SOR_{50P}, ainda houve uma pequena concentração residual no final da fermentação. Com relação ao fator de conversão de substrato em células (calculado em $t_{x,m}$), o valor encontrado para SOR_{50P} (0,44 g/g) é coerente com o aumento desproporcional da produção de biomassa (ΔX) em relação ao consumo de ART no ensaio.

Apesar da maior duração da Fase II e da maior produção de biomassa, a duração das Fases III e IV em SOR_{50P} foi apenas 1 h maior que a observada em SOR₅₀. Com isso, o aumento no tempo total de processo correspondeu à diferença entre $t_{x,m}$ nestes ensaios.

Tabela 9: Resultados gerais obtidos no cultivo de *Bt var. israelensis* nos meios SOR_{50P} e SOR₅₀.

	SOR _{50P}	SOR ₅₀
S ₀ (g/L)	52,1	54,7
t _f (h)	34	28
t _{gr} (h)	6,5	6,5
t _{x,m} (h)	20,5	12,7
ΔS _{x,m} (g/L)	48,5	24,5
ΔS _f (g/L)	49,9	36,5
ΔS _f (%)	95,8	66,8
ΔX (g/L)	21,4	15,1
Y _{x/s} (g/g)	0,44	0,62
p _x (g/L.h)	1,05	1,2
μ _m (h ⁻¹)	0,79	0,80
ES (ufc/mL)	1,35. 10 ⁹	2,21. 10 ⁹
CV (ufc/mL)	3,28. 10 ⁸	5,77. 10 ⁸
CE (ufc/mL)	5,12. 10 ⁹	5,55. 10 ⁸
ET (ufc/mL)	6,47. 10 ⁹	2,76. 10 ⁹
CT (ufc/mL)	6,80. 10 ⁹	3,34. 10 ⁹
T _{SP} (%)	95,18	82,7
LC ₅₀ (mg/L)	27,27	8,00

S₀ - Concentração inicial de substrato; t_f - tempo de fermentação; t_{gr} - tempo de formação de grumos; t_{x,m} - tempo para obtenção da máxima concentração celular; ΔS_{x,m} - substrato consumido até t_{x,m}; ΔS_f - consumo total de substrato; ΔX - máxima concentração celular; Y_{x/s} - fator de conversão de substrato em células; p_x - produtividade em células; μ_m - máxima velocidade específica de crescimento; ES - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE - número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT - número total de células; T_{SP} - taxa de esporulação.

Com relação à variação do pH, o meio SOR_{50P} apresentou o mesmo perfil (dados não mostrados) verificado em SOR₅₀: queda nas primeiras horas do processo, devido à produção de ácidos orgânicos, e aumento no final do processo para valores próximos do neutro.

A Tabela 9 mostra que os valores de CT e ET foram consideravelmente maiores no meio SOR_{50P}, 2 e 2,3 vezes, respectivamente, em comparação com os obtidos em SOR₅₀. A taxa de esporulação foi cerca de 10% maior. No entanto, o número de esporos livres foi aproximadamente 63% menor que o obtido no meio SOR₅₀, indicando que o processo de lise celular estava atrasado. A Figura 12, que mostra os resultados comparativos das contagens de células e esporos nestes meios, evidencia claramente a diferença dos valores de CT e ET encontrados.

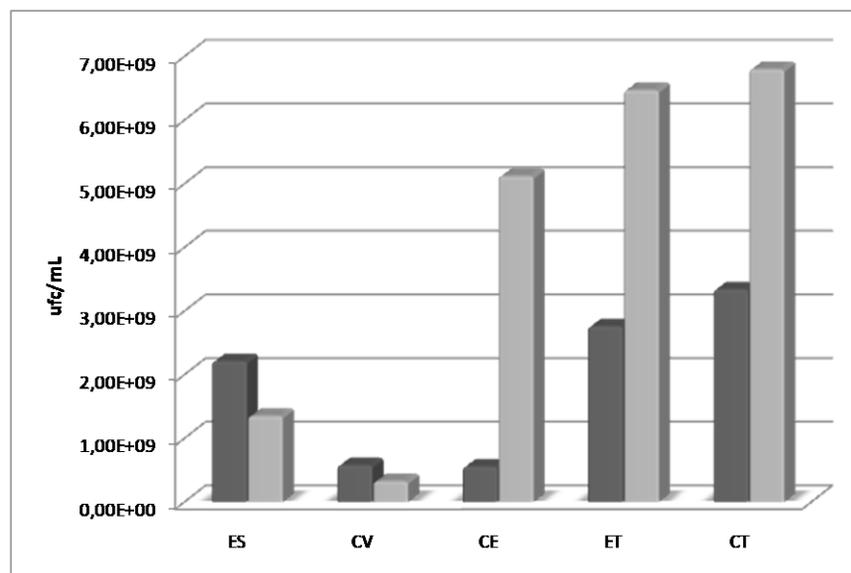


Figura 12 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios SOR₅₀ e SOR_{50P}. ES - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.

Anderson e Jayaraman (2003) também verificaram que concentrações de extrato de levedura da ordem de 20 g/L resultaram em uma população heterogênea de células vegetativas, células esporuladas e esporos no final do cultivo, prejudicaram, além disso, o processo de lise celular e liberação dos esporos, por terem afetado negativamente a síntese de componentes do esporo.

Apesar da expressiva diferença na produção de células e esporos, a atividade larvicida encontrada com o meio SOR_{50P} (27,27 mg/L) foi significativamente inferior à obtida com o meio SOR₅₀ (8,00 mg/L) (Tabela 9 e Figura 13), o que demonstrou a ineficiência da alimentação do meio para incrementar esse parâmetro. Como os valores de LC₅₀ dos demais meios SOR (item 4.3) também não diferiram do valor encontrado para SOR₅₀, a diferença destes para o do meio SOR_{50P} foi significativa em nível de 5% pelo teste Tukey.

Os dados mostraram que as concentrações de alguns componentes do meio de cultivo, após a alimentação, podem ter ficado acima das concentrações adequadas para o processo e podem ter interferido de maneira negativa sobre a produção das δ -endotoxinas. Dados da literatura mostram que os níveis ótimos de minerais para a síntese de δ -endotoxinas de *Bti* foram distintos daqueles necessários para o crescimento, mostrando que concentrações distintas de minerais atuam de forma diferente nos parâmetros relacionados com a fermentação de *Bti* (Sikidar et al., 1991).

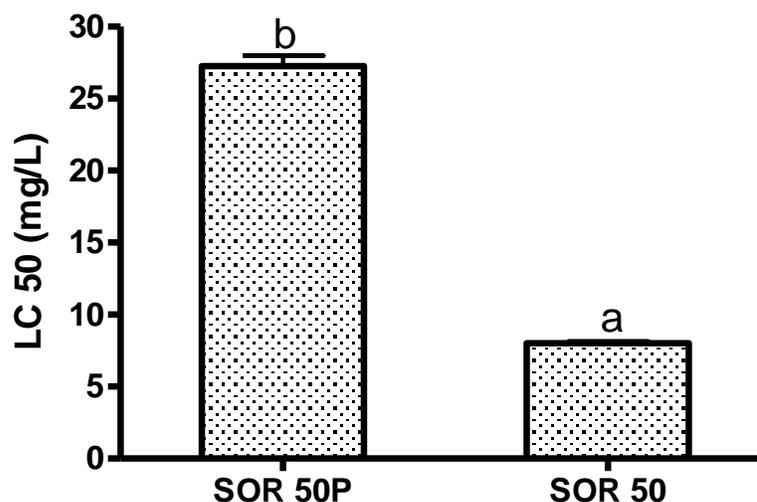


Figura 13 – Valores de LC₅₀ obtidos para larvas de *Aedes aegypti* obtidos na fermentação dos meios SOR₅₀ e SOR_{50P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A Tabela 10 e a Figura 11 mostram, respectivamente, os resultados gerais e a cinética de crescimento obtidos no ensaio com o meio SOR_{75P}.

A comparação dos perfis cinéticos de SOR_{75P} e SOR₇₅ mostra a mesma diferença verificada entre a cinética dos meios SOR₅₀ e SOR_{50P}. Após o pulso de nutrientes, em lugar de entrar na fase estacionária, a curva de crescimento manteve-se crescente (Figura 14) e $t_{x,m}$ foi alcançado somente com 31 h (Tabela 10), 15 a mais que em SOR₇₅. A concentração máxima de células (29,5 g/L) foi também muito superior (78%) àquela obtida no meio sem alimentação, levando a uma produtividade similar. Com perfis cinéticos análogos, o valor de μ_m (0,87 h⁻¹) foi também similar.

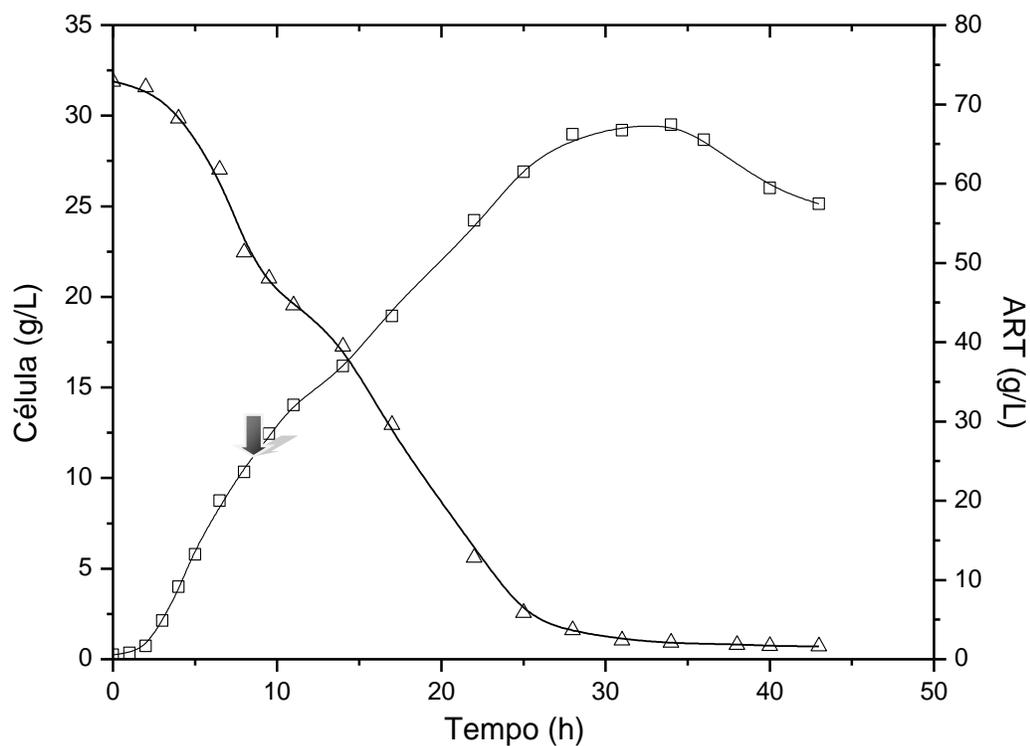


Figura 14 – Concentração de células (□) e de ART (△), em função do tempo, na fermentação do meio SOR_{75P} em biorreator de bancada. A seta indica o momento de adição da solução nutritiva.

Com relação ao consumo de substrato, também neste ensaio houve um incremento considerável no metabolismo de carboidratos, em comparação com o verificado no meio sem alimentação. Até $t_{x,m}$, 96,5% de substrato havia sido consumido, contrastando com os 35% verificados em SOR₇₅, indicando uma melhora no balanço C:N. Mas, da mesma forma, houve uma pequena concentração residual de ART no final da fermentação. O fator de conversão de substrato em células foi de 0,40 g/g, também coerente com o aumento desproporcional da produção de biomassa (ΔX) em relação ao consumo de ART no ensaio.

Tabela 10: Resultados gerais obtidos no cultivo de *Bt var. israelensis* nos meios SOR_{75P} e SOR₇₅.

	SOR _{75P}	SOR ₇₅
S ₀ (g/L)	72,9	74,9
t _f (h)	43	27
t _{gr} (h)	6,5	6,5
t _{x,m} (h)	31	16
ΔS _{x,m} (g/L)	70,4	26,2
ΔS _f (g/L)	71,3	34,9
ΔS (%)	97,7	46,6
ΔX (g/L)	29,3	16,1
Y _{x/s} (g/g)	0,4	0,61
p _x (g/L.h)	0,95	1,1
μ _m (h ⁻¹)	0,87	0,84
ES (ufc/mL)	1,37. 10 ⁹	2,02. 10 ⁹
CV (ufc/mL)	5,30. 10 ⁸	4,21. 10 ⁸
CE (ufc/mL)	4,90. 10 ⁹	6,78. 10 ⁸
ET (ufc/mL)	6,26. 10 ⁹	2,70. 10 ⁹
CT (ufc/mL)	6,79. 10 ⁹	3,12. 10 ⁹
T _{SP} (%)	92,2	86,5
LC ₅₀ (mg/L)	37,6	8,63

S₀ - Concentração inicial de substrato; t_f - tempo de fermentação; t_{gr} - tempo de formação de grumos; t_{x,m} - tempo para obtenção da máxima concentração celular; ΔS_{x,m} - substrato consumido até t_{x,m}; ΔS_f - consumo total de substrato; ΔX - máxima concentração celular; Y_{x/s} - fator de conversão de substrato em células; p_x - produtividade em células; μ_m - máxima velocidade específica de crescimento; ES - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE - número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT - número total de células; T_{SP} - taxa de esporulação.

Como mostra a Tabela 10 e a Figura 15, é evidente o melhor desempenho do processo fermentativo, em relação ao número total de células (CT) e de esporos (ET), quando se realiza um pulso de nutrientes durante a fermentação, sendo ambos

os parâmetros 2 vezes maior em SOR_{75P} que em SOR_{75} . A taxa de esporulação foi similar em ambos os meios (86,6 e 92,2%, respectivamente).

Da mesma forma observada em SOR_{50P} , verificou-se que no meio SOR_{75P} o número de esporos livres (ES) foi menor (47%) que o encontrado em SOR_{75} , indicando que esta condição também prejudicou de alguma forma a liberação dos esporos. A densidade celular, o alto metabolismo e a produção de alguns produtos de fermentação, podem ter contribuído para esses resultados, influenciando a lise celular.

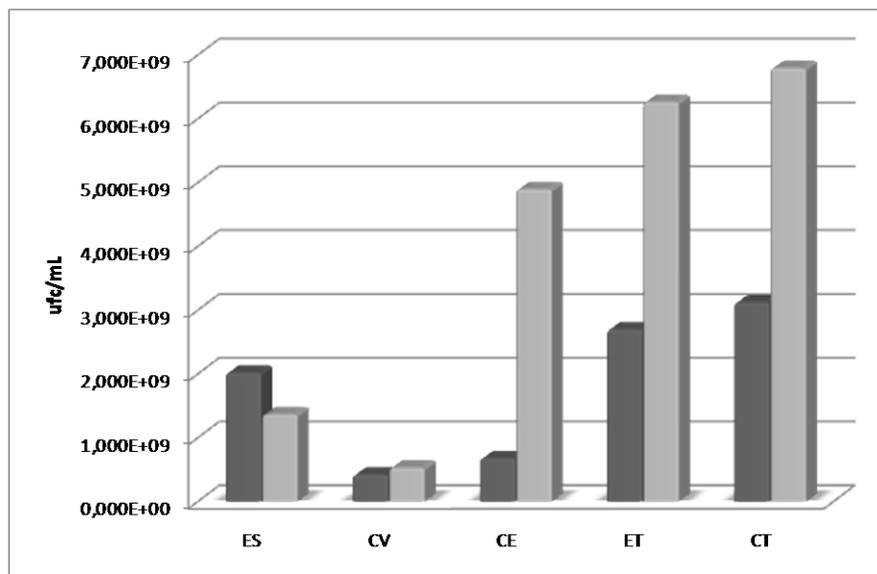


Figura 15 - Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios SOR_{75} e SOR_{75P} . ES - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.

A realização do pulso de nutrientes durante a fermentação, e o conseqüente incremento na produção de células, não levou, também neste caso, a uma melhor atividade tóxica do meio fermentado (Figura 16). Ao contrário, a diferença entre os valores de LC_{50} obtidos com SOR_{75P} (37,6 mg/L) e SOR_{75} (8,63 mg/L) foi ainda mais

acentuada. A atividade larvicida de SOR_{75P} foi, na verdade, inferior a de todos os demais meios avaliados neste trabalho (Figura 17), confirmando o efeito negativo de maiores concentrações de nutrientes sobre a produção de toxinas.

No cultivo de *Bt* var. *kurstaki*, Arcas et al. (1987) verificaram um aumento de sete vezes na concentração de toxinas quando a concentração de glicose foi aumentada de 8 pra 56 g/L, com o correspondente aumento dos demais constituintes do meio. Anderson e Jayaraman (2003) testaram a influência de diferentes concentrações da fonte de carbono (glicose: 3,4, 18,7 e 34 g/L) e de nitrogênio (extrato de levedura: 1, 10,5 e 20 g/L) sobre o cultivo de *Bt* var. *galleriae* e concluíram que o efeito do aumento da fonte de nitrogênio sobre a síntese de toxinas é mais acentuado que o da fonte de carbono.

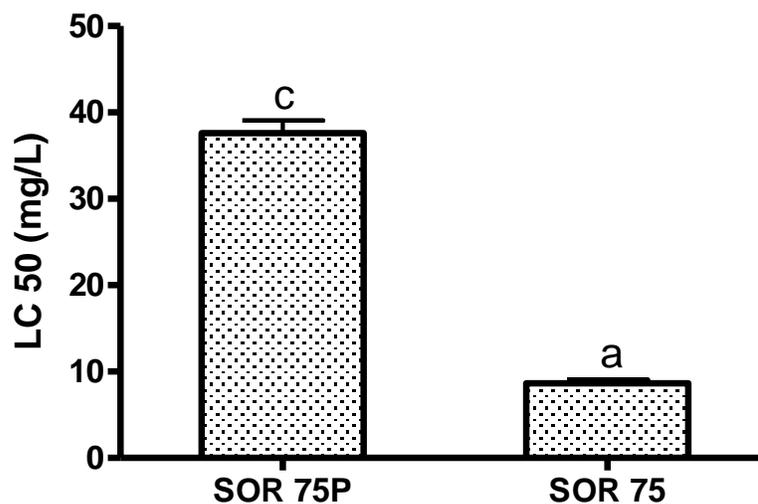


Figura 16 - Valores de LC₅₀ para larvas de *Aedes aegypti* obtidos na fermentação dos meios SOR₇₅ e SOR_{75P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

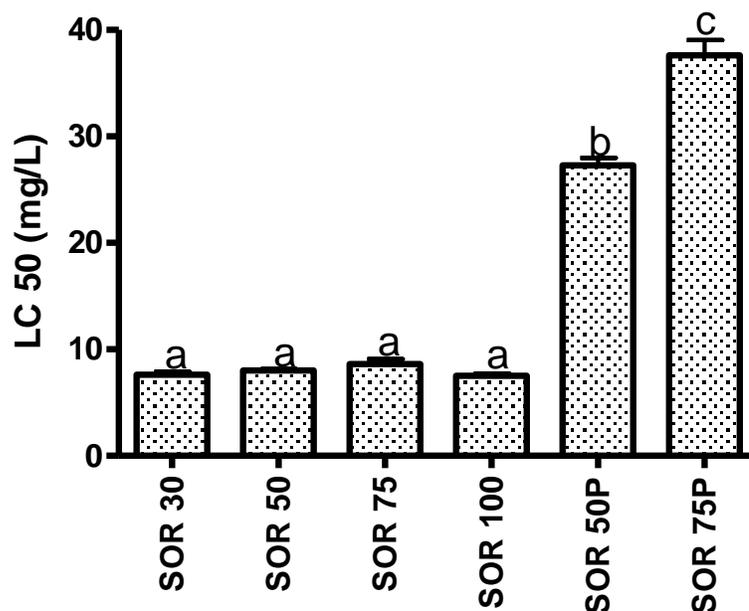


Figura 17 - Valores de LC₅₀ obtidos na fermentação dos meios SOR₃₀, SOR₅₀, SOR₇₅, SOR₁₀₀, SOR_{50P} e SOR_{75P} em biorreator de bancada. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados gerais obtidos com os meios SOR_{50P} e SOR_{75P} mostraram que em termos de concentração celular (ΔX), consumo total de açúcar (ΔS_t), células e esporos totais (CT e ET), a realização de um pulso de nutrientes no meio em fermentação tem um efeito positivo, sendo obtidos valores superiores aos alcançados com os meios sem alimentação. Os dados também confirmaram que havia uma relação desproporcional entre as concentrações de ART e da fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) nos meios formulados com proporções crescentes da solução osmótica. Porém, com relação à atividade larvívica (LC₅₀), a alimentação dos meios não resultou na contribuição esperada, indicando que a concentração de alguns minerais influenciou de forma negativa a produção de toxinas.

Considerando-se, desta forma, os resultados globais do estudo, constatou-se que a solução residual da desidratação osmótica de abacaxi pode constituir uma matéria-prima efetiva para o cultivo de *Bti*, ainda que sua composição nutricional não atenda plenamente as exigências da bactéria. Com uma suplementação adequada é possível, no entanto, obter atividades tóxicas equivalentes às obtidas por outros autores, sendo ainda possível melhorar estes níveis com a otimização de outros parâmetros de processo.

Com base apenas nos resultados obtidos até o momento, e considerando uma eventual aplicação deste resíduo para este processo fermentativo, acredita-se que a diluição do xarope para concentrações de ART próximas de 30 g/L sejam as mais adequadas. Nesta condição (meio SOR₃₀), foi possível obter elevadas concentrações de células e de esporos e atividade tóxica análoga a de todos os demais meios SOR. Esta atividade foi, além disso, muito superior às obtidas nos meios mais ricos em nutrientes (SOR_{50P} e SOR_{75P}). Isto representaria uma diluição aproximada de 10 vezes de soluções osmóticas com cerca de 40 °Brix, implicando em grande aproveitamento do resíduo. Além desta economia, o fato de não haver necessidade de alimentação visando o enriquecimento adicional em nutrientes para o melhor desempenho do microrganismo, também significaria uma redução no custo do processo de produção de bioinseticida.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho propôs-se avaliar o xarope residual gerado após a desidratação osmótica de abacaxi variedade Smooth Cayenne como base para a formulação de meios para o cultivo da bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*), visando o eventual emprego da biomassa microbiana para a produção de bioinseticida. Para obtenção da solução osmótica, fatias de fruta foram desidratadas pela imersão em solução a 40% de açúcar invertido com grau de inversão superior a 99%, utilizando relação fruta:xarope de 1:5 (p/p), temperatura de 50 °C, frequência de agitação de 60 min⁻¹ e tempo de incubação de 2 h. Primeiramente, a aplicabilidade da solução osmótica para o processo fermentativo foi comparada com o desempenho da bactéria em um meio de referência. Na seqüência, estudou-se a cinética da fermentação em meios formulados com diluições decrescentes do xarope osmótico, visando obter concentrações crescentes de açúcares redutores totais (ART entre 31 e 106,2 g/L). Em uma terceira etapa, foi avaliada a influência do enriquecimento nutricional do meio de cultivo, no curso da fermentação, sobre os principais parâmetros cinéticos do processo. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

5.1- Ensaio do Grupo 1

❖ A solução residual da desidratação osmótica de abacaxi apresentou potencial para ser utilizada no cultivo de *Bti*, embora tenha havido necessidade de suplementação nutricional do meio para o adequado desenvolvimento microbiano. No xarope não suplementado, os números totais de células e de esporos foram sensivelmente inferiores (2,5 e 3 vezes), com taxa de esporulação de apenas 70,3%.

5.2 - Ensaio do Grupo 2

❖ Os perfis cinéticos de crescimento foram similares nos meios compostos com concentrações variadas de solução osmótica [concentrações iniciais de ART (S_0) entre 31 e 106,2 g/L], embora no meio mais concentrado tenha havido uma defasagem da curva de crescimento em relação às demais;

❖ Valores similares das máximas velocidades específicas de crescimento (μ_m) foram encontrados para todas as concentrações iniciais de ART testadas, indicando ausência de inibição pelo substrato;

❖ Valores crescentes de S_0 implicaram em valores similares das máximas concentrações celulares, apesar do maior tempo de crescimento observado nos meios com maiores S_0 ;

❖ Em nenhum dos meios avaliados houve consumo total de substrato durante a fase de crescimento, embora este tenha aumentado gradativamente com o aumento de S_0 , mostrando que a interrupção da multiplicação celular foi decorrente da deficiência nutricional do meio de fermentação e que parte do substrato foi direcionada para outros processos metabólicos;

❖ Valores decrescentes de $Y_{X/S}$ (fator de conversão de substrato em célula) foram obtidos com o aumento de S_0 , em decorrência do aumento gradativo no consumo de substrato e pequena variação na produção de células;

❖ O número de células totais (CT) decresceu com o aumento de S_0 , apesar do comportamento inverso das máximas concentrações celulares, indicando que a massa celular foi variável nos diferentes meios. O número de esporos totais (ET)

seguiu a mesma tendência, mas as taxas de esporulação foram equivalentes para os diferentes meios. A lise celular foi, no entanto, prejudicada no meio com maior S_0 ;

- ❖ Os valores de atividade tóxica (LC_{50}) não apresentaram diferença significativa em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey, mostrando que as diferentes concentrações de ART não interferiram no processo de produção das δ -endotoxinas.

5.3 - Ensaio do Grupo 3

- ❖ A realização de um pulso de nutrientes em curso de fermentação levou a um prolongamento da fase de crescimento, com ambos S_0 testados (52,1 e 72,9 g/L), sendo obtidas concentrações celulares máximas superiores (41,7 e 78%, respectivamente) às obtidas nos mesmos meios sem alimentação. A produtividade em células foi semelhante em ambos os casos;

- ❖ Apesar do consumo de substrato não ter sido total, houve uma melhora sensível no metabolismo de carboidratos, comprovando que nos meios SOR havia uma relação desproporcional entre as concentrações de ART e da fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura). O aumento desproporcional da produção de biomassa em relação ao consumo de ART levou, no entanto, a menores valores de $Y_{X/S}$;

- ❖ Os valores de CT foram consideravelmente maiores (2 vezes) nos meios com suplementação de nutrientes, mas o número de esporos livres ao final do processo foi muito inferior, indicando retardamento do processo de lise celular;

- ❖ Valores significativamente inferiores de LC_{50} foram obtidos, indicando que a alimentação do meio de cultivo no curso da fermentação influenciou de forma negativa a produção de toxinas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELL-HAMEED, A. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.857-861, 2001.
- ABDELL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – III. Selection of media for delta-endotoxin production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.313-317, 1990.
- AGNELLI, M.E.; MARANI, C.M.; MASCHERONI, R.H. Modelling of heat and mass transfer during (osmo) dehydrofreezing of fruits. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.415-424, 2005.
- ALVES, D.G.; BARBOSA, J.L.; ANTONIO, G.C.; A.; MURR, F.E.X. Osmotic dehydration of Acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.). **Journal of Food Engennering**, v.68, p.99-103, 2005.
- ALVES, L.F.A.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M; CAPALBO, D.M.F. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. **Biocontrol Science and Technology**, v.7, p.377-383, 1997.
- 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 Biochemical Engineering Quarterly**, v.17, n.3, p.225-231, 2003.

- ANDRADE, S.A.; METRI, J.C.; BARROS NETO, B. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.276-281, 2003.
- ANTONIALI, S.; SANCHES, J. (2008) **Abacaxi: Importância Econômica e Nutricional**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acessado dia 12 de janeiro de 2009.
- ARCAS, J.; YANTORNO, G.; ERTOLA, R. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. **Biotechnology Letters**, v.9, n.2, p.105-110, 1987.
- ARONSON, A.I. The two face of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. **Molecular Microbiology**, v.7, p.489-496, 1993.
- 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.
- AZEREDO, H.M.C.; JARDINE, J.G. Desidratação osmótica de abacaxi aplicada à tecnologia de métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.74-82, 2000.
- BARAT, J.M.; FITO, P.; CHIRALT, A.. Modelling of simultaneous mass transfer and structural changes in fruit tissues. **Journal of Food Engineering**, v.49, p.77-85, 2001.
- 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. Estudo da influência do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82 em regime descontínuo. 1998. **Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica)** - Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil. 1998.
- 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**. John Wiley and Sons Ltd., p.255-267, 1993.

- BRANDÃO, M.C.C. MAIA,G.A.; LIMA,D.P.; PARENTE, E.J.S.; CAMPELLO, C.C.; NASSU, R.T.; FEITOSA, T.S.P. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico-solar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.38-41, 2003.
- BRITO, C.A.K.; SATO, H.H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W.J. Abacaxi Gomo-de-mel (*Ananas comosus* (L.) Merrill): características da polpa e da peroxidase do suco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p. 244-249, 2005.
- BULLA JR., L.A.; FAUST, R.M.; ANDREWS, R.; GOODMAN, N. Insecticidal *Bacilli*. In: D. A. Dubnau (ed.). **The Molecular Biology of the Bacilli**. New York: Academic Press, Inc., v.2, p.185-209, 1985.
- CHEN, S.; HONG, J.Y.; WU, W.T. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.677-681, 2003.
- COOPER D. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.49, p.21-26, 1994.
- CORZO, O.; GOMEZ, E.R. Optimization of osmotic dehydration of cantaloupe using desired function methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 2, p. 213-219, 2004.
- CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: Cunha, G.A.P. da; Cabral, J.R.S.; Souza, L.F. da S. (Org.) **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.17-51, 1999.
- DALLA ROSA, M.; GIROUX, F. Osmotic treatments (OT) and problems related to the solution management. **Journal of Food Engineering**, v.49, p.223-236, 2001.
- DE BARJAC. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Simulium damnosum* (DIPTERA: SIMULIIDAE) larvae. **Mosquito News**, v.39, n.4, 1978.
- DHINGRA, D.; SINGH, J., PATIL, R.T., UPPAL, D.S. Osmotic dehydration of fruits and vegetables: A review. **Journal of Food Science Technology**, v.45, n.3, p.209–217, 2008.
- DIAS, M.C. **Comida jogada fora**. Correio Braziliense, 31 de Agosto de 2003. Disponível em: <<http://www.consciencia.net/2003/09/06/comida.html>>. Acessado em: 19 de janeiro de 2007.

- DIONELLO, R.G.; BERBERT, P.A.; BERBERT-MOLINA, M.A.; VIANA, A.P.; CARLESSO, V.O.; QUEIROZ, V.A.V. Desidratação por imersão-impregnação de abacaxi em soluções de sacarose e em xarope de açúcar invertido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.701-709, 2007.
- DIONELO, R.G. Desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção de abacaxi (*Ananas comusus* (L.) Merrill). **Tese (Doutorado em Produção Vegetal)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2005.
- DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD-I, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebral Pathology**, v.15, p.232-239, 1970.
- FARRERA, R.R.; PÉREZ-GUEVARA, F.; DE LA TORRE, M. Carbon-nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, n.6, p.758-765, 1998.
- FITO, P.; CHIRALT, A.; BARAT, J.; SALVATORI, J.D.; ANDRÉS, A. **Food Science and Technology International**; v.4; p.329-338, 1998
- FLORES, E.R.; PÉREZ, F.; De La TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.83, n.6, p.561-564. 1997.
- GARCIA-MARTINEZ, E.; MARTINEZ-MONZO, J.; CAMACHO, M.M.; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Characterisation of reused osmotic solution as ingredient in new product formulation. **Food Research International**, n.35, p.307–313, 2002.
- GILL, S.S.; COWLES; E.A.; PIENRANTONIO, P.V. The mode of action of endotoxins. **Annual Review of Entomology**. v.37, p.615-636, 1992.
- GLARE, T.R.; O' CALLAGHAN, N.M. **Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety**. Chichester: Wiley and Sons, 350p, 2000.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, N.M. Environmental and health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health, Grasslands**, New Zealand. Division, AgResearch, Lincoln, p.58, 1998.
- GOMES, A.T.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. Desidratação osmótica: uma tecnologia de baixo custo para o desenvolvimento da agricultura familiar. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v.3, n.3, p.212-226, 2007.
- GREENSMITH, M. **Practical dehydration**. 2ed. Flórida: CRC Press, 274p., 1998.

- HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas auruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresearch Technology**, v.65, p.73-82, 1998.
- HÖFTE, H.K.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v.53, p.242-245, 1989.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Comunicação Social**, 17 de outubro de 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=998>. Acessado em: 10 de janeiro de 2009.
- IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCEENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I: Effects of mineral elements and pH. **Research of Microbiology**, v.153, p.599-604, 2002a.
- IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCEENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, v.153, p.605-609, 2002b.
- KANG, B.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. **Biotechnology Letters**, v.14, n.8, p.721-726, 1992.
- KAYMAK-ERTEKIN, F.; SULTANOĞLU, M. Modelling of mass transfer during osmotic dehydration of apples. **Journal of Food Engineering**, v. 46, n. 4, p. 243-250, 2000.
- KHUZHAMSHUKUROV, N.A.; YUSUPOV, T.Y.; KHALILOV I.M.; GUZALOVA A.G.; MURADOV, M.M.; DAVRANOV, K.D. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, n.6, p.596-598, 2001.
- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v.24, n.27, p.308, 1994.
- KOZIEL, M.G.; CAROZZI, N.B.; CURRIER, T.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.V. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v.11, p. 171-228, 1993.
- KRAEMER-SCHAFHALTER, A.; MOSER, A. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. **Bioprocess Engineering**, v.14, p.139-144, 1996.
- LACEY, L.A.; KAYA, R.H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control. agents: Do they have a future? **Biological Control**, v.21, p.230-248, 2001.

- LAZARIDES, H.N. Osmotic Preconcentration: Developments and Prospects. In: SINGH, R.P.; OLIVEIRA, F.A.R. (Eds.). **Minimal processing of foods and process optimization. An Interface**. Boca Raton: CRC Press, p. 73-85, 1994.
- LENART, A. Osmo-convective drying of fruits and vegetables: technology and application. **Drying Technology**, v.14, n.2, p.391-413, 1996.
- LENART, A., PIOTROWSKI, D. Drying characteristics of osmotically dehydrated fruits coated with semipermeable edible films. In: KUDRA, T.; MUJUMDAR, A.S. **Drying Technology**. New York: MARCEL DEKKER, vol.19, n.5, p. 849-877, 2001.
- LENART, A.; GRODECKA, E. Influence of kind of osmotic substance on the kinetics of convection drying of apples and carrots. **Food Technology Nutrition**, v.18, p.27- 35, 1989.
- LIMA, A.S.; FIGUEIREDO, R.W.; LIMA, J.R.; SOUZA NETO, M.A.; SOUZA, A.C.R. Estudos das variáveis de processo sobre a cinética de desidratação osmótica de melão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p. 282-286, 2004.
- LIU, W.M.; BAJPAI, R.K. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Program**, v.11, p.589-591, 1995.
- LÓPEZ y LÓPEZ, V.E.; DE LA TORRE, M. Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.254-260, 2005.
- LÓPEZ y LÓPEZ, V.E.; CHAVARÍA-HERNÁNDEZ, N.; FERNÁNDEZ-SUMANO, P.; DE LA TORRE, M. Fermentation process for bioinsecticide production: an overview. **Recent Research Developments in Biotechnology and Bioengineering**, v.3, p. 1-20. 2000.
- LUNA, C.L.; SILVA, G.R.; RIOS, E.M.M.M. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. **Biotechnology Letters**, v.26, p.143-145, 2004.
- MAGALHÃES, A.M.; QUEIROZ, M.R. Desidratação osmótica de abacaxi. In. **IX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**. Campinas, SP, setembro 2001.
- 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.19, n.7, p.671-674, 2003.

- MASTRANGELO, M.M.; ROJAS, A.M.; CASTRO, M.A.; GERSCHENSON, L.N.; ALZAMORA, S.M. Texture and structure of glucose-infused melon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 769-776, 2000.
- MATSUURA, F.C.A.U.; ROLIM, R.B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando a produção de um “blend” com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.138-141, 2002.
- MIGNONE, C.F., AVIGNONE-ROSSA, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.46, p.78-84, 1996.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426, 1959.
- Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Abacaxi Pós-Colheita**. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa, 45p.,1998.
- MORRIS, O.N.; CONVERSE, V.; KANAGARATNAM, P.; DAVIES, J.S. Effect of cultural conditions on spore crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawa* (HD 133). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.129-136, 1996.
- MOTA, R.V. Avaliação da qualidade físico-química e aceitabilidade de passas de pêsego submetidas à desidratação osmótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.789-794, 2005.
- MURRELL, W.G. The biochemistry of the bacterial endospore. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.1, n.133-251, 1967.
- NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2007. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/>. Acessado em: 12 janeiro 2009.
- NEVES FILHO, L.G. Alimentos resfriados e congelados. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 14, 1994, São Paulo, SP. **ANAIS...**, p.12-19.
- OBETA, J.A.; OKAFOR, N. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied Environment and Microbiology**, v.47, n.4, p.863-867, 1984.
- ÖZKAN, M.; DILEK, F.B; YETIS, U.; ÖZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**, v.154, p.49-53, 2003.

- PALOU, E. ; LÓPEZ-MALO, A.; ARGAIZ, A.; WELTI, J. Osmotic dehydration of papaya. Effect of syrup concentration. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.33, n.6, p.621-630, 1993.
- PANAROTTO, C. Influência de parâmetros operacionais, fontes proteicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 2006. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS. Brasil. 2006.
- PARK, K.J.; BIN, A.; BROD, F.P.R. Drying of pear d'Anjou with and without osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.97-103, 2002.
- PEIRÓ, R.; DIAS, V.M.C.; CAMACHO, M.M.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Micronutrient flow to the osmotic solution during grapefruit osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.299–307, 2006.
- PEIRÓ-MENA, R.; CAMACHO, M.M.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Compositional and physicochemical changes associated to successive osmodehydration cycles of pineapple (*Ananas comosus*). **Journal of Food Engineering**, v.79, p.842–849, 2007.
- PELCZAR, M; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. Caracterização dos microrganismos. In: **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996. 1v. Cap.3, p.75-99.
- PERES, P.S. **O varejo vai determinar a melhor embalagem para frutas, legumes e verduras** (FLV). Disponível em: <<http://www.abpo.org.br/artigos .html#março>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2008.
- PESSANHA, L. G. Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para a produção de biomassa e a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 2005. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)** – UENF, Campos dos Goytacazes, 2005.
- PESSANHA, L.G. Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 2008. **Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. Brasil. 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 vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48 n.1, p.127-132, 2004.

- POKHARKAR, S.M.; PRASAD, S. Mass transfer during osmotic dehydration of banana slices. **Journal of Food Science and Technology**, v.35, n.4, p.336-338, 1998.
- POLANCZYK, R.A. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas – do uso convencional em pulverização à Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.31, jul/dez, 2003.
- PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interaction among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.66, n.2, p.131-135, 1995.
- POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Use of feather-based culture media for the production of mosquit larvicide. **Biological Control**, v.43, p.49-55, 2007.
- POOPATHI, S.; KUMAR, A. Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.96, n.4, p.1039-1044, 2003.
- POOPATHI, S.; KUMAR, A.; KABILAN, L., Sekar V. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.219-216, 2002.
- PRABAKARAN, G.; HOTI, S.L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of delta-endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquit larvicide. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.961-965, 2008.
- PRINZIVALLI, C.; BRAMBILLA, A.; MAFFI, D.; SCALZO, R.L.O.; TORREGGIANI, D. Effects of osmosis time on structure, texture and pectin composition of strawberry tissue. **Europe Food Research Technology**, v.224, p.119-127, 2007.
- QUEIROZ, V.A.V. Qualidade de goiaba (*Psidium guajava* L.) submetida aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem por convecção. **Tese (Doutorado em Produção Vegetal)** UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
- QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A. BERBERT-MOLINA, M.A.; GRAVINA, G.A.; QUEIROZ, L.R.; Deliza, R. Desidratação por imersão-impregnação e secagem por convecção de goiaba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1479-1486, 2007.
- QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A.; BERBERT-MOLINA, M.A., GRAVINA, G.A.; QUEIROZ, L.R.; Accácio da SILVA, J.A. Qualidade nutricional de goiabas

- submetidas aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.329-340, 2008.
- RAMADA, J.S. Formulação de meios a base de melaço de cana-de-açúcar para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 2008. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.
- RAMALLO, L.A.; MASCHERONI, R.H. Rate of water loss and sugar uptake during the osmotic dehydration of pineapple. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.5, 2005.
- RAOULT-WACK, A. L.; GUILBERT, S.; MAGUER, M.; RIOS, G. Simultaneous water and solute transport in shrinking media-Part 1. Application to dewatering and impregnation soaking process analysis (Osmotic Dehydration). **Drying Technology**, v. 9, n. 3, p. 589-612, 1991.
- RAOULT-WACK, A.L. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, n. 8, p. 255-260, 1994.
- RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Effect of temperature and concentration on osmotic dehydration of coconut. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 27, n. 6, p.564-567, 1994.
- RODRIGUES, R. C. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico sobre a produção de biomassa e a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 2006. **Monografia (Licenciatura em Biologia)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
- ROGOFF, M.; YOUSSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: Microbiological considerations. **Annual Review of Microbiology**, v.23, p.257-386, 1969.
- ROWE, G.E.; MARGARITIS, A. Endocellular fatty acid composition during batch growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77, p.503-507, 2003.
- ROWE, G.E.; MARGARITIS, A.; WEI, N. Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. **Biotechnology Progress**, v.19, p.1439-1443, 2003.
- SACHIDANANDHAM, R.; JENNY, K.; FIECHTER, A. Stabilization and increased production of insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady- and transient-state continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.12-17, 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 endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Zbl Microbiology**, v.138, p.553-563, 1983.
- SARRAFZADEH, M.H.; NAVARRO, J.M. The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.305-310, 2006.
- SCHNEPF, H.E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, n.3, p.775-806, 1998.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (SMS) Ministério da Saúde. **Portal da Saúde**. Disponível em: <www.saude.gov.br/>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2008.
- SERENO, A.M.; HUBINGER, M.D.; COMESAÑA, J.F.; CORREA, A. Prediction of water activity of osmotic solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p.103-114, 2001.
- 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.
- SINGH, B.; KUMAR, A.; GUPTA, A.K. Study of mass transfer kinetics and effective diffusivity during osmotic dehydration of carrot cubes. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.471-480, 2007.
- SOMMER, R. (1996) Yeast Extracts: Production, Properties and Components. In: **International Symposium on Yeasts**, 9th, 1996, Sydney, Austrália. Disponível em: <<http://ohly.de/publications/download/Yeast%20extracts%20Production.doc>>. Acessado em: 15 de janeiro de 2009.
- SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A.; SOUZA FILHO, M.S.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUZA, A.C.R. Goiabas desidratadas osmoticamente seguidas de secagem em estufa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p.414-416, 2003a.

- SOUSA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.A.; MAIA, G.A.; SOUZA FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, R.W. Desidratação osmótica de frutos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA**, v. 37, p. 94-100, 2003b.
- SOUZA-NETO, M.A.; MAIA, G.A.; LIMA, J.R.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUZA-FILHO, M.S.M.; LIMA, A.S. Cinética de desidratação osmótica de manga. **Ciências Exatas e da Terra**, v.10, n.2, p.37-44, 2004.
- SPIRONELLO, A.; QUAGGIO, J.A.; TEIXEIRA, L.A.J.; FURLANI, P.R.; SIGRIST, J.M.M. Pineapple yield and fruit quality affected by NPK fertilization in a tropical soil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, 2004.
- STAHLY, P.; ANDREWS, R.E.; YOUSSTEN, A.A. The genus *Bacillus* – Insect Pathogens. In: Balows, A.H.G.; Truper, M.; Dworkin, W.; Harder, K.H.; Schliefer (Ed.). **The Prokaryotes**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1991.
- TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.3, p.867-871, 2002.
- TORREGGIANI, D. Osmotic dehydration in fruit and vegetable processing. **Food Research International**, v.26, p.59-68, 1993.
- TORREGGIANI, D.; BERTOLO, G. Osmotic pre-treatments in fruit processing: Chemical, physical and structural effects. **Journal of Food Engineering**, v. 49, 247-256, 2001.
- VALLEJO, F.; GONZÁLEZ, A.; POSADA, A.; RESTREPO, A.; ORDUZ, S. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.279-281, 1999.
- 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. Barley based medium for the cost-effective production on *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.173-178, 2005.
- VORA, D., SHETNA, Y.I. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in seed meal extract media containing cystine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.747-749, 1999.
- WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of

- Bacillus thuringiensis* **Applied Environment Microbiology**, v.43, n.6, p.1473-1480, 1982.
- WHO, (1999) *Bacillus thuringiensis: Microbial Pest Control Agent*; World Health Organization: Geneva.
- WINKLER, M. Limitations of fermentation process for utilization of food wastes. In: Wiseman, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. New York: Ellis Horwood, Chapter 9, p.271-307, 1983.
- XIAOYAN, L.; YI, L.; PENG, L.; JUNCHENG, Z.; Li, L.; SONGSHENG Q.; ZINIU, Y. Microcalorimetric study of *Bacillus thuringiensis* growth with different plasmid numbers and various promoters. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.79, p.649–652, 2005
- YANG, X.M.; WANG, S.S. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.28, p.95-98, 1998.
- YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; QU, S.S.; YU, Z.N. A microcalorimetric study of the biologic effect of Mn(II) on *Bacillus thuringiensis* growth. **Journal of 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 **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.39, n.6, p.576-580, 2003.