

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO SÓLIDO-FLUIDO NA PRODUÇÃO DE
BIOINSETICIDAS A PARTIR DE *Bacillus sphaericus* E
Bacillus thuringiensis var. *israelensis*

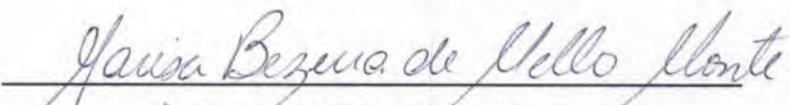
Christine Lamenha Luna

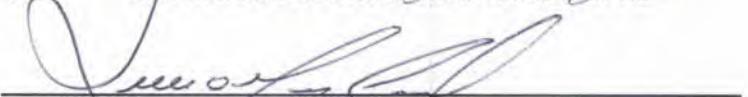
TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

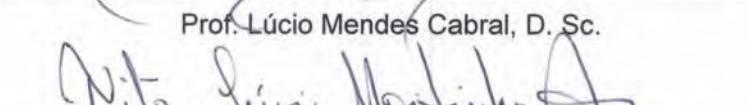
Aprovada por:


Prof. Giulio Massarani, D. Sc.


Prof. Carlos Edison Lopes, Ph.D.


Drá. Marisa Bezerra de Melo Monte, D. Sc.


Prof. Lúcio Mendes Cabral, D. Sc.


Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2004

ENG. QUIMICA/CT
232

LUNA, CHRISTINE LAMENHA

Avaliação de Técnicas de Separação Sólido-Fluido na Produção de Bioinseticidas a Partir de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

[Rio de Janeiro] 2004

XXVI, 200 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2004)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Separação Sólido-Fluido

2. *Bacillus sphaericus*

3. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*Aos meus pais, José Audísio e Maria Agristina, por tudo que sou,
pela vida, incentivo, amor, por tudo que representam para mim.*

*Aos meus irmãos, Christiane, Cláudio e Clarice,
meus grandes e verdadeiros amigos.*

À minha avó Bernadeth, exemplo de vida, meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

- ◊ A Deus, por tudo, pelas bênçãos, por sempre tornar possíveis todos os caminhos que sigo.
- ◊ Ao professor, mestre e amigo Giulio Massarani, exemplo de amor à arte de ensinar e de dedicação obstinada à pesquisa científica, sempre solícito e atencioso em todos os momentos. Agradeço pela oportunidade de compartilhar dos seus ensinamentos e de sua amizade.
- ◊ Ao professor, mestre e amigo Carlos Edison Lopes, grande incentivador de minha vida profissional, pelo apoio, confiança e amizade sempre presentes.
- ◊ À professora e amiga Eugênia Rios, exemplo de profissional dedicada ao trabalho, pelo estímulo e apoio em todos os momentos.
- ◊ À professora e amiga Maria de Los Angeles Palha, pela amizade e conselhos nos momentos de dificuldades.
- ◊ Aos professores do Departamento de Antibióticos da UFPE, Glícia Calazans, José Otamar, Fátima Queiroz, Janete Magali, Eulália, Ana Maria, Márcia, pelo apoio e incentivo constantes durante o decorrer da pesquisa.
- ◊ À técnica e amiga Vanda, meus sinceros agradecimentos pela valiosa colaboração cotidiana, amizade e apoio técnico indispensável na realização dos trabalhos.
- ◊ Ao amigo Irapuan Pinheiro, sempre disposto a ajudar, pelo companheirismo, dedicação e amizade.
- ◊ Aos técnicos, estagiários e alunos do Laboratório de Processos Fermentativos do DANTI/UFPE: Marcela, Cynthia, Danilo, Salatiel, Adriana, Carol, Valdemir, Rita, Cíntia, pela amizade, alegria e momentos de descontração.

- ◊ A todos os professores e funcionários do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, que possibilitaram as condições necessárias para a realização do trabalho.
- ◊ A todos do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Dra. Leda Régis, Chica, Sidney, Aninha, Alaíde e toda a equipe técnica envolvida na realização dos testes biológicos, meus sinceros agradecimentos pela competente colaboração científica. Agradeço em especial às amigas Maria Alice e Cláudia, pela grande contribuição ao trabalho e pela amizade.
- ◊ À toda a equipe e agentes de saúde que trabalharam na aplicação e monitoramento dos testes de atividade biológica em campo, pela valiosa colaboração.
- ◊ A todos que fazem o Laboratório de Tecnologia Mineral da UFPE, Prof. Baltar, Leila, Marcelo, pela valiosa colaboração para a realização dos ensaios de flotação em célula mecânica.
- ◊ À Corn Products Brasil – Ingredientes Industriais Ltda., que cedeu a milhocina utilizada nos experimentos de fermentação.
- ◊ À Tanac SA, pelas amostras de tanino utilizadas nos experimentos de flocação.
- ◊ Aos inesquecíveis amigos do LSP/COPPE: Flávia, Marcelinho, Marcel, Marquinho, John-John, Sílvia, Claudinha, que me acolheram e me fizeram sentir em casa, pelas descobertas, pelos momentos de alegria e amizade. Saudades...
- ◊ A todos os professores do Programa de Engenharia Química da COPPE, pelos ensinamentos transmitidos.
- ◊ A todos que fazem o Programa de Engenharia Química da COPPE, pelo excelente convívio. Às secretárias Beth, Suzy e Luciana, que sempre estiveram a disposição para ajudar em todas as situações, o meu sincero agradecimento.
- ◊ A todos que fazem o Laboratório de Bioprocessos da COPPE, em especial à Cláudia e Tânia, pela ajuda, apoio e amizade sempre dispensadas.

- ◊ Aos colegas e amigos da COPPE, pelo companheirismo e incentivo.
 - ◊ Às minhas amigas do Rio: Silvinha, Beth, Isabela, Larissa, Zilmara, Zilma, pela amizade, apoio e carinho em todos os momentos.
 - ◊ Aos amigos Fabrício e Silvinha, pela amizade, carinho e sempre acolhida no Rio.
-
- ◊ Às primas Iolanda e Luiselena, pela companhia e amizade na minha estada no Rio; à D. Idalina, pela atenção e apoio, minha gratidão.
 - ◊ Às minhas amigas Angela, Lane e Alessandra, pela amizade e incentivo.
-
- ◊ Aos meus pais e irmãos, sempre presentes em todos os momentos, agradeço por serem pessoas tão especiais e por preencherem a minha vida com amor, carinho e alegrias, meu agradecimento especial.
-
- ◊ À toda minha família, aos amigos Márcio e Beth, à tia Lourdinha, todos os tios (as) e primos (as), pelas palavras amigas e incentivo nos momentos difíceis.
-
- ◊ À minha vizinha Bernadeth, agradeço a Deus pela sua presença na minha vida.
-
- ◊ A Leandro, por estar sempre presente, por incentivar e acreditar, por ser tão especial. "Vou te contar, os olhos já não podem ver, coisas que só o coração pode entender. Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho..." .
-
- ◊ Ao CNPq, pelo apoio financeiro.
-
- ◊ A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

“Jamais ceder. Trabalhar sobre outro plano, o mais autêntico, aquele no qual o êxito não se mede pelo crescimento individual, mas pela fidelidade ao esforço realizado para tornar o mundo menos duro e mais humano para alguém”

Teihard de Chardin

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO SÓLIDO-FLUIDO NA PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS A PARTIR DE *Bacillus sphaericus* E
Bacillus thuringiensis var. *israelensis*

Christine Lamenha Luna

Abril/2004

Orientadores: Giulio Massaraní
Carlos Edison Lopes

Programa: Engenharia Química

O trabalho teve como objetivo a utilização da floculação/sedimentação e da flotação para a obtenção de concentrados bioativos das bactérias *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, agentes de controle biológico de importância comprovada no controle à larvas de insetos vetores de doenças endêmicas como dengue, febre amarela, filariose e malária. Os caldos fermentados foram produzidos em modo batelada a partir de meios de cultivo límpidos e contendo sólidos em suspensão, estes últimos visando-se diminuir os custos de produção dos biolarvicidas. Foi analisada a influência do pH e da adição de agentes floculantes sobre a floculação e sedimentação dos caldos fermentados, e o processo mostrou-se dependente do tipo de microrganismo, da característica da suspensão floculada e do agente floculante empregado. Visando-se avaliar a utilização da flotação para a separação de células de *B. sphaericus*, foram realizados testes em célula mecânica convencional e em coluna operando em batelada. As atividades larvicidas dos concentrados obtidos por floculação/sedimentação mostraram-se adequadas para o controle de populações de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. A formulação sólida em comprimido desenvolvida à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentou excelente resultado de controle populacional de *Aedes* spp. em diferentes tipos de criadouros.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

EVALUATION OF SOLID-FLUID SEPARATION TECHNIQUES ON THE
PRODUCTION OF BIOINSECTICIDES FROM *Bacillus sphaericus* AND
Bacillus thuringiensis var. *israelensis*

Christine Lamenha Luna

April/2004

Advisors: Giulio Massarani

Carlos Edison Lopes

Department: Chemical Engineering

The aim of this work was the use of flocculation/sedimentation and flotation techniques for production of bioactive concentrates of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. Both are used as biological control agents to control larval insects related to endemic diseases such as yellow fever, filariasis and malaria. The fermented broths were produced batch wise from limpid and turbid cultivation media. The last one envisaging the reduction of the biolarvicides production costs. The addition of flocculating agents and pH effects on flocculation/sedimentation were studied. The process showed to be dependent on the microorganism strain, flocculated suspension characteristics and flocculating agent used. To evaluate the use of flotation in *Bacillus sphaericus* separation a mechanical agitated flotation cell and a flotation column were used. The larvicidal activities of the concentrated samples obtained by flocculation/sedimentation showed to be adequate for the control of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* populations. The developed solid tablets using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* presented population control against *Aedes* sp. in different kind of breeding sites.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 2 – INSETICIDAS BIOLÓGICOS.....	04
2.1. Insetos.....	04
2.1.1- Mosquitos de Importância para a Saúde Pública.....	05
<u>a) <i>Anopheles</i>.....</u>	05
<u>b) <i>Culex</i>.....</u>	06
<u>c) <i>Simulium</i>.....</u>	07
<u>d) <i>Aedes</i>.....</u>	07
2.2. Controle Químico.....	08
2.3. Controle Biológico.....	10
2.3.1- Controle Microbiano de Insetos.....	11
<u>a) Vírus.....</u>	11
<u>b) Fungos.....</u>	13
<u>c) Protozoários.....</u>	14
<u>d) Nematóides.....</u>	14
<u>e) Bactérias.....</u>	16
2.3.2- Bactérias do Gênero <i>Bacillus</i>.....	16
<u>a) <i>Bacillus sphaericus</i>.....</u>	16
<u>b) <i>Bacillus thuringiensis</i>.....</u>	19
2.4. Aspectos da Fermentação.....	23
2.5. Formulações.....	24
2.5.1- Formulações Sólidas.....	26
2.6. Critérios de Controle de Qualidade.....	27
CAPÍTULO 3 – FLOCUAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO.....	28
3.1- O Fenômeno da Agregação Celular.....	28

3.1.1- Mecanismos de Agregação.....	29
a) Fatores Genéticos.....	29
b) Fatores Fisiológicos.....	31
c) Fatores Químicos.....	31
d) Fatores Físicos.....	33
e) Natureza da Superfície Celular.....	33
3.1.2- Importância Biotecnológica.....	36
3.2- Sedimentação Gravitacional.....	37
CAPÍTULO 4 – FLOTAÇÃO.....	39
4.1- O Processo de Flotação.....	39
4.1.1- Reagentes de Flotação.....	40
a) Coletores.....	40
b) Ativadores.....	41
c) Depressores ou Inibidores.....	41
d) Reguladores.....	42
e) Espumantes.....	42
f) Floculantes.....	42
4.2- Célula Mecânica Convencional e Coluna de Flotação..	43
4.3- Aplicações.....	45
4.3.1- Flotação de Microrganismos.....	46
CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS.....	48
CAPÍTULO 6 - MATERIAL E MÉTODOS.....	50
Material.....	50
6.1- Microrganismos.....	50
6.2- Meios de Cultivo.....	50
6.2.1- Meios para Fermentação de <i>Bacillus sphaericus</i>.....	50
a) Meio MBS.....	50
b) Meio MBS-6.....	51

6.2.2- Meios para Fermentação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....	52
a) <u>Meio UG</u>	52
b) <u>Meio MBti-Glicose</u>	52
6.2.3- Meios para Controle de Qualidade dos Fermentados e Formulados.....	53
a) <u>Meio Ágar Nutriente (AN)</u>	53
b) <u>Meio Sabouraud com Cloranfenicol</u>	54
c) <u>Caldo Verde Brilhante (CVB)</u>	54
d) <u>Meio Eosina Azul de Metíleno (EMB)</u>	55
e) <u>Meio Caldo Asparagina</u>	55
f) <u>Meio Caldo Acetamida</u>	56
g) <u>Meio Específico para <i>Staphylococcus aureus</i></u>	56
6.3- Larvas.....	56
6.4- Equipamentos.....	57
Métodos.....	58
6.5- Manutenção dos Microrganismos.....	58
6.6- Fermentações.....	58
6.6.1- Preparação dos Inóculos.....	58
6.6.2- Descrição do Biorreator.....	58
6.6.3- Produção de Biomassa.....	60
6.6.4- Determinação dos Parâmetros Cinéticos das Fermentações....	61
6.7- Esterilização de Materiais.....	63
6.8- Concentração Ótima de Agente Floculante.....	64
6.9- Caracterização das Suspensões Floculentas.....	65
6.9.1- Densidade Média dos Flocos e Fração Volumétrica de Fluido..	65
6.9.2- Diâmetro Médio dos Flocos.....	67
6.10- Testes de Sedimentação.....	68
6.11- Testes de Flotação.....	69

6.11.1- Flotação em Coluna.....	69
6.11.2- Flotação em Célula Mecânica Convencional.....	71
6.11.3- Determinação da Cinética de Flotação.....	72
6.12- Desenvolvimento da Formulação em Comprimidos.....	73
6.13- Determinações Analíticas.....	74
6.13.1- Determinação da Concentração Celular.....	74
6.13.2- Determinação da Concentração de Esporos Viáveis.....	75
6.13.3- Determinação do pH.....	75
6.13.4- Dosagem de Glicose.....	75
6.13.5- Determinação da Distribuição de Tamanhos dos Microrganismos.....	77
6.13.6- Observações Microscópicas.....	77
6.13.7- Atividade Biológica.....	77
a) Atividade Biológica em Laboratório.....	77
b) Atividade Larvicida em Teste Sob Condições Simuladas de Campo (TCS).....	79
c) Teste de Estabilidade.....	80
d) Atividade Larvicida em Campo.....	80
CAPÍTULO 7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
7.1- Acompanhamento Cinético das Fermentações.....	82
7.1.1- Fermentação de <i>Bacillus sphaericus</i>.....	83
7.1.2- Fermentação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....	88
7.1.3- Considerações Gerais sobre as Fermentações de <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....	94
7.2- Ensaios de Floculação.....	97
7.2.1- <i>Bacillus sphaericus</i>.....	97
7.2.2- <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....	100
7.2.3- Considerações Gerais sobre os Resultados de Floculação.....	103
a) Efeito dos floculantes.....	103
b) Efeito do pH.....	106

7.3- Caracterização das Partículas.....	109
7.3.1- Distribuição de Tamanhos nos Caldos Fermentados.....	109
7.3.2- Densidade e Diâmetro Médio dos Flocos.....	113
7.4- Testes de Sedimentação.....	114
7.4.1- <i>Bacillus sphaericus</i>.....	114
<u>a) Meio MBS.....</u>	115
<u>b) Meio MBS-6.....</u>	120
7.4.2- <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....	125
<u>a) Meio UG.....</u>	125
<u>b) Meio MBti-Glicose.....</u>	130
7.4.3- Considerações Gerais sobre os Resultados de Sedimentação	135
7.5- Testes de Flotação de <i>B. sphaericus</i>.....	145
7.5.1- Flotação em Célula Mecânica.....	145
7.5.2- Flotação em Coluna.....	153
7.6- Pós Ativos e Formulação em Comprimidos.....	156
7.7- Atividade Biológica.....	158
7.7.1- Atividade Biológica em Laboratório.....	158
<u>a) <i>Bacillus sphaericus</i>.....</u>	158
<u>b) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>.....</u>	161
7.7.2- Atividade Larvicida em Teste Sob Condições Simuladas de Campo (TCS)	165
7.7.3- Testes de Estabilidade.....	166
7.7.4- Atividade Larvicida em Campo.....	167
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	172
8.1- Conclusões.....	172
8.2- Sugestões.....	180
CAPÍTULO 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	182

LISTA DE FIGURAS

2.1	Ciclo de vida do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	06
2.2	Micrografia eletrônica de uma célula esporulante de <i>Bacillus sphaericus</i> 2297 contendo o cristal protéico.....	17
2.3	Estrutura tridimensional da toxina Cry 3A de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
3.1	Flocação em leveduras: a teoria da lectina.....	30
3.2	Grupamentos químicos presentes na superfície celular de microrganismos.....	32
3.3	Regiões observadas no teste de sedimentação em batelada.....	38
4.1	Hidrofobicidade e ângulo de contato.....	40
4.2	Molécula do oleato de sódio e os grupos polar e apolar.....	41
4.3	Representação esquemática de uma coluna de flotação.....	44
6.1	Conjunto de fermentação utilizado para a produção de biomassa.....	59
6.2	Diagrama de linha do sistema de fermentação.....	59
6.3	Geometria do biorreator.....	60
6.4	Esquema do processo fermentativo das bactérias <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	61
6.5	Teste de jarro com o caldo fermentado de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose utilizando $Al_2(SO_4)_3$ como agente floculante.....	64
6.6	Coluna de flotação.....	69
6.7	Dimensões da coluna de flotação.....	70
6.8	Célula de flotação mecânica.....	71
6.9	Curva de calibração de glicose.....	76
6.10	Testes de campo simulado. (A) Casa de vegetação onde os experimentos foram realizados; (B) Recipientes plásticos de 100L; (C) Recipientes plásticos de 100L com abertura para o escoamento de água.....	80
7.1	Cubas de fermentação contendo os meios de cultivo MBS (esquerda) e MBS-6 (direita).....	83
7.2	Crescimento celular, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS.....	84
7.3	Cultivo de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS após 48 horas de fermentação (aumento de 40 vezes).....	85

7.4	Variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6.....	86
7.5	Cubas de fermentação contendo os meios de cultivo UG (esquerda) e MBti-Glicose (direita).....	88
7.6	Crescimento celular, consumo de glicose, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG.....	89
7.7	Concentração de sólidos totais, consumo de glicose, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose.....	91
7.8	Curva de crescimento celular típica para <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	95
7.9	Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS.....	98
7.10	Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6.....	99
7.11	Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG.....	101
7.12	Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose.....	102
7.13	Caldo fermentado de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS floculado com 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	104
7.14	Estrutura química do tanino (Tanfloc-SG, TANAC).....	105
7.15	Caldo fermentado de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 floculado na condição de pH 3,0 (amostra de 60L).....	107
7.16	Distribuição de tamanhos das partículas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS (equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultrassom)	110
7.17	Distribuição de tamanhos das partículas do caldo fermentado de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 (equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultrassom)	110
7.18	Distribuição de tamanhos das partículas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG (equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultrassom)	112
7.19	Distribuição de tamanhos das partículas do caldo fermentado de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose (equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultrassom).....	112
7.20	Flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS na presença do floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (aumento de 10 vezes)	114
7.21	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS na presença de 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 2.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração celular.....	116

7.22	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS na presença de 2.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 150ppm de tanino de acordo com a concentração celular.....	117
7.23	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS a pH 3,0 de acordo com a concentração celular.....	118
7.24	Velocidades de sedimentação das suspensões flocculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS de acordo com a concentração celular.....	118
7.25	Eficiência de recuperação das suspensões flocculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS de acordo com a concentração celular.....	119
7.26	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 na presença de 1.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 3.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração de sólidos.....	121
7.27	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 na presença de 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 1.700ppm de tanino de acordo com a concentração de sólidos.....	122
7.28	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 a pH 3,0 de acordo com a concentração de sólidos.....	123
7.29	Velocidades de sedimentação das suspensões flocculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 de acordo com a concentração de sólidos.	123
7.30	Eficiência de recuperação das suspensões flocculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 de acordo com a concentração de sólidos.	124
7.31	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG na presença de 2.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 1.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração celular.....	126
7.32	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG na presença de 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 400ppm de tanino de acordo com a concentração celular.....	127
7.33	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG a pH 3,0 de acordo com a concentração celular.....	128
7.34	Velocidades de sedimentação das suspensões flocculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG de acordo com a concentração celular.....	128
7.35	Eficiência de recuperação das suspensões flocculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG de acordo com a concentração celular.....	129
7.36	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose na presença de 2.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 2.500ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração de sólidos....	131
7.37	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose na presença de 3.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 1.000ppm de tanino de acordo com a concentração de sólidos.....	132
7.38	Curvas de sedimentação de flocos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> a pH 3,0 de acordo com a concentração de sólidos.....	133

7.39	Velocidades de sedimentação das suspensões floculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose de acordo com a concentração de sólidos.....	133
7.40	Eficiência de recuperação das suspensões floculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose de acordo com a concentração de sólidos.....	134
7.41	Comparação entre as máximas velocidades de sedimentação para as suspensões floculentas de <i>B. sphaericus</i> nos meios MBS e MBS-6 (concentração de 3,21g/L ± 0,41g/L)	136
7.42	Comparação entre as máximas velocidades de sedimentação para as suspensões floculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> nos meios UG e MBti-Glicose (concentração de 3,76g/L ± 0,46g/L).....	136
7.43	Curva de sedimentação em proveta e os parâmetros utilizados no projeto de sedimentadores de acordo com KYNCH (1952).....	138
7.44	Diagrama de fluxo em um sedimentador contínuo.....	139
7.45	Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,5g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,7g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ - 2,1g/L; pH 3,0 - 2,6g/L; tanino - 2,5g/L)	142
7.46	Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4,6g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 4,8g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ - 5,0g/L; pH 3,0 - 4,2g/L; tanino - 4,4g/L)	142
7.47	Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 3,8g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3,3g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ - 3,2g/L; pH 3,0 - 3,6g/L; tanino - 3,5g/L)	143
7.48	Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 4,6g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 4,5g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ – 4,5g/L; pH 3,0 – 4,4g/L; tanino – 4,0g/L)	144
7.49	Fração de esporos residuais de <i>B. sphaericus</i> em função do tempo de flotação em meio MBS-6 (960rpm; 6L ar/min; pH 8,9).....	147
7.50	Fração de esporos residuais de <i>B. sphaericus</i> em função do tempo de flotação em meio MBS-6 (960rpm; 6L ar/min; pH 7,0).....	147
7.51	Flotação de <i>B. sphaericus</i> (80ppm Flotigam, 750ppm Tween, 960rpm; 6L ar/min; pH 8,9)	149
7.52	Fração de esporos residuais de <i>B. sphaericus</i> em função do tempo de flotação em meio MBS-6 (200, 400 e 600ppm do coletor; 832 e 960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)	149
7.53	Flotação de <i>B. sphaericus</i> (600ppm Flotigam; 960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)	151
7.54	Recuperação de esporos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 (6L ar/min; pH 7,0)	151

7.55	Fator de concentração de esporos de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 (6L ar/min; pH 7,0)	152
7.56	Aspecto visual das amostras de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS-6 flotada (esquerda) e original (direita) (600ppm Flotigam; 960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)	153
7.57	Fração de esporos residuais de <i>B. sphaericus</i> em função do tempo de flotação em meio MBS de acordo com a vazão de ar na coluna (pH 8,9)	154
7.58	Determinação da constante cinética para a operação em batelada.....	155
7.59	Amostras de <i>B. sphaericus</i> em meio MBS flotada (esquerda) e original (direita) (Qar=1240mL/min; pH 8,9)	155
7.60	Pós ativos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose....	156
7.61	Pó ativo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose na presença de tanino (A - aumento de 40 vezes; B - aumento de 100 vezes)	157
7.62	Comprimidos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose, obtidos com o floculante CaCl ₂ .2H ₂ O e utilizados nos testes de campo.....	157
7.63	Bairro de Nossa Senhora das Graças, município de Moreno (PE).....	167
7.64	Diferentes tipos de criadouros encontrados no bairro de Nossa Senhora das Graças, município de Moreno (PE) (A - tonel; B - cacimba; C - caixa d'água; D - tanque).....	168
7.65	Esquema de instalação peridomiciliar de armadilhas de oviposição – ovitrampas (A); armadilha composta por recipiente plástico preto, palheta de eucatex e infusão de gramíneas (B).....	169
7.66	Representação da infestação por <i>Aedes</i> spp. do bairro de Nossa Senhora das Graças estimada através de índices baseados na coleta de ovos por armadilhas no período de novembro de 2002 a abril de 2003. O IPO representa o percentual de ovitrampas positivas para ovos de <i>Aedes</i> spp.....	170

LISTA DE TABELAS

2.1	Alguns vírus aplicados no controle de pragas da agricultura.....	12
2.2	Alguns fungos aplicados no controle de pragas da agricultura.....	13
2.3	Alguns protozoários entomopatogênicos.....	14
2.4	Alguns nematóides entomopatogênicos.....	15
2.5	Principais variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas para o controle biológico de insetos.....	20
2.6	Exemplos de proteínas Cry encontradas em <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.7	Ingredientes para fermentações de <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	23
2.8	Níveis aceitáveis quanto à presença de microrganismos contaminantes em produtos bioinseticidas.....	27
3.1	Ângulos de contato para diferentes espécies microbianas.....	35
4.1	Exemplos de separação de moléculas orgânicas dissolvidas por flotação.....	47
6.1	Composição do meio MBS.....	51
6.2	Composição do meio MBS-6.....	51
6.3	Composição do meio UG.....	52
6.4	Composição do meio MBti-Glicose.....	53
6.5	Composição do meio Ágar Nutriente (AN).....	53
6.6	Composição do meio Sabouraud com Cloranfenicol.....	54
6.7	Composição do meio Caldo Verde Brilhante (CVB).....	54
6.8	Composição do meio Eosina Azul de Metíleno (EMB).....	55
6.9	Composição do meio Caldo Asparagina.....	55
6.10	Composição do meio Caldo Acetamida.....	56
6.11	Métodos e condições de esterilização para os materiais utilizados.....	63
6.12	Condições de centrifugação das suspensões.....	66

6.13	Linhagens padrão das bactérias <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	78
7.1	Parâmetros cinéticos obtidos para as fermentações de <i>B. sphaericus</i> nos meios de cultivo MBS e MBS-6 e em outros trabalhos.....	87
7.2	Parâmetros cinéticos obtidos para fermentações de <i>B. thuringiensis</i> nos meios de cultivo UG e MBti-Glicose e em outros trabalhos.....	92
7.3	Tabela 4.3 – Concentrações ótimas dos floculantes e valores de pH para <i>B. sphaericus</i>	100
7.4	Concentrações ótimas dos floculantes e valores de pH para <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	100
7.5	Resultados de densidade e diâmetro médio dos flocos para <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	113
7.6	Observações da hidrodinâmica do sistema de flotação.....	145
7.7	Testes preliminares de flotação (6L ar/min; 640, 832 e 960rpm).....	146
7.8	Condições experimentais para os ensaios de flotação (6L ar/min; 960rpm).....	146
7.9	Atividade biológica das amostras do caldo fermentado, suspensões floculentas concentradas e pós ativos de <i>B. sphaericus</i> 2362 em meio MBS-6 contra larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , determinada através de bioensaios completos.....	159
7.10	Informações técnicas de produtos comerciais à base de <i>B. sphaericus</i>	160
7.11	Atividade biológica das amostras do caldo fermentado e suspensões floculentas concentradas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio UG contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> , determinada através de bioensaios completos.....	162
7.12	Atividade biológica das amostras do caldo fermentado e suspensões floculentas concentradas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em meio MBti-Glicose contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> , determinada através de bioensaios exploratórios.....	163

7.13	Informações técnicas de produtos experimentais e comerciais à base de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	164
7.14	Eficácia inicial de controle dos comprimidos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Antilarv® Ci) contra larvas de 4º estádio de <i>Aedes aegypti</i> (Recife-LAB), determinada em testes sob condições simuladas de campo.....	165
7.15	Parâmetros de infestação por <i>Aedes</i> spp. estimados a partir de ovos coletados em armadilhas, instaladas no peridomicílio de imóveis residenciais do bairro de Nossa Senhora das Graças – Município de Moreno/PE, no período de novembro de 2002 a abril de 2003.....	169

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLOS LATINOS

A	Área da seção transversal do sedimentador	[L ²]
AB _{Sg}	Absorbância da amostra de glicose a 540nm	[-]
C	Concentração de sólidos no processo de flotação ou em um nível arbitrário no processo de sedimentação	[M L ⁻³]
CL ₅₀	Concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos da população testada	[M L ⁻³]
C ₀	Concentração de partículas no início do processo de flotação ou na alimentação do sedimentador	[M L ⁻³]
C _s	Concentração de sólidos no sobrenadante após a sedimentação	[M L ⁻³]
C _T	Concentração total de sólidos na suspensão antes da sedimentação	[M L ⁻³]
C _u	Concentração de sólidos na lama do sedimentador contínuo	[ML ⁻³]
D _f	Diâmetro médio dos flocos	[L]
DP	Desvio padrão	[-]
ΔS	Diferença entre a concentração de substrato no tempo para atingir a concentração máxima de células e no início do cultivo	[M L ⁻³]
E _{MAX}	Concentração máxima de esporos viáveis	[UFC L ⁻³]
F	Vazão volumétrica da suspensão na alimentação do sedimentador contínuo	[L ³ T ⁻¹]
F/A	Capacidade operacional do sedimentador contínuo	[LT ⁻¹]
FC	Fator de concentração dos esporos	[-]
g	Aceleração gravitacional	[L T ⁻²]
G	Concentração de açúcares redutores expressa em termos de glicose	[M L ⁻³]
k	Permeabilidade do meio	[L ²]
k _c	constante cinética de remoção	[T ⁻¹]
m	Coeficiente específico de manutenção celular	[T ⁻¹]
M ₁	Massa da membrana	[M]
M ₂	Massa da membrana + massa do material celular seco	[M]
M _C	Percentual de mortalidade corrigida do grupo tratado	[-]
M _{CT}	Percentual de mortalidade do grupo controle	[-]

M_T	Percentual de mortalidade do grupo tratado	[-]
n	Ordem da cinética de remoção das partículas por flotação	[-]
Q_0	Vazão volumétrica da alimentação no sedimentador contínuo	[L ³ T ⁻¹]
Q	Vazão volumétrica em um nível arbitrário do sedimentador contínuo	[L ³ T ⁻¹]
Q_u	Vazão volumétrica da lama do sedimentador contínuo	[L ³ T ⁻¹]
Q_{asc}	Vazão volumétrica ascendente de líquido clarificado no sedimentador contínuo	[L ³ T ⁻¹]
Q_{ar}	Vazão de ar	[L ³ T ⁻¹]
q_P	Taxa específica de formação do produto	[T ⁻¹]
q_s	Taxa específica de consumo de substrato	[T ⁻¹]
q_{so}	Fluxo máximo de sólidos (por unidade de área) alimentados em cada camada horizontal do sedimentador contínuo, operando em regime permanente	[MT ⁻¹ L ⁻²]
$(q_S)_{op}$	Fluxo operacional mínimo do sedimentador contínuo	[MT ⁻¹ L ⁻²]
$Rec (\%)$	Percentual de recuperação de esporos na flotação	[-]
$R (\%)$	Percentual de recuperação dos sólidos na sedimentação	[-]
S	Concentração de substrato	[M L ⁻³]
S_i	Concentração do substrato no tempo $t = t_i$	[M L ⁻³]
S_0	Concentração do substrato no tempo $t = 0$	[M L ⁻³]
ST	Concentração de sólidos totais	[M L ⁻³]
ST_{MAX}	Concentração máxima de sólidos totais	[M L ⁻³]
ST_{FINAL}	Concentração de sólidos totais no final da fermentação	[M L ⁻³]
T_{EMAX}	Tempo para atingir a concentração máxima de esporos viáveis	[T]
T_{XMAX}	Tempo para atingir a concentração máxima de células	[T]
T_{STMAX}	Tempo para atingir a concentração máxima de sólidos totais	[T]
T_{FINAL}	Tempo de final de fermentação	[T]
t^*	Tempo transcorrido no ensaio em proveta para que a posição da interface clarificada seja dada por Z^*	[T]
V_a	Volume da amostra a ser filtrada	[L ³]
V_{fl}	Volume de flocos centrifugado	[L ³]
V_o	Volume inicial posto a flotar	[L ³]
V_R	Volume do líquido residual após a flotação	[L ³]
V_{sob}	Volume de fluido sobrenadante	[L ³]
v_s	Velocidade de sedimentação calculada à taxa constante	[L T ⁻¹]

v_{asc}	Velocidade ascendente de líquido clarificado no sedimentador contínuo	[L T ⁻¹]
V_t	Volume total de suspensão no tubo de ensaio	[L ³]
X	Concentração celular	[M L ⁻³]
X_t	Concentração celular no tempo $t = t_i$	[M L ⁻³]
X_0	Concentração celular no tempo $t = 0$	[M L ⁻³]
X_{0E}	Concentração de esporos na amostra a flotar	[UFC L ⁻³]
X_F	Concentração de esporos na espuma flotada	[UFC L ⁻³]
X_R	Concentração de esporos no líquido residual de flotação	[UFC L ⁻³]
X_{FINAL}	Concentração celular no final da fermentação	[M L ⁻³]
X_{MAX}	Concentração máxima de células	[M L ⁻³]
Y_{xs}	Fator de conversão de substrato em células em relação à concentração máxima de células ou de sólidos totais	[M M ⁻¹]
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto em relação à concentração máxima de produto	[M M ⁻¹]
Z	Posição da interface superior no ensaio de sedimentação em batelada no instante de tempo t	[L]
Z_0	Altura da coluna de suspensão no ensaio de sedimentação em batelada	[L]
Z_t	Interseção da tangente à curva de sedimentação em proveta com o eixo dos Z, num instante t qualquer	[L]
Z^*	Altura mínima da zona de compactação	[L]

SÍMBOLOS GREGOS

β	Parâmetro que depende da porosidade para sistemas particulados expandidos	[-]
ε_f	Fração volumétrica de fluido	[-]
ρ_f	Densidade do fluido	[M L ⁻³]
ρ_f	Densidade média dos flocos	[M L ⁻³]
μ	Taxa específica de crescimento celular	[T ⁻¹]
μ_f	Viscosidade do fluido	[M L ⁻¹ T ⁻¹]

ABREVIATURAS

IPO	Índice de Positividade de Ovitrampas
IIP	Índice de Infestação Predial
L1	Larvas jovens do 1º estádio de desenvolvimento
L4	Larvas jovens do 4º estádio de desenvolvimento
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidades Tóxicas Internacionais
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A utilização indiscriminada dos defensivos químicos e suas consequências danosas ao meio ambiente impulsionaram o desenvolvimento de técnicas de controle biológico no combate a insetos prejudiciais, tanto na agricultura, como em saúde pública. Dentre os procedimentos empregados para o manejo integrado de pragas, o controle biológico se destaca pelas vantagens que apresenta, particularmente especificidade e inocuidade para o homem.

As bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os microrganismos entomopatógenos mais utilizados como agentes biocontroladores, especialmente pela sua capacidade de formar esporos e toxinas de elevada especificidade aos insetos-alvo. Dentre estas, destacam-se *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, utilizadas em programas de controle de larvas de insetos vetores de doenças endêmicas como dengue, filariose e malária.

A atividade larvicida destas bactérias está relacionada à produção de cristais protéicos sintetizados durante o processo de esporulação; contudo, a presença de esporos viáveis no produto potencializa o efeito da toxina protéica, favorecendo a dispersão do agente biocontrolador no meio ambiente. Desta forma, o método de obtenção do princípio ativo deve preservar a integridade de ambos: toxina protéica e esporo.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de bioinseticidas depende basicamente de quatro etapas: i) isolamento e seleção de linhagens com maior atividade; ii) otimização do processo fermentativo, utilizando-se matérias-primas de baixo custo visando a produção em larga escala; iii) aplicação de métodos adequados

de separação da biomassa; iv) desenvolvimento de formulações visando a sua aplicação em campo.

Os processos que visam o estabelecimento de operações adequadas de recuperação, extração ou purificação do produto final desejado representam a maior parte dos custos de produção de muitos processos biotecnológicos. Na tecnologia de produção de biolarvicidas em larga escala, um dos principais problemas encontrados é o processo de recuperação da biomassa, especialmente devido ao fato de que as células microbianas encontram-se nos líquidos fermentados em baixas concentrações (1 a 20g/l), são de pequenas dimensões (1 a 10 μ m) e baixa densidade. O procedimento clássico para a recuperação de microrganismos de meios fermentados é baseado na centrifugação, operação que apresenta o inconveniente de requerer equipamento de elevado custo de investimento, manutenção e operação.

Os processos de floculação/sedimentação constituem uma das principais alternativas de recuperação de células em suspensão. A floculação microbiana facilita a separação das células devido ao aumento do tamanho das biopartículas. É um fenômeno de grande interesse biotecnológico, visto que possibilita o emprego de sedimentadores em escala industrial, diminuindo os custos do processo.

A observação de que as células bacterianas possuem uma tendência natural de se aderirem às bolhas de ar durante os processos fermentativos submersos e aerados sugere a possibilidade de se utilizar a flotação para recuperação da biomassa, um procedimento de separação bem estabelecido em tecnologia mineral e também utilizado para a recuperação de diversos tipos de materiais biológicos.

Neste trabalho, foi avaliada a utilização da floculação/sedimentação e da flotação como técnicas de separação sólido-fluido para a separação de biomassa das bactérias *B. sphaericus* 2362 e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, permitindo a obtenção de materiais concentrados que são a base para a preparação de formulados bioinseticidas.

No Capítulo 2 é apresentada uma revisão da literatura sobre a importância da utilização de inseticidas biológicos como agentes de controle de insetos: vantagens em relação ao uso de inseticidas químicos e os principais agentes microbianos empregados, destacando-se as bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

No Capítulo 3 são relatados os principais aspectos relacionados à agregação celular e à utilização da sedimentação gravitacional, enquanto que o Capítulo 4 descreve o processo de flotação.

O Capítulo 5 se refere aos objetivos da tese, e os materiais e metodologias experimentais são expostos no Capítulo 6.

No Capítulo 7 são apresentados e discutidos os resultados obtidos, enquanto que as conclusões e sugestões para trabalhos futuros são descritas no Capítulo 8. Finalmente, no Capítulo 5, as referências são indicadas.

CAPÍTULO 2

INSETICIDAS BIOLÓGICOS

2.1. Insetos

Os insetos são animais altamente especializados e evoluídos, facilmente adaptáveis às mais variadas e surpreendentes condições de vida. Pertencem ao filo dos artrópodes, compreendendo mais de um milhão de espécies já descritas (ALVES, 1998).

A maioria das espécies é benéfica ou útil ao homem, sendo importantes para o equilíbrio dos ecossistemas através da polinização de plantas, decomposição de matéria orgânica, participação ativa no equilíbrio biológico, produção de cera, mel, seda, melhoramento das condições do solo e fonte de alimento para peixes, anfíbios, répteis, pássaros, etc.

Apenas de cinco a quinze mil espécies são consideradas nocivas, embora um número dez vezes maior possa vir a se tornar praga devido à alterações no equilíbrio populacional (BULL e HATHAWAY, 1986). Estas espécies possuem grande importância epidemiológica, pois atuam como vetores de transmissão de doenças ao homem.

Dentre as principais atividades do homem que favoreceram o aumento populacional de alguns insetos, destacam-se o desmatamento, monoculturas, criação intensiva de animais, superpopulação humana, condições inadequadas de escoamento de águas e de remoção de dejetos e lixos, precárias condições de moradia, alimentação, vestuário e higiene.

Dessa forma, encontrando um ambiente propício, com poucos competidores, sem barreiras, alimento fácil e abundante, algumas espécies se reproduziram com facilidade, tornando-se pragas para saúde pública, agricultura e pecuária.

2.1.1- Mosquitos de Importância para a Saúde Pública

Dentro da classe dos insetos, os Dípteros (mosquitos) se destacam como vetores biológicos pela transmissão de doenças como as arboviroses (dengue e febre amarela), filariose (elefantíase), malária e oncocercose.

Estes animais pertencem à Família *Culicidae*, sendo conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto.

Os principais gêneros de mosquitos causadores de doenças são *Anopheles* (transmissor da malária), *Culex* (transmissor da filariose), *Simulium* (transmissor da oncocercose) e *Aedes* (transmissor da dengue e da febre amarela).

a) Anopheles

Mosquito transmissor da malária, causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. No Brasil, cinco espécies são consideradas os principais vetores: *Anopheles darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitalis*, *An. cruzi* e *An. bellator*. Segundo DEANE (1986), o *An. darlingi* é o vetor mais importante em áreas no interior do país, do nordeste até o norte do Estado do Paraná, enquanto que o *An. aquasalis* está presente ao longo da costa brasileira.

No século XX, um dos principais eventos relacionados ao controle de vetores ocorreu em 1955, através do primeiro Programa Global de Erradicação da Malária, com grande utilização do inseticida químico DDT. Em todo o mundo, foram observadas reduções no número de casos da doença nos anos de 1961 e 1962; posteriormente, uma grande reincidência das populações de *Anopheles* foi ocasionada principalmente pela resistência do mosquito a este inseticida. (RÉGIS et al., 2000).

Em 1970, foram registrados pouco mais de 50 mil casos em todo o país; contudo, em 1999 a doença voltou a crescer, sendo notificados mais de 630 mil casos principalmente na Amazônia. Isto ocorre especialmente devido às suas condições climáticas, chuvas freqüentes e enchentes, que favorecem os criadouros dos vetores.

b) *Culex*

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor da filariose linfática no Brasil, transmitida pelo verme *Wuchereria bancrofti*.

A Figura 2.1 ilustra o ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus*.

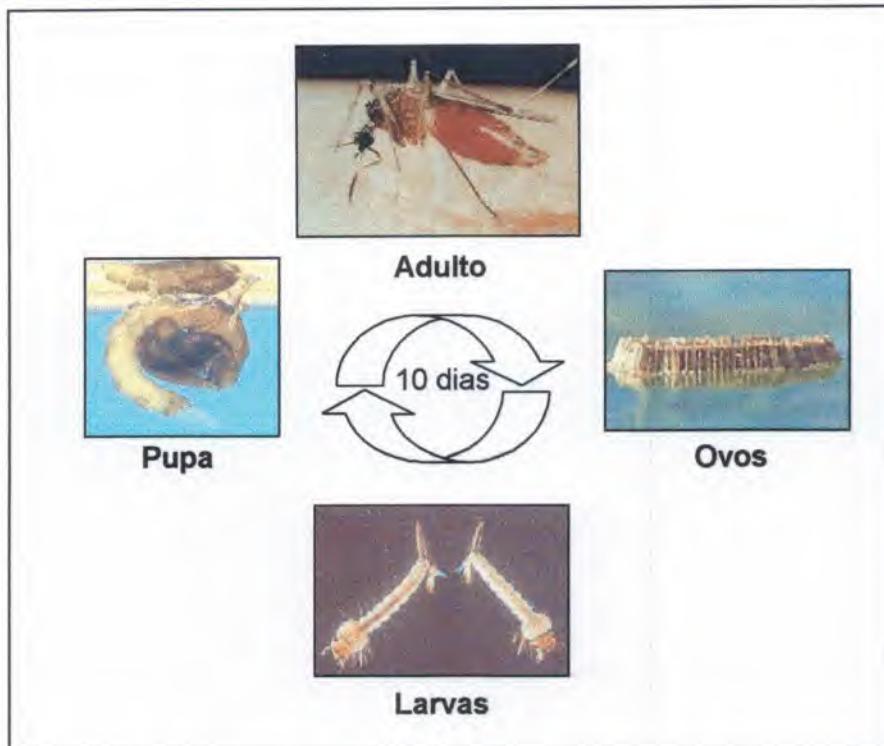


Figura 2.1 – Ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Ilustração gentilmente cedida pelo Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ)

Os principais focos da doença estão localizados nas cidades de Recife, Maceió e Belém. Recife é a que apresenta os maiores índices de prevalência da doença, sendo notificada há décadas como um problema de saúde pública (MACIEL et al., 1996). As condições climáticas, geográfica e sócio-cultural da região favorecem a proliferação do agente transmissor, muito encontrado em águas estagnadas e poluídas.

De acordo com ALBUQUERQUE et al. (1995), a distribuição da doença na cidade ocorre de forma heterogênea, com índices de prevalência que chegam a alcançar 14,9%, principalmente em áreas onde a população apresenta baixa qualidade de moradia e baixo nível sócio-econômico.

c) Simulium

Várias espécies de mosquitos do gênero *Simulium* são transmissoras de uma doença parasitária crônica denominada oncocercose, tendo como agente etiológico o nematódeo *Onchocerca volvulus*. A doença pode causar danos oculares e cegueira.

O caráter endêmico da doença foi confirmado em 1974, através de pesquisas epidemiológicas realizadas no Amazonas. Esta tem se mantido restrita ao território de comunidades indígenas da região (RABINOVITCH et al., 1999a).

d) Aedes

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue e febre amarela.

A dengue é uma doença cujo agente infeccioso é um arbovírus e clinicamente pode se apresentar sob duas formas: dengue clássica e dengue hemorrágica. É a virose urbana mais difundida no mundo, presente em todos os continentes com exceção da Europa, sendo típica de áreas tropicais e subtropicais. A transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito e os criadouros encontram-se, em geral, em lugares onde existe acúmulo de água parada e limpa. As fêmeas depositam seus ovos sobre a superfície líquida ou em substratos úmidos, próximos à água ou em locais inundáveis. Os criadouros são transitórios, condicionados diretamente pelas chuvas.

Há registros da doença no Brasil desde 1846, quando uma epidemia atingiu as cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador. Somente em 1982, com uma epidemia em Boa Vista (RO), foi isolado pela primeira vez o vírus da dengue no país (sorotipos 1 e 4) (NOBRE et al., 1994).

Em 1986, a doença reapareceu de forma epidêmica nos estados do Ceará, Alagoas e Rio de Janeiro, atingindo neste último mais de 1 milhão de pessoas. Casos também foram registrados na Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Em 1990, surgiram os primeiros casos de dengue hemorrágica no Rio de Janeiro, com a introdução de um novo sorotípico, o Den 2. De 1990 a 1998, 718 casos de dengue hemorrágica foram confirmados no país, com a ocorrência de 27 óbitos (NOBRE et al., 1994).

A dengue teve um crescimento significativo no Brasil na década de 90, atingindo o nível mais elevado em 1998, ano em que foram registrados cerca de 528 mil casos. Houve uma redução acentuada em 1999, com 210 mil casos notificados. Uma nova tendência de aumento foi observada a partir de 2000, culminando com cerca de 794 mil casos notificados em 2002.

De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde, até a 30^o semana epidemiológica de 2003, foram notificados 254.646 casos da doença. No primeiro semestre de 2003 foram notificados 248.787 casos, o que corresponde a uma redução de 66,14% em relação ao mesmo período de 2002.

Neste período, a região Nordeste apresentou o maior número de casos notificados (132.645), seguido da Região Sudeste com 72.432. Atualmente há circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus em 22 Estados brasileiros, o que potencializa o risco de surgimento de epidemias de febre hemorrágica da dengue, especialmente nas grandes metrópoles que já tiveram epidemias por dois sorotipos.

A dengue tem sido objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública realizadas no país. O controle da transmissão da doença exige um esforço de toda a sociedade, em virtude da elevada capacidade de adaptação e transmissão do seu vetor.

A febre amarela urbana também é transmitida por meio do mosquito *Aedes aegypti*, cujo agente etiológico também é um arbovírus. Ao contrário da dengue, existe vacina contra a doença, oferecendo altos níveis de proteção e garantindo imunidade por pelo menos 10 anos (NOBRE et al., 1994).

A primeira epidemia de febre amarela no Brasil ocorreu em 1685 em Pernambuco. Em 1928, nova epidemia foi registrada no Rio de Janeiro.

No Brasil, a doença se localiza em áreas rurais das regiões Norte, Centro-Oeste e Maranhão. Neste Estado, 90 casos foram diagnosticados nos anos de 1993 e 1994, sendo 13 fatais (RABINOVITCH et al., 1999a).

2.2. Controle Químico

Desde o início do século vinte, todo o controle de insetos vetores de doenças ou pragas na agricultura era feito através da utilização de inseticidas químicos. Os primeiros produtos desenvolvidos foram à base de compostos arsênicos, seguindo-se dos compostos organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides.

Entretanto, muitos problemas associados ao uso indiscriminado destes inseticidas de amplo-espectro foram se evidenciando ao longo dos anos:

- a) são produtos de elevada toxicidade e que causam danos à saúde humana;
- b) os insetos têm adquirido resistência a estas substâncias, sendo necessárias doses cada vez mais elevadas de aplicação;
- c) possuem um amplo espectro de ação, eliminando os predadores naturais;

- d) sua persistência no meio ambiente, pois são substâncias que não se degradam com facilidade, acumulando-se nos ecossistemas.

Apesar do aumento do uso de inseticidas químicos em dez vezes desde a Segunda Guerra Mundial, a perda de alimentos na agricultura causada por insetos praga aumentou de 7 para 13%.

As informações disponíveis sobre os problemas associados ao uso dos pesticidas químicos nos países em desenvolvimento são limitadas, considerando que existem dificuldades de monitoramento dos casos de danos causados pela exposição ocupacional ou pelos problemas causados pela estocagem inadequada destes produtos. Em 1990, a Organização Mundial de Saúde estimou em 25 milhões de casos por ano o número de doenças causadas pela exposição ocupacional de trabalhadores aos inseticidas químicos nos países em desenvolvimento (JEYARATNAM, 1990). Vale salientar que a maioria dos casos não são relatados, estimando-se que existem cerca de 50 casos para cada caso reportado.

A persistência no ambiente também é outro fator importante. Alguns produtos, como o DDT e compostos afins, são muito estáveis e se acumulam com facilidade no ambiente. Isto ocorre devido à impossibilidade do aproveitamento de suas estruturas pela maioria dos organismos. Além disso, a eficiência destes agentes tem diminuído consideravelmente devido ao aumento da resistência em insetos de importância médica e na agricultura (SINGER, 1980), causado pelos processos de variação genética e de seleção natural. Dessa forma, dosagens cada vez mais elevadas destes agentes são empregadas, causando graves danos ao meio ambiente.

Recentemente, o custo para o desenvolvimento de novas moléculas químicas tornou-se bastante elevado. De acordo com FERREIRA LIMA (1998), no início da década de 90 era necessário sintetizar cerca de 20.000 compostos para que apenas um produto comercial chegassem ao mercado, num prazo de avaliação entre 8 e 10 anos.

Face à crescente preocupação do público quanto à ocorrência de seus efeitos adversos e em virtude do aumento do rigor na legislação de alguns países quanto à presença de resíduos químicos em alimentos, torna-se necessário o uso de novas estratégias de controle a insetos prejudiciais.

No Brasil e no mundo, tem sido implementados métodos que não implicam no uso massivo de inseticidas, mas que são seletivos para as espécies de importância para a saúde pública e animal. Desta forma, o controle biológico apresenta grande potencial de uso como alternativa ao uso de produtos químicos.

2.3. Controle Biológico

A utilização de métodos biológicos para o controle de insetos tem sido relatada desde o primeiro milênio da nossa era, quando formigas eram usadas na China no controle de pragas de citrus (COPPEL E MERTINS, 1977).

O uso de métodos microbianos para a proteção de colheitas foi reconhecido no século 19. Aparentemente, o primeiro relato de uma doença animal causada por um microrganismo foi em 1834, quando Agostino Bassi observou uma doença do bicho-da-seda causada pelo fungo posteriormente conhecido como *Beauveria bassiana*. Em 1878, o russo Elie Metchnikoff realizou pesquisas sobre doenças no besouro *Anisoplia austriaca*, as quais resultaram na descoberta do fungo *Metarhizium anisopliae* (STOCKDALE, 1992).

O controle biológico possui uma definição bastante abrangente, e compreende todos os métodos que têm como objetivo biológico principal limitar o desenvolvimento de pragas, insetos vetores, doenças e plantas invasoras. Estes métodos podem ser divididos em quatro tipos:

- i) Controle biológico clássico: envolve principalmente a utilização de inimigos naturais;
- ii) Controle microbiano: utiliza microrganismos (bactérias, fungos, vírus, protozoários, nematódeos) capazes de causar doenças em insetos ou de prevenir o estabelecimento de microrganismos causadores de doenças em plantas;
- iii) Modificadores de comportamento da praga: que exploram comportamentos específicos das pragas de forma a confundi-las ou alterá-las, conseguindo assim o seu controle (por exemplo, os feromônios);
- iv) Manipulação genética: técnica que possui a capacidade de interferir na reprodução do inseto, na imunização da planta ao ataque de insetos selecionados ou no aumento da atividade microbiana de controle da praga.

A utilização do controle biológico possui algumas vantagens, tais como (ALVES, 1998):

- a) São produtos inócuos ao homem e a outros animais;
- b) Possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente;
- c) Produção de efeitos secundários às populações de insetos, como redução da oviposição, perda de viabilidade de ovos ou aumento da sensibilidade a outros agentes de controle;
- d) São produtos específicos ao inseto praga, não ocasionando efeitos maléficos aos inimigos naturais;

- e) Possibilitam o estabelecimento de um controle permanente, de modo a manter a população da praga sob controle após sucessivas aplicações;
- f) Podem ser utilizados em associação com os inseticidas químicos em subdosagens, possibilitando uma ação sinérgica e mais eficiente;
- g) Os índices de aparecimento de resistência são baixos;
- h) Podem ser produzidos por processos fermentativos relativamente simples, utilizando-se matérias-primas de baixo custo.

O emprego de produtos de origem biológica para controle de insetos vetores e pragas da agricultura aumenta a qualidade do produto agrícola e reduz a poluição do meio ambiente, contribuindo para a preservação de recursos naturais e aumentando a sustentabilidade dos ecossistemas.

Embora os microrganismos entomopatógenos possam ser aplicados puros ou na forma em que são produzidos, muitas vezes tais condições não permitem a distribuição e a cobertura homogêneas e a obtenção de um controle eficiente. Estes problemas podem ser superados pelo desenvolvimento de uma formulação adequada.

2.3.1- Controle Microbiano de Insetos

Diversos agentes microbianos podem causar doenças em insetos, incluindo vírus, fungos, protozoários, nematóides e bactérias.

a) Vírus

A ocorrência de vírus patógenos a insetos tem sido bem documentada ao longo dos anos. Podem ser produzidos *in vivo*, através da infecção em insetos susceptíveis, ou *in vitro*, pela multiplicação de células hospedeiras. Algumas das principais dificuldades encontradas na produção de vírus entomopatogênicos é a necessidade de grandes quantidades de insetos pelo processo *in vivo*, enquanto que na produção em laboratório as células animais cultivadas são muito suscetíveis a danos mecânicos.

O mais importante grupo de vírus entomopatógenos são os baculovírus, pertencentes à família Bacloviridae, que infectam principalmente insetos da Ordem Lepidoptera (lagartas). De acordo com VOLKMAN et al. (1995), os gêneros mais importantes são o *Nucleopolyhedrovirus* (vírus da poliedrose nuclear – NPV), muito utilizado para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), e o Granulovírus (vírus da granulose – GV), usado no combate à broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*).

No Brasil, um dos exemplos mais bem sucedidos de controle biológico pela utilização de vírus entomopatógenos é o da lagarta-da-soja. Desde 1977, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sediado em Londrina, PR, desenvolve pesquisas para viabilizar sua utilização em campo. Foram realizados testes-piloto em diferentes regiões produtoras de soja no Paraná por duas safras consecutivas (1980/81 e 1981/82) e, após a constatação da viabilidade técnico-econômica, foi iniciada a difusão da técnica de aplicação do baculovírus na safra 1982/83, primeiramente no Paraná e Rio Grande do Sul.

A Tabela 2.1 ilustra alguns dos vírus entomopatógenos aplicados na agricultura:

Tabela 2.1 – Alguns vírus aplicados no controle de pragas da agricultura

Vírus	Inseto-alvo	Referência
Baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis</i> (AgNPV)	Lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)	MOSCARDI (1989)
Baculovírus <i>Spodoptera frugiperda</i> (SfNPV)	Lagarta do cartucho do milho (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	VALICENTE e CRUZ (1991)
Baculovírus <i>Spodoptera littoralis</i> (SINPV)	Traça do algodão (<i>Spodoptera littoralis</i>)	STOCKDALE (1992)
Vírus da granulose <i>Erinnyis ello</i> (ErGV)	Mandarová da mandioca	MOSCARDI (1999)
Vírus da granulose <i>Phthorimaea operculella</i> (PoGV)	Traça da batata (<i>Phthorimaea operculella</i>)	BRIESE e PODGWAITE (1985)

A área de soja tratada com *Baculovirus anticarsia* no Brasil cresceu rapidamente, de 2.000ha em 1982/83 para mais de 500.000ha em 1987/88. Atualmente, estima-se que, desde 1983, o produto tenha sido utilizado em mais de dez milhões de hectares, proporcionando ao país uma economia estimada em cem milhões de dólares em agrotóxicos, sem considerar os benefícios ambientais resultantes da não aplicação de mais de onze milhões de litros desses produtos. Ressalta-se que, em termos de área atingida, este é o maior programa de uso de vírus de insetos, a nível mundial (MOSCARDI, 1989).

b) Fungos

De acordo com ROBBS e BITTENCOURT (1998), os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das doenças em populações de insetos. Cerca de 700 espécies são reconhecidas como entomopatógenas; entretanto, apenas algumas delas são utilizadas atualmente em programas de controle (ROBERTS e YENDOL, 1971). Algumas destas espécies são ainda capazes de parasitar diferentes tipos de ácaros, mosquitos e moscas. Estes agentes possuem a característica de serem de fácil dispersão, o que representa uma grande vantagem para sua aplicação em campo. Possuem grande capacidade de supressão de populações de pragas e grande facilidade de cultivo *in vitro*.

Alguns dos principais fungos empregados em programas de controle biológico são aqueles pertencentes aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Entomophthora* e *Aschersonia*. No Brasil, a agricultura consome anualmente cerca de 66 toneladas de bioinseticidas à base de fungos, sendo 55 toneladas de *Metarhizium anisopliae*, 3 de *Beauveria bassiana* e 8 de *Sporothrix insectorum*, que equivalem a vendas de aproximadamente US\$ 1 milhão.

A Tabela 2.2 mostra alguns dos fungos entomopatógenos mais utilizados.

Tabela 2.2 – Alguns fungos aplicados no controle de pragas da agricultura

Fungo	Inseto-alvo	Referência
<i>Metarhizium anisopliae</i>	-Cigarrinhas-da-cana-de-açúcar (<i>Mahanarva posticata</i> , <i>M. fimbriolata</i> , <i>M. rubicunda indentata</i>)	ALVES (1998); MENDONÇA (1998)
	-Cigarrinha-das-pastagens	
	-Broca-de-cana (<i>Diatraea saccharalis</i>)	
	-Broca-dos-citrus (<i>Diploschema rotundicolle</i>)	
<i>Beauveria bassiana</i>	Broca da coroa do trigo (<i>Listronotus bonariensis</i>)	CISTERNAS et al. (1998)
<i>Sporothrix insectorum</i>	Percevejo da renda (<i>Leptopharsa heveae</i>)	TANZINI (1998)
<i>Nomuraea rileyi</i>	Lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)	BARROS et al. (1999)

No Brasil, um exemplo de aplicação de bioinseticidas à base de fungos é a utilização de *Sporothrix insectorum* no combate ao percevejo da renda (*Leptopharsa*

heveae), uma das pragas mais indesejadas no cultivo da seringueira. Em 2000, este agente foi aplicado em 5 mil hectares de seringueira no Estado de São Paulo, o maior produtor nacional de látex. Na Região do Vale do Paraíba (SP), produtos à base do fungo *Metarhizium anisopliae* são empregados no combate à broca-dos-citrus e à cigarrinha-das-pastagens.

c) Protozoários

Em trabalho desenvolvido por Pasteur, em 1865, foi identificado o primeiro caso de uma doença em inseto causada por um protozoário. A doença era conhecida como “pebrina”, que atingia o bicho da seda, e o agente causal é hoje conhecido como *Nosema bombycis*. No início deste século, outro protozoário foi reconhecido como o agente etiológico de uma doença em abelha, o *Nosema apis* (RIOS, 1998).

São conhecidas cerca de 65.000 espécies de protozoários, entretanto, são poucas as espécies que possuem atividade inseticida. As mais importantes são encontradas no filo *Microspora* (LEVINE et al., 1980).

A grande dificuldade encontrada para a utilização destes microrganismos como agentes biológicos de controle é a sua dificuldade de produção em larga escala. Atualmente, o único bioinseticida desta natureza disponível comercialmente é da espécie *Nosema locustae*, muito utilizado no controle de gafanhotos. Podem ser destacadas outras espécies do gênero que possuem atividade contra insetos, conforme mostra a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Alguns protozoários entomopatogênicos

Protozoário	Inseto-alvo	Referência
<i>Nosema locustae</i>	-Gafanhoto	LANGE (1996)
<i>Nosema bombycis</i>	-Bicho da seda (<i>Bombyx mori</i>)	
<i>Nosema apis</i>	-Abelha (<i>Apis mellifera</i>)	McLAUGHLIN (1971)
<i>Nosema grandis</i>	-Bicudo do algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>)	

d) Nematóides

A utilização de nematóides para o controle de insetos tem sido relatada desde o início do século (POINAR Jr., 1971). São microrganismos que possuem grande capacidade de adaptação e dispersão no ambiente, além de resistência a produtos

químicos e possibilidade de atuar de forma sinérgica com outros agentes entomopatogênicos, aumentando a eficiência do controle (STOCK e CAMINO, 1995). Entretanto, sua sensibilidade à condições ambientais adversas e baixa estabilidade reduzem sua eficácia em campo.

São conhecidas sete famílias de nematóides com propriedades inseticidas, destacando-se as espécies *Romanomermis culicivorax* e *Neoaplectana carpocapsae*, sendo esta última espécie produzida *in vitro* em escala comercial (FERRAZ, 1986).

Um exemplo de utilização deste microrganismo no Brasil é o emprego da espécie *Deladenus siricidola* no controle biológico da vespa-da-madeira *Sirex noctilio*. Este inseto se desenvolve no interior do tronco de algumas coníferas, em especial, espécies de *Pinus* spp. Atualmente, dois milhões de hectares estão plantados com *Pinus* spp., sendo metade desta área localizada na região sul.

De acordo com IEDE et al. (1998), as primeiras aplicações deste agente biológico foram realizadas em 1989. A partir do isolamento da linhagem K2, em 1997, este agente tem sido utilizado em grandes quantidades pelos produtores. Atualmente, o índice de parasitismo no Brasil é muito variado, havendo locais onde a praga está totalmente controlada em áreas contínuas de 12.000ha, com cerca de 80% de parasitismo.

A Tabela 2.4 ilustra alguns exemplos de nematóides com propriedades inseticidas.

Tabela 2.4 – Alguns nematóides entomopatogênicos

Nematóide	Inseto-alvo	Referência
<i>Neoaplectana carpocapsae</i>	-Besouro da batata (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) -Traça do tabaco (<i>Heliothis virescens</i>) -Traça do repolho (<i>Pieris rapae</i>) -Traça do milho (<i>Heliothis zea</i>)	POINAR Jr. (1971)
<i>Deladenus siricidola</i>	-Vespas (gênero <i>Sirex</i>)	BEDDING (1974)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	-Cigarrinha da cana-de-açúcar (<i>Mahanarva fimbriolata</i>)	EL-KADI (1977)
<i>Heterotylenchus spp.</i>	-Moscas	POINAR Jr. (1971)

e) Bactérias

As mais bem conhecidas bactérias entomopatogênicas estão assim classificadas: *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Serratia* (*S. marcescens*, *S. entomophila*), *Clostridium* (*C. bifermentans*) e *Bacillus* (*B. alvei*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*) (THIERY e FRACHON, 1997).

Alguns autores as classificam como esporulantes e não esporulantes. As espécies esporulantes são mais adequadas à produção industrial e à aplicação em campo, além da menor sensibilidade dos esporos às radiações ultravioleta e condições climáticas, como calor excessivo e baixos teores de umidade, aumentando sua persistência no campo (FALCON, 1971). As espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia* são não-esporulantes, enquanto que *Clostridium* e *Bacillus* são esporulantes.

2.3.2- Bactérias do Gênero *Bacillus*

Dentre as bactérias esporulantes, merecem especial destaque as espécies do gênero *Bacillus*. A espécie mais estudada e utilizada no campo é *B. thuringiensis*, que apresenta dezenas de variedades tóxicas contra insetos das Ordens Lepidoptera (lagartas), Coleoptera (besouros) e Diptera (mosquitos e moscas). A espécie *B. sphaericus* apresenta maior especificidade contra insetos da Ordem Diptera.

a) *Bacillus sphaericus*

A bactéria *B. sphaericus* (Bs) foi primeiramente descoberta em 1904 (NEIDE, 1904). Apenas em 1965 sua atividade contra larvas de culicídeos foi reconhecida; entretanto a cepa então descoberta (*B. sphaericus* K) não possuía uma atividade muito eficaz, o que limitou a sua utilização (KELLEN et al., 1965).

Atualmente, diversas linhagens tóxicas são conhecidas, e a maioria dos trabalhos utilizam as cepas 1593 e 2362, isoladas respectivamente na Indonésia (SINGER, 1973) e na Nigéria (WEISER, 1984). Apresenta elevada toxicidade e especificidade contra insetos da Ordem Diptera, especialmente contra as espécies do gênero *Culex* e *Anopheles*.

Por ser inofensiva ao homem, animais e meio ambiente, sua utilização é recomendada pela Organização Mundial de Saúde em programas de saúde pública. A linhagem 2362 é amplamente utilizada em diversos programas de controle de

mosquitos em todo o mundo, constituindo o princípio ativo de todos os produtos comerciais à base de *B. sphaericus* que são utilizados para o controle de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*.

É estritamente aeróbica e Gram-positiva. Não é capaz de utilizar açúcares como fontes de carbono e energia, necessitando de meios de crescimento à base de proteínas e íons Ca^{++} e Mg^{++} para a esporulação (RUSSEL et al., 1989). Apresenta esporos esféricos situados terminalmente em um esporângio distendido.

As variedades mais tóxicas às larvas de mosquitos, incluindo-se a linhagem 2362, produzem um cristal protéico em forma de paralelepípedo composto por duas proteínas de 51,4 e 41,9kDa. Ambas as proteínas são requeridas para a ação tóxica, sendo sintetizadas em quantidades equimolares durante a esporulação (CHARLES et al., 1997). Após a esporulação, o cristal permanece associado ao endosporo, estando este complexo (endosporo+cristal) contido no exospório.

Após ingestão do cristal, as duas proteínas são solubilizadas no estômago das larvas pela ação combinada de proteases e pH alcalino, causando danos ao sistema nervoso e ao trato digestivo, até a ocorrência de septicemia (RIOS, 1998). O período compreendido entre a ingestão da toxina e a letalidade das larvas é de até 48 horas.

A Figura 2.2 ilustra uma célula esporulante de *B. sphaericus* 2297 contendo o cristal protéico.

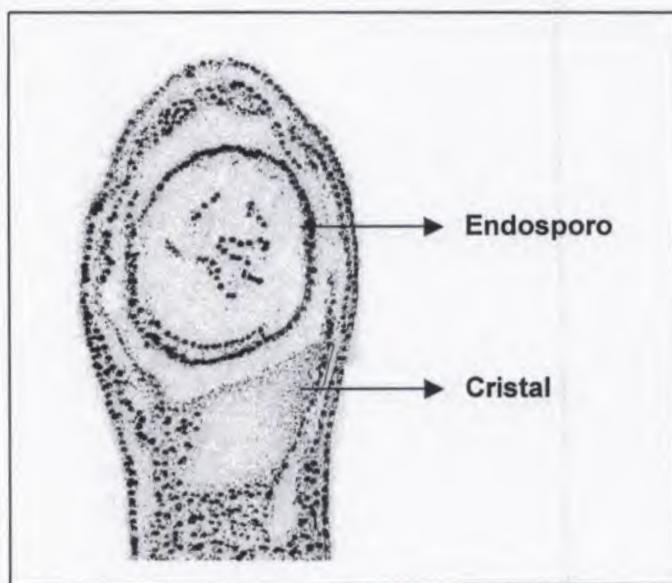


Figura 2.2 – Micrografia eletrônica de uma célula esporulante de *B. sphaericus* 2297 contendo o cristal protéico (Fonte: BAUMANN et al., 1991)

As cepas menos ativas produzem um grupo de toxinas denominadas de Mtx, sendo sintetizadas apenas durante a fase vegetativa (THANABALU et al., 1991). Sua localização na célula ainda não é bem definida e possuem um modo de ação ainda desconhecido (CHARLES et al., 1996).

É uma espécie bastante comum e de ampla distribuição, podendo ser isolada do solo de ecossistemas aquáticos ou em larvas de mosquitos mortos. Além disso, possui a habilidade de persistir em ambientes aquáticos, poluídos ou não (BAUMANN et al., 1991). Este fato representa uma grande vantagem em se tratando de aplicações realizadas em canais, valetas ou fossas, todos contendo grandes quantidades de matéria orgânica, proporcionando um controle mais duradouro sobre as populações de larvas.

A eficácia de *B. sphaericus* no controle dos mosquitos tem sido extensamente comprovada ao longo dos anos, podendo ser citados programas de longa duração como, por exemplo, no Vale do Reno, Alemanha (BECKER, 1997).

GUNASEKARAN et al. (2000) demonstraram que esta bactéria, quando aplicada em doses sub-letais contra *Culex quinquefasciatus*, além de causar mortalidade das larvas, reduzia a eficiência dos mosquitos adultos quanto à transmissão da filariose.

CONSOLI et al. (1997) investigaram a utilização de uma formulação líquida concentrada para o controle de *C. quinquefasciatus* na cidade de Montes Claros (MG). O produto foi aplicado durante 46 dias em intervalos regulares, com excelentes resultados de controle populacional do mosquito.

Áreas das cidades de Recife e Olinda (PE) também têm sido investigadas para testar a viabilidade da utilização deste biolarvicida para o controle de *C. quinquefasciatus* (RÉGIS et al., 1995). Em Recife, 3.000 criadouros em uma área urbana de 1,2km² foram tratados mensalmente com o caldo fermentado de *B. sphaericus* 2362 durante um período de 2 anos, com redução da densidade populacional de *C. quinquefasciatus* de 50% no primeiro ano e de 85% no segundo ano de tratamento. Em adição, baixa densidade populacional foi mantida durante 10 meses após a suspensão das aplicações. Na cidade de Olinda, um formulado comercial (Spherimos®) foi usado no tratamento de 2.500 criadouros durante 18 meses, com redução de 90% da densidade populacional do mosquito em 80% da área testada.

Diversas pesquisas tem sido desenvolvidas em todo o mundo buscando o isolamento de novas linhagens que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptadas às condições locais, com maior eficácia em campo.

RODRIGUES et al. (1998) investigaram dez linhagens de *B. sphaericus* isoladas de solos brasileiros para o controle de vetores da malária na Amazônia – *Anopheles nuneztovari* e *An. darlingi* – e os resultados demonstraram que as cepas apresentaram maior atividade larvicida em relação à linhagem padrão 2362.

SILVA et al. (2002) realizaram testes de patogenicidade com 246 estirpes de *B. sphaericus* isoladas de diversas regiões do Brasil contra larvas de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, com seleção de 87 linhagens entomopatogênicas.

Existem poucos relatos sobre a ocorrência de resistência induzida por *B. sphaericus* à populações de insetos (SILVA-FILHA et al., 1995), excetuando-se em populações de *C. quinquefasciatus* tratadas em laboratório.

A resistência a esse agente pode ser desenvolvida em campo quando este é utilizado intensamente. Em uma área urbana do Recife, cuja população natural de *C. quinquefasciatus* havia sido intensamente tratada com *B. sphaericus* 2362, verificou-se que houve a redução de cerca de 10 vezes na sensibilidade dos indivíduos da população a esta bactéria, após 37 tratamentos, durante um período aproximado de dois anos (SILVA-FILHA, 1994).

b) *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis foi isolado pela primeira vez no Japão em 1902, quando Ishiwata descreveu uma bactéria esporulante que causava mortalidade em lagartas do bicho da seda (*Bombyx mori*). Em 1911, Berliner relatou o mesmo tipo de bactéria atuando sobre a traça-das-farinhas (*Anagasta kuhniella*), e em 1915 a batizou de *Bacillus thuringiensis*. O pesquisador comentou a presença de um corpo de inclusão no esporo, mas não o relacionou com as propriedades inseticidas do microrganismo, mencionando ainda a possibilidade de utilizá-lo no controle das traças (CAPALBO e MORAES, 1987).

O potencial de sua utilização para o controle de lepidópteros logo foi reconhecido, e em 1938 foi comercializado o primeiro produto à base desta bactéria, o Sporeine, efetivo contra diversas lagartas de hortaliças e pomares (DIAS, 1992).

O desenvolvimento de produtos à base de *B. thuringiensis* se intensificou na década de 50, mas foi apenas em 1970 que a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, ativa contra um grande número de espécies de pragas, foi produzida comercialmente por muitas empresas de produtos agroquímicos e de fermentação (NAVON, 2000). Atualmente, produtos à base desta bactéria correspondem a cerca de 90% do mercado mundial de agentes de controle biológico.

Em 1977, GOLDBERG e MARGALIT (1977) identificaram uma linhagem que apresentou atividade tóxica contra dípteros. A cepa foi isolada em Israel, a partir de larvas moribundas de *Culex pipiens*, sendo denominada *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), sendo esta a primeira bactéria utilizada em programas de controle biológico contra dípteros em todo o mundo. No Instituto Pasteur de Paris, a linhagem foi identificada como *B. thuringiensis* sorotipo H-14.

Apresenta elevada toxicidade a larvas de mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes* e *Culex*, sendo menos ativa contra o gênero *Anopheles*. Também possui ação tóxica contra larvas de mosquitos da família dos simulídeos (borrachudos), insetos transmissores de doenças como a oncocercose, além de causarem intenso desconforto, reações alérgicas e infecções na pele. No Brasil, sua utilização no combate a larvas de simulídeos tem obtido resultados excelentes no controle destes insetos, como no Rio Grande do Sul, onde foi estabelecido um programa estadual de controle desde 1983 (MARDINI et al., 1999).

A Tabela 2.5 apresenta as principais variedades de *B. thuringiensis* utilizadas para o controle biológico de insetos.

Tabela 2.5 – Principais variedades de *B. thuringiensis* utilizadas para o controle biológico de insetos

Variedade	Inseto-alvo
<i>aizawai</i>	Lepidópteros
<i>tenebrionis</i>	Coleópteros
<i>kurstaki</i>	Lepidópteros
<i>israelensis</i>	Dípteros

Recentemente, novos isolados têm se mostrado ativos contra nematódeos, acarídeos e protozoários, enquanto que diversas pesquisas estão sendo realizadas na procura de novas linhagens tóxicas. No Brasil, podemos destacar o trabalho desenvolvido pelo Instituto Oswaldo Cruz (RJ), através de numerosos estudos e trabalhos publicados neste sentido (RABINOVITCH et al., 1999b; CAVADOS et al., 1998).

Pode ser facilmente encontrada no meio ambiente e isolada do solo, armazéns, superfície de folhas e em habitat de insetos (HONGYU et al., 2000).

A segurança de produtos à base de *B. thuringiensis* aos organismos não-alvo tem sido extensamente revisada por diversos autores. É totalmente inócuia ao homem e a outros mamíferos, bem como a vertebrados aquáticos, invertebrados e plantas.

Possui metabolismo aeróbio, a glicose é usada como fonte de carbono e energia, assim como a L-arabinose, D-xilose e D-manitol, sendo que algumas cepas utilizam a sacarose.

A atividade inseticida da grande maioria das subespécies de *B. thuringiensis* está relacionada à produção de uma inclusão parasporal de estrutura cristalina denominada de δ-endotoxina, que é sintetizada durante a esporulação. Dependendo da variedade da espécie, as δ-endotoxinas são formadas por proteínas de diferentes estruturas e pesos moleculares, variando entre 65 e 138kDa. Estas proteínas (protoxinas) são chamadas de proteínas Cry e são identificadas de acordo com a sua maior ou menor toxicidade às diversas Ordens de insetos susceptíveis. Diferentemente do que ocorre com *B. sphaericus*, a toxina produzida pelo *B. thuringiensis* não permanece associada ao endosporo.

Por exemplo, a classe Cry1 possui maior atividade contra insetos da Ordem Lepidoptera, enquanto que cristais formados por proteínas do tipo Cry4 são tóxicos contra Diptera (Tabela 2.6). Estas proteínas são codificadas por diferentes genes cry, estando agrupadas em 22 classes.

Tabela 2.6 – Exemplos de proteínas Cry encontradas em *B. thuringiensis*

Proteína	Formato do cristal	Tamanho da Proteína (kDa)	Inseto-alvo	Referência
Cry 1	Bipiramidal	130-138	Lepidópteros	MONNERAT e BRAVO (2000)
Cry 2	Cubóide	65	Lepidópteros e Dípteros	HÖFTE e WHITELEY (1989)
Cry 3	Irregular	72-73	Coleópteros	MONNERAT e BRAVO (2000)
Cry 4	Ovóide, esférico ou retangular	128-135	Dípteros	HÖFTE e WHITELEY (1989)

A estrutura tridimensional da proteína Cry 3A de *B. thuringiensis* é mostrada na Figura 2.3. As moléculas estão organizadas em três domínios: domínio I, responsável pela formação de poros no epitélio intestinal do organismo alvo; domínio II, que tem papel essencial na seletividade da toxina, estando associado à ligação da mesma ao receptor; e o domínio III, possivelmente envolvido na estabilidade estrutural da molécula (YOUTEN, 1996; LI et al., 1991; ARONSON e SHAI, 2001).

Quando as larvas dos insetos ingerem estas inclusões, as protoxinas são solubilizadas e convertidas em toxinas ativas de baixo peso molecular, através de enzimas (proteases) presentes no estômago das larvas e pH alcalino. Após a ligação a receptores específicos, a toxina insere-se rapidamente na membrana plasmática de células do intestino, causando a abertura ou formação de canais ou poros e provocando um desequilíbrio osmótico pela perda da integridade da membrana. Tais eventos conduzem à lise celular e, finalmente, à morte do inseto por inanição ou septicemia (KUMAR et al., 1996).

Atualmente, tem sido objeto de interesse da comunidade científica internacional a incorporação de genes codificadores das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* em plantas, que podem adquirir características de resistência seletiva a insetos com interesse econômico imediato. Entretanto, o desenvolvimento das chamadas "plantas transgênicas" tem ocasionado diversas discussões relacionadas a possíveis efeitos danosos à saúde do homem e dos animais, ainda não comprovados cientificamente.

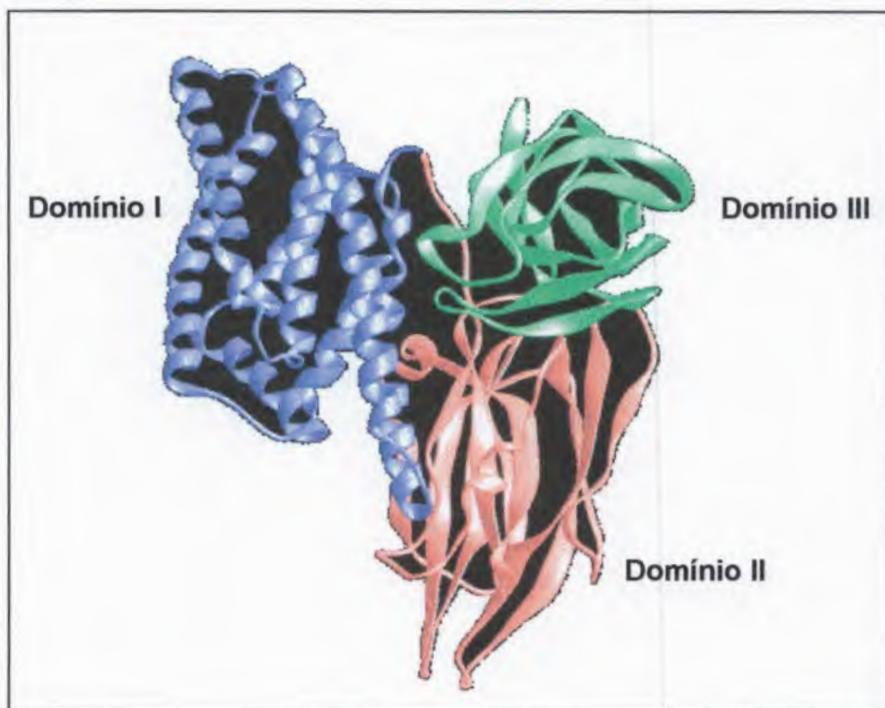


Figura 2.3 – Estrutura tridimensional da toxina Cry 3A de *B. thuringiensis*
(LI et al., 1991)

A utilização de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de dípteros vem se intensificando ao longo dos anos. Um dos exemplos clássicos é o emprego de produtos comerciais à base desta bactéria pelo Programa de Controle da Oncocercose

da Organização Mundial de Saúde, em uma área abrangendo 11 países da África Ocidental. A utilização destes produtos deu-se em 1981, surgindo como um método alternativo ou suplementar aos inseticidas químicos, os quais haviam se tornado ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência em insetos da região (BECKER e MARGALIT, 1993).

2.4. Aspectos da Fermentação

Os principais componentes dos meios de cultivo para a produção de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* são fontes de carbono e nitrogênio e elementos traços (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Ingredientes para fermentações de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (BEEGLE et al., 1990; ROWE e ARGYRIOS, 1987)

Ingrediente	Concentração (g/L)
Farinha de soja	20-40
Farinha de semente de algodão	14-30
Milhocina	15-30
Glicose	10-30
Peptona	2-5
Xarope de milho	20-45
Melaço	1-18,6
Glicerol	2-10
Amido de milho	10-15
Extrato de levedura	2
KH_2PO_4	1
K_2HPO_4	1
FeSO_4	0,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0005-0,02
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
CaCO_3	1-1,5

De acordo com COUCH (2000), as fermentações comerciais das bactérias entomopatógenas são realizadas em batelada ou em batelada alimentada. A escolha adequada dos ingredientes do meio é fundamental para o sucesso da produção comercial, tendo como objetivo a obtenção de uma maior atividade tóxica por volume de caldo fermentado.

Como observado na Tabela 2.7, diversos substratos de baixo custo podem ser utilizados na composição dos meios. Para *B. sphaericus*, que não utiliza carboidratos como fonte de carbono, estes devem ser formulados à base de proteínas, enquanto que açúcares podem ser empregados para as linhagens de *B. thuringiensis*.

Os principais parâmetros monitorados durante o processo fermentativo são temperatura, oxigênio dissolvido, pH e concentração de açúcar. Devido ao grande consumo de oxigênio durante o cultivo, o controle deste parâmetro é muito importante, não devendo atingir valores abaixo de 20% (COUCH, 2000).

Existem controvérsias com relação à necessidade do controle de pH durante a fermentação. Segundo COUCH (2000), alguns produtores utilizam meios tamponados por não possuírem um sistema adequado de controle. Outros autores verificaram um aumento na atividade inseticida dos caldos fermentados de *B. sphaericus* (YOUTSEN e WALLIS, 1987) e de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (SMITH, 1982) quando a fermentação era realizada sem controle de pH.

Em bateladas alimentadas, os níveis de açúcar (para o caso de *B. thuringiensis* var. *israelensis*) não devem atingir níveis inferiores a 2g/L. A temperatura deve ser mantida em $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; valores maiores inibem a produção das toxinas (ROWE e ARGYRIOS, 1987), enquanto que valores menores que 25°C aumentam os custos de produção.

2.5. Formulações

As biomassas das bactérias inseticidas do gênero *Bacillus*, após separadas de seus caldos fermentados, são compostas por um complexo de componentes orgânicos, mais especificamente as protoxinas e os respectivos esporos. Como proteínas, as protoxinas são mais sensíveis a alterações em suas estruturas químicas e se inativam ao longo do tempo. A inativação pode ser causada por contaminação microbiana, radiação ultra-violeta, enzimas proteolíticas, sensibilidade às condições de temperatura, compostos tóxicos, secagem não controlada, umidade, etc. (RABINOVITCH et al., 1999a).

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de desenvolver formulações mais eficientes e duradouras, além de técnicas de engenharia genética com o objetivo de produzir novas combinações de toxinas, proteínas tóxicas adicionais e um maior nível de produção da toxina para aumentar a eficiência das diversas cepas existentes.

Alguns critérios gerais devem ser obedecidos para a obtenção de formulados de qualidade e comercialmente viáveis COUCH (2000):

- a) A atividade inseticida deve ser mantida e/ou aumentada durante o processo de formulação;
- b) As formulações devem possuir um tempo de prateleira variando entre 18-36 meses sob condições de estocagem à temperatura média de 25°C. Exposições à temperaturas acima de 30°C por períodos prolongados devem ser evitadas;
- c) As formulações líquidas devem ser facilmente dispersas;
- d) As formulações devem garantir uma distribuição adequada do ingrediente ativo;
- e) Os formulados devem ser estáveis sob condições ambientais e protegidos dos efeitos da radiação ultra-violeta;
- f) Os formulados devem ser adequados aos hábitos do inseto e também com às características dos locais onde se encontram os criadouros.
- g) Os formulados devem ser economicamente viáveis, com preço competitivo no mercado.

Uma formulação adequada aumenta a eficiência do produto no campo, facilita o manuseio e a aplicação e diminui os custos de armazenamento, diminuindo a perda na qualidade. Contudo, existem poucos relatos na literatura científica sobre o estudo de formulações de microrganismos entomopatogênicos, especialmente considerando que as formulações já desenvolvidas são, em geral, mantidas sob sigilo pelas empresas que as desenvolvem.

Os componentes de uma formulação, além de serem inativos às larvas, devem envolver os cristais de protoxinas sem aumentar o tamanho da partícula, caso contrário podem não ser digeridos pelo inseto. Além disso, devem contribuir para o aumento da estabilidade, virulência, eficácia e persistência do agente de biocontrole.

As formulações também devem ser compatíveis com as técnicas de aplicação e com os equipamentos existentes. Em geral, a aplicação de inseticidas microbianos tem sido realizada com equipamentos e tecnologia desenvolvidos para os inseticidas químicos. Caso contrário, encontrarão dificuldades para concorrer no mercado e terão sua aceitação limitada.

As formulações comerciais à base de *Bacillus entomopatogênicos* disponíveis no mercado são formulações líquidas, sólidas (pós molháveis, pós, grânulos dispersíveis em água, formas encapsuladas) e óleos emulsionáveis.

2.5.1- Formulações Sólidas

Uma formulação sólida apresenta, em geral, uma maior estabilidade quando comparada à uma formulação líquida, devido ao baixo teor de umidade. Além disso, favorece o transporte e o armazenamento.

As principais formulações sólidas bioinseticidas são pós, pós molháveis, granulados, cápsulas e comprimidos, sendo que ainda não existem produtos sob a forma de comprimidos no mercado.

Os comprimidos são preparações sólidas obtidas por aglomeração/aglutinação sobre pressão de um ou vários princípios ativos com o auxílio de adjuvantes apropriados, denominados excipientes. A utilização de comprimidos possui inúmeras vantagens, tais como: a) facilidade de manuseio, acondicionamento e transporte; b) dosagem precisa; c) meio seco e condensado favorável a uma boa conservação; d) baixo custo de fabricação. Entretanto, o processo de formulação e fabricação muitas vezes apresenta-se muito delicado, devido às características do princípio ativo e dos tipos e concentrações dos excipientes selecionados.

A primeira etapa do desenvolvimento de uma formulação sólida é a preparação do pó, que compreende as etapas de secagem do princípio ativo e pulverização.

Os excipientes devem garantir a liberação do princípio ativo e sua necessária estabilidade. Podem ser classificados como segue:

- Diluentes – produtos inertes utilizados para conferir carga/peso aos comprimidos, possuindo também uma função adsorvente, diminuindo a ação da umidade sobre o princípio ativo. Exs.: lactose, amidos, carbonatos, fosfatos;
- Ligantes ou aglutinantes – conferem agregação às partículas, devendo permitir a obtenção de comprimidos de dureza suficiente, sem prejudicar sua desintegração. Exs.: amido, goma arábica, derivados de celulose;
- Desintegrantes – auxiliam na disagregação. Exs.: sulfato de sódio, croscarmelose, crospovidona;
- Lubrificantes – melhoram a fluidez do pó, facilitam o preenchimento da câmara de compressão, diminuem os fenômenos de “colagem” entre o pó e a máquina e dão brilho aos comprimidos. Exs.: estearato de magnésio, talco.

2.6. Critérios de Controle de Qualidade

O principal critério de avaliação de uma formulação bioinseticida é a sua atividade tóxica ao inseto suscetível. Veremos, no Capítulo 6, a metodologia para determinação da atividade larvícola de *B. sphaericus* e de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

A avaliação da presença de contaminantes deve ser rigorosamente conduzida de forma a garantir um produto isento de microrganismos contaminantes. Esta deve ser realizada em todas as etapas de produção, desde a fermentação até a formulação do produto final.

A Tabela 2.8 mostra os níveis de contaminação aceitáveis para estes produtos COUCH (2000):

Tabela 2.8 – Níveis aceitáveis quanto à presença de microrganismos contaminantes em produtos bioinseticidas

Organismo	Limite
Coliformes	< 10/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausente em 1g
<i>Salmonella</i>	ausente em 10g
<i>Streptococcus faecalis</i>	< 1x10 ⁴ /g
Leveduras e fungos	< 100/g

CAPÍTULO 3

FLOCULAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO

A remoção de células microbianas de seus caldos fermentados constitui numa das etapas mais importantes da maioria dos processos biotecnológicos. Estas partículas, por possuírem dimensões da ordem de micrômetros e baixa densidade, muitas vezes necessitam de pré-tratamentos para a obtenção de recuperações eficientes nos processos de separação por filtração ou sedimentação gravitacional, e a indução da floculação das células é uma das alternativas mais utilizadas.

3.1- O Fenômeno da Agregação Celular

O fenômeno da agregação celular pode ser definido como um processo de junção das células para formar um agregado, sendo este uma unidade transportável. A definição inclui dois componentes principais: o movimento físico e a promoção de um contato estável, ambos requeridos para qualquer sistema de agregação.

Descrito por Pasteur em 1876, a floculação de leveduras foi o primeiro sistema microbiano floculento estudado. No início do século XX, diversos trabalhos foram desenvolvidos visando investigar o efeito de sais, substâncias promotoras de crescimento e outros componentes sobre a floculação de microrganismos (CALLEJA, 1987).

A floculação de microrganismos pode ser classificada como ativa ou passiva, natural ou artificial. A agregação ativa ocorre quando as células se movem em decorrência de sinais quimiotáxicos, ou seja, sinais que promovem uma ação atrativa

entre as células, enquanto que na agregação passiva as células formam um agregado em decorrência de colisões randômicas, ocasionadas pelo movimento do fluido. A agregação é natural quando ocorre de forma espontânea, sendo inerente ao microrganismo, e o fenômeno é considerado artificial quando resulta da utilização de substâncias químicas que promovam a junção das células (CALLEJA, 1987).

O contato entre as células deve ser reversível, mas eficaz e duradouro o suficiente para que o fenômeno seja experimentalmente observável.

3.1.1- Mecanismos de Agregação

Os fatores que determinam os processos de agregação celular tem sido discutidos ao longo dos anos com o objetivo de facilitar sua aplicação prática na biotecnologia. De maneira geral, a floculação é determinada por fatores genéticos, fisiológicos (fase de crescimento celular, condições nutricionais), químicos (pH, presença de substâncias floculantes) e físicos (temperatura, agitação) (ESSER e KÜES 1983).

O fenômeno também está diretamente relacionado com a natureza da superfície microbiana, como hidrofobicidade do envoltório celular, densidade de carga e presença de moléculas na parede que são responsáveis pela floculação. De acordo com CALLEJA et al. (1984), o arranjo celular do agregado também é função da geometria da célula e da presença de estruturas extracelulares, como cápsulas ou fímbrias.

a) Fatores Genéticos

Os mecanismos genéticos da floculação tem sido muito estudados em células de leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*.

FORSTER et al. (1985) relatam a existência de no mínimo 5 genes FLO que podem influenciar a composição da parede celular, incluindo a presença ou ausência de proteínas como lectinas na superfície da parede. Estas moléculas, sob a influência de fatores externos como a presença de íons Ca^{2+} , formam um complexo que se liga especificamente à resíduos de manose, como mostra a Figura 3.1. Este mecanismo é denominado "teoria da lectina" e é baseado na hipótese de que leveduras não-floculentas não produzem lectinas, esclarecendo os fenômenos de autoflocação (levedura naturalmente floculenta, Figura 3.1A), coflocação (flocação de uma mistura de leveduras floculenta e não-floculenta, Figura 3.1B) e da ausência de flocação das células de leveduras (Figura 3.1C).

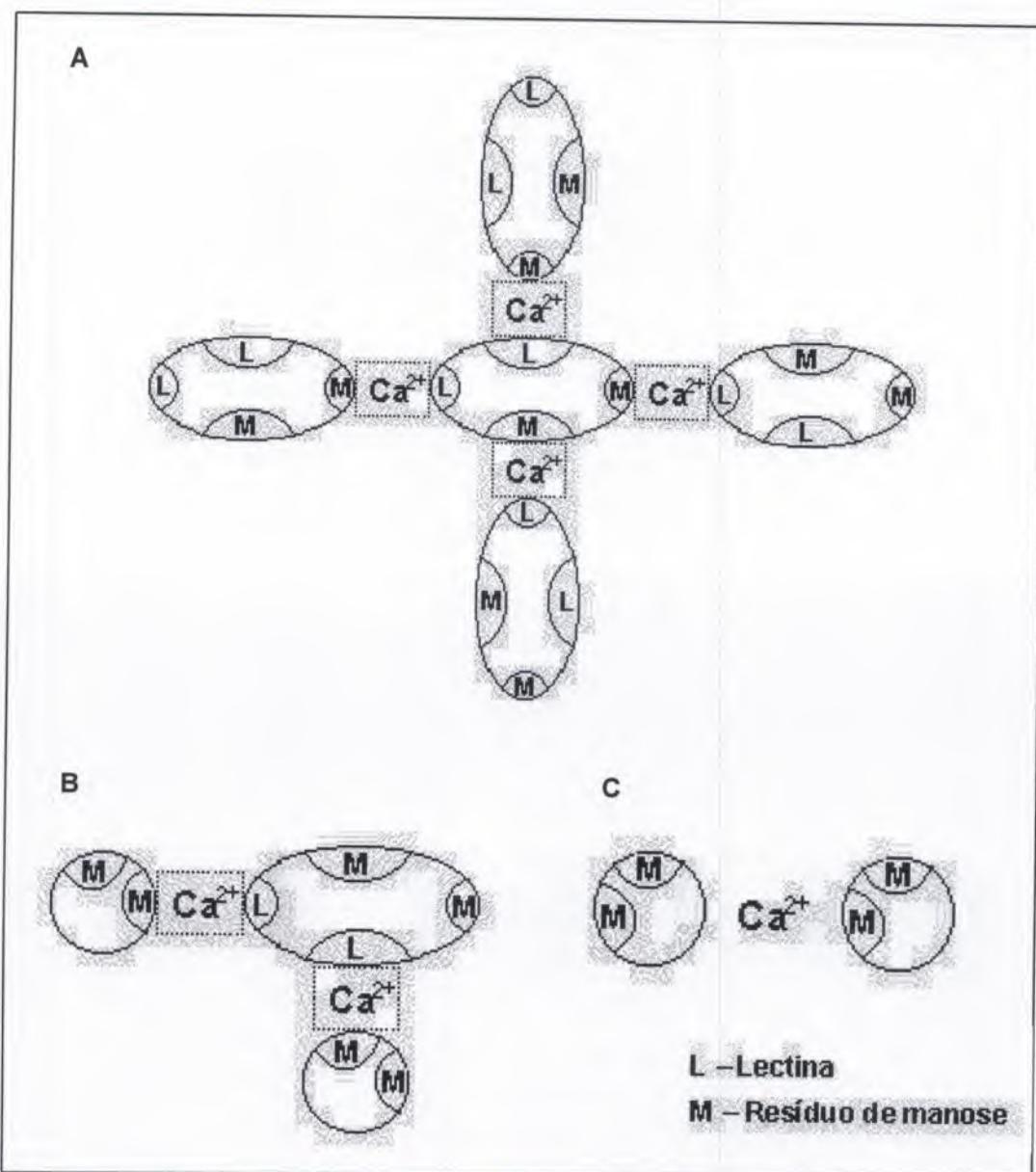


Figura 3.1 – Flocação em leveduras: a teoria da lectina (FORSTER et al., 1985)

Segundo ROSE (1984), os genes FLO também poderiam ser responsáveis pela produção de enzimas que catalisariam mudanças na arquitetura da superfície celular, dando origem à agregação.

STRATFORD e ASSINDER (1991) descrevem ainda a existência de cepas com um fenótipo denominado NewFlo. Estas floculam durante a fase estacionária de crescimento, e a expressão gênica da agregação é inibida por glicose e manose. De acordo com os autores, as diferenças genéticas e fisiológicas entre as espécies fenotípicas Flo e NewFlo ainda não são completamente elucidadas.

b) Fatores Fisiológicos

A floculação depende consideravelmente da idade fisiológica das células. As diferenças encontradas nas características de floculação durante o crescimento muitas vezes é determinada pela gênese do microrganismo, como exemplificado no item anterior para as cepas de *S. cerevisiae* pertencentes ao grupo fenotípico NewFlo.

As condições nutricionais do meio também podem influenciar a agregação. A carência de nutrientes pode causar um estresse químico ou físico, favorecendo a floculação das células. Além disso, alguns microrganismos possuem a habilidade de se mover na direção de um gradiente de substrato, vindo a agregar-se (BOSSIER e VERSTRAETE, 1996).

De acordo com ESSER e KÜES (1983), leveduras não floculam na ausência de glicose, e compostos nitrogenados como amônia, aminoácidos e uréia inibem a agregação.

A floculação de microrganismos também pode ser ocasionada pela produção de polímeros extracelulares durante o crescimento, tais como proteínas, celulose, mucopolissacarídeos e ácidos nucléicos. Este mecanismo ocorre principalmente em bactérias, com adsorção dos polímeros na superfície celular e formação de "pontes" entre as células, possibilitando a agregação (BUSCH e STUMM, 1968).

Em trabalho realizado por ERIKSSON e HARDIN (1987), verificou-se que a floculação da bactéria *Escherichia coli* estava relacionada à quantidade de polímeros liberados pelas células na solução, e que a hidrofobicidade das células dependia da ligação dos polímeros na superfície celular.

c) Fatores Químicos

A influência do pH sobre a agregação é de relevada importância, isto porque este parâmetro está diretamente relacionado às propriedades de carga da suspensão. As células bacterianas apresentam, em sua maioria, carga negativa resultante da ionização dos grupos funcionais carboxila e fosfato, presentes em maior quantidade na superfície das células (MOZES e ROUXHET, 1990; PELCZAR et al., 1993).

Em geral, uma redução do pH da suspensão para valores entre 2 e 3 diminui a repulsão entre as partículas pela interação com os prótons do meio, ocorrendo um mecanismo de atração entre as células e as cargas positivas.

A Figura 3.2 ilustra alguns grupamentos químicos presentes na superfície celular de microrganismos.

Grupo Químico	Nome	Propriedade
	Grupo Carboxila (ácido)	Ioniza-se a R-COO ⁻
	Grupo Amina (básico)	Ioniza-se a R-NH ₃ ⁺
	Grupo Fosfato (ácido)	Ioniza-se a R-PO ₃ ²⁻
R-OH	Grupo Hidroxila	Polar
	Grupo Carbonila	Polar
R-CH ₃	Grupo Metil	Apolar
	Grupo Fenil	Apolar

Figura 3.2 – Grupamentos químicos presentes na superfície celular de microrganismos (PELCZAR et al., 1993).

Em leveduras o efeito do pH sobre a agregação é variável entre as espécies, que exibem propriedades floculentas em faixas variáveis de pH. De acordo com CALLEJA (1987), as células não perdem sua carga negativa durante a fermentação. Isto explica porque tem sido rejeitada a hipótese de que a flocação em leveduras cervejeiras possa ocorrer devido a efeitos de neutralização de cargas superficiais.

Diversas substâncias podem ser utilizadas como indutores da flocação em microrganismos. As mais utilizadas são polímeros sintéticos como poliacrilamida,

floculantes naturais (quitosana, taninos), floculantes de origem microbiana (proteínas, polissacarídeos) e compostos inorgânicos como sódio, cálcio, magnésio, alumínio e ferro (SHIH et al., 2001; ESSER e KÜES, 1983; CALLEJA, 1987).

d) Fatores Físicos

A temperatura é um dos fatores físicos que exerce influência sobre a floculação de microrganismos. PALHA (1999) verificou que em temperaturas entre 15°C e 20°C, as células da bactéria *Zymomonas mobilis* permaneciam dispersas, enquanto que a agregação era observada entre 30°C e 40°C. O trabalho propõe que mudanças estruturais na membrana celular poderiam explicar a dispersão das células em temperaturas baixas, além de inibir ligações hidrofóbicas entre as mesmas.

Suspensões floculentas submetidas à agitações vigorosas podem ser desfloculadas devido à elevada turbulência, ocasionando a separação das células agregadas.

e) Natureza da Superfície Celular

Seja na autoflocação ou na agregação induzida por agentes externos, o processo de floculação está diretamente relacionado com a natureza da superfície celular.

Em se tratando das paredes celulares bacterianas, estas podem ser divididas em bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas de acordo com a estrutura da parede e sua composição química.

As bactérias Gram-positivas, como *Bacillus* spp., possuem um envoltório celular mais simples, sendo formado pela membrana citoplasmática, a parede celular e, em muitos casos, a cápsula. O principal componente da parede é o peptidoglicano, cuja composição varia entre 40 e 80% do peso seco da mesma, dependendo da espécie. Os outros principais constituintes da parede são os ácidos teicóicos, ácidos teicurônicos e polissacarídeos (PERRY e STALEY, 1997). Os ácidos teicóicos e os ácidos teicurônicos são polímeros aniónicos, e suas cargas negativas são dadas pelos grupos fosfodiéster e pelos ácidos urônicos, respectivamente (RIOS, 1998). De acordo com LANG et al. (1982), as condições de cultivo podem definir os tipos e composições destes polímeros na parede, mas não alteram o caráter aniónico da mesma. Além de serem responsáveis pelas carga superficial das células, possuem a propriedade de se ligarem a cátions metálicos, protegendo a célula contra metais tóxicos (ARCHIBALD et al., 1993).

As bactérias Gram-negativas possuem um envoltório mais complexo. Este é formado pela membrana citoplasmática (membrana interna), pelo espaço periplasmático onde se encontra a parede celular, constituída uma fina camada de peptidoglicano, pela membrana externa e, em alguns casos, pela cápsula. O peptidoglicano está presente numa proporção de apenas 5% do peso da parede (PERRY e STALEY, 1997). Como não está em contato com o ambiente externo, este componente provavelmente exerce pouca influência sobre o processo de flocação (FORSTER et al., 1985). Neste caso, as propriedades da membrana externa são determinantes, sendo formada por lipoproteínas e lipopolissacarídeos.

Células do gênero *Bacillus* podem conter estruturas adicionais como fimbrias, flagelos, cápsulas e uma camada superficial protéica de configuração cristalina.

As fimbrias e os flagelos são estruturas de composição protéica que se estendem a partir da superfície sob a forma de filamentos. Alguns autores, através de estudos de microscopia eletrônica, têm proposto que estas estruturas podem atuar como "ganchos", sendo responsáveis pelo contato entre as células (BROCK e MADIGAN, 1991; PALHA, 1999).

As cápsulas produzidas por algumas bactérias patogênicas são responsáveis pelos chamados fatores de virulência, como por exemplo na espécie *Streptococcus pneumoniae*. Em organismos não patogênicos, estas estruturas muitas vezes não parecem ser essenciais, podendo ser removidas sem perda da viabilidade celular. Podem ser encontradas em algumas espécies do gênero *Bacillus*, sendo formadas por polipeptídeos.

Uma camada externa às estruturas celulares ocorre em algumas espécies de *Bacillus*. Esta é denominada de camada S, sendo composta por proteínas contendo aminoácidos de natureza hidrofóbica. Também é encontrada nos esporos, e pode ter algumas funções, como proteção, manutenção da forma e rigidez e fixação de íons (RIOS, 1998). A característica hidrofóbica dos esporos deste gênero provavelmente está relacionada com esta estrutura.

A natureza hidrofóbica das superfícies microbianas é fator determinante em alguns fenômenos biotecnológicos, como por exemplo na adesão de microrganismos à superfícies (VAN LOOSDRECHT et al., 1987) e na afinidade de células à interfaces gasosas (ROSENBERG et al., 1980). Esta encontra grande aplicação nos processos de flotação, como será discutido no Capítulo 4.

O termo hidrofobicidade tem sido utilizado para explicar a relativa insolubilidade dos compostos apolares em água ou, para o caso da recuperação de partículas por flotação, a tendência de partículas a possuírem maior afinidade pela fase gasosa do que pela fase líquida. Entretanto, seu completo entendimento ainda não está

devidamente estabelecido devido às dificuldades encontradas nos estudos teóricos e experimentais das interfaces das moléculas (LUNA, 1999).

São reportados na literatura diferentes metodologias para a avaliação da hidrofobicidade da superfície das células, tais como adesão a hidrocarbonetos (ROSENBERG et al., 1980) e medidas de ângulo de contato (ABSOLOM et al., 1983).

Medidas de ângulo de contato tem sido relatadas em diversos trabalhos na literatura, incluindo bactérias, leveduras e actinomicetos. Considerando que esta propriedade é inerente à superfície celular, apresenta grande variação entre as espécies, como pode ser observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Ângulos de contato para diferentes espécies microbianas

Microrganismo	Ângulo de contato (grau)	Referência
<i>Pseudomonas</i> 52	19	
<i>Thiobacillus versutus</i>	27	
<i>Micrococcus luteus</i>	45	VAN LOOSDRECHT et al. (1987)
<i>Mycobacterium phlei</i>	70	
<i>Candida albicans</i>	59	
<i>Enterococcus faecalis</i> 1131	23	VAN DER MEI et al. (1998)
<i>Enterococcus faecalis</i> C1030	100	
<i>Rhodococcus opacus</i>	70	
<i>Bacillus brevis</i>	50	VAN DER WAL et al. (1997)
<i>Rhodococcus</i> sp. C125	70	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	87	RIJINARTS et al. (1999)
<i>Arthrobacter</i> sp. DSM 6687	15	

AHIMOU et al. (2001) analisaram a hidrofobicidade dos esporos, células vegetativas e células mortas de nove linhagens de *Bacillus subtilis* através de medidas de ângulo de contato, cromatografia por interação hidrofóbica e adesão a hidrocarbonetos. Os autores verificaram as medidas de ângulo de contato produziam uma melhor estimativa da hidrofobicidade da superfície. Além disso, as mesmas variavam de acordo com a espécie, sendo obtidos maiores ângulos de contato para os esporos em comparação com as células vegetativas.

DOYLE et al. (1984), estudando as características hidrofóbicas de espécies de *Bacillus*, verificaram que todas as espécies testadas (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B.*

mycoides, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*) apresentaram esporos hidrofóbicos quando comparados com suas células vegetativas.

É de se esperar uma relação inversa entre a carga superficial das células e a hidrofobicidade, pois quantidades maiores de cargas negativas aumentam probabilidade de ligações polares com as moléculas de água e, dessa forma, as interações hidrofóbicas são diminuídas. MOZES e ROUXHET (1990), em experimentos realizados com linhagens de *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis*, demonstraram que uma maior floculência estava relacionada com maior hidrofobicidade e menor carga superficial.

3.1.2- Importância Biotecnológica

A floculação de microrganismos é de particular importância em muitos processos industriais, tais como na indústria cervejeira, produção de biomassa e no tratamento de águas residuais.

Uma das principais aplicações industriais ocorre na indústria cervejeira, onde a seleção da linhagem da levedura depende fortemente de sua capacidade floculante, das condições de fermentação e do tipo de cerveja a ser produzida. Leveduras floculantes produzem cervejas com melhor aspecto, mais claras e de melhor paladar (ESSER e KÜES, 1983).

BAUTISTA et al. (1987) estudaram a remoção de células da bactéria *Sreptococcus equisimilis* por floculação/sedimentação, utilizando um polieletrólio como agente floculante, sendo observado um aumento na eficiência de separação em comparação com a centrifugação contínua.

O processo de floculação também é encontrado no tratamento de águas residuais, em que a remoção de poluentes é realizada através dos chamados lodos ativados. Estes são formados por culturas mistas contendo principalmente bactérias e protozoários, que sedimentam com facilidade através do processo de floculação (FORSTER et al., 1985).

3.2- Sedimentação Gravitacional

A sedimentação é um processo de separação sólido-líquido baseado na diferença entre as densidades do líquido e dos constituintes sólidos de uma suspensão, e a separação ocorre pela ação do campo gravitacional (FRANÇA, 2000). O processo freqüentemente é composto por dois estágios. O primeiro envolve a conversão de partículas discretas em agregados pela adição de floculantes ou pela utilização de suspensões naturalmente floculentas, como visto no item anterior para o caso de algumas suspensões biológicas. O segundo estágio consiste na obtenção de um sedimento compacto contendo pequena quantidade de água, correspondendo ao processo de sedimentação propriamente dito.

Os princípios fundamentais do processo de sedimentação têm sido extensivamente estudados ao longo dos anos. O primeiro trabalho publicado neste sentido foi realizado por MISHLER (1912), que calculava a área da seção transversal do sedimentador supondo que a velocidade de sedimentação dos sólidos e de ascensão do líquido eram iguais.

Posteriormente, COE e CLEVENGER (1916) apresentaram um método para o cálculo de projeto de sedimentadores contínuos. O método foi utilizado por mais de meio século e consistia na realização de vários experimentos de sedimentação em batelada, medindo-se a velocidade de sedimentação na região de concentração constante em ensaios com concentrações iniciais variando desde a concentração de alimentação do sedimentador até a concentração da lama desejada. Considera que a velocidade de sedimentação independe da concentração inicial de sólidos no ensaio em batelada.

Anos mais tarde, KYNCH (1952) estabeleceu a primeira teoria para a sedimentação. Sua principal contribuição ao cálculo de projeto de sedimentadores é o fato de possibilitar a determinação da relação funcional entre a velocidade de sedimentação e a concentração de sólidos a partir de um único ensaio em proveta, onde a concentração é igual à concentração de alimentação do sedimentador (DAMASCENO e MASSARANI, 1990). Este procedimento possibilitou uma grande simplificação no cálculo de projeto e trouxe ganhos operacionais, reduzindo para um o número necessário de ensaios em proveta.

O método de Kynch considera o efeito da concentração inicial de sólidos no ensaio em batelada. No entanto, assim como no método de Coe e Clevenger, estabelece que a velocidade de sedimentação é uma função única da concentração de

sólidos, não levando em consideração o fenômeno da compressão. Uma análise mais detalhada da metodologia de Kynch será discutida mais adiante, no Capítulo 7.

O teste clássico de proveta consiste no acompanhamento do deslocamento da interface superior da suspensão com o tempo. Como mostra a Figura 3.3, pode ser observada a formação de três regiões distintas: a região de líquido clarificado, a de sedimentação livre e a região de compactação.

Na região de sedimentação livre a velocidade de sedimentação e a porosidade são consideradas constantes; as partículas sedimentam livremente e não interagem entre si. Na região de compactação há interação entre as partículas; a porosidade varia ao longo da região e a pressão nos sólidos é fator determinante.

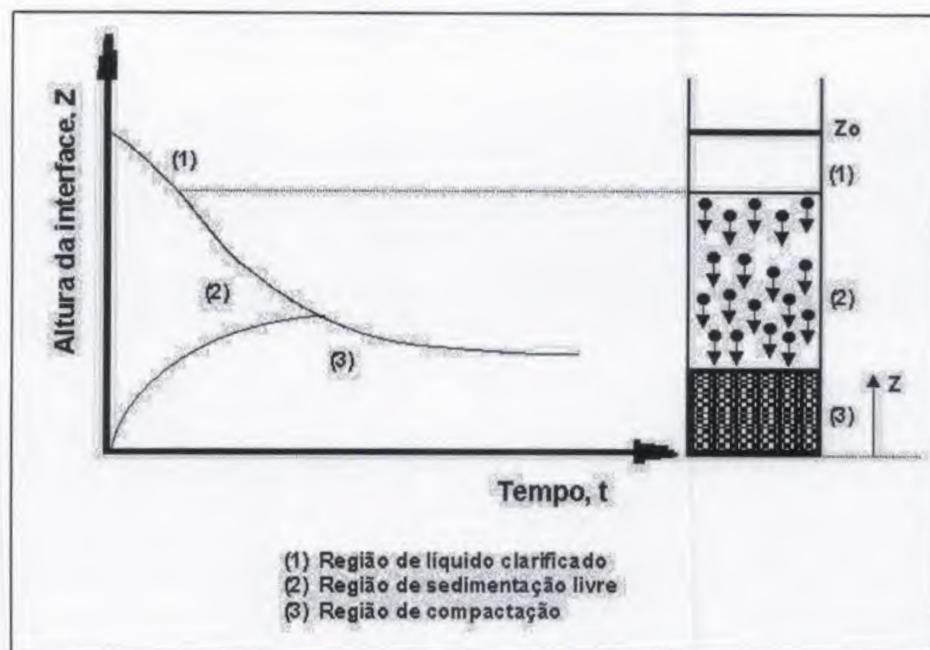


Figura 3.3 – Regiões observadas no teste de sedimentação em batelada

Os fatores mais importantes que exercem influência sobre o perfil de sedimentação das suspensões são (OSBORNE, 1981):

- natureza das partículas: distribuição de tamanhos, densidade, diâmetro;
- concentração da suspensão;
- tipo de pré-tratamento: floculação, aquecimento, resfriamento;
- tipo de vaso: tamanho, forma, efeitos de parede.

CAPÍTULO 4

FLOTAÇÃO

4.1- O Processo de Flotação

A flotação é um processo de separação sólido-líquido onde os sólidos presentes na suspensão são recuperados pela adesão dos mesmos à bolhas de gás (geralmente ar). Ao contrário do que ocorre na sedimentação gravitacional, o agregado (definido como agregado bolha-partícula) possui densidade menor que a densidade da suspensão. Este agregado ascende na fase aquosa permitindo, assim, a separação do sólido.

Sua utilização teve início no século passado e possui aplicação clássica no beneficiamento de minérios. Neste caso, a recuperação de espécies sólidas existentes em suspensões não homogêneas é baseada nas diferentes capacidades das partículas em suspensão de se aderirem às bolhas, permitindo uma separação seletiva.

A formação do agregado está diretamente associada à hidrofobicidade da superfície e à probabilidade de contato bolha-partícula.

Com relação à hidrofobicidade, as partículas devem apresentar uma superfície ativa (apolar) para aderirem-se à superfície da bolha durante o tempo de contato com a fase gasosa. De acordo com GOCHIN (1981), um ângulo de contato superior a 30° é usualmente requerido para que a separação por flotação ocorra de forma eficiente (Figura 4.1).

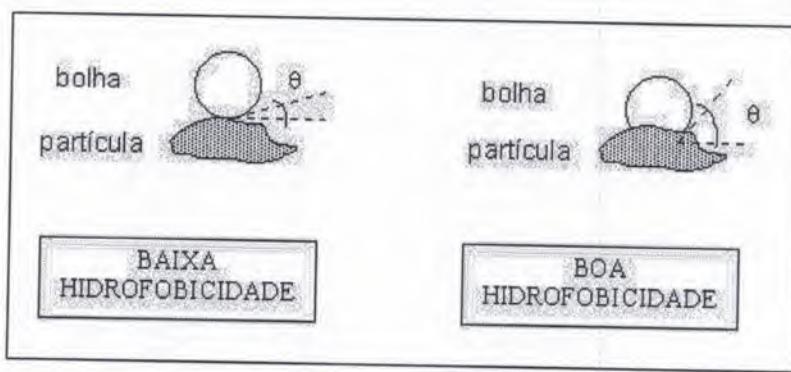


Figura 4.1 – Hidrofobicidade e ângulo de contato (GOCHIN, 1981)

Um dos enfoques para a formulação da taxa de flotação é baseado na analogia com a cinética das reações químicas, como veremos no Capítulo 6. De acordo com SANTOS (1996), a velocidade de remoção da espécie na suspensão também é dependente da concentração de partículas na alimentação, do tamanho das bolhas, das propriedades das partículas a serem flotadas (densidade, tamanho, hidrofobicidade), do tempo de contato bolha-partícula, das dimensões e da geometria do equipamento usado, do grau de turbulência da suspensão, bem como do condicionamento prévio da suspensão na presença de agentes químicos.

4.1.1- Reagentes de Flotação

A adição de agentes químicos apropriados à polpa de flotação pode induzir ou melhorar a separação seletiva das espécies. Estes reagentes são comumente classificados como segue:

a) Coletores

Os coletores são substâncias químicas utilizadas com o objetivo de provocar uma hidrofobização seletiva nas partículas presentes na polpa de flotação, possibilitando sua aderência às bolhas de ar e aumentando a eficiência de coleta (DUDENHOV et al., 1980).

Em praticamente todos os casos os coletores são substâncias orgânicas heteropolares, ou seja, substâncias que possuem moléculas contendo uma parte apolar e outra polar. A parte apolar é formada por um radical hidrocarboneto, enquanto que a parte polar da molécula pode reagir com a água. Uma molécula típica é o oleato de sódio, $C_{17}H_{33}COONa$ (Figura 4.2).

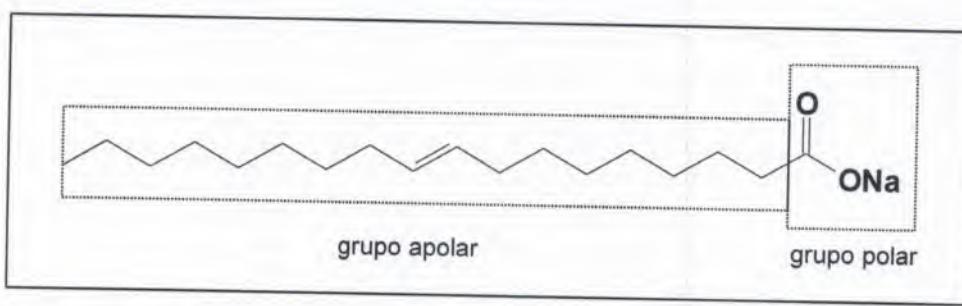


Figura 4.2 – Molécula do oleato de sódio e os grupos polar e apolar

Estas substâncias compreendem um grande grupo de reativos orgânicos, bastante diversos em sua composição e estrutura. Podem ser classificados de acordo com sua capacidade de dissociação em água, sendo divididos em não-iônicos (não ocorre dissociação) e iônicos (ocorre dissociação).

Os coletores iônicos são classificados de acordo com o grupamento ativo da molécula em relação à superfície da partícula, dividindo-se em aniónicos e catiônicos. Os primeiros produzem um grupamento negativamente carregado após dissociação (por exemplo, o oleato de sódio), sendo muito utilizados para a flotação de sulfetos, enquanto que os coletores catiônicos produzem grupamentos carregados positivamente, como as aminas. Estes são utilizados para a separação de partículas que possuem carga superficial negativa, como os silicatos e as células bacterianas.

b) Ativadores

Substâncias conhecidas como ativadores são adicionadas à polpa de flotação com o objetivo de propiciar uma melhor adsorção do coletor na superfície destas partículas.

c) Depressores ou Inibidores

Os depressores são substâncias que evitam a adsorção do coletor a determinada espécie, permitindo uma coleta seletiva. Formam um dos mais importantes grupos de compostos químicos usados na flotação de minérios. O emprego destes compostos é muito comum na flotação de sulfetos, principalmente quando se tem problemas com relação à seletividade ou se deseja separar vários minerais (BULATOVIC e WYSLOUZIL, 1995).

De acordo com DUDENHOV et al. (1980), os depressores podem ser divididos em quatro grupos: polímeros não iônicos (hidroxietilcelulose, álcool polivinílico), aniônicos (carboximetilcelulose, poliacrilatos), catiônicos (resinas de uréia-formaldeído) e anfóteros (caseína, etc.), sendo que estes últimos são pouco utilizados.

d) Reguladores

A eficiência da maioria dos processos de separação por flotação depende consideravelmente do pH da suspensão. Compostos que modulam o ambiente da flotação através da regulação do pH são denominados de reguladores. Podem ser classificados em inorgânicos (ácidos, bases, sais) ou orgânicos (polímeros não iônicos, aniônicos, catiônicos e anfóteros).

e) Espumantes

Os espumantes são substâncias tensoativas heteropolares que adsorvem na interface ar-água. Sua ação na fase líquida da polpa de flotação eleva a resistência mecânica das bolhas de ar, favorecendo a dispersão das bolhas e diminuindo a coalescência. Ocorre um aumento da superfície de aderência das partículas, permitindo a formação de uma espuma estável e consistente.

Podem ser classificados como ácidos (reativos fenólicos), atualmente pouco utilizados devido às exigências de ausência de fenóis em águas servidas, básicos e neutros (álcoois) (DUDENHOV et al., 1980).

f) Floculantes

Como já mencionado anteriormente, os agentes floculantes atuam na aglomeração das partículas, possibilitando a formação de agregados mais suscetíveis a serem separados por flotação.

Em geral, são substâncias de alto peso molecular sintéticas ou naturais. Podem ser divididos em quatro grupos: compostos inorgânicos ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , FeSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), substâncias de baixo e médio peso molecular, substâncias de alto peso molecular (polissacarídeos) e floculantes sintéticos (poliacrilato de sódio, poliacrilamida, etc.) (DUDENHOV et al., 1980).

A seguir, serão discutidos os dois sistemas de flotação utilizados no presente trabalho: flotação em célula mecânica convencional e em coluna.

4.2- Célula Mecânica Convencional e Coluna de Flotação

A utilização de células mecânicas convencionais possui mais de um século de existência (PITTA, 2001). Nestes equipamentos as bolhas são geradas por agitação mecânica combinada com injeção de ar, permitindo a introdução de grande quantidade de ar ao sistema. No entanto, as bolhas geradas são maiores do que as partículas ou agregados a serem flotados. De acordo com IVES 1982), em geral as bolhas geradas são maiores que 1mm.

Segundo GOCHIN (1981), a cinética de remoção das espécies pode ser melhorada pelo aumento da hidrofobicidade das partículas ou pelo aumento da turbulência da suspensão, a qual ocasiona uma maior freqüência de colisão bolha-partícula. Espumantes também podem ser utilizados para promover bolhas de menores tamanhos e uma espuma mais estável.

A célula de flotação em coluna surgiu pela primeira vez em 1962, no Canadá (WHEELER, 1988), visando sua aplicação na flotação do minério de ferro pela companhia canadense "Iron Ore Company of Canada". O desenvolvimento deste equipamento possibilitou, em 1981, a instalação da primeira coluna de flotação industrial no estágio secundário (limpeza) de molibdênio em Les Mines Gaspé, na província de Quebec, Canadá. Esta coluna substituiu treze estágios secundários de células mecânicas convencionais, com uma maior recuperação do mineral. Em 1990, foi instalada, nos Estados Unidos, a primeira planta industrial, totalmente baseada em colunas, para a flotação do fosfato (SANTOS, 1996).

As células mecânicas convencionais e as colunas de flotação diferem na forma de contactar as fases. Nas primeiras, a agitação provocada por um rotor é responsável pela suspensão das partículas e sua conseqüente colisão com as bolhas. Nas colunas de flotação, a suspensão escoa em contracorrente com as bolhas de ar, proporcionando um contato eficiente bolha-partícula.

A Figura 4.3 ilustra uma célula de flotação em coluna. Como pode ser notado, a coluna pode ser dividida em duas regiões principais: a de coleta e a de limpeza. A região de coleta representa a região compreendida entre o ponto de injeção de ar e o ponto de alimentação da suspensão. Nesta região, as partículas descendentes na suspensão entram em contato direto com as bolhas ascendentes. Se o tempo de contato for suficiente para que ocorra a adesão das partículas hidrofóbicas à superfície da bolha, tem-se a formação do agregado bolha-partícula, responsável pela separação das espécies.

A região de limpeza está compreendida entre o ponto de alimentação e a adição da água de lavagem. Nesta região, as partículas não flotáveis que foram arrastadas pelas bolhas são forçadas a retornar à região de coleta, sob a ação da água de lavagem. O fluxo da água de lavagem também força a suspensão alimentada a se mover descendente, evitando a contaminação do produto concentrado no topo da coluna (SANTOS, 1996).

O sistema de injeção de ar deve assegurar a distribuição homogênea das bolhas no interior da coluna e um tamanho de bolha uniforme, de forma a garantir as condições de estabilidade requeridas no processo. Usualmente, são utilizados dispersores internos, onde o ar atravessa um meio poroso.

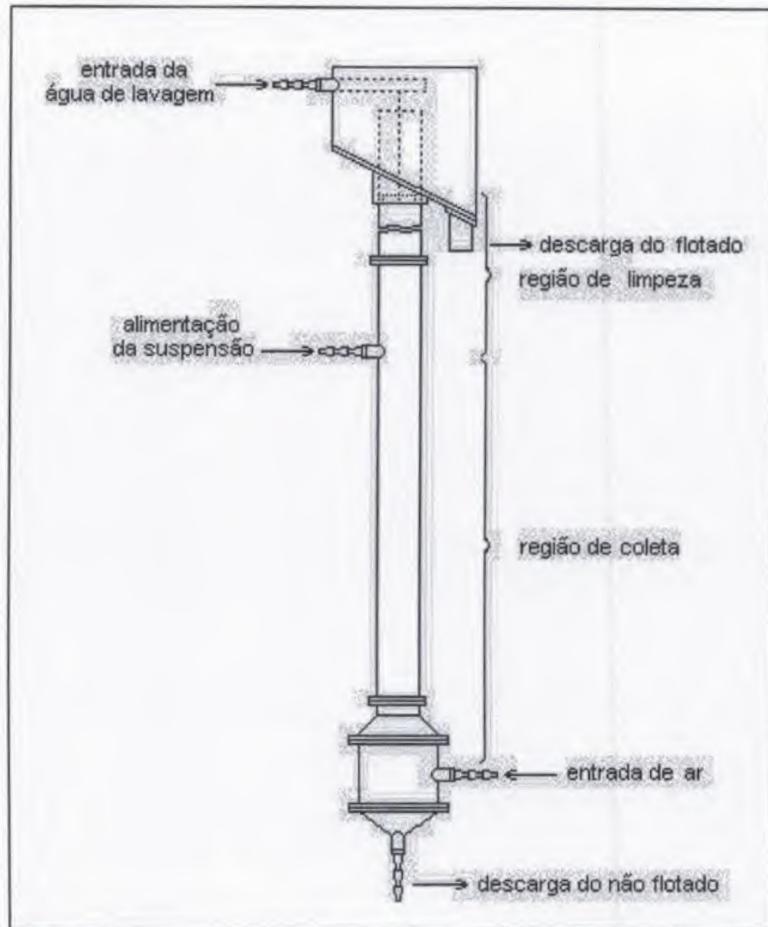


Figura 4.3 – Representação esquemática de uma coluna de flotação

A utilização de colunas de flotação tem se intensificado ao longo dos anos, especialmente devido a uma série de vantagens destas em relação às células mecânicas convencionais:

- (i) uma das principais vantagens está relacionada com a forma de contato entre as fases: nas colunas de flotação, a suspensão escoa em contracorrente com as bolhas de ar, proporcionando um contato mais eficiente entre as bolhas e as partículas;
- (ii) a adição de água de lavagem no topo da coluna possibilita o arraste das partículas hidrofílicas para o fundo, aumentando o teor do material flotado no produto de topo;
- (iii) aumento na eficiência de remoção das espécies, especialmente devido a um melhor controle do tamanho das bolhas;
- (iv) maior facilidade de controle da operação, possibilitando a automação do processo;
- (v) capazes de flotar partículas menores (como por exemplo, microrganismos) pela formação de bolhas de menores tamanhos;
- (vi) menores custos de investimento e de operação;
- (vii) maior capacidade de processamento por área instalada.

4.3- Aplicações

Atualmente, a flotação tem sido utilizada para a recuperação de uma grande variedade de materiais em suspensão, sejam eles de natureza mineral ou orgânica. Por exemplo, podem ser citados os processos industriais relacionados com os processamentos de alimentos e de papel, visando a remoção de óleos, gorduras, fibras e tintas.

Recentemente, têm sido desenvolvidas novas técnicas para a recuperação de minérios for flotação, incluindo-se a utilização de agentes biológicos, sendo esta técnica denominada de bioprocessamento mineral.

De acordo com SOMASUNDARANA et al. (1998), estes processos possibilitam a concentração de minérios que não são facilmente recuperados através dos procedimentos convencionais, além de reduzirem os custos de operação. Baseiam-se na adesão de microrganismos à superfície das partículas, alterando a hidrofobicidade de diversos minerais. Trata-se de uma tecnologia bastante atrativa, visto que os microrganismos ou os produtos por eles excretados não são tóxicos ao meio ambiente.

Segundo MESQUITA et al. (2002), microrganismos e/ou seus produtos metabólicos podem modificar a superfície mineral por dois mecanismos: direto e

indireto. O mecanismo direto envolve a adesão direta das células às partículas minerais, enquanto que no mecanismo indireto a alteração das propriedades de superfície ocorre através de substâncias produzidas pelo metabolismo celular.

MISRA et al. (1996) estudaram a utilização de *Thiobacillus thiooxidans* para a recuperação da pirita, que se torna hidrofílica após a adsorção da bactéria, podendo ser separada do carvão, enquanto que SANTHIYA et al. (2000) relataram a utilização desta mesma bactéria na flotação da galena.

A remoção de íons adsorvidos a microrganismos também tem sido investigada por diversos autores. SHARMA et al. (1991) propuseram a separação de zinco por adsorção à bactéria *Thiobacillus thiooxidans*, enquanto que a remoção de chumbo por *Streptomyces pilosus* foi estudada por SADOWSKI et al. (1991).

Diversos trabalhos vem sendo desenvolvidos pelo Laboratório de Sistemas Particulados da COPPE/UFRJ visando à separação de efluentes líquidos por flotação. MELO (2002) investigou a utilização da flotação para o tratamento de água oleosa, enquanto que PUGET et al. (2000) estudaram a recuperação de zircônio utilizando alamina como agente extrator.

PUGET et al. (2001) estudaram o tratamento de efluente lácteo nas condições de ponto isoelétrico utilizando uma coluna e um tanque de flotação, sendo obtida uma eficiência de remoção de partículas da ordem de 90% para a operação contínua nos dois sistemas estudados.

Recentemente, COUTO (2003) avaliou a utilização da flotação por ar dissolvido no tratamento de dois tipos de efluentes: um da industria láctea e um efluente oleoso. Experimentos em operação contínua realizados em um tanque de flotação revelaram uma eficiência de separação de partículas na ordem de 90%, utilizando uma pressão de saturação do ar de 4 atm.

4.3.1- Flotação de Microrganismos

No campo da biotecnologia, a flotação encontra inúmeras aplicações. É utilizada no tratamento de águas residuárias, na separação de proteínas, separação de células vegetais e de microrganismos.

A Tabela 4.1 mostra alguns exemplos de separação de proteínas por flotação.

CHEEN et al. (1998) estudaram a remoção da alga *Scenedesmus quadricauda* por flotação em coluna. Os autores utilizaram três tipos de coletores (catiônico, aniônico e não-iônico), verificando que o maior índice de recuperação (90%) foi obtido com o coletor catiônico.

Tabela 4.1 – Exemplos de separação de moléculas orgânicas dissolvidas por flotação

Aplicação	Referência
Recuperação de catalases	BOISMENU et al. (1990)
Recuperação de α -amilase	MIRANDA e BERGLUND (1993)
Recuperação de albumina de soro bovino	SANTANA (1994)

Um dos primeiros trabalhos que relatam a possibilidade da utilização da flotação para a recuperação de células microbianas foi realizado por DOGNON e DUMONTET (1941), que estudaram a separação de *Mycobacterium tuberculosis*.

Alguns autores tem estudado a aplicação deste processo para a separação de leveduras. NUNOKAWA et al. (1971), investigando a flotação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que a condição de pH 3 favorecia a recuperação das células.

BAHR et al. (1991) estudaram a separação da levedura *Hansenula polymorpha* por flotação em coluna sob diferentes condições de cultivo. Os autores verificaram que o processo de recuperação das células era influenciado pela liberação de proteínas extracelulares (glicoproteínas) durante a fermentação, sendo uma função do tipo de meio de cultivo empregado.

A utilização da flotação para a recuperação de biomassa é baseada na tendência natural das células microbianas, incluindo as bactérias, de se aderirem às bolhas de ar durante os processos fermentativos submersos e aerados. A formação natural de espumas é muito comum nestes processos, seja devido à presença de proteínas na composição original dos meios de cultura ou originadas do metabolismo ou lise celular, seja pela produção de substâncias surfactantes durante a fermentação.

O emprego deste processo na recuperação de esporos do gênero *Bacillus* constitui uma alternativa promissora para a obtenção de concentrados bioativos, especialmente considerando a natureza hidrofóbica destas células, como discutido no Capítulo 3.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a utilização da floculação/sedimentação e da flotação para a separação de biomassa ativa de *Bacillus sphaericus* 2362 e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, bactérias de importância comprovada como agentes larvicidas.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Produção de *Bacillus sphaericus* 2362 e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* através de processo fermentativo em batelada, avaliando-se os parâmetros cinéticos das fermentações em meios de cultivo límpidos e em meios contendo sólidos em suspensão;
- Determinação da distribuição de tamanhos das partículas nos caldos fermentados;
- Determinação da concentração ótima de agentes floculantes sobre a floculação/sedimentação das biomassas;
- Avaliação do efeito do pH sobre a floculação/sedimentação das biomassas;
- Caracterização das suspensões floculentas;
- Experimentos de sedimentação em batelada, avaliando-se o efeito do pH, adição de agentes floculantes e concentração inicial de células sobre a sedimentação;
- Utilização da flotação em célula mecânica convencional e da flotação em coluna para obtenção de concentrados bioativos de *Bacillus sphaericus* 2362;

- Avaliação da atividade biológica em laboratório dos materiais concentrados obtidos por floculação/sedimentação;
- Desenvolvimento de uma formulação sólida à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*;
- Avaliação da atividade biológica da formulação desenvolvida em testes de campo simulado e em campo real.

CAPÍTULO 6

MATERIAL E MÉTODOS

Material

6.1- Microrganismos

Foram utilizadas as bactérias inseticidas *Bacillus sphaericus* 2362 e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14, cedidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os microrganismos foram obtidos do Institut Pasteur, na França, através do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ).

6.2- Meios de Cultivo

6.2.1- Meios para Fermentação de *Bacillus sphaericus*

a) Meio MBS

Meio de cultura utilizado para a produção de *B. sphaericus* e proposto por KALFON (1983). Sua composição é apresentada na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Composição do meio MBS

Componente	Quantidade (g)
Peptona de caseína	10,0
Extrato de levedura	1,0
KH_2PO_4	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Água	1.000mL
	pH 7,2

b) Meio MBS-6

Meio de cultura atualmente utilizado pela Empresa Pernambucana de Pesquisa em Agropecuária (IPA - Instituto de Pesquisa em Agropecuária de Pernambuco) para a produção de *B. sphaericus*. Trata-se de um meio que apresenta sólidos em suspensão, formulado com produtos industriais como leite desnatado e milhocina, um subproduto da indústria de refinação do milho também denominada de “água de maceração do milho”, visando-se redução de custos para produção em larga escala. A Tabela 6.2 mostra a composição deste meio.

Tabela 6.2 – Composição do meio MBS-6

Componente	Quantidade (g)
Leite desnatado	20,0
Milhocina	25,0
KH_2PO_4	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Água	1.000mL
	pH 7,2

6.2.2- Meios para Fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

a) Meio UG

Meio de cultura utilizado para a produção de *B. thuringiensis israelensis* (THIERY e FRACHON, 1997). Sua composição é apresentada na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Composição do meio UG

Componente	Quantidade (g)
Peptona de carne	7,5
KH ₂ PO ₄	6,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,123
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0017
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,014
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,02
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,147
Glicose	10,0
Água	1.000mL
	pH 7,4

b) Meio MBti-Glicose

Foi proposta a formulação de um meio a baixo custo, a base de milhocina e glicose, para a produção de *B. thuringiensis israelensis* em larga escala. A Tabela 6.4 mostra a sua composição.

Durante a preparação dos meios de cultura, os componentes CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O e glicose eram adicionados assepticamente após a esterilização dos meios nos frascos dos inóculos e nas cubas de fermentação. Os meios eram preparados com água de torneira.

Tabela 6.4 – Composição do meio MBti-Glicose

Componente	Quantidade (g)
Milhocina	25,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
CaCO ₃	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Glicose	10,0
Água	1.000mL
	pH 7,4

6.2.3- Meios para Controle de Qualidade dos Fermentados e Formulados

a) Meio Ágar Nutriente (AN)

Este meio foi empregado visando-se isolar colônias das bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* para verificar a pureza dos caldos fermentados e formulados, como também no procedimento de contagem de esporos viáveis. Sua composição é apresentada na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 – Composição do meio Ágar Nutriente (AN)

Componente	Quantidade (g)
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne	5,0
Ágar	20,0
Água destilada	1.000mL
	pH 7,0

b) Meio Sabouraud com Cloranfenicol

Este meio foi utilizado para pesquisar possíveis contaminações por fungos e leveduras (Tabela 6.6). A presença do antibiótico de amplo-espectro cloranfenicol inibe a presença da bactérias, sendo adicionado assepticamente após a esterilização do meio a uma concentração de 100mg/L.

As amostras eram inoculadas na forma de estrias sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio, e incubadas a 30°C durante 48h.

Tabela 6.6 – Composição do meio Sabouraud com Cloranfenicol

Componente	Quantidade (g)
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0
Glicose ou maltose	20,0
Ágar	20,0
Água destilada	1.000mL
	pH 5,6

c) Caldo Verde Brilhante (CVB)

Este meio foi utilizado para realização do teste presuntivo para coliformes (Tabela 6.7). Em um tubo de ensaio estéril contendo o meio de cultivo e um tubo de Durham, o material a ser testado era inoculado com duas alçadas e incubado a 35°C ± 0,5°C por 24 a 48h. A presença de gás retido no tubo de Durham indica a presença de bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais.

Tabela 6.7 – Composição do meio Caldo Verde Brilhante (CVB)

Componente	Quantidade (g)
Peptona	10,0
Lactose	10,0
Bile de boi	20,0
Verde brilhante	0,0133
Água destilada	1.000mL
	pH 7,2

d) Meio Eosina Azul de Metileno (EMB)

Este meio foi utilizado com o objetivo de verificar possíveis contaminações por bactérias Gram-negativas e diferenciar o aparecimento de colônias do tipo coliforme. Estas apresentam uma característica morfológica típica, com colônias com centro escuro e brilho metálico. Sua composição é apresentada na Tabela 6.8.

Os corantes eosina amarela e azul de metileno (0,4 e 0,065g para cada litro de meio, respectivamente) foram adicionados assepticamente ao meio fundido, após a esterilização.

Tabela 6.8 – Composição do meio Eosina Azul de Metileno (EMB)

Componente	Quantidade (g)
Peptona de carne	10,0
Lactose	10,0
K ₂ HPO ₄	2,0
Ágar	20,0
Água destilada	1.000mL
	pH 7,1

e) Meio Caldo Asparagina

Meio cuja composição encontra-se na Tabela 6.9, sendo utilizado para o teste presuntivo de *Pseudomonas aeruginosa*. Uma alçada da amostra a ser analisada era inoculada em tubo de ensaio contendo o meio e incubada durante 48h a 35°C. A turvação do meio indica a presença de contaminação.

Tabela 6.9 – Composição do meio Caldo Asparagina

Componente	Quantidade (g)
Asparagina	4,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Glicerol	16ml
Água destilada	1.000mL
	pH 7,1-7,2

f) Meio Caldo Acetamida

Em caso de crescimento em meio asparagina, a amostra era inoculada em meio acetamida, seguindo-se o mesmo procedimento anterior, para confirmar a presença de *Pseudomonas aeruginosa*. Sua composição é apresentada na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 – Composição do meio Caldo Acetamida

Componente	Quantidade (g)
Acetamida	10,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,39
KH ₂ PO ₄	0,73
Vermelho de fenol	0,012
Água destilada	1.000mL
	pH 7,1-7,2

g) Meio Específico para *Staphylococcus aureus*

Este meio foi utilizado para detectar eventual contaminação por *Staphylococcus aureus*. O mesmo era desidratado, sendo apenas necessária sua reidratação (149g de meio desidratado/1L de água destilada) e esterilização (*Staphylococcus* medium 110-DIFCO). Foram feitas semeaduras por estrias na superfície do meio, distribuído em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante 48h.

6.3- Larvas

Foram utilizadas larvas de *Culex quinquefasciatus* e de *Aedes aegypti* jovens do 4º estádio de desenvolvimento, com idade entre 4 e 6 dias, para os ensaios de atividade biológica das bactérias *B. sphaericus* 2362 e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, respectivamente. Larvas de 1º estádio foram empregadas nos ensaios biológicos de persistência.

6.4- Equipamentos

Bomba peristáltica modelo 302S (Watson Marlow)
Agitador vórtex modelo MA 162 (Marconi)
Agitador magnético modelo 258 (Fanem)
Banho termostático modelo CT 248 (Cientec)
Centrífuga Ecco-Superior-II-B
Centrífuga Excelsa Baby modelo 1 206/1 (Fanem)
Contador de colônias modelo EC 5504 (Phoenix)
Espectrofotômetro spectro UV-VIS RS (Labomed)
Autoclave vertical modelo 105 (Soc. Fabbe Ltda)
Autoclave vertical (Ibacli S.A.)
Estufa de esterilização modelo 306/4 (Tonini)
Estufas de incubação 30°C e 35°C modelo 002CB (Fanem Ltda)
Estufas de secagem modelos 330 e 315/2 (Fanem)
Estufa de secagem modelo M4 030 (Marconi)
Fermentador FS-614 (New Brunswick Scientific Company)
Compressor de ar modelo WT-10/200 (Wetzel)
Bomba à vácuo modelo 141 tipo 2VC (Primar)
Microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss)
Mesa agitadora
Cabine de fluxo laminar modelo FLV (Trox)
Potenciômetro pH - Meter modelo E350B (Metrohm rterisau)
Balança semi-analítica modelo Bel Mark 220 (Bel Engineering)
Balança analítica modelo SBA 31 (Scaltec)
Máquina Compressora modelo 3145 (Neuberger Ind. Com. Ltda)
Rotâmetro
Jar test modelo JT-103 (Milan)
Moinho Pulverisette 14-Fritsch
Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001
Coluna de flotação em vidro
Célula de flotação mecânica Outokumpu

Métodos

6.5- Manutenção dos Microrganismos

As culturas foram mantidas sob a forma de esporos sobre a superfície de discos de papel de filtro. Estes foram impregnados com alíquotas de 20 μ L das suspensões bacterianas, que continham concentrações de 1,7x10⁶ e 6,4x10⁷ esporos/mL para *B. thuringiensis* var. *israelensis* e *B. sphaericus*, respectivamente. Os discos foram secados em estufa a 35°C ± 1°C durante 24h e então conservados sob refrigeração a 5°C ± 1°C.

6.6- Fermentações

6.6.1- Preparação dos Inóculos

Os inóculos foram preparados partindo-se de um disco de papel impregnado com as culturas esporuladas. Foram utilizados frascos de Fernbach contendo 250mL de meio, e os cultivos realizados durante 12 a 15h, sob agitação de 200rpm, a 30°C ± 1°C. Utilizou-se como inóculo 5% (v/v) do volume inicial de fermentação.

6.6.2- Descrição do Biorreatore

As biomassas bacterianas foram produzidas no Conjunto de Fermentação New Brunswick Company FS-614, ilustrado na Figura 6.1. O equipamento acondicionava 6 cubas de fermentação com capacidade nominal de 14L.

O ar, proveniente de um compressor de ar comprimido, passava por um filtro de lã de vidro antes de entrar no biorreatore, e a aeração era controlada através de um rotâmetro. A distribuição do ar era realizada através de um dispersor de ar do tipo placa sinterizada, localizado no fundo do recipiente.

A agitação era controlada e os agitadores eram do tipo turbina de quatro lâminas planas. Em cada cuba foram instaladas duas turbinas, a primeira fixada 1cm após o dispersor de ar e a segunda a uma distância da primeira turbina de 12cm.

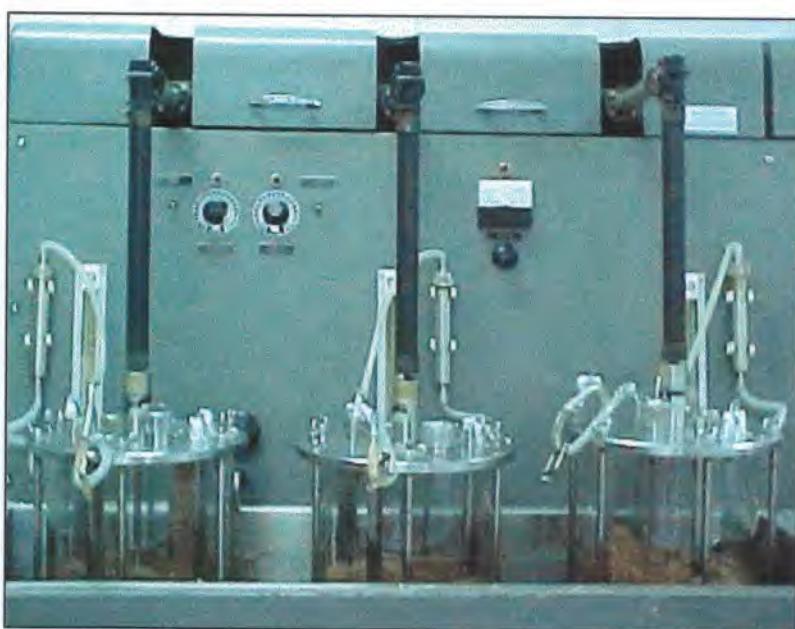


Figura 6.1 – Conjunto de fermentação utilizado para a produção de biomassa

A temperatura era controlada por um banho termostático. As amostras eram recolhidas assepticamente através de pressurização do biorreatore. A Figura 6.2 ilustra o diagrama de linha do sistema utilizado e a Figura 6.3 mostra detalhes da geometria do biorreatore.

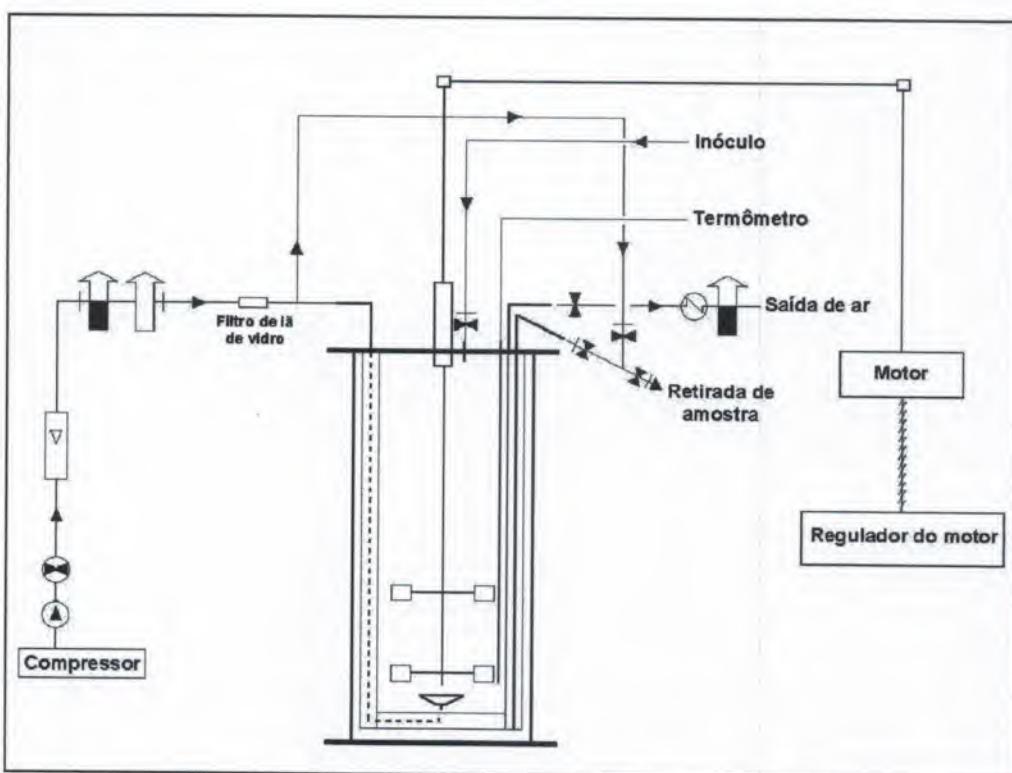


Figura 6.2 – Diagrama de linha do sistema de fermentação

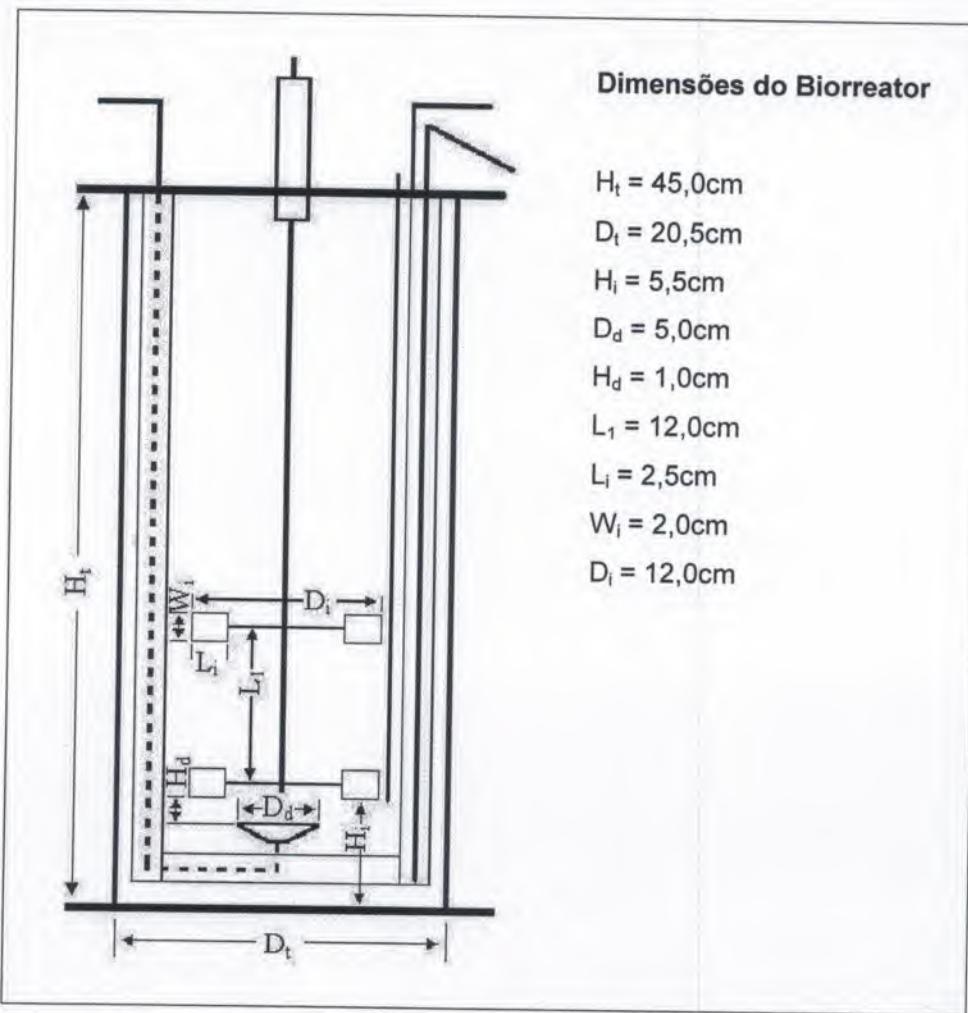


Figura 6.3 – Geometria do biorreator

6.6.3- Produção de Biomassa

As bactérias foram produzidas em biorreatador operando em batelada. As fermentações foram realizadas com 10L de volume útil, sob agitação de 200rpm, aeração de 1vvm, a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os tempos de cultivo foram de 48h para *B. sphaericus* e 72h para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, utilizando-se os meios de produção descritos anteriormente. Amostras foram retiradas ao longo do tempo para determinação da concentração celular, concentração de esporos viáveis, pH e concentração de glicose durante as fermentações.

A Figura 6.4 ilustra o processo fermentativo utilizado para a produção de biomassa das bactérias inseticidas.

Um volume de aproximadamente 10mL de um antiespumante à base de polímero de éter glicol (Prevol AE-19, Hoechst) era adicionado durante a inoculação do biorreator.

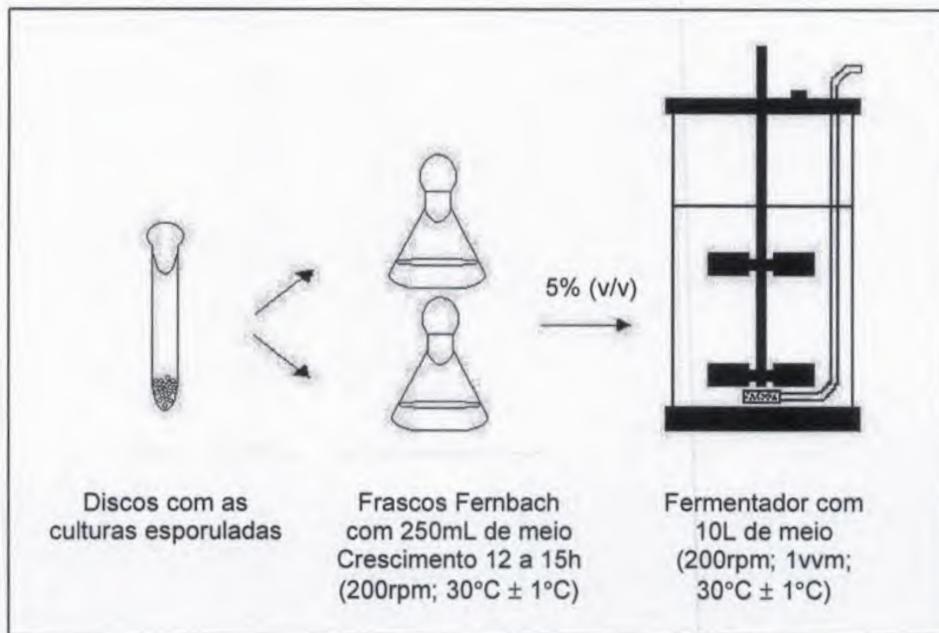


Figura 6.4 – Esquema do processo fermentativo das bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*

6.6.4- Determinação dos Parâmetros Cinéticos das Fermentações

De acordo com SOUSA (1998), considerando um biorreator perfeitamente agitado operando em batelada (volume de meio no biorreator constante), o balanço de material com relação à concentração de células é dado por:

$$\left(\begin{array}{l} \text{Taxa de acúmulo de massa} \\ \text{de células no biorreator} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{Taxa de massa de células que} \\ \text{se reproduz no biorreator} \end{array} \right)$$

Dessa forma, a taxa específica de crescimento celular durante a fase exponencial pode ser expressa a partir da Equação 6.1 (BAILEY e OLLIS, 1986):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \times X \quad (6.1)$$

onde:

X – concentração celular [M L⁻³]

μ – taxa específica de crescimento celular [T⁻¹]

Integrando a equação 6.1 no intervalo de t_1 a t_2 resulta na Equação 6.2:

$$\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right) = \mu \times (t_2 - t_1) \quad (6.2)$$

O balanço de material com relação à utilização do substrato é dado por:

$$\begin{aligned} \left(\begin{array}{l} \text{Taxa de acúmulo} \\ \text{de substrato} \\ \text{dentro do} \\ \text{biorreator} \end{array} \right) &= \left(\begin{array}{l} \text{Taxa de consumo} \\ \text{de substrato para} \\ \text{a produção de} \\ \text{células} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{l} \text{Taxa de consumo} \\ \text{de substrato para} \\ \text{a formação do} \\ \text{produto} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{l} \text{Taxa de consumo} \\ \text{de substrato para} \\ \text{a manutenção} \\ \text{das células} \end{array} \right) \\ -\frac{dS}{dt} &= -\mu \times \left(\frac{X}{Y_{X/S}} \right) - q_P \times \left(\frac{X}{Y_{P/S}} \right) - m \times X \end{aligned} \quad (6.3)$$

Rearranjando a Equação 6.3, obtém-se:

$$-\frac{1}{X} \times \left(\frac{dS}{dt} \right) = q_S = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} - \frac{q_P}{Y_{P/S}} - m \quad (6.4)$$

onde:

S – concentração de substrato [M L⁻³]

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células em relação à concentração máxima de células [M M⁻¹]

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto em relação à concentração máxima de produto [M M⁻¹]

q_S – taxa específica de consumo de substrato [T⁻¹]

q_P – taxa específica de formação do produto [T⁻¹]

m – coeficiente específico de manutenção celular [T⁻¹]

Segundo AIBA et al. (1973), supondo desprezível o consumo de substrato para a manutenção das células, o fator de conversão $Y_{X/S}$, que expressa a quantidade de substrato consumida para produzir células, é dado pela Equação 6.5:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_i - X_o)}{(S_o - S_i)} \quad (6.5)$$

onde:

X_i – concentração celular no tempo $t = t_i$ [M L⁻³]

X_o – concentração celular no tempo $t = 0$ [M L⁻³]

S_i – concentração do substrato no tempo $t = t_i$ [M L⁻³]

S_o – concentração do substrato no tempo $t = 0$ [M L⁻³]

Considerando que o substrato é convertido apenas em biomassa ($q_P = 0$; $m = 0$), a taxa específica de consumo de substrato (q_S) é dada pela Equação 6.6:

$$q_S = -\frac{1}{X} \times \left(\frac{dS}{dt} \right) = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (6.6)$$

6.7- Esterilização de Materiais

Os procedimentos de esterilização dos meios de cultura e materiais utilizados dependiam da natureza e volume dos mesmos. A Tabela 6.11 ilustra os métodos e as condições de esterilização empregadas.

Tabela 6.11 – Métodos e condições de esterilização para os materiais utilizados

Material	Método de esterilização	Condições
Frascos Erlenmeyer, balões, pipetas, placas e outras vidrarias	Calor seco em estufa	180°C – 1h30min
Filtros de ar contendo lã de vidro	Calor seco em estufa	180°C – 1h30min
Frascos até 2L contendo meio de cultivo e soluções	Calor úmido em autoclave	121°C – 20min
Tubos de ensaio com água	Calor úmido em autoclave	121°C – 20min
Biorreatador com capacidade de 14L contendo 10L de meio de cultivo e conexões	Calor úmido em autoclave	121°C – 45min
Mangueiras de silicone	Calor úmido em autoclave	121°C – 20min
Ponteiras	Calor úmido em autoclave	121°C – 20min

6.8- Concentração Ótima de Agente Floculante

A concentração ótima dos agentes floculantes foi determinada através do “teste de jarro”, muito utilizado em estações de tratamento de água para determinação das condições ótimas de agitação, teor de floculante e tempo de sedimentação dos flocos de uma suspensão. O equipamento utilizado foi o Jar Test (Milan JT103), que opera com 6 cubas (dimensões 19 x 11,7 x 11,7cm) com volume útil de 2L e controle de tempo e agitação (Figura 6.5).

Foram testadas as seguintes substâncias: NaCl, CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃, tanino (Tanfloc SG) e uma poliacrilamida catiônica (Polyfloc CP1600P) sobre a floculação e a eficiência de recuperação dos sólidos em suspensão.



Figura 6.5 – Teste de jarro com o caldo fermentado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose utilizando Al₂(SO₄)₃ como agente floculante

As suspensões eram colocadas nas cubas e submetidas à agitação de 90rpm; posteriormente, volumes distintos das soluções floculantes eram adicionados de forma concomitante, de modo a serem obtidas concentrações variáveis das substâncias em estudo. O volume total nas cubas era mantido em 2L.

Após agitação das suspensões a 90rpm durante 5min para a completa mistura do floculante, estas eram agitadas a 40rpm durante 10min para a formação dos flocos. Em seguida, as suspensões eram mantidas em repouso para observação visual da melhor condição de sedimentação dos flocos e da qualidade do clarificado.

O teste de jarro com ajuste de pH era realizado em duas etapas: primeiramente, adicionava-se um volume correspondente a 1.980mL do caldo fermentado em uma cuba teste e, com uma solução de HCl a 50% (v/v), mediam-se os

volumes de ácido necessários para que o pH da suspensão assumisse valores de 3,0 a 7,0. Em seguida o teste de jarro era iniciado, adicionando-se em cada cuba os volumes de ácido estabelecidos anteriormente. Neste caso, os volumes de HCl geralmente variavam entre 6 e 20mL, de forma que o volume final das suspensões nas cubas ficavam entre 1986mL e 2.000mL. Entretanto, esta pequena variação de volume não influenciava de forma significativa a concentração final de sólidos. O procedimento de agitação era o mesmo descrito anteriormente.

Considerando que a concentração de sólidos é um dos parâmetros que interfere nos resultados de flocação, esta era mantida em torno dos valores de concentração ao final das fermentações ($3,0 \pm 0,5\text{g/L}$ para os caldos fermentados produzidos com os meios límpidos MBS e UG e $4,5 \pm 0,5\text{g/L}$ para os fermentados produzidos com os meios industriais MBS-6 e MBti-Glicose).

Para determinação da eficiência de recuperação, amostras eram retiradas no início do processo de agitação e após a altura das interfaces terem atingido o ponto de amostragem, estabelecido a uma altura de 3cm do fundo da cuba, correspondente a 20% da altura da suspensão. Os experimentos foram realizados em duplicata.

O percentual de recuperação de sólidos foi calculado pela Equação 6.7:

$$R(\%) = \left(\frac{C_T - C_S}{C_T} \right) \times 100 \quad (6.7)$$

onde:

$R (\%)$ – percentual de recuperação dos sólidos na sedimentação [-]

C_T – concentração total de sólidos na suspensão antes da sedimentação [M L^{-3}]

C_S – concentração de sólidos no sobrenadante [M L^{-3}]

6.9- Caracterização das Suspensões Floculentas

6.9.1- Densidade Média dos Flocos e Fração Volumétrica de Fluido

A densidade média dos flocos foi determinada através da técnica de centrifugação, como descrita por FRANÇA (2000).

Primeiramente, pesava-se um tubo de centrífuga vazio, e em seguida com 10mL da amostra. Esta era então centrifugada de forma a se obter uma fase floculada sem sinais de compactação, sendo lidos os volumes de flocos centrifugado (V_f) e de

fluido sobrenadante (V_{sob}). A massa do sobrenadante era determinada considerando sua densidade equivalente a 1g/cm^3 , e a massa dos flocos calculada por diferença. Com o volume V_t , calculava-se a densidade média dos flocos (ρ_f).

A Tabela 6.12 mostra as condições de rotação e tempo de centrifugação utilizadas para as suspensões floculentas estudadas. Os valores foram determinados de acordo com a observação visual dos flocos, de forma a se obter um sedimento não compactado.

Esta técnica também permite a determinação da fração volumétrica de fluido, através da Equação 6.8:

$$\varepsilon_f = \frac{V_{sob}}{V_t} \quad (6.8)$$

onde:

ε_f – fração volumétrica de fluido [-]

V_{sob} – volume de fluido sobrenadante [L^3]

V_t – volume total de suspensão no tubo de ensaio [L^3]

Tabela 6.12 – Condições de centrifugação das suspensões

Microrganismo	Meio de Cultura	Floculante	Rotação (rpm)	Tempo (min)
<i>B. sphaericus</i>	MBS		250	5
	MBS-6	CaCl ₂ .2H ₂ O	250	5
	MBS		360	2
	MBS-6	FeCl ₃ .6H ₂ O	250	5
	MBS		360	2
	MBS-6	Al ₂ (SO ₄) ₃	250	5
	MBS		360	5
	MBS-6	tanino	250	5
	MBS		250	5
	MBS-6	pH 3,0	250	5
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	UG			
	MBti-Glicose	CaCl ₂ .2H ₂ O	250	5
	UG			
	MBti-Glicose	FeCl ₃ .6H ₂ O	250	5
	UG			
	MBti-Glicose	Al ₂ (SO ₄) ₃	250	5
	UG			
	MBti-Glicose	tanino	250	5
	UG			
	MBti-Glicose	pH 3,0	250	5

6.9.2- Diâmetro Médio dos Flocos

Testes preliminares realizados no equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001 demonstraram que a agitação necessária à análise provocava uma quebra dos flocos. Dessa forma, o diâmetro médio dos flocos (D_f) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por MASSARANI (2002), a partir da Equação (6.9):

$$k = k(\varepsilon_f) = \frac{D_f^2 \varepsilon_f^3}{36\beta(1 - \varepsilon_f)^2} \quad (6.9)$$

onde k é a permeabilidade do meio, calculada pela Equação (6.10):

$$k(\varepsilon_f) = \frac{\mu_f v_s}{(1 - \varepsilon_f)(\rho_f - \rho_f)g} \quad (6.10)$$

e β é um parâmetro que depende da porosidade para sistemas particulados expandidos, calculado através das Equações 6.11 e 6.12:

$$\beta = 0,60 \frac{(\varepsilon_f^{-1,94})}{1 - \varepsilon_f}, \quad 0,5 < \varepsilon_f \leq 0,9 \quad (6.11)$$

$$\beta = \frac{\varepsilon_f^2}{2(1 - \varepsilon_f)(4,8\varepsilon_f - 3,8)}, \quad 0,9 < \varepsilon_f < 1 \quad (6.12)$$

onde:

μ_f – viscosidade do fluido [$M L^{-1} T^{-1}$]

v_s – velocidade de sedimentação calculada à taxa constante [$L T^{-1}$]

ρ_f – densidade do flocos [$M L^{-3}$]

ρ_f – densidade do fluido [$M L^{-3}$]

g – aceleração gravitacional [$L T^{-2}$]

6.10- Testes de Sedimentação

Os caldos fermentados eram transferidos para proveta de 1000mL de capacidade e as soluções floculantes adicionadas de forma a serem obtidas suspensões com as concentrações ótimas de flocação já determinadas nos testes de jarro. Em seguida, a biomassa floculante era separada por decantação e o sobrenadante retirado.

Os flocos eram transferidos para proveta de 500mL de capacidade (diâmetro 5,4cm e altura 36,2cm) e, após ressuspensão em água destilada até uma altura correspondente a 30cm, a proveta era agitada cuidadosamente. Para a obtenção de suspensões à diferentes concentrações de sólidos, diferentes volumes dos flocos eram adicionados nas provetas. A substituição do sobrenadante por água teve como objetivo facilitar a observação da sedimentação dos flocos.

Os testes de sedimentação foram realizados em batelada segundo a metodologia de KYNCH (1952), através da observação do deslocamento da altura do leito de células em função do tempo.

As velocidades máximas de sedimentação foram calculadas através da inclinação da seção linear das curvas de sedimentação, e o percentual de recuperação dos sólidos foi determinado pela Equação 6.7. A concentração total de sólidos na suspensão (C_T) era determinada através de amostragem antes das sedimentações, enquanto que a concentração de sólidos no sobrenadante (C_S) pela retirada de amostras quando o leito atingia 20% da altura total, ou no final das sedimentações para o caso das suspensões mais concentradas.

Após sedimentação das suspensões, os sobrenadantes eram retirados através de uma bomba peristáltica e os sedimentos floculados eram centrifugados a 5.000rpm durante 30min. Amostras dos flocos foram separadas para os testes de atividade biológica.

Para a obtenção dos pós ativos, as biomassas centrifugadas eram espalhadas em bandejas de vidro previamente esterilizadas com álcool a 70% (v/v) e, em seguida, o material era colocado para secar em estufa com circulação interna de ar a 35°C. posteriormente, os pós eram triturados em almofariz e testados quanto à sua atividade larvicida.

6.11- Testes de Flotação

6.11.1- Flotação em Coluna

A coluna de flotação utilizada foi projetada no Laboratório de Sistemas Particulados do PEQ/COPPE e construída em vidro, podendo operar continuamente ou em batelada. As Figuras 6.6 e 6.7 mostram a coluna utilizada e suas dimensões, respectivamente.



Figura 6.6 – Coluna de flotação

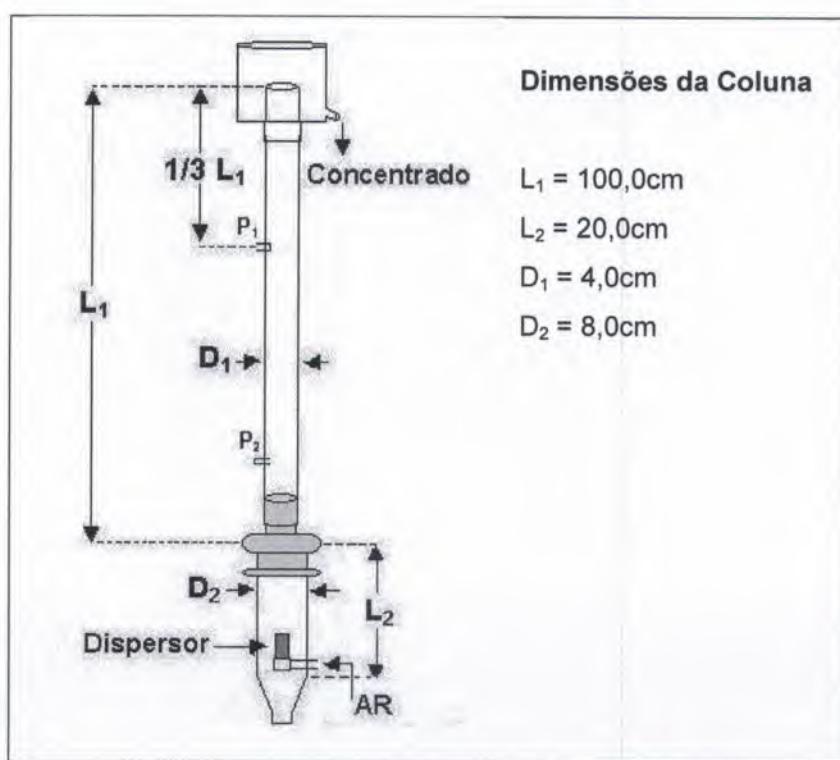


Figura 6.7 – Dimensões da coluna de flotação

Os experimentos de flotação em coluna foram realizados em batelada com o caldo fermentado de *B. sphaericus* obtido com cultivo em meio MBS. A flotação com o meio MBS-6 não foi possível devido à grande quantidade de sólidos em suspensão, os quais sedimentavam rapidamente no fundo do equipamento.

Após injeção de ar, a coluna era carregada pela parte superior até um volume correspondente a 1,9L. A vazão de ar era ajustada e amostras eram recolhidas ao longo do tempo no ponto de amostragem P_2 para determinação da concentração de esporos.

A eficiência da flotação foi avaliada através do fator de concentração residual de esporos que permanecia na coluna durante a flotação, determinado pela relação X_R/X_{0E} , onde X_R é a concentração de esporos no líquido residual e X_{0E} é a concentração de esporos na amostra a flotar.

6.11.2- Flotação em Célula Mecânica Convencional

Os ensaios de flotação em célula mecânica convencional foram realizados com a bactéria *B. sphaericus* cultivada em meio MBS-6. Foi utilizada uma célula de flotação mecânica (Outokumpu) com cuba de 2L de capacidade, esquematizada na Figura 6.8. O equipamento possui entrada simultânea de ar e água no eixo de agitação e rotor.

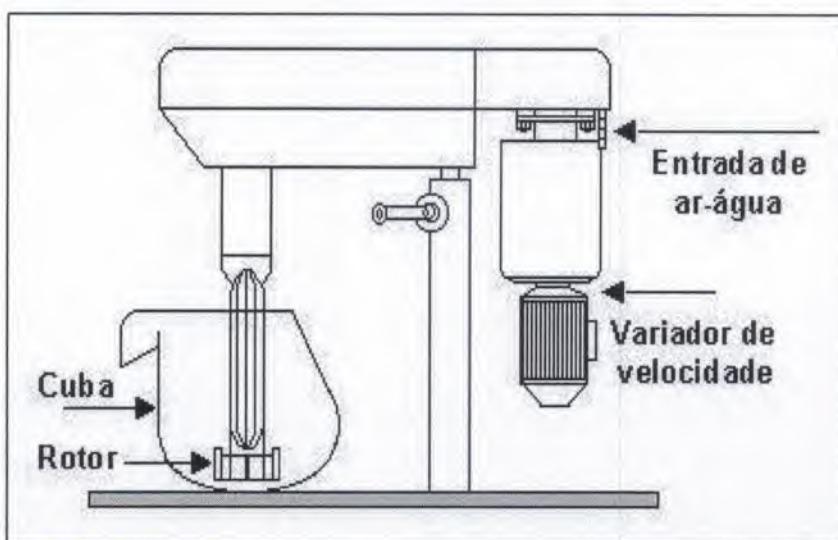


Figura 6.8 – Célula de flotação mecânica

Foram avaliadas a influência da agitação, adição de um coletor catiônico (amina comercial Flotigam 3135B), adição de espumante (tween) e do pH sobre o percentual de recuperação e o fator de concentração de esporos. Os tempos de condicionamento dos reagentes foram de 3min para o coletor e de 1min para o espumante, sob agitação de 640rpm. Foi estabelecido um tempo de flotação de 20min, sendo retiradas amostras no líquido residual que permanecia na cuba ao longo da flotação para determinação da cinética de remoção dos esporos. A espuma era arrastada através de palhetas a cada 15 segundos, sendo recebida em bandejas.

A concentração de esporos na espuma flotada (X_F) foi determinada a partir da Equação 6.13:

$$X_F = \frac{(V_0 \times X_{0E}) - (V_R \times X_R)}{(V_0 - V_R)} \quad (6.13)$$

onde:

V_0 – volume inicial posto a flotar [L³]

X_{0E} – concentração de esporos na amostra a flotar [UFC L⁻³]

V_R - volume do líquido residual após a flotação [L³]

X_R - concentração de esporos no líquido residual de flotação [UFC L⁻³]

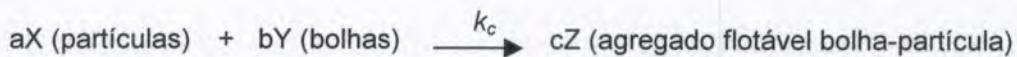
Com o valor de X_F , foram calculados o percentual de recuperação e o fator de concentração dos esporos, %Rec e FC, respectivamente, como mostram as Equações 6.14 e 6.15:

$$\% \text{Rec} = \left[\frac{(V_0 - V_R) \times X_F}{(V_0 \times X_{0E})} \right] \times 100 \quad (6.14)$$

$$FC = \frac{X_F}{X_{0E}} \quad (6.15)$$

6.11.3- Determinação da Cinética de Flotação

Uma das abordagens mais simples e utilizadas na literatura com relação à determinação da cinética de flotação baseia-se na analogia com a cinética das reações químicas, na qual as partículas são “consumidas” pelas bolhas de ar, formando como produto um agregado flotável bolha-partícula que é retirado do sistema. Desta forma, podemos descrever a flotação de acordo com a seguinte reação:



Para uma reação de ordem desconhecida (n), a taxa de remoção das partículas é dada pela Equação 6.16:

$$\frac{dC}{dt} = -k_c \cdot C^n \quad (6.16)$$

onde:

k_c – constante cinética [T⁻¹]

C - concentração de sólidos [M L⁻³]

De acordo com GOCHIN (1981), a taxa global de remoção das espécies sólidas da fase contínua pelas bolhas de ar pode ser representada por uma reação química de primeira ordem ($n = 1$). Esta hipótese é válida considerando constante a taxa de alimentação de ar (concentração de bolhas constante) e desprezando a variação do volume da mistura devido à remoção dos sólidos.

Desta forma, considerando uma cinética de remoção de primeira ordem, a determinação experimental da constante cinética k para um processo de flotação em batelada é obtida através da integração no tempo da Equação 6.16, resultando na Equação 6.17:

$$-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = k_C \times t \quad (6.17)$$

onde C_0 é a concentração de partículas no início do processo.

6.12- Desenvolvimento da Formulação em Comprimidos

Foi desenvolvida uma formulação em comprimidos à base da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo utilizados nos testes de campo simulado, ensaios de persistência, testes de estabilidade e testes de campo.

O caldo fermentado foi floculado com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na concentração ótima determinada no teste de jarro (2.500ppm) e, após sedimentação da biomassa, o pó ativo foi obtido através do procedimento descrito no item 6.10.

O pó ativo era retirado das bandejas com o auxílio de uma espátula e submetido à moagem. Em seguida, o pó era peneirado em peneira de 100 mesh e estocado em dessecador a temperatura ambiente.

Foi proposta uma formulação em comprimido contendo 63,65% (w/w) de princípio ativo. Alguns excipientes foram adicionados para conferir características de fluidez ao pó, e de carga, dureza, desagregação e brilho aos comprimidos.

Os comprimidos foram estocados em frascos de penicilina devidamente lacrados contendo 10 comprimidos por frasco para os testes de estabilidade tóxica, enquanto que os demais reservados para os ensaios de teste de campo simulado e teste de campo. A condição de estocagem foi a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor.

6.13- Determinações Analíticas

6.13.1- Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada por gravimetria, sendo expressa como massa de material seco por unidade de volume. Após retirada de 10mL da amostra, esta era filtrada em membrana de nitrato de celulose MFS (porosidade 0,45µm; diâmetro 47mm) e lavada duas vezes com água destilada, utilizando-se um conjunto de filtração Millipore acoplado a uma bomba de vácuo. Após filtração, a membrana era colocada em estufa a 105°C durante 4h e posteriormente em dessecador para ser resfriada e, em seguida, pesada. A pesagem era realizada em intervalos de 2h até obtenção de peso constante.

De acordo com COONEY (1981), as técnicas de determinação da concentração celular, incluindo a filtração e a centrifugação, possuem algumas limitações. A operação de lavagem é capaz de remover apenas os materiais solúveis de baixo peso molecular (que podem representar cerca de 5 a 10% da massa celular). Portanto, os resultados obtidos por estas técnicas incluem, além dos materiais insolúveis presentes no caldo fermentado, o teor de células mortas e o material celular formado e perdido por lise.

Outra limitação é que a secagem em temperaturas entre 40 a 80°C ou entre 100 a 105°C pode ser insuficiente ou levar à carbonização e volatilização de alguns materiais celulares, respectivamente. Segundo o autor, os resultados obtidos podem diferir da concentração real de células em valores da ordem de 30%; entretanto, estas técnicas ainda são as mais adequadas e mais comumente utilizadas para se determinar a concentração de células em uma suspensão.

Para os caldos fermentados produzidos a partir dos meios de cultivo límpidos (MBS e UG), os resultados foram expressos em termos de biomassa, enquanto que para os meios de cultivo contendo sólidos em suspensão (MBS-6 e MBti-Glicose), os resultados foram expressos como sólidos totais, como mostra a Equação 6.18:

$$X \text{ ou } ST = \frac{(M_2 - M_1)}{V_a} \quad (6.18)$$

onde:

X ou ST – concentração de células ou de sólidos totais [$M L^{-3}$]

M_2 – massa da membrana + massa do material celular seco [M]

M_1 – massa da membrana [M]

V_a – volume da amostra a ser filtrada [L³]

6.13.2- Determinação da Concentração de Esporos Viáveis

As concentrações de esporos foram determinadas por contagem de colônias crescidas sobre a superfície de placas de Petri contendo meio agar nutritivo. A amostra era diluída em 10 vezes e submetida a choque térmico a 80°C durante 12min para eliminação das células vegetativas. Após diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo água estéril, os microrganismos eram distribuídos nas placas através de 5 semeaduras de volume conhecido (10µL ou 5µL) por placa e incubados a 30°C durante 20 a 22h. As colônias eram contadas e os resultados tratados estatisticamente através do programa DIFMED, sendo expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

Esta metodologia também foi empregada para a avaliação da viabilidade dos esporos nas amostras floculadas e na presença do coletor utilizado nos ensaios de flotação em célula mecânica. Estes testes foram realizados imediatamente após a floculação e após 24h de permanência dos flocos em geladeira.

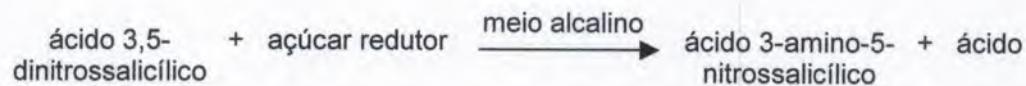
6.13.3- Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente por potenciometria após coleta das amostras do biorreator.

6.13.4- Dosagem de Glicose

O consumo de glicose durante o crescimento da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* foi determinado através do método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNSA), como descrito por MILLER (1959).

O método é baseado na reação de oxi-redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico, que em meio alcalino é reduzido para o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que o açúcar redutor é oxidado a um grupamento carboxila. O esquema da reação é mostrado como segue:



Aliquotas da amostra eram completadas para o volume de 0,75mL com água destilada, adicionando-se, em seguida, 0,5mL do reagente DNSA. A mistura era homogeneizada e aquecida por 5min em banho de água a 100°C. Após resfriamento imediato em banho de gelo, o volume era completado para 12,5mL e a amostra homogeneizada. A leitura espectrofotométrica era realizada a 540nm, tendo o ensaio em branco como referência (água destilada).

A faixa de sensibilidade do método é de 1 a 20 μ moles de glicose (0,18 a 3,6mg de glicose). Para determinação da melhor faixa de trabalho (mais linear) e para o cálculo da concentração de glicose da amostra, foi preparada uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de glicose de concentração conhecida (1,8 mg/mL). A curva é mostrada na Figura 6.9.

A correlação linear obtida é dada pela Equação 6.19:

$$ABSg = 0,0213 + 0,6659 \times G \quad (6.19)$$

$$R = 0,99624$$

onde:

$ABSg$ – absorbância da amostra a 540nm [-]

G – concentração de açúcares redutores expressa em termos de glicose [M L⁻³]

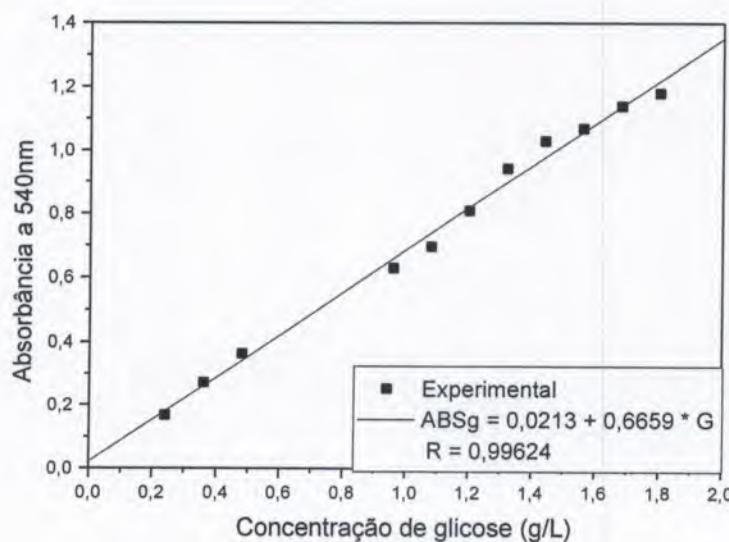


Figura 6.9 – Curva de calibração de glicose

6.13.5- Determinação da Distribuição de Tamanhos dos Microrganismos

A distribuição de tamanhos dos microrganismos foi realizada através de análise no equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultra-som. O equipamento utiliza como princípio o espalhamento de luz para determinação da distribuição de partículas na faixa de diâmetro entre 0,05 e 550 μm .

6.13.6- Observações Microscópicas

A morfologia celular era observada em microscópio de contraste de fase por meio de preparações a fresco.

6.13.7- Atividade Biológica

a) Atividade Biológica em Laboratório

A atividade biológica foi determinada nas seguintes fases do processo de produção: caldo fermentado, biomassa floculenta concentrada e pó ativo. Os testes foram realizados pelo Serviço de Referência para controle de culicídeos vetores do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-FUNASA.

Os bioensaios foram conduzidos contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e de *Aedes aegypti* utilizando-se *B. sphaericus* 2362 e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, respectivamente. Grupos homogêneos de larvas jovens do 4º estádio de desenvolvimento (L4), com idade entre 4 e 6 dias, foram selecionados para os bioensaios.

Os testes foram realizados de acordo com os protocolos da Organização Mundial de Saúde (de BARJAC e LARGET-THIÉRY, 1984). O parâmetro utilizado para quantificar a resposta de mortalidade dos indivíduos expostos à bactérias entomopatógenas é a concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos da população testada (CL_{50}).

Os valores de CL_{50} encontrados nos testes de atividade biológica de um produto são usados para o cálculo de sua potência, convencionalmente expressa em Unidades Tóxicas Internacionais (UTI/mg), como mostra a Equação 6.20:

$$\text{Potência amostra} = \frac{\text{potência padrão} \times CL_{50} \text{ padrão}}{CL_{50} \text{ amostra}} \quad (6.20)$$

A Tabela 6.13 mostra os valores de potência e CL₅₀ das linhagens padrão de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Tabela 6.13 – Linhagens padrão das bactérias *B. sphaericus*
e *B. thuringiensis* var. *israelensis*

Bactéria	Cepa padrão	Potência (UTI/mg) ⁽¹⁾	(CL ₅₀ ⁽²⁾ ± DP ⁽³⁾) (ppm)	População de referência ⁽⁴⁾
<i>B. sphaericus</i>	SPH88	1.700	0,0097 ± 0,0135	<i>Culex quinquefasciatus</i> CqSL
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	IPS82	15.000	0,023 ± 0,002	<i>Aedes aegypti</i> Recife-LAB

⁽¹⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

⁽²⁾ Concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos expostos

⁽³⁾ Desvio padrão

⁽⁴⁾ Dipteros culicídeos

As amostras-teste eram submetidas a duas modalidades de bioensaios: 1) bioensaio exploratório, que consistia na exposição de larvas a concentrações 2, 4 e 10 vezes maiores que uma concentração pré-estabelecida, cujo objetivo era de determinar o valor inferior e superior de um intervalo de concentrações; 2) bioensaio completo, que consistia na exposição de larvas a um intervalo composto por no mínimo cinco concentrações que promovessem mortalidades variando entre 10% a 99%, cujo objetivo era determinar a CL₅₀. Cada concentração foi testada em duplícata ou triplicata de 20 larvas. A CL₅₀ foi calculada através de uma regressão linear log-Probit.

A mortalidade era avaliada após 48h de exposição para *B. sphaericus* e 24h de exposição para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, tempo requerido para a expressão máxima de toxicidade das bactérias. Os ensaios eram realizados nas condições de 28°C ± 1°C e a 70% ± 10% de umidade relativa.

Caso ocorresse uma mortalidade entre 5 a 10% do grupo controle, era necessária a correção da mortalidade do grupo tratado através da fórmula de ABBOT, descrita pela Equação 6.21. Testes com a mortalidade do grupo controle superior a 10% foram desconsiderados.

$$M_C = \frac{(M_T - M_{CT})}{(100 - M_{CT})} \times 100 \quad (6.21)$$

onde:

M_C – percentual de mortalidade corrigida do grupo tratado [-]

M_T – percentual de mortalidade do grupo tratado [-]

M_{CT} – percentual de mortalidade do grupo controle [-]

b) Atividade Larvicida em Teste Sob Condições Simuladas de Campo (TCS)

Após a determinação da bioatividade dos pós ativos pertencentes aos lotes de produção *Bti* 11/11/02 e *Bti* 23/12/02, estes foram formulados em comprimidos para serem testados em condições simuladas de campo. Estes testes foram realizados com o objetivo de definir a melhor dose do comprimido e sua freqüência de reaplicação.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Eficácia inicial: determinada pela mortalidade larval após 24h da aplicação do produto no recipiente-teste. Para esta avaliação eram utilizados grupos de 50 L4 jovens de *Aedes aegypti*.
- Persistência: determinada pela mortalidade larval maior que 50% ao longo do tempo. Para a avaliação deste parâmetro, eram realizadas introduções semanais de 50 L1 de *Aedes aegypti*. Os testes de persistência foram realizados em recipientes plásticos opacos (baldes) com capacidade para 60 ou 100L (Figura 6.10B). Os recipientes foram mantidos em casa de vegetação ao longo dos experimentos (Figura 6.10A).

O produto foi testado nas seguintes doses: 1 comprimido para 30, 50 ou 100L de água de poço.

Após determinação da melhor dose, foi realizada uma bateria de testes para avaliar a atividade larvicida residual em função da reposição de 20% do volume de água tratada, a cada 2 dias. Estes testes foram realizados em recipientes com dispositivo para escoamento de água (Figura 6.10C) com o objetivo de simular as condições de utilização sistemática de água semelhante ao verificado em reservatórios de uso doméstico. A dose testada foi de 1 comprimido para 50L de água.

A leitura de mortalidade era realizada a cada 7 dias, sendo feita a reposição de 50 L1/recipiente após este período. Em todos os testes era preparado o grupo controle, sem adição do larvícida.



Figura 6.10 – Testes de campo simulado. (A) Casa de vegetação onde os experimentos foram realizados; (B) Recipientes plásticos de 100L; (C) Recipientes plásticos de 100L com abertura para o escoamento de água

c) Teste de Estabilidade

A formulação sólida de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Antilarv® Ci), lote *Bti* 23/12/02, foi submetida a teste de estabilidade da atividade tóxica, em amostras de 10 comprimidos, embaladas separadamente. A eficácia inicial de controle era avaliada contra L4 e os testes foram realizados em intervalos mensais irregulares por um período de 13 meses.

d) Atividade Larvicida em Campo

A formulação sólida em comprimido à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foi testada em área piloto do bairro de Nossa Senhora das Graças, localizado a 7Km da área urbana do município de Moreno-PE.

O produto foi avaliado em criadouros de campo e a dose adotada foi de 1 comprimido/50L, previamente definida nos testes de campo simulado.

Antes do primeiro tratamento, 50% dos imóveis da área foram inspecionados com o objetivo de detectar a presença de formas jovens do mosquito (larvas e pupas).

A infestação da área ao longo de tratamento foi monitorada através de armadilhas de oviposição (ovitrampas) do mosquito instaladas de forma fixa no peridomicílio de aproximadamente 40 residências. A presença e o quantitativo de ovos de *Aedes* spp. nas ovitrampas permitiram o cálculo do número médio de ovos coletados por armadilha por dia, usado para avaliar o impacto das ações de controle sobre a população alvo. As ovitrampas permaneceram instaladas em campo ao longo de três ciclos de tratamento, realizados com intervalo de 39 dias e 44 dias entre eles.

Simultaneamente, um teste preliminar foi realizado utilizando-se comprimidos contendo a décima parte de pó ativo em 15 armadilhas de oviposição contendo infusão de gramínea a 30%, por um período de até 40 dias, para avaliar a cobertura larvicida nas armadilhas.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, serão mostrados os resultados obtidos dos experimentos de produção de biomassa, avaliando-se o acompanhamento cinético das fermentações realizadas em modo descontínuo; em seguida, serão mostrados os resultados dos ensaios de floculação com os agentes floculantes estudados. Após seleção das concentrações ótimas dos floculantes, serão avaliados os resultados de caracterização das suspensões floculentas, através da determinação da densidade e diâmetro médio dos flocos, bem como a distribuição de tamanhos das partículas nos caldos fermentados. Posteriormente, serão mostrados os resultados dos experimentos de sedimentação em batelada e dos ensaios de flotação em célula mecânica convencional e em coluna. Por fim, serão mostrados os resultados de atividade biológica das amostras contra os insetos susceptíveis, em experimentos de laboratório e em ensaios em campo.

7.1- Acompanhamento Cinético das Fermentações

Com base nas informações descritas no Capítulo 6, os parâmetros cinéticos avaliados durante os experimentos de fermentação foram os seguintes:

μ – taxa específica de crescimento celular [T^{-1}]

Y_{XS} – fator de conversão de substrato em células em relação à concentração máxima de células ou de sólidos totais [$M M^{-1}$]

q_S – taxa específica de consumo de substrato [T^{-1}]

X_{MAX} ou ST_{MAX} – concentração máxima de células ou de sólidos totais [$M L^{-3}$]

T_{XMAX} ou T_{STMAX} – tempo para atingir X_{MAX} ou ST_{MAX} [T]

ΔS – diferença entre a concentração de substrato em T_{XMAX} e no início do cultivo [$M L^{-3}$]

E_{MAX} – concentração máxima de esporos viáveis [$UFC L^{-3}$]

T_{EMAX} – tempo para atingir E_{MAX} [T]

X_{FINAL} ou ST_{FINAL} (g/L) – concentração final de células ou de sólidos totais [$M L^{-3}$]

T_{FINAL} – tempo de final de fermentação [T]

7.1.1- Fermentação de *Bacillus sphaericus*

Para a avaliação da cinética de crescimento celular de *B. sphaericus*, foram utilizados dois meios de cultivo: o meio MBS, à base de peptona, extrato de levedura e sais minerais, e o meio MBS-6, à base de leite desnatado, milhocina e sais. A Figura 7.1 ilustra os meios MBS e MBS-6 utilizados para a produção de biomassa de *B. sphaericus*, podendo ser verificada a diferença de coloração e turbidez entre os mesmos.



Figura 7.1 – Cubas de fermentação contendo os meios de cultivo MBS (esquerda) e MBS-6 (direita)

A Figura 7.2 ilustra os resultados do acompanhamento cinético para a fermentação de *B. sphaericus* em meio MBS. Observou-se que a fase exponencial de crescimento ocorreu entre 4,5 e 7,0 horas de fermentação, a uma taxa específica de crescimento celular de $0,58\text{h}^{-1}$. A concentração máxima de células foi 2,70g/L após 15 horas, com a fase estacionária se estendendo até o final das 48 horas de processo fermentativo.

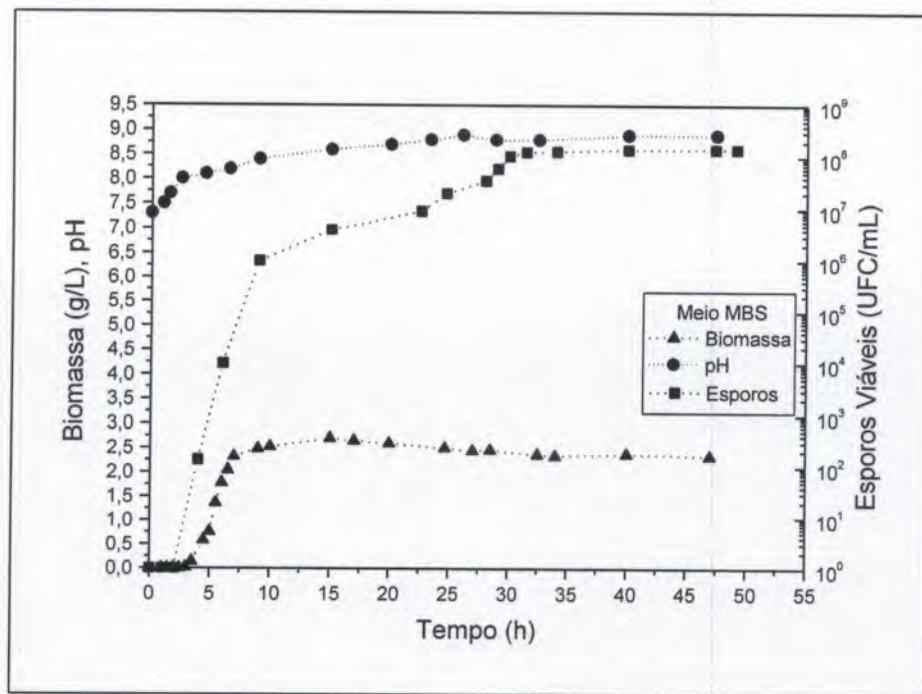


Figura 7.2 – Crescimento celular, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de *B. sphaericus* em meio MBS

A Figura 7.3 ilustra o cultivo de *B. sphaericus* em meio MBS após 48 horas de fermentação, mostrando a completa esporulação das células.

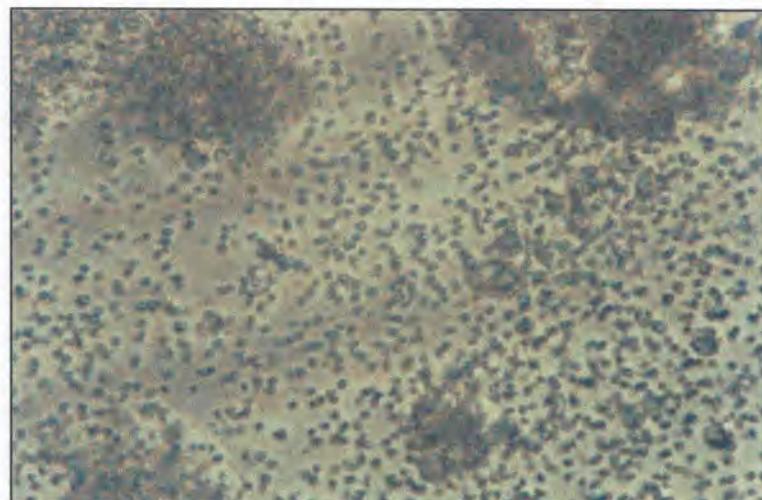


Figura 7.3 – Cultivo de *B. sphaericus* em meio MBS após 48 horas de fermentação
(aumento de 40 vezes)

A concentração máxima de esporos foi de $1,4 \times 10^8$ esporos/mL após 40 horas de fermentação. Os valores de pH ascendem desde 7,3 até 8,9, indicando um acúmulo de compostos protéicos provenientes da metabolização da fonte de nitrogênio e originados da lise celular.

Como pode ser observado na Figura 7.4, a máxima concentração de esporos para o cultivo em meio MBS-6 foi de $8,4 \times 10^9$ esporos/mL, obtida com 48 horas de fermentação. A presença de milhocina, um resíduo do processo de fabricação de farinha de milho, rico em fontes de nitrogênio e outros nutrientes, provavelmente induz à obtenção de uma maior concentração de esporos viáveis em relação ao cultivo da bactéria em meio MBS.

Assim como no caso anterior, o pH aumenta de forma gradual ao longo da fermentação, variando entre 7,2 e 8,9.

O teor máximo de sólidos totais foi de 5,2g/L para um tempo de fermentação de 10 horas, e após 48 horas de processo o valor observado foi de 4,8g/L. A concentração inicial de sólidos totais no meio de cultivo foi de 2,30g/L.

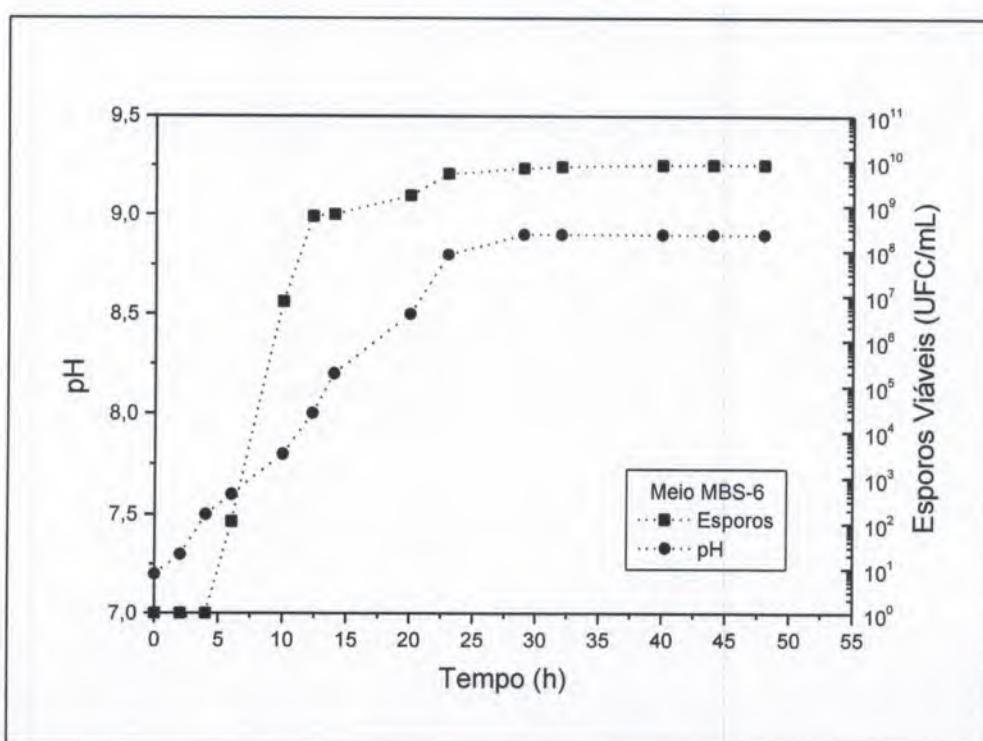


Figura 7.4 – Variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de *B. sphaericus* em meio MBS-6

A Tabela 7.1 ilustra os parâmetros cinéticos para as fermentações de *B. sphaericus* nos meios de cultivo MBS e MBS-6 obtidos neste trabalho, bem como alguns resultados observados por outros autores.

As variáveis $Y_{X/S}$, q_S e ΔS não foram determinadas para o cultivo em meio MBS devido à impossibilidade de realização de medidas de consumo de substrato.

A avaliação da curva de crescimento celular durante a fermentação em meio MBS-6 ficou comprometida em virtude da grande quantidade de sólidos em suspensão presentes neste meio de cultivo, o que promoveu grande variação nas medidas de concentração de sólidos totais. Dessa forma, não foi possível a determinação dos parâmetros μ , $Y_{X/S}$ e q_S . A variável ΔS também não foi avaliada.

Os resultados obtidos em meio MBS para a concentração máxima de células e esporos foram semelhantes aos observados por RIOS (1998), utilizando o mesmo meio de cultivo.

Em trabalho realizado por VILLELA et al. (1990), foi estudado o efeito da adição de glicerol ao meio de água de levedura. Comparando-se os meios com e sem adição desta

Tabela 7.1 – Parâmetros cinéticos obtidos para as fermentações de *B. sphaericus* nos meios de cultivo MBS e MBS-6 e em outros trabalhos

Parâmetro	Meio de Cultivo					
	MBS ⁽¹⁾	MBS-6 ⁽¹⁾	MBS ⁽²⁾	ALG7 ⁽³⁾	NYSM ⁽⁴⁾	AL ⁽⁴⁾
μ (h ⁻¹)	0,58	nc*				
$Y_{X/S}$ (g/g)	nc*	nc*				
q_s (h ⁻¹)	nc*	nc*				
X_{MAX} ou S_{TMAX} (g/L)	2,70	5,20	2,70	1,90	2,20	1,42
T_{XMAX} ou T_{STMAX} (h)	15,0	10,0	12,0			
ΔS (g/L)	nc*	nc*				
E_{MAX} (UFC/mL)	$1,4 \times 10^8$	$8,4 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$
T_{EMAX} (h)	40,0	48,0	48,0			
X_{FINAL} ou S_{TFINAL} (g/L)	2,33	4,80	1,83			
T_{FINAL} (h)	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0	48,0

⁽¹⁾ Este trabalho; ⁽²⁾ RIOS (1998); ⁽³⁾ VILLELA et al. (1990); ⁽⁴⁾ VILARINHOS et al. (1988)

*nc - não calculado

fonte de carbono, os melhores resultados de esporulação e atividade biológica foram observados no meio ALG7 (água de levedura, glicerol a 7g/L e sais minerais), sugerindo que o glicerol tem um efeito indutor sobre a formação de esporos e produção de toxinas em *B. sphaericus*. Contudo, a concentração máxima de esporos foi menor que a observada neste trabalho.

VILARINHOS et al. (1988), estudando o crescimento e esporulação de *B. sphaericus* em dois meios de cultivo, um à base de caldo nutritivo e extrato de levedura (NYSM) e outro à base de água de levedura (AL) em biorreatore de 14L contendo 10L de meio, obtiveram baixas concentrações celulares em ambos os casos. Entretanto, o teor máximo de esporos para o meio NYSM foi idêntico ao observado neste trabalho para o meio MBS. Além disso, apesar da menor concentração de esporos obtida para o cultivo em AL, os resultados de atividade biológica demonstraram uma toxicidade das células cultivadas neste meio duas vezes superior em relação ao meio NYSM.

Em se tratando da produção de larvicidas à base da bactéria *B. sphaericus*, o grande interesse é na maximização da concentração de esporos. Como dito anteriormente, a atividade tóxica às larvas de mosquitos susceptíveis está relacionada à presença do cristal

protéico, o qual se encontra associado ao esporo. No entanto, apesar do teor de esporos ser um bom indicativo da produção do biolarvíscida, é necessária a realização de ensaios de atividade biológica contra o inseto-alvo para comprovar a qualidade e eficiência do caldo fermentado.

7.1.2- Fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Os estudos cinéticos de crescimento celular de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foram realizados nos meios de cultivo UG, à base de peptona, glicose e sais minerais, e no meio MBti-Glicose, à base de milhocina, glicose e sais (Figura 7.5).



Figura 7.5 – Cubas de fermentação contendo os meios de cultivo UG (esquerda) e MBti-Glicose (direita)

A Figura 7.6 ilustra o acompanhamento cinético para a fermentação no meio de cultivo UG. A fase exponencial de crescimento celular ocorre até cerca de 4,5 horas de fermentação, a uma velocidade máxima correspondente a $0,35\text{h}^{-1}$. A partir deste período ocorre um crescimento mais lento, atingindo uma concentração máxima de células de 3,77g/L para um tempo de fermentação de 46 horas. Em seguida nota-se o início da fase estacionária, coincidente com o término do metabolismo do substrato.

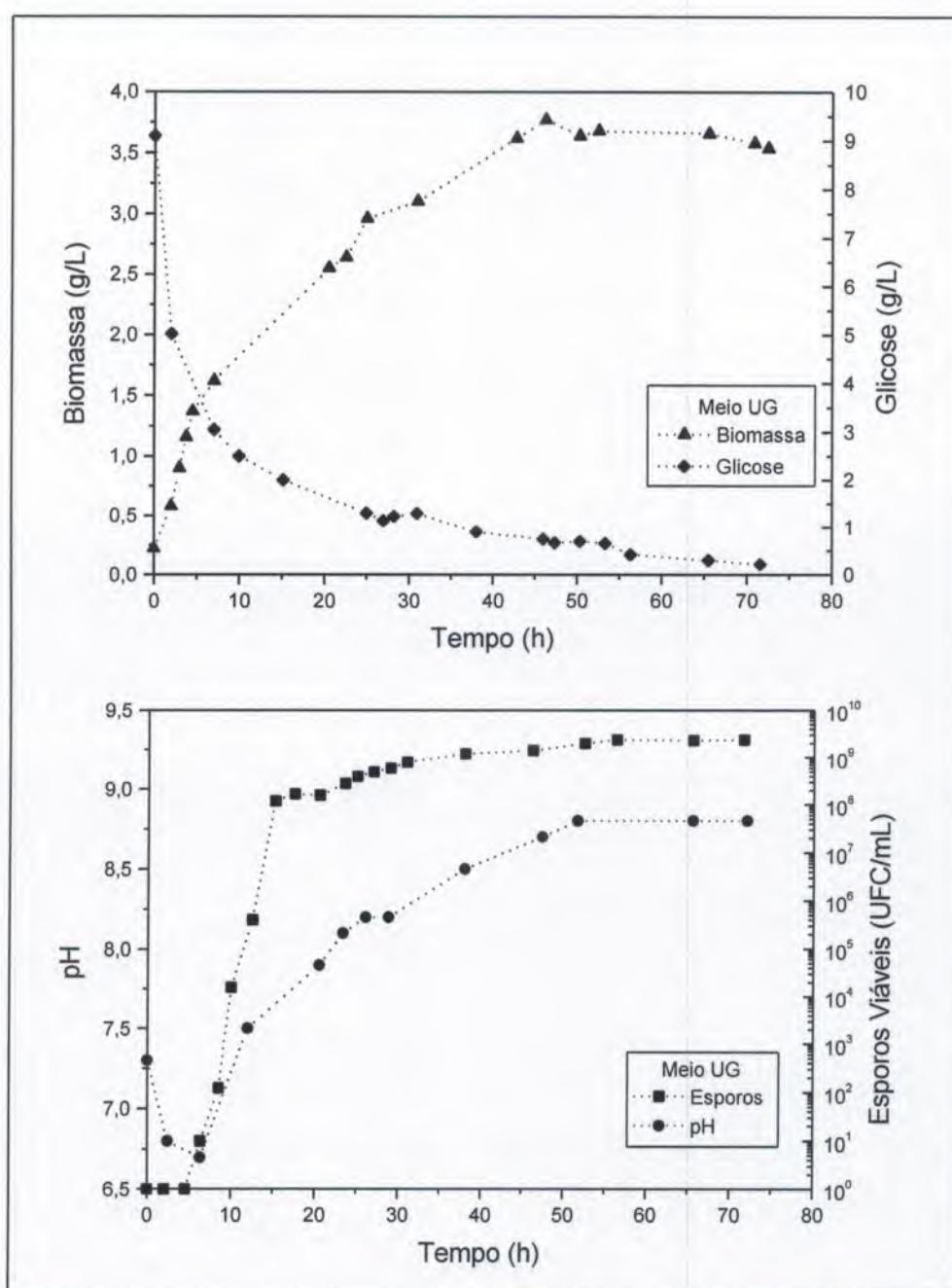


Figura 7.6 – Crescimento celular, consumo de glicose, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG

A esporulação é intensificada a partir das 10 primeiras horas de cultivo, quando cerca de 73% da fonte de carbono já havia sido consumida e a concentração de esporos era equivalente a $1,6 \times 10^4$ esporos/mL. A formação de esporos aumenta com o desaparecimento da glicose no meio fermentado, sendo obtida uma concentração máxima de $2,4 \times 10^9$ esporos/mL para um tempo de fermentação de 56 horas.

Como pode ser notado, os valores de pH decrescem nas primeiras 6 horas de cultivo, provavelmente pela liberação de ácidos orgânicos provenientes da intensa utilização de glicose neste período. Um posterior aumento do pH está relacionado ao processo de esporulação e lise celular, atingindo o valor de 8,8 a partir de 51 horas de fermentação.

Os resultados para a fermentação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* no meio MBti-Glicose são apresentados na Figura 7.7. Foi possível obter a curva de crescimento celular, pois este meio contém menores quantidades de sólidos em suspensão que o meio MBS-6. Entretanto, neste caso, a biomassa foi quantificada e expressa em termos de sólidos totais. A concentração inicial de sólidos totais neste meio foi de 0,50g/L.

A fase de crescimento exponencial é obtida entre 4,0 e 7,0 horas de fermentação, com uma taxa específica de crescimento celular igual ao experimento com o meio UG, de $0,35 \text{ h}^{-1}$. Um crescimento mais lento também foi observado após este período, com máxima concentração de sólidos totais de 5,04g/L para 47,6 horas de fermentação.

Comparando com o cultivo em meio UG, a fase de esporulação no meio MBti-Glicose é iniciada mais rapidamente. A partir de 9 horas de fermentação, cerca de 85% da glicose já estava exaurida, com uma concentração de esporos da ordem de $1,0 \times 10^5$ esporos/mL. Após 65 horas de processo é atingida a concentração máxima de esporos, $2,1 \times 10^{10}$ esporos/mL.

Os valores de pH decrescem no início da fermentação. Posteriormente, o pH aumenta até atingir o valor de 9,2 a partir de 60 horas de fermentação.

Na Tabela 7.2 são mostrados os parâmetros cinéticos para as fermentações de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios de cultivo UG e MBti-Glicose.

A máxima velocidade específica de crescimento foi equivalente nos meios estudados. O valor um pouco mais elevado de $Y_{X/S}$ obtido para o cultivo em MBti-Glicose é devido à maior quantidade de biomassa produzida, mesmo considerando o teor inicial de sólidos presentes (0,5g/L). Este meio também proporcionou uma elevada esporulação após 65 horas de fermentação, atingindo uma concentração de esporos de $2,1 \times 10^{10}$ esporos/mL.

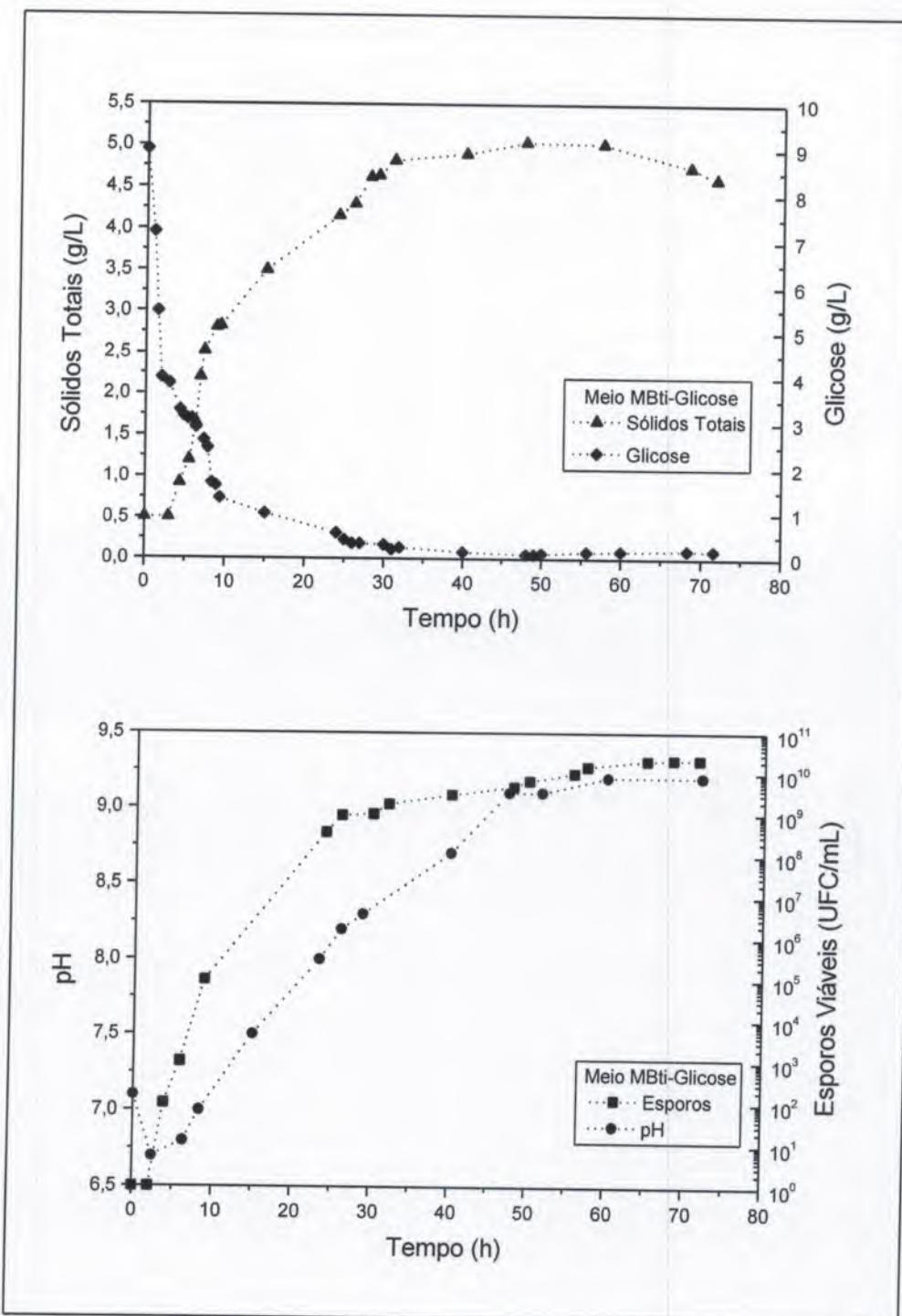


Figura 7.7 – Concentração de sólidos totais, consumo de glicose, variação do pH e concentração de esporos viáveis durante cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glucose

Tabela 7.2 – Parâmetros cinéticos obtidos para fermentações de *B. thuringiensis* nos meios de cultivo UG e MBti-Glicose e em outros trabalhos

Parâmetro	Meio de Cultivo						
	UG ⁽¹⁾	MBti-Glicose ⁽¹⁾	GYS mod. ⁽²⁾	Efluente BVS ⁽³⁾	TSY ⁽⁴⁾	Farinha de Soja ⁽⁴⁾	Efluente CUQS ⁽⁴⁾
μ (h ⁻¹)	0,35	0,35	1,00	0,30	0,64	0,53	0,42
Y_{XS} (g/g)	0,43	0,51	0,83				
q_s (h ⁻¹)	0,81	0,69					
X_{MAX} ou $S T_{MAX}$ (g/L)	3,77	5,04	8,50				
T_{XMAX} ou T_{STMAX} (h)	46,3	47,6	6,0				
ΔS (g/L)	8,35	8,90	10,0				
E_{MAX} (UFC/mL)	$2,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{10}$		$1,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$
T_{EMAX} (h)	56,3	65,0			48,0	48,0	48,0
X_{FINAL} ou $S T_{FINAL}$ (g/L)	3,54	4,60					
T_{FINAL} (h)	72,0	72,0	22,0				

⁽¹⁾ Este trabalho; ⁽²⁾ MOLINA et al. (2000); ⁽³⁾ MONTIEL et al. (2001); ⁽⁴⁾ VIDYARTHI et al. (2002)

MOLINA et al. (2000) investigaram o efeito da concentração inicial de glicose sobre o cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, em concentrações que variavam entre 10 e 152g/L. Os ensaios foram conduzidos em biorreatador de 5L com 3,6L de meio, até que o percentual de lise celular fosse correspondente a 50%.

De forma análoga ao observado no presente trabalho, os autores verificaram que na condição de 10g/L a interrupção do crescimento coincidia com o esgotamento do açúcar no meio, indicando que a concentração de glicose era limitante. O crescimento celular não foi afetado para concentrações de glicose até 75g/L, com máximas velocidades específicas de crescimento entre 1,0 e 1,1h⁻¹. Para concentrações iniciais de glicose maiores que 124g/L, foi observada inibição do cultivo. Os elevados valores de μ , Y_{XS} e X_{MAX} encontrados na

condição de 10g/L de glicose podem ser atribuídos ao meio de cultivo utilizado (GYS modificado), que contém como fonte de nitrogênio o componente extrato de levedura em elevada concentração (12g/L). Segundo MIGNONE e AVIGNONE-ROSSA (1996), compostos presentes no extrato de levedura são incorporados às células sem modificações químicas prévias, sendo utilizados preferencialmente para a produção de biomassa.

MONTIEL et al. (2001) estudaram a utilização de sete tipos de efluentes industriais como alternativa para a produção de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Os efluentes eram provenientes de diferentes estações de tratamento e possuíam composições químicas variadas em relação à fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes, o que influenciou os resultados de crescimento celular, esporulação e produção de endotoxina. Os ensaios foram realizados em frascos agitados e o maior valor de concentração de esporos ($1,8 \times 10^7$ esporos/mL) foi obtido com cultivo em meio à base do efluente BVS hidrolisado (24,5g de nitrogênio total / kg de efluente). A hidrólise do efluente aumenta a disponibilidade dos nutrientes, possibilitando um aumento na taxa específica de crescimento e na concentração de esporos viáveis.

Ainda com relação à utilização de efluentes industriais como matéria-prima para a produção *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, VIDYARTH et al. (2002) realizaram um estudo comparativo para a produção desta bactéria com os meios de cultivo TSY (Tryptic Soya Yeast Extract), Farinha de soja (contendo 5g/L de glicose, 5g/L de amido e sais minerais) e CUQS, efluente denominado "Communaute Urbaine du Quebec Slugde" (44,1g de nitrogênio total / kg de efluente). Os valores mais elevados para as máximas velocidades específicas de crescimento foram observados para os meios TSY e Farinha de soja. No entanto, uma maior atividade tóxica foi observada em CUQS, correspondendo a uma velocidade máxima de esporulação de ($0,12\text{h}^{-1}$), seguindo-se dos meios TSY e Farinha de soja ($0,05\text{h}^{-1}$). Estes resultados sugerem uma maior transformação de células vegetativas em esporos para o meio CUQS.

7.1.3- Considerações Gerais sobre as Fermentações de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*

Em um processo fermentativo descontínuo típico, o crescimento microbiano segue as fases identificadas abaixo (PERRY e STALEY, 1997):

- (I) Fase lag: fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo, onde não há crescimento celular considerável. A fase lag é um período de crescimento não-balanceado, onde os vários componentes das células individuais são sintetizados para fornecerem coenzimas e metabólitos necessários para o posterior crescimento balanceado e divisão celular. Esta fase pode ser reduzida se o inóculo for adicionado em fase de crescimento exponencial;
- (II) Crescimento exponencial: nesta fase as células passam a se multiplicar rapidamente e o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. Um dos fatores determinantes da taxa de crescimento exponencial é a composição do meio de cultivo. Um meio rico proporciona uma taxa de crescimento mais rápida devido a um maior fornecimento de componentes celulares, sendo gasta pouca energia com os mecanismos de síntese;
- (III) Fase estacionária: período no qual as células param de crescer, seja pela exaustão de algum substrato ou nutriente essencial ou pelo acúmulo no meio de algum produto inibitório proveniente do metabolismo microbiano. Durante esta fase, ocorre morte e lise de algumas células, e os produtos de lise celular podem ser utilizados para o fornecimento de nutrientes para outras células. Em geral, as células são mais resistentes à condições físicas adversas, como aumento da temperatura, radiação, ou mudança no pH.
- (IV) Fase de declínio ou morte: se uma cultura é mantida em fase estacionária durante um certo período de tempo, o microrganismo atingirá a fase de declínio ou morte. Nesta fase, o número de células viáveis diminui com o tempo a uma velocidade que depende da espécie e das condições de cultivo.

De forma geral, os cultivos de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* se caracterizaram pelas seguintes variações morfológicas e fisiológicas (Figura 7.8):

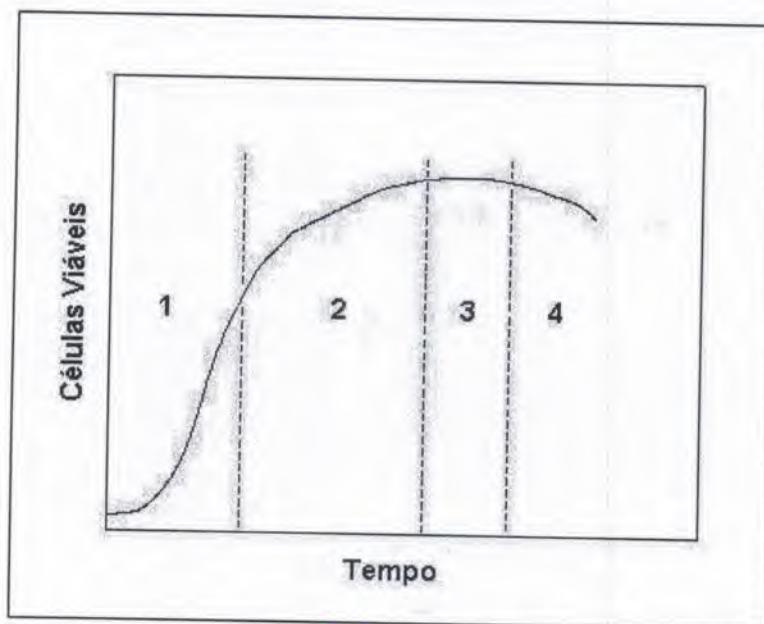


Figura 7.8 – Curva de crescimento celular típica para *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*

1. Etapa de crescimento vegetativo, com ocorrência de fase exponencial. Presença de células isoladas, aos pares e em cadeias, com bacilos com tamanho uniforme e elevada mobilidade;
2. Etapa de transição para a esporulação, com diminuição da velocidade de crescimento e presença de bacilos mais curtos, células imóveis e isoladas;
3. Etapa de esporulação;
4. Etapa de maturação dos esporos e lise celular.

Nos cultivos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, foi observada na primeira etapa uma fase de crescimento linear após a fase exponencial de crescimento, com queda rápida do pH nas primeiras horas de cultivo. Na etapa de esporulação, observou-se uma tendência de flocação das células, como verificado por MOLINA et al. (2000).

A seleção dos ingredientes do meio de cultivo depende basicamente de três fatores: assimilação pelo microrganismo, disponibilidade e custo. Para a obtenção de bioinseticidas em larga escala, a utilização de matérias-primas provenientes de resíduos industriais pode diminuir os custos do processo fermentativo; entretanto, deve-se levar em consideração a influência destes resíduos sobre a recuperação e a formulação do produto final.

Diversos subprodutos e resíduos de agroindústrias podem ser empregados como substratos, tais como: melaço, águas de lavagem e prensagem de frutas e cereais, soro de

queijo, peptonas, sangue e resíduos de matadouros, farelo de trigo e farinha de peixe. A utilização de água de levedura, um subproduto das indústrias de etanol, também é relatada como fonte de carbono e nitrogênio para a produção destes inseticidas bacterianos (DIAS, 1992).

As matérias-primas que podem ser utilizadas no cultivo destas bactérias diferem um pouco. *B. sphaericus* não metaboliza açúcares, sendo aminoácidos e proteínas as suas principais fontes de carbono e nitrogênio. A utilização de glicerol também tem sido relatada.

A escolha dos substratos para o cultivo de *B. thuringiensis* é mais simples, pois consome açúcares, além de aminoácidos e proteínas. Glicose, amido e melaço são as fontes de carbono mais utilizadas. O meio para o cultivo desta bactéria deve ser formulado adequadamente quanto à concentração de açúcar, pois a utilização de altos níveis deste substrato sem o ajuste adequado na concentração da fonte de nitrogênio pode ocasionar uma queda do pH a valores entre 5,6 e 5,8, o que prejudicaria o crescimento e levaria à inibição do processo de esporulação.

Segundo YANG e WANG (1998), a glicose tem sido um dos substratos mais empregados na produção em larga escala. Em geral, concentrações maiores que 40g/L podem causar inibição do crescimento, podendo diferir de acordo com a linhagem utilizada. Por outro lado, baixos níveis de açúcar também podem impedir o crescimento celular.

SCHERRER et al. (1973) investigaram a fermentação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em concentrações iniciais de glicose de 0 a 15g/L. Os autores verificaram que o aumento da concentração do açúcar conduzia à produção de cristais tóxicos de maior tamanho, com maior conteúdo protéico e maior atividade inseticida, e que a concentração ótima de glicose variava entre 6 e 8g/L.

O uso da milhocina, que se apresenta como um líquido pouco viscoso e muito rico em proteínas e aminoácidos, é uma das alternativas para a formulação de meios de cultivo de baixo custo que necessitem de substratos protéicos, como no caso das fermentações de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*. É proveniente do tratamento ácido do milho na produção comercial de amido. Nos experimentos de fermentação realizados, as maiores concentrações de esporos foram obtidas com os meios de cultivo contendo este subproduto.

Os resultados obtidos neste trabalho com relação à variação do pH ao longo do processo fermentativo estão de acordo com os descritos por DULMAGE et al. (1990). Estes autores relatam que o padrão típico para a variação do pH nas fermentações de *B. thuringiensis* em biorreator reflete a produção de ácido nas primeiras horas de cultivo a partir da utilização de glicose ou açúcares pelo microrganismo. Em seguida, o pH aumenta

gradativamente pela produção de compostos nitrogenados, atingindo valores próximos a 8,0 após cerca de 30 horas e 9,0 após 50-60 horas de fermentação.

Em contraste, o pH nas fermentações de *B. sphaericus* aumenta gradativamente ao longo do crescimento e formação de esporos, visto que não há formação de ácidos pela ausência de açúcares como fonte de carbono. Neste caso, ocorre um acúmulo de amônia provavelmente devido à desaminação de aminoácidos, e o valor do pH ao final do processo fica entre 8,0 e 9,0, dependendo do conteúdo protéico no meio de cultura.

Concentrações mais elevadas de esporos de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* são necessárias para a obtenção de uma elevada atividade larvicida, isto porque a esporulação está associada à formação do cristal tóxico. Entretanto, diversos autores têm enfatizado que altos níveis de esporulação nem sempre estão associados a uma alta toxicidade dos cristais produzidos (MONTIEL et al., 2001; MUMMIGATTI e RAGHUNATHAN, 1990; DULMAGE, 1970).

7.2- Ensaios de Floculação

As substâncias NaCl, CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃, tanino (Tanfloc SG) e uma poliacrilamida catiônica (Polyfloc CP1600P) foram testadas como agentes floculantes das bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sem qualquer ajuste de pH. A influência deste parâmetro foi investigada variando-se o pH das suspensões entre 3,0 e 7,0 para *B. sphaericus* em meio MBS e entre 2,0 e 7,0 nas demais suspensões bacterianas.

Em todos os casos, o sal NaCl não induziu à formação de flocos, sendo testado em uma ampla faixa de concentrações (250 a 6.000ppm). O polieletrólio poliacrilamida não apresentou uma floculação satisfatória devido à formação pequenos filamentos dispersos, sem possibilidade de visualização da frente de sedimentação.

7.2.1- *Bacillus sphaericus*

Para o meio MBS, as concentrações ótimas dos floculantes foram de 3.000, 2.000, 2.500 e 150ppm para CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃ e tanino, com índices médios de recuperação correspondentes a 95, 100, 95 e 98%, respectivamente. Com o aumento das concentrações dos floculantes, os índices de recuperação permaneceram estáveis em todos os casos. A condição ótima de pH variou entre 3,0 e 4,0, com recuperação total das células em suspensão (Figura 7.9).

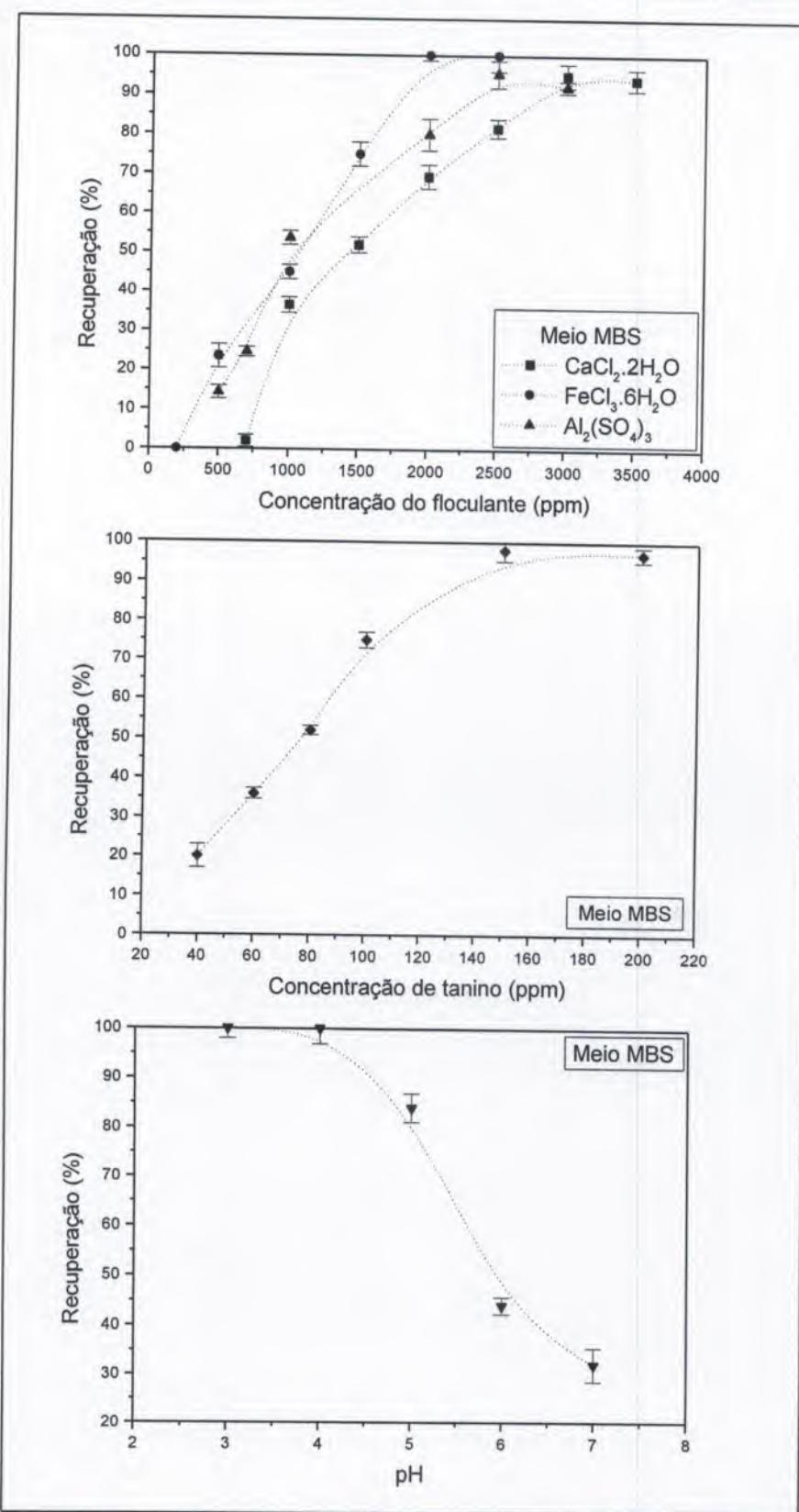


Figura 7.9 – Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de *B. sphaericus* em meio MBS

Como mostra a Figura 7.10, as concentrações ótimas para o meio MBS-6 foram de 1.500, 3.000, 2.000 e 1.700ppm para $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino, respectivamente, com índices médios de recuperação de em torno de 100% para todos os casos. A condição ótima de pH variou entre 2,0 e 4,0, com 100% de recuperação celular. As concentrações ótimas dos floculantes e os valores finais de pH após a adição dos mesmos encontram-se resumidos na Tabela 7.3.

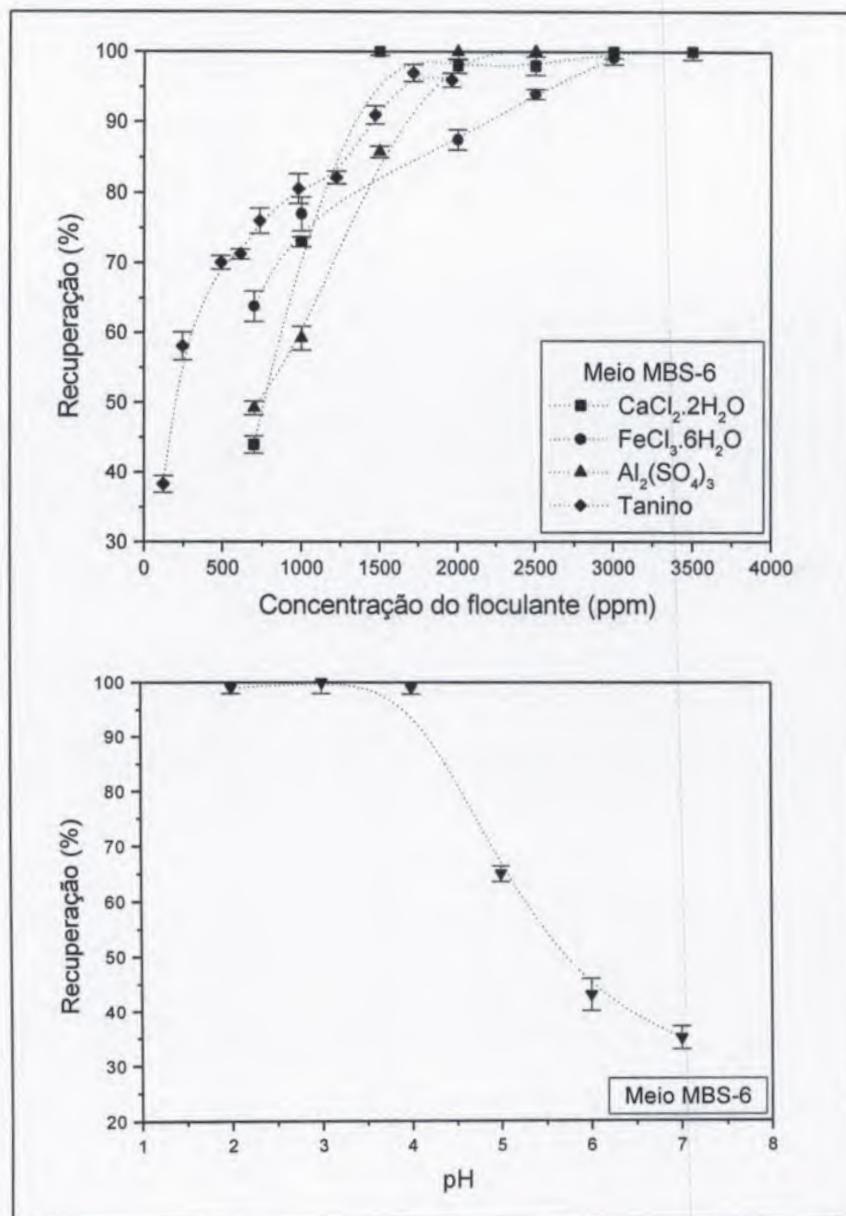


Figura 7.10 – Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de *B. sphaericus* em meio MBS-6

Tabela 7.3 – Concentrações ótimas dos floculantes e valores de pH para *B. sphaericus*

Microrganismo	Meio de Cultura	Floculante	Concentração (ppm)	pH
<i>B. sphaericus</i>	MBS		3.000	8,1
	MBS-6	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.500	8,9
	MBS		2.000	7,8
	MBS-6	FeCl ₃ .6H ₂ O	3.000	7,6
	MBS		2.500	7,6
	MBS-6	Al ₂ (SO ₄) ₃	2.000	8,3
	MBS		150	8,9
	MBS-6	tanino	1.700	8,8

7.2.2- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Analizando-se os gráficos da Figura 7.11, verifica-se que as máximas eficiências de recuperação de biomassa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG, quando floculada com as substâncias CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O e Al₂(SO₄)₃, foram equivalentes a 52, 40 e 67% para concentrações dos sais de 2.000, 1.000 e 2.000ppm, respectivamente. O floculante tanino induziu a um maior percentual de recuperação (98%), para uma concentração de 400ppm. O valor ótimo de pH foi 3,0, com índice de recuperação de 100%.

Para os ensaios de floculação em meio MBti-Glicose, os resultados da Figura 7.12 mostram que as máximas eficiências de floculação para CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃ e tanino foram obtidas para as concentrações de 2.500, 2.500, 3.500 e 1.000ppm, respectivamente. As recuperações foram de 90% para CaCl₂.2H₂O e 100% para todos os demais floculantes. Para valores de pH entre 2,0 e 4,0 também foi observada máxima recuperação das células em suspensão.

A Tabela 7.4 mostra as concentrações ótimas dos agentes floculantes e os valores finais de pH das suspensões de *B. thuringiensis* var. *israelensis* após a floculação.

Tabela 7.4 – Concentrações ótimas dos floculantes e valores de pH para *B. thuringiensis* var. *israelensis*

Microrganismo	Meio de Cultura	Floculante	Concentração (ppm)	pH
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	UG		2.000	8,5
	MBti-Glicose	CaCl ₂ .2H ₂ O	2.500	8,6
	UG		1.000	8,1
	MBti-Glicose	FeCl ₃ .6H ₂ O	2.500	8,2
	UG		2.000	8,2
	MBti-Glicose	Al ₂ (SO ₄) ₃	3.500	8,0
	UG		400	8,8
	MBti-Glicose	tanino	1.000	9,1

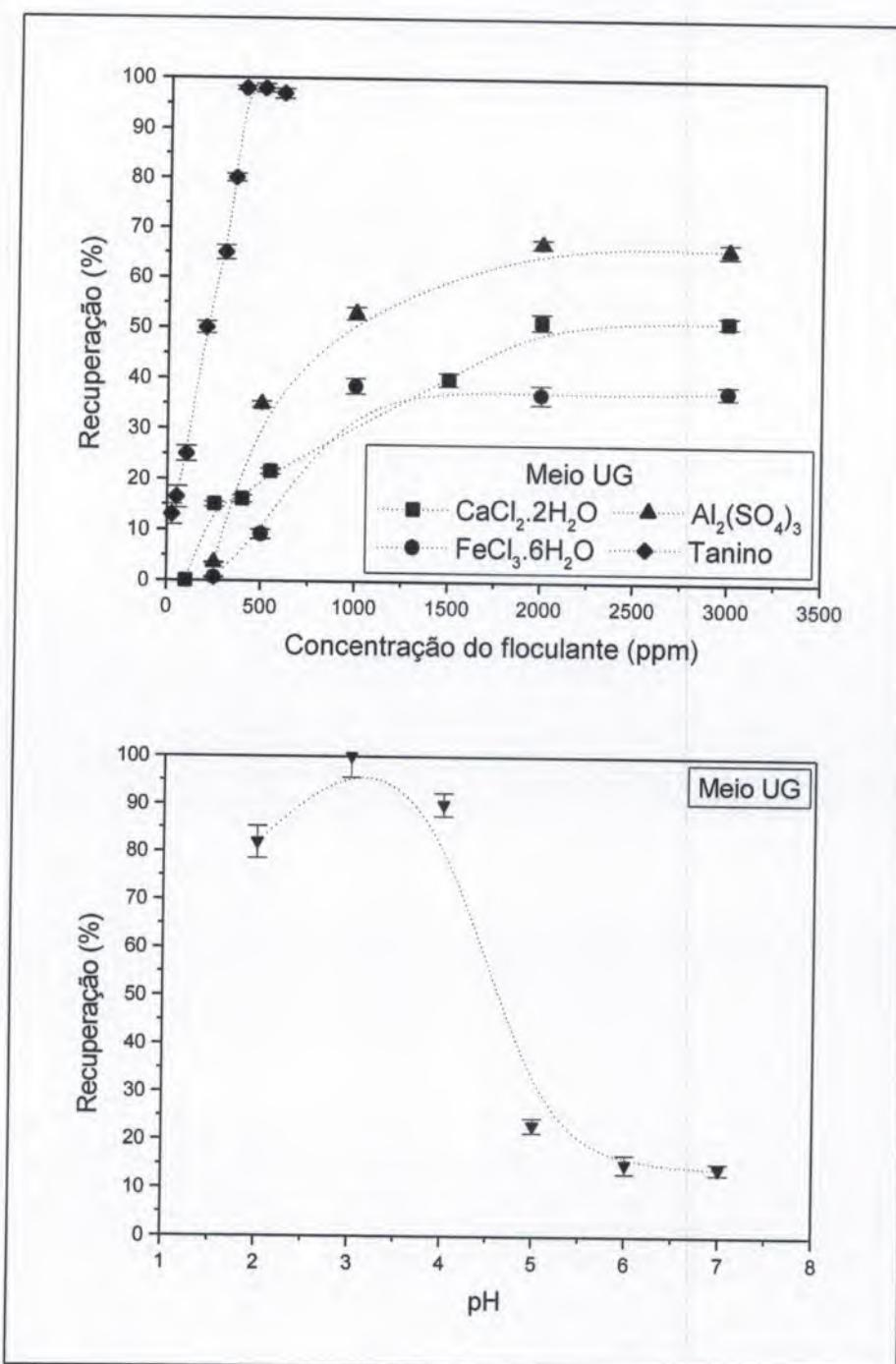


Figura 7.11 – Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG

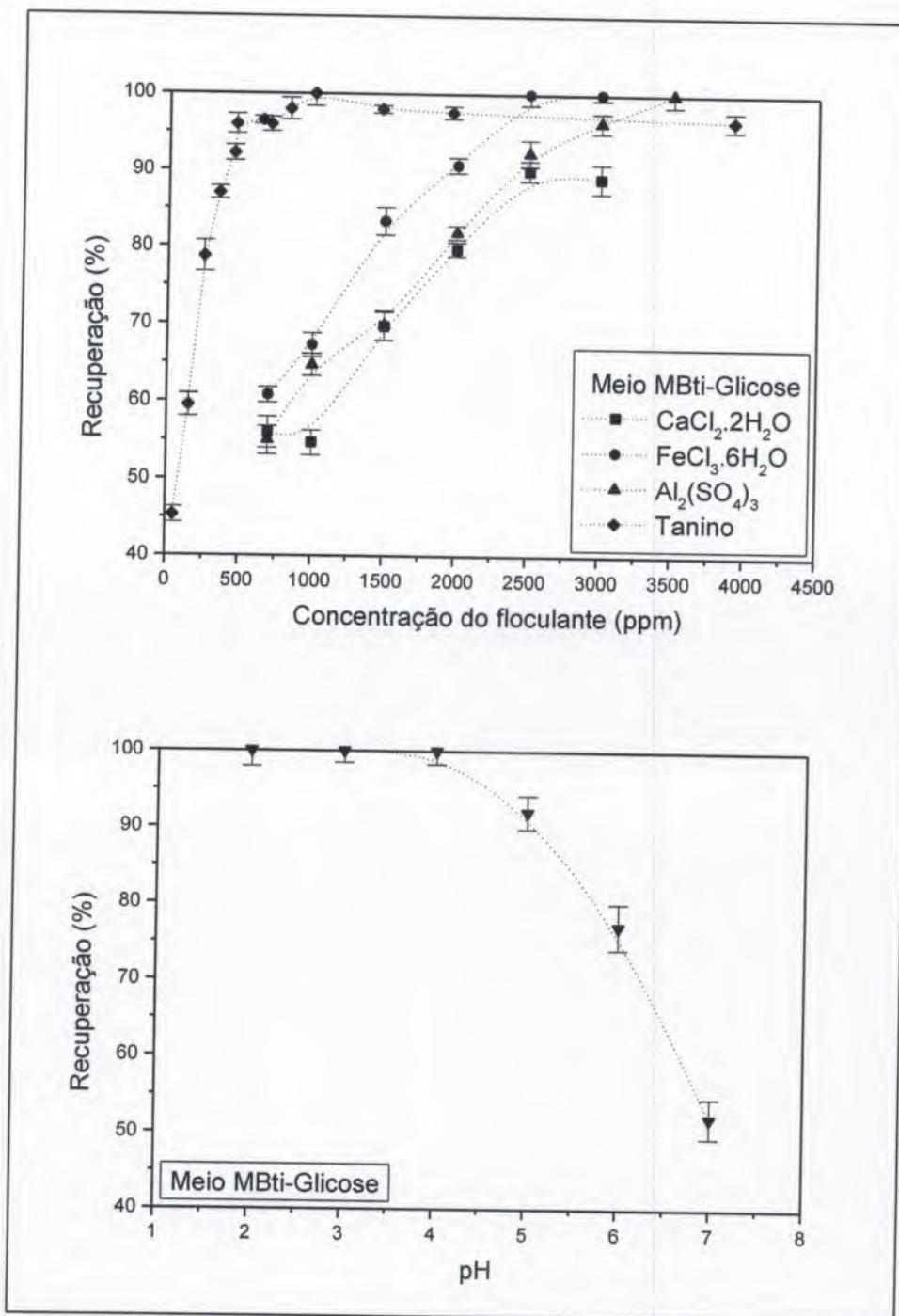


Figura 7.12 – Efeito da adição dos floculantes e do pH sobre o percentual de recuperação de biomassa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose

7.2.3- Considerações Gerais sobre os Resultados de Floculação

Para todas as condições ótimas de floculação obtidas em ambas as bactérias, testes de viabilidade dos esporos realizados com amostras dos flocos demonstraram que as células permaneciam viáveis após um período de observação de 24h.

a) Efeito dos floculantes

A adição de eletrólitos inorgânicos pode alterar as propriedades de carga de suspensões, tornando-as instáveis e ocasionando a aglomeração das partículas.

De acordo com HUGHES (1981), a intensidade da floculação é determinada pela valência do íon de carga oposta às partículas que é adicionado à suspensão, e os cátions trivalentes Al^{3+} e Fe^{3+} são muito eficientes para dispersões de partículas negativamente carregadas.

Outros fatores que exercem influência sobre a estabilidade das dispersões coloidais e, por conseguinte, podem determinar a floculação, são a concentração do eletrólito requerida para causar a agregação das partículas (denominada de concentração de coagulação crítica), a natureza da suspensão e a hidrólise das espécies em solução. Os cátions de metais alcalinos como Na^+ e K^+ não são facilmente hidrolisados em uma ampla faixa de pH (1-14), sendo hidratados em fase aquosa. Por outro lado, os cátions metálicos Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} sofrem hidrólise, sendo os dois primeiros com maior facilidade. Segundo BELTER et al. (1988), os íons podem agir apenas como eletrólitos, diminuindo a repulsão eletrostática que comumente existe entre as partículas coloidais, ou formar pontes entre as mesmas.

Os principais compostos que induzem ou estimulam a floculação em bactérias são sais inorgânicos de sódio, magnésio e cálcio e polímeros como poliacrilamida, proteínas e polissacarídeos. Como visto no Capítulo 3, diversos fatores estão envolvidos no processo de floculação, tais como: fatores genéticos, pH, concentração de células em suspensão, temperatura, fase de crescimento e composição do meio de cultivo (ESSER e KÜES, 1983).

PALHA (1999) investigou a adição dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} e NH_4^+ como cloreto sobre a floculação da bactéria *Zymomonas mobilis*. Verificou-se que a floculação é favorecida para concentrações de NH_4Cl entre 0,5 e 3,0g/L e concentrações inferiores a 1,0g/L para o $CaCl_2$, enquanto que o cátion Mg^{2+} causa a desfloculação. O íon amônio parece favorecer a floculação devido à sua estereoquímica, que permite ligações de hidrogênio entre este cátion e a superfície eletronegativa das células.

Verificando-se os resultados para os testes de floculação de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* com os floculantes $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, não foi observada uma correlação entre o aumento da valência do cátion e a diminuição na concentração de coagulação crítica para ambas as bactérias em todos os meios de cultivo estudados. Em adição, a floculação do caldo fermentado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG com estes agentes foi menos eficiente, obtendo-se baixos percentuais de recuperação em relação aos ensaios com os demais meios de cultivo.

A Figura 7.13 ilustra uma amostra do caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS floculado com 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

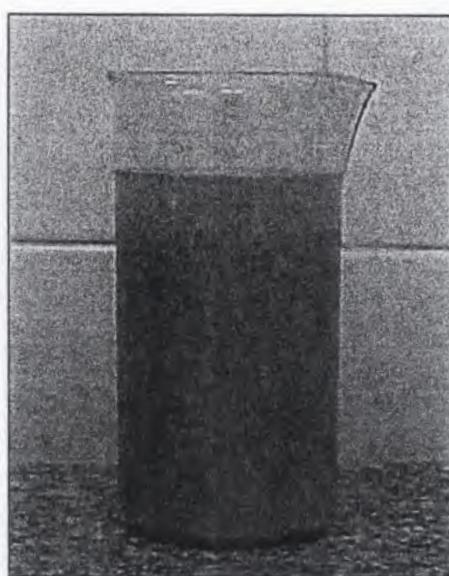


Figura 7.13 – Caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS floculado com 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A agregação celular parece ser influenciada por efeitos sinérgicos entre os floculantes e os componentes dos meios de cultivo. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que relatam esta influência sobre a floculação de microrganismos.

PALHA (1999) analisou o comportamento individual dos componentes do meio durante a fermentação de uma linhagem floculante de *Zymomonas mobilis* (CP-4), através de ensaios onde variava-se a concentração de cada nutriente, mantendo-se constante a concentração dos demais (composição do meio, em g/L: glicose 100,0; extrato de levedura 2,0; uréia 1,0; KH_2PO_4 1,0 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5). As faixas de concentrações estudadas foram de 0 a 4g/L para uréia, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 a 350g/L para a glicose e 0 a 10g/L para o extrato de levedura. Verificou-se que a glicose contribui para a floculação para

concentrações entre 100 e 150g/L, a uréia e o KH_2PO_4 , favorecem a agregação celular, enquanto que o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e o extrato de levedura induzem à desfloculação.

Em trabalho realizado por LÓPEZ et al. (1996), o caráter floculante de três linhagens da mesma bactéria (Z-1-81, T2 e CP1) foi avaliado de acordo com a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Os autores verificaram que o tipo de açúcar empregado (sacarose, glicose, frutose e mistura equimolar de glicose-frutose) exercia influência sobre a floculação e a sedimentação da bactéria, dependendo da linhagem em estudo.

Segundo CALLEJA (1987), a influência das condições nutricionais sobre a agregação de microrganismos, seja em leveduras ou em bactérias, ainda tem gerado muitas controvérsias. Vários componentes tem sido reconhecidos ao mesmo tempo como inibidores ou indutores da floculação, tais como açúcares, aminoácidos, proteínas, sais, lipídios, álcoois, etc.

A agregação de microrganismos também é influenciada pela interação de polímeros excretados pela célula durante o crescimento ou expostos à sua superfície sob condições fisiológicas adequadas. De acordo com BUSCH e STUMM (1968), bactérias podem ser floculadas com uma série de polieletrolitos, tais como poliacrilamida, dextrana, ácido poliglutâmico e polissacarídeos.

Neste trabalho, foi investigada a adição de tanino sobre a floculação das bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

O tanino, conhecido como tanato quaternário de amônio, é um eficiente floculante natural. O produto utilizado (Tanfloc SG, TANAC) é extraído da casca de um vegetal (Acácia Negra), sendo muito empregado como coagulante/floculante para o tratamento de águas de abastecimento em geral. Sua estrutura química é mostrada na Figura 7.14.

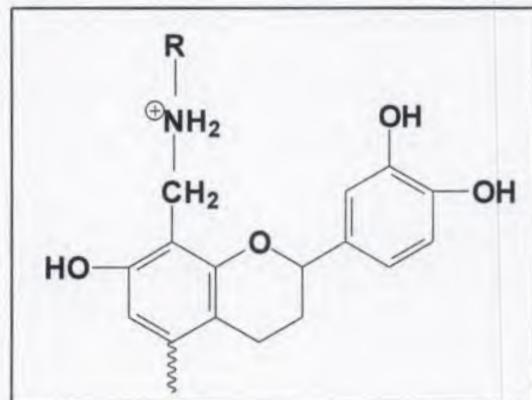


Figura 7.14 – Estrutura química do tanino (Tanfloc-SG, TANAC)

Trata-se de um polímero orgânico-catiônico, de baixa massa molecular, biodegradável, não tóxico, e que não altera o pH da suspensão. O pH ideal de atuação se encontra na faixa de 4,5 - 8,0.

Os flocos originados pela adição de tanino possibilitaram uma clarificação eficiente em todos os casos. Exceto para a flocação de *B. sphaericus* em meio MBS-6, em que a concentração ótima de tanino (1.700ppm) foi um pouco maior que a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.500ppm), menores concentrações deste polieletrólio foram requeridas em comparação com os demais agentes floculantes estudados.

Fatores como turbidez, cor, teor de matéria orgânica e quantidade de sólidos dissolvidos podem determinar sua dosagem. De fato, os menores valores de concentração deste floculante foram observados para os meios límpidos MBS e UG, correspondendo a apenas 150ppm e 400ppm, respectivamente, para uma recuperação de células de 98%.

PUGET et al. (1999) estudaram a influência dos floculantes tanino, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e poliacrilamida na produção de álcool de uma linhagem não floculante de *Zymomonas mobilis*. Os melhores resultados de sedimentação foram observados para o floculante tanino na dosagem ótima de 140ppm. Ensaios de fermentação em bateladas repetidas demonstraram que esta substância não causou prejuízo na produção de etanol.

A interação entre o polieletrólio e a superfície celular provavelmente ocorre devido à adsorção específica da molécula do polímero, com a formação de "pontes" entre as partículas. Para tanto, são fundamentais a carga, o peso molecular e o grupo funcional do mesmo. Por se tratar de um polímero catiônico, o tanino se ioniza e adquire carga positiva quando dissolvido em água, atuando como um autêntico cátion e neutralizando as cargas das partículas em suspensão. Além disso, a adsorção das partículas ao polímero será favorecida quanto maior a atuação do grupo funcional.

b) Efeito do pH

Os resultados de flocação com variação de pH demonstraram que o meio ácido favorece a agregação celular para ambas as bactérias nos meios de cultura estudados. Em geral, os valores ótimos variaram entre 2,0 e 4,0.

A Figura 7.15 ilustra o caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS-6 floculado na condição de pH 3,0.

Existem poucos trabalhos na literatura que abordam a influência do pH sobre a flocação de bactérias. LUNA et al. (2001), investigando a flocação de *B. sphaericus*, verificaram que a condição de pH 3,0 favorecia a agregação e a hidrofobicidade das células.

PALHA (1999), investigando a expressão da flocação em uma linhagem floculante da bactéria *Zymomonas mobilis*, verificou que a flocação era favorecida entre valores de pH correspondentes a 1,0 e 4,4, sendo observado um aumento na desflocação com o aumento do pH.



Figura 7.15 – Caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS-6 floculado na condição de pH 3,0 (amostra de 60L)

Conforme discutido no Capítulo 3, as superfícies microbianas, sejam as estruturas de membrana celular, parede celular ou algum outro envoltório, são compostas por ácidos graxos, aminoácidos, ácidos teicóicos, lipídios e polissacarídeos. Dessa forma, as cargas superficiais são originadas de seus diversos grupos funcionais, como fosfatos, carboxilas e hidroxilas, conferindo assim um caráter anfótero à superfície da célula.

Em geral, a maioria das bactérias possui uma carga líquida negativa em suas superfícies, apresentando ponto isoelétrico em meio ácido. Isto ocorre provavelmente devido ao grande percentual de grupamentos aniónicos, principalmente carboxilas e fosfatos, em detrimento aos catiônicos (MOZES e ROUXHET, 1990; PELCZAR et al., 1993). Dessa forma, a superfície negativamente carregada permite a interação entre as células e os prótons presentes no meio, possibilitando a agregação.

O efeito do pH sobre a floculação de leveduras tem sido abordado em diversos trabalhos. Estudando a floculação da levedura *Pichia stipitis*, PEREIRA Jr. (1991) verificou que a melhor expressão da floculação foi na faixa de pH entre 4,0 e 8,0 em soluções onde o cátion cálcio encontrava-se a uma concentração de 4,0mM.

KAMADA e MURATA (1984) verificaram que duas linhagens de leveduras cervejeiras de fermentação baixa que encontravam-se dispersas na condição de pH 5,5, aumentaram sua característica de hidrofobicidade com o abaixamento do pH para 4,2, tornando-se floculantes.

Como descrito no Capítulo 3, as linhagens floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser divididas em dois grupos fenotípicos distintos, com fenótipos denominados Flo1 e NewFlo (STRATFORD e ASSINDER, 1991). Quase todas as cepas do primeiro grupo floculam durante o crescimento em diferentes meio de cultivo, e a floculação é relativamente insensível a variações extremas de pH. As linhagens pertencentes ao segundo grupo exibem a característica de floculação geralmente durante a fase estacionária de crescimento, e a maioria delas é empregada na indústria cervejeira. De acordo com CALLEJA (1987), a floculação em leveduras ocorre geralmente no final do processo fermentativo, quando a maior parte do açúcar é consumida e ocorre uma queda no pH do meio fermentado. Entretanto, o início da floculação depende das condições da fermentação e da linhagem utilizada.

Investigando a influência do pH sobre a floculação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pertencentes aos dois grupos fenotípicos citados, STRATFORD (1996) verificou que o fenótipo Flo1 apresenta boa tolerância ao pH, exibindo a característica de floculação em valores entre 1,5 e 10,0. Entre as linhagens do fenótipo NewFlo, foi verificado que algumas exibiam floculação em uma ampla faixa de pH, entre 2,5 e 9,0, enquanto que outras floculavam apenas no intervalo que variava entre 2,5 e 5,0.

Dessa forma, verifica-se que o fenômeno da floculação em leveduras ocorre em uma ampla faixa de pH, sendo muito variável entre as espécies.

Devido à facilidade de desfloculação e refloculação, ligações mais fracas como pontes de hidrogênio podem estar envolvidas na interação entre as células de leveduras, além de ligações de proteínas de superfície com receptores de carboidratos (MIKI et al., 1982). Vimos no Capítulo 3 que a influência de proteínas tipo lectinas na presença de íons Ca^{2+} também é uma hipótese considerada que poderia favorecer a floculação nestes microrganismos.

Dois aspectos são levados em consideração com relação à floculação de leveduras cervejeiras: a tendência inerente da espécie naturalmente floculenta, determinada por

fatores genéticos, e as interações entre células potencialmente floculentas que podem levar à formação de flocos. Em ambos os casos, fatores ambientais como condições fisiológicas do meio, presença de indutores de flocação e velocidade de colisões celulares são determinantes (MOZES e ROUXHET, 1990).

7.3- Caracterização das Partículas

O conhecimento das propriedades das partículas, tais como distribuição de tamanhos, densidade, tamanho, forma e propriedades de superfície é de vital importância para o projeto e operação de equipamentos de separação sólido-líquido.

A seguir, serão apresentados os resultados para a distribuição de tamanhos das partículas nos caldos fermentados e os valores de densidade e diâmetro médio dos flocos para as suspensões floculentas estudadas. Os resultados correspondem à média de experimentos realizados em duplicata.

7.3.1- Distribuição de Tamanhos nos Caldos Fermentados

A Figura 7.16 mostra os resultados obtidos para a distribuição de tamanhos das partículas de *B. sphaericus* em meio MBS, visto se tratar de um meio de cultivo límpido. Foi obtida uma distribuição regular, com diâmetro médio de 1,15 μm . Estudando as alterações morfológicas da célula de *B. sphaericus* por microscopia eletrônica, RIOS (1998) observou que a dimensão dos esporos esféricos era de cerca de 0,6 μm , enquanto que as células vegetativas possuíam dimensões aproximadas de 1,7 $\mu\text{m} \times 0,3\mu\text{m}$.

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem à dimensão das partículas na mistura de células vegetativas e esporos que se encontra ao final do processo fermentativo, corroborando com os resultados experimentais obtidos por microscopia eletrônica no trabalho citado.

De acordo com a Figura 7.17, pode ser notado que são observadas partículas com tamanhos maiores no meio MBS-6, que possui uma concentração de sólidos em suspensão de 2,3g/L. Foi obtida uma distribuição de tamanhos irregular, com 11,4% das partículas com

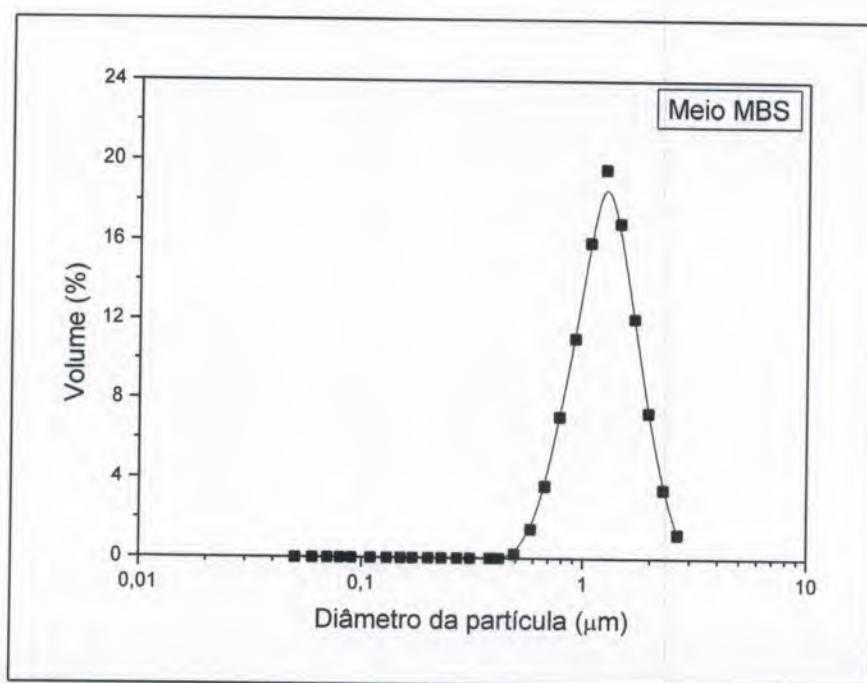


Figura 7.16 – Distribuição de tamanhos das partículas de *B. sphaericus* em meio MBS
(equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultra-som)

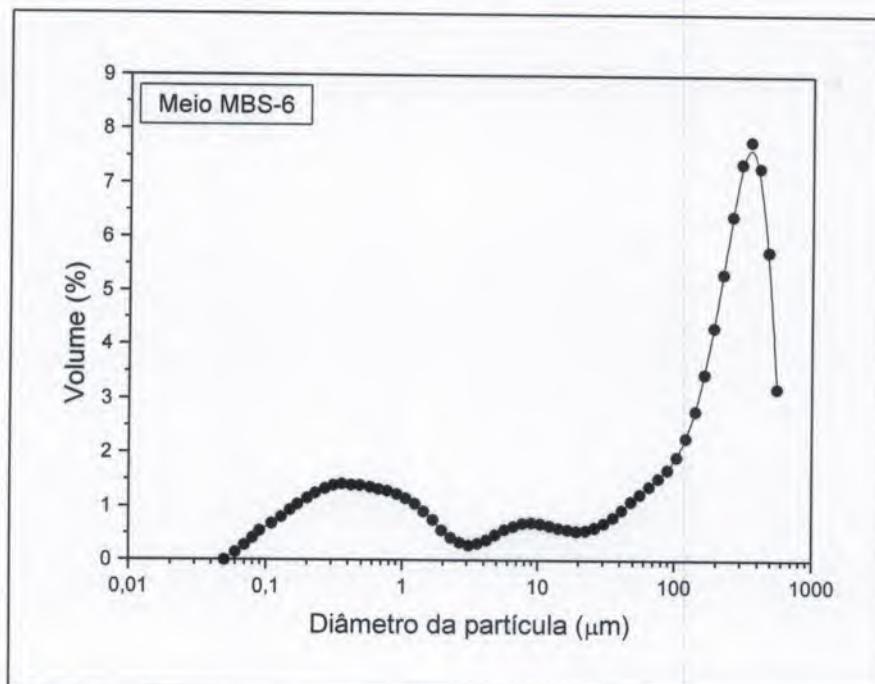


Figura 7.17 – Distribuição de tamanhos das partículas do caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS-6 (equipamento Malvern Mastersizer Micro "Plus", MAF 5001, com ultra-som)

diâmetro até 0,36 μm , 28% das partículas até 9,0 μm e 84% delas com tamanho até 351,5 μm .

As Figuras 7.18 e 7.19 mostram os resultados da distribuição de tamanhos das partículas presentes nos caldos fermentados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* cultivada nos meios UG e MBti-Glicose, respectivamente.

No meio límpido UG, observou-se que 90% das partículas em suspensão possuem diâmetro até 1,7 μm , enquanto que os 10% restantes apresentam tamanho entre este valor e 12,2 μm . O diâmetro médio foi de 0,98 μm .

A presença de partículas um pouco maiores indica a presença de microflocos durante o cultivo, como observado microscopicamente. De acordo com PALHA (1999), os flocos podem ser classificados como microflocos (diâmetros inferiores a 100 μm) ou macroflocos (diâmetros superiores a 100 μm).

Como mostrado na Figura 7.19, o caldo fermentado do meio MBti-Glicose apresenta, como esperado, partículas com maiores diâmetros. Este meio possui sólidos em suspensão (0,5g/L), mas em menor quantidade que o meio MBS-6 para a bactéria *B. sphaericus*. Observou-se uma distribuição de tamanhos irregular, com 23% das partículas com diâmetro até 1,25 μm , 74% das partículas até 43,8 μm e 93% com tamanho até 170,0 μm .

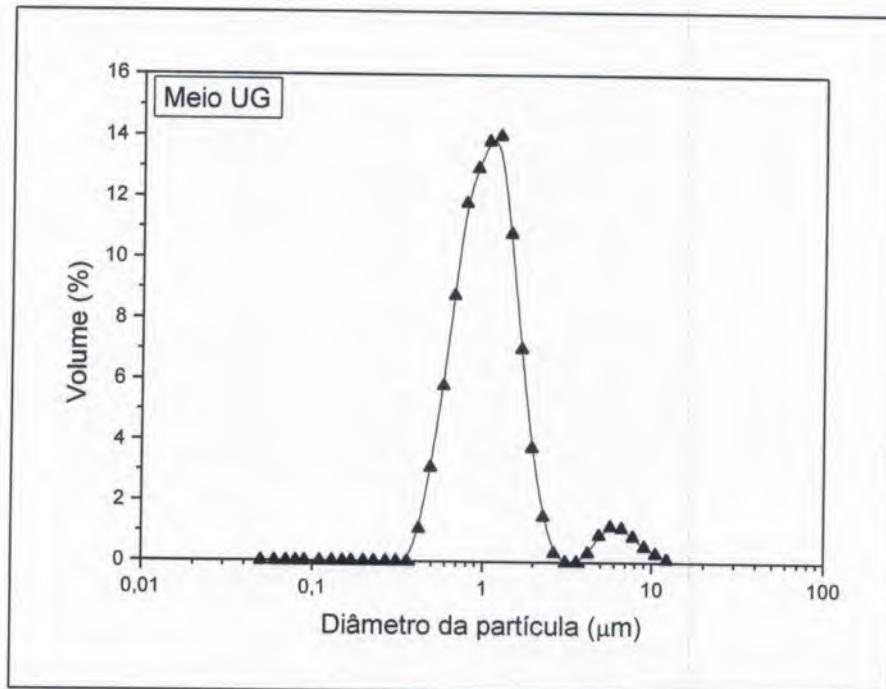


Figura 7.18 – Distribuição de tamanhos das partículas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG (equipamento Malvern Mastersizer Micro “Plus”, MAF 5001, com ultra-som)

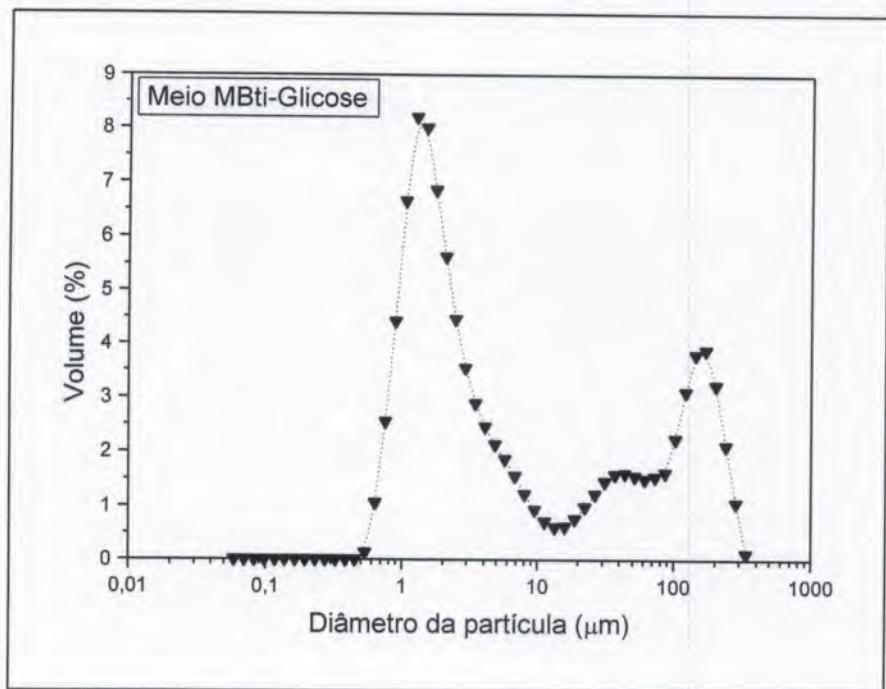


Figura 7.19 – Distribuição de tamanhos das partículas do caldo fermentado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose (equipamento Malvern Mastersizer Micro “Plus”, MAF 5001, com ultra-som)

7.3.2- Densidade e Diâmetro Médio dos Flocos

A Tabela 7.5 mostra os resultados de caracterização das suspensões floculentas de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* através da determinação da densidade e do diâmetro médio dos flocos, de acordo com o meio de cultivo e o floculante utilizado.

Para *B. sphaericus*, os valores de densidade variaram entre $1,080\text{g/cm}^3 \pm 0,025\text{g/cm}^3$ e $1,140\text{g/cm}^3 \pm 0,060\text{g/cm}^3$ para os flocos a pH 3,0 em meio MBS e com tanino em meio MBS-6, respectivamente. O menor diâmetro foi obtido para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em meio MBS ($103,1\mu\text{m} \pm 4,3\mu\text{m}$), enquanto que os flocos de maior tamanho foram os de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em meio MBS-6 ($275,6\mu\text{m} \pm 9,5\mu\text{m}$).

Tabela 7.5 – Resultados de densidade e diâmetro médio dos flocos para *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*

Microrganismo	Meio de Cultura	Floculante	$\rho_f(\text{g/cm}^3)$	$D_f(\mu\text{m})$
<i>B. sphaericus</i>	MBS		$1,092 \pm 0,012$	$178,2 \pm 8,7$
	MBS-6	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,102 \pm 0,025$	$275,6 \pm 9,5$
	MBS		$1,083 \pm 0,008$	$103,1 \pm 4,3$
	MBS-6	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,100 \pm 0,020$	$114,8 \pm 8,9$
	MBS		$1,094 \pm 0,034$	$196,5 \pm 6,1$
	MBS-6	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$1,101 \pm 0,020$	$132,4 \pm 11,4$
	MBS		$1,090 \pm 0,045$	$208,0 \pm 10,0$
	MBS-6	tanino	$1,140 \pm 0,060$	$157,8 \pm 29,6$
	MBS		$1,080 \pm 0,025$	$151,3 \pm 8,7$
	MBS-6	pH 3,0	$1,089 \pm 0,043$	$105,4 \pm 8,1$
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	UG		$1,030 \pm 0,003$	$289,2 \pm 5,3$
	MBti-Glicose	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,036 \pm 0,015$	$295,0 \pm 25,6$
	UG		$1,030 \pm 0,016$	$211,9 \pm 10,7$
	MBti-Glicose	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,037 \pm 0,018$	$267,4 \pm 31,3$
	UG		$1,046 \pm 0,041$	$265,8 \pm 5,2$
	MBti-Glicose	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$1,023 \pm 0,015$	$313,9 \pm 21,9$
	UG		$1,071 \pm 0,005$	$272,0 \pm 7,8$
	MBti-Glicose	tanino	$1,063 \pm 0,038$	$286,4 \pm 38,3$
	UG		$1,051 \pm 0,008$	$162,2 \pm 21,4$
	MBti-Glicose	pH 3,0	$1,054 \pm 0,055$	$202,3 \pm 6,4$

A Figura 7.20 ilustra uma fotografia dos flocos de *B. sphaericus* em meio MBS na presença do floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.



Figura 7.20 – Flocos de *B. sphaericus* em meio MBS na presença do floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (aumento de 10 vezes)

O menor valor de densidade dos flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foi de $1,023\text{g}/\text{cm}^3 \pm 0,015\text{g}/\text{cm}^3$ ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; meio MBti-Glicose), enquanto que o maior valor foi correspondente a $1,071\text{g}/\text{cm}^3 \pm 0,005\text{g}/\text{cm}^3$ (tanino; meio UG). Com relação ao diâmetro, este variou na faixa de $162,2\mu\text{m} \pm 21,4\mu\text{m}$ (pH 3,0; meio UG) e $313,9\mu\text{m} \pm 21,9\mu\text{m}$ ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; meio MBti-Glicose).

Os valores obtidos para a densidade dos flocos são típicos de sistemas floculentos, sendo muito próximos a densidade da água. São estruturas caracterizadas pela presença de aglomerados de partículas e de moléculas de água unidas por forças de superfície.

Excetuando-se os flocos de *B. sphaericus* com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, tanino e a pH 3,0, os flocos formados com os meios MBS-6 e MBti-Glicose possuem maior diâmetro que os flocos para os meios límpidos MBS e UG. Em adição, comparando-se os diâmetros dos flocos para os mesmos agentes floculantes, tamanhos maiores foram observados para a bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

7.4- Testes de Sedimentação

7.4.1- *Bacillus sphaericus*

a) Meio MBS

As Figuras 7.21, 7.22 e 7.23 ilustram as curvas de sedimentação dos flocos de *B. sphaericus* em meio MBS na presença de 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 150ppm de tanino e a pH 3,0, de acordo com a concentração de células em suspensão. A Figura 7.24 mostra as máximas velocidades de sedimentação obtidas em cada ensaio em proveta, calculadas a partir da inclinação da seção linear de cada curva de sedimentação.

Os flocos obtidos com tanino sedimentam mais rapidamente, mesmo para suspensões mais concentradas, com velocidades máximas de sedimentação que decrescem de 10,3 a 5,3cm/min para concentrações celulares entre 2,5 e 11,8g/L. A velocidade foi muito dependente da concentração de células, particularmente para valores até 11,0g/L. Em seguida, sedimentações mais rápidas são obtidas para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (6,2 a 0,8cm/min para concentrações entre 0,9 e 5,5g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,3 a 0,8cm/min para concentrações entre 1,3 e 4,0g/L), com perfis de velocidades muito semelhantes até 3,0g/L; concentrações maiores induzem a velocidades de sedimentação um pouco mais elevadas para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

As menores velocidades são observadas para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,2 a 0,2cm/min para concentrações de 1,0 a 5,2g/L) e a pH 3,0 (2,0 a 0,4cm/min para concentrações de 1,2 a 3,7g/L).

Apesar de terem sido obtidos valores muito próximos para a densidade dos flocos com tanino ($1,090\text{g/cm}^3 \pm 0,045\text{g/cm}^3$), $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ($1,094\text{g/cm}^3 \pm 0,034\text{g/cm}^3$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,092\text{g/cm}^3 \pm 0,012\text{g/cm}^3$), é possível correlacionar o tamanho dos flocos com as velocidades máximas de sedimentação. De fato, os flocos com tanino apresentaram o maior diâmetro médio ($208,0\mu\text{m} \pm 10,0\mu\text{m}$), seguindo-se dos flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ($196,5\mu\text{m} \pm 6,1\mu\text{m}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($178,2\mu\text{m} \pm 8,7\mu\text{m}$).

As menores velocidades são observadas para os flocos de menor diâmetro e densidade, ou seja, a pH 3,0 ($1,080\text{g/cm}^3 \pm 0,025\text{g/cm}^3$; $151,3\mu\text{m} \pm 8,7\mu\text{m}$) e com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,083\text{g/cm}^3 \pm 0,008\text{g/cm}^3$; $103,1\mu\text{m} \pm 4,3\mu\text{m}$).

Como mostra a Figura 7.25, os menores índices de recuperação foram obtidos com o floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (63 a 84%), seguindo-se dos flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (68 a 93%), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (82 a 91%), tanino (90 a 98%) e a pH 3,0 (100%).

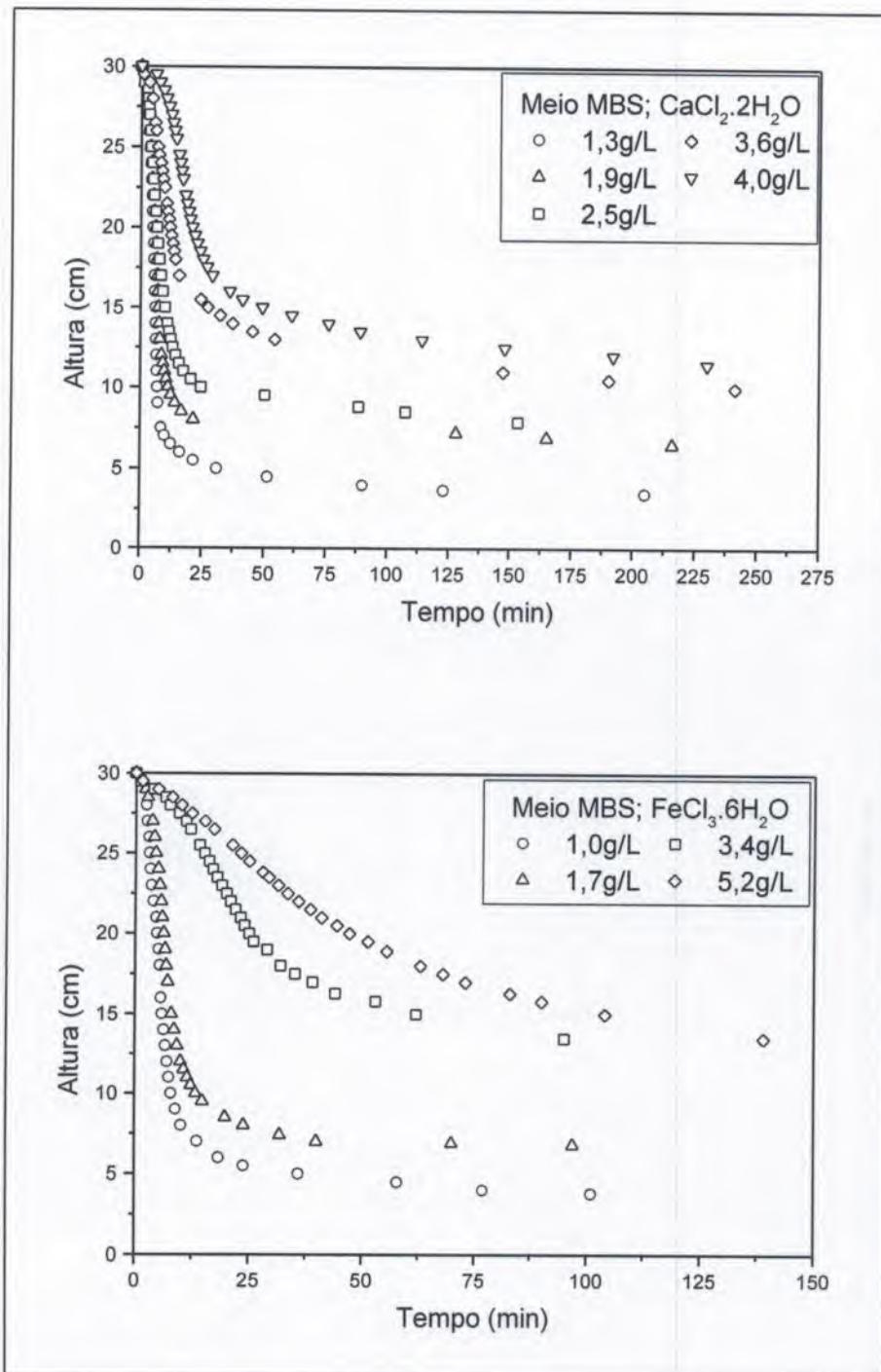


Figura 7.21 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS na presença de 3.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 2.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração celular

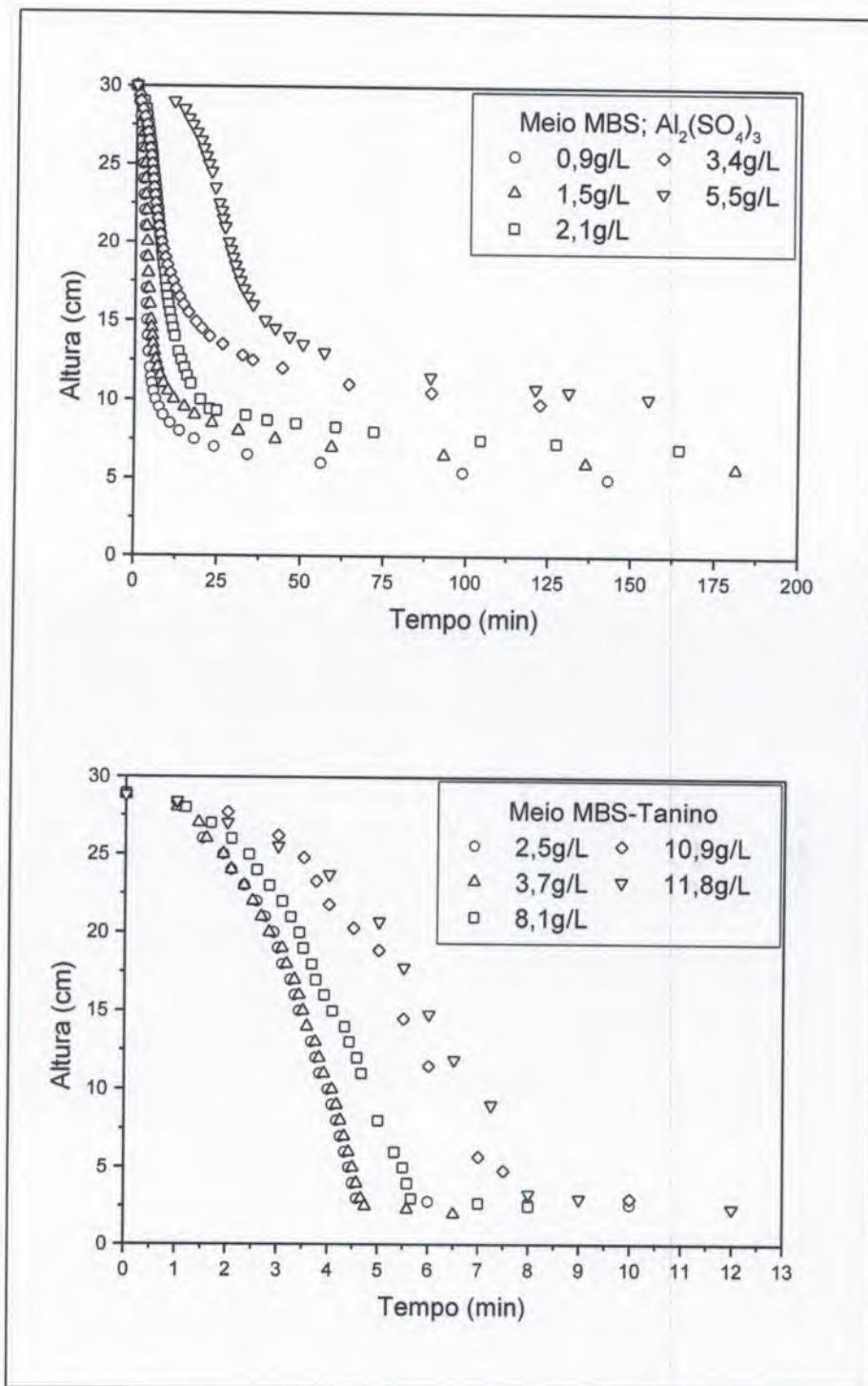


Figura 7.22 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS na presença de 2.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 150ppm de tanino de acordo com a concentração celular

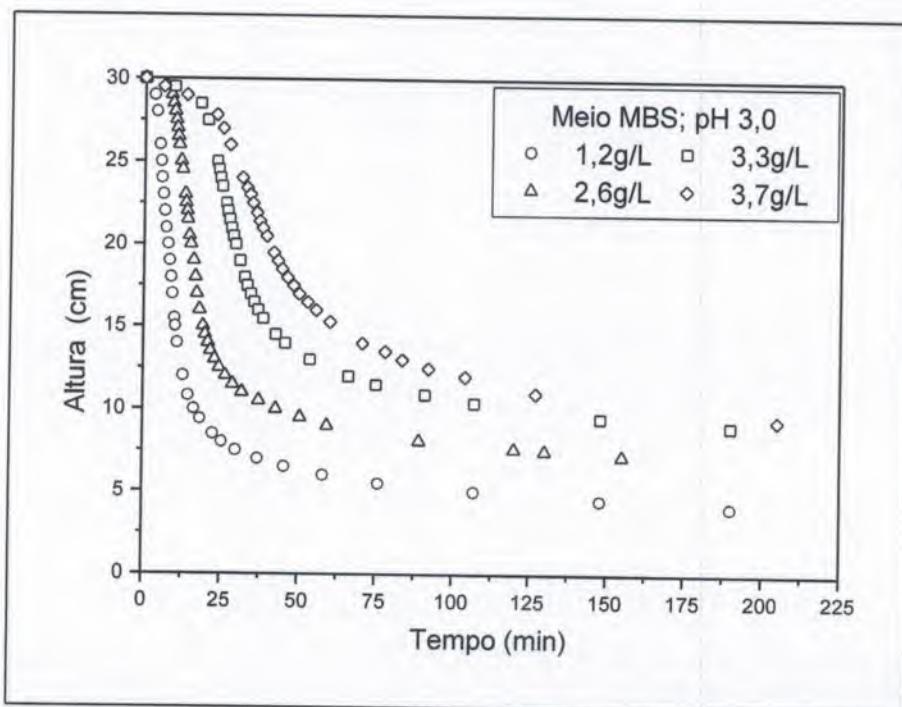


Figura 7.23 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS a pH 3,0 de acordo com a concentração celular

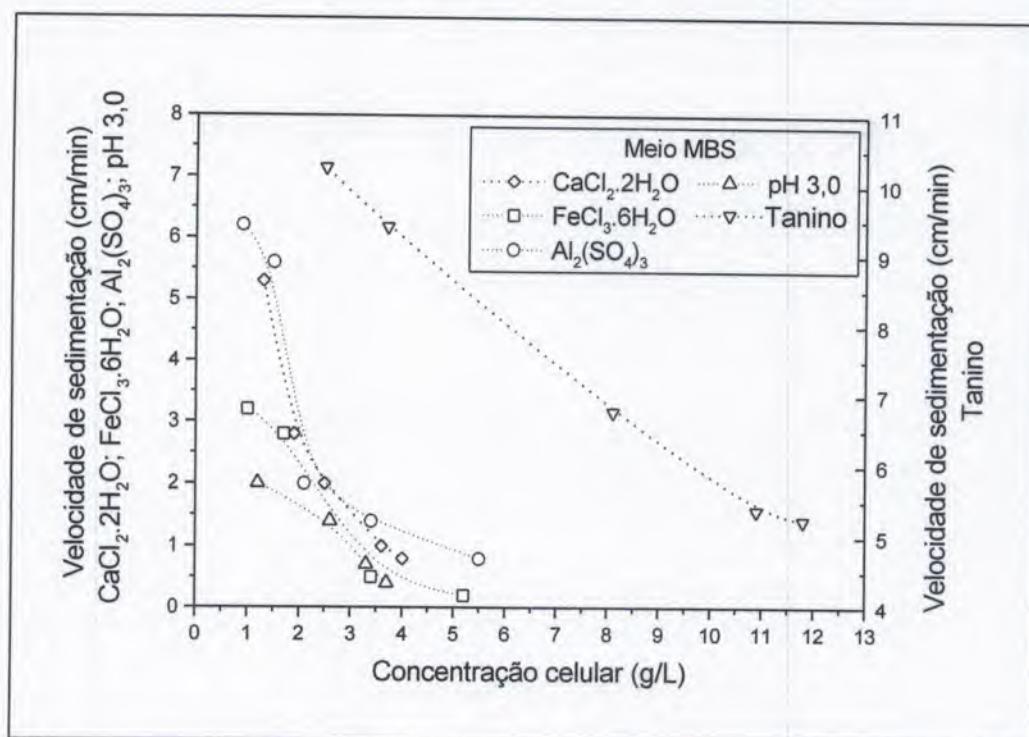


Figura 7.24 – Velocidades de sedimentação das suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS de acordo com a concentração celular

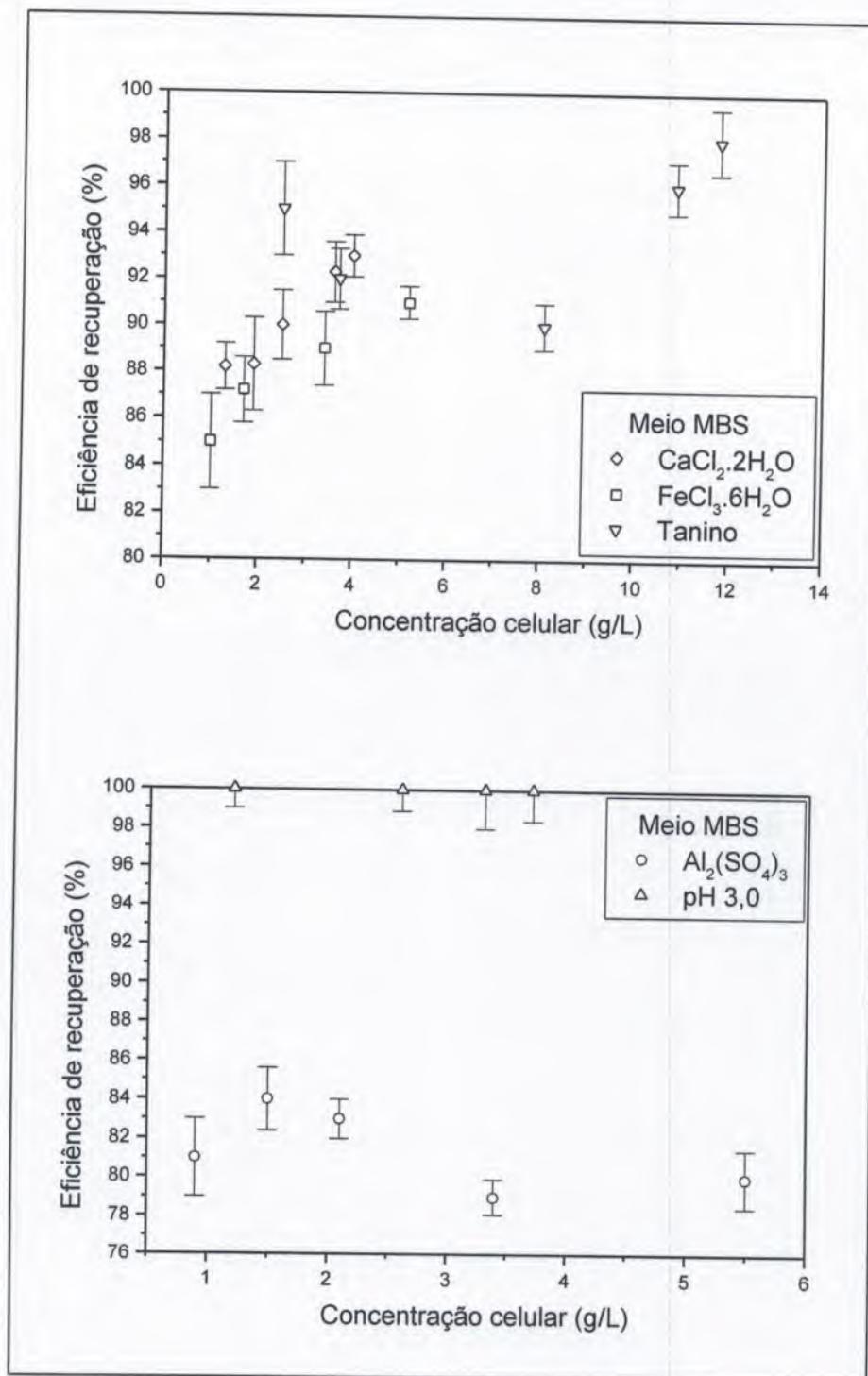


Figura 7.25 – Eficiência de recuperação das suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS de acordo com a concentração celular

b) Meio MBS-6

As Figuras 7.26, 7.27 e 7.28 mostram as curvas de sedimentação dos flocos de *B. sphaericus* em meio MBS-6 na presença de 1.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 1.700ppm de tanino e a pH 3,0. Os valores obtidos para as máximas velocidades de sedimentação em função da concentração de sólidos em suspensão são mostrados na Figura 7.29.

As maiores velocidades foram obtidas para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, o que coincide com o maior diâmetro médio ($275,6\mu\text{m} \pm 9,5\mu\text{m}$) observado dentre os sistemas floculentos para o meio MBS-6. Os valores de velocidade variaram entre 5,2 e 0,4cm/min para concentrações de sólidos de 1,8 a 7,0g/L. Uma variação mais acentuada com a concentração é verificada até cerca de 4,5g/L, quando a velocidade tende a se estabilizar.

Comparando-se os flocos com tanino, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, os primeiros apresentam maiores velocidades para concentrações abaixo de 2,0g/L. Os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ possuem perfis de velocidade semelhantes, com valores variando entre 4,0-0,35cm/min e 3,1-0,3cm/min para concentrações de 0,8 a 3,8g/L e de 1,5 a 5,0g/L, respectivamente. Valores de densidade e diâmetro muito próximos também foram observados para estes casos.

Apesar dos flocos com tanino possuírem a maior densidade ($1,140\text{g/cm}^3 \pm 0,060\text{g/cm}^3$), estes sedimentam mais lentamente que os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, talvez por apresentarem um menor diâmetro médio ($157,8\mu\text{m} \pm 29,6\mu\text{m}$).

As menores velocidades de sedimentação foram obtidas para os flocos a pH 3,0 (3,1 a 0,9cm/min), quando as concentrações celulares variaram de 0,3 a 2,9g/L. Como previsto, estes apresentaram os menores valores de densidade ($1,089\text{g/cm}^3 \pm 0,043\text{g/cm}^3$) e de diâmetro médio ($105,4\mu\text{m} \pm 8,1\mu\text{m}$).

Com base nos dados de recuperação mostrados na Figura 7.30, pode-se notar que foram obtidos elevados índices de recuperação para todos os casos. Para o floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ os valores estiveram entre 83 e 86%, seguindo-se dos flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (86 a 91%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (89 a 95%), pH 3,0 (93 a 98%) e tanino (96 a 100%).

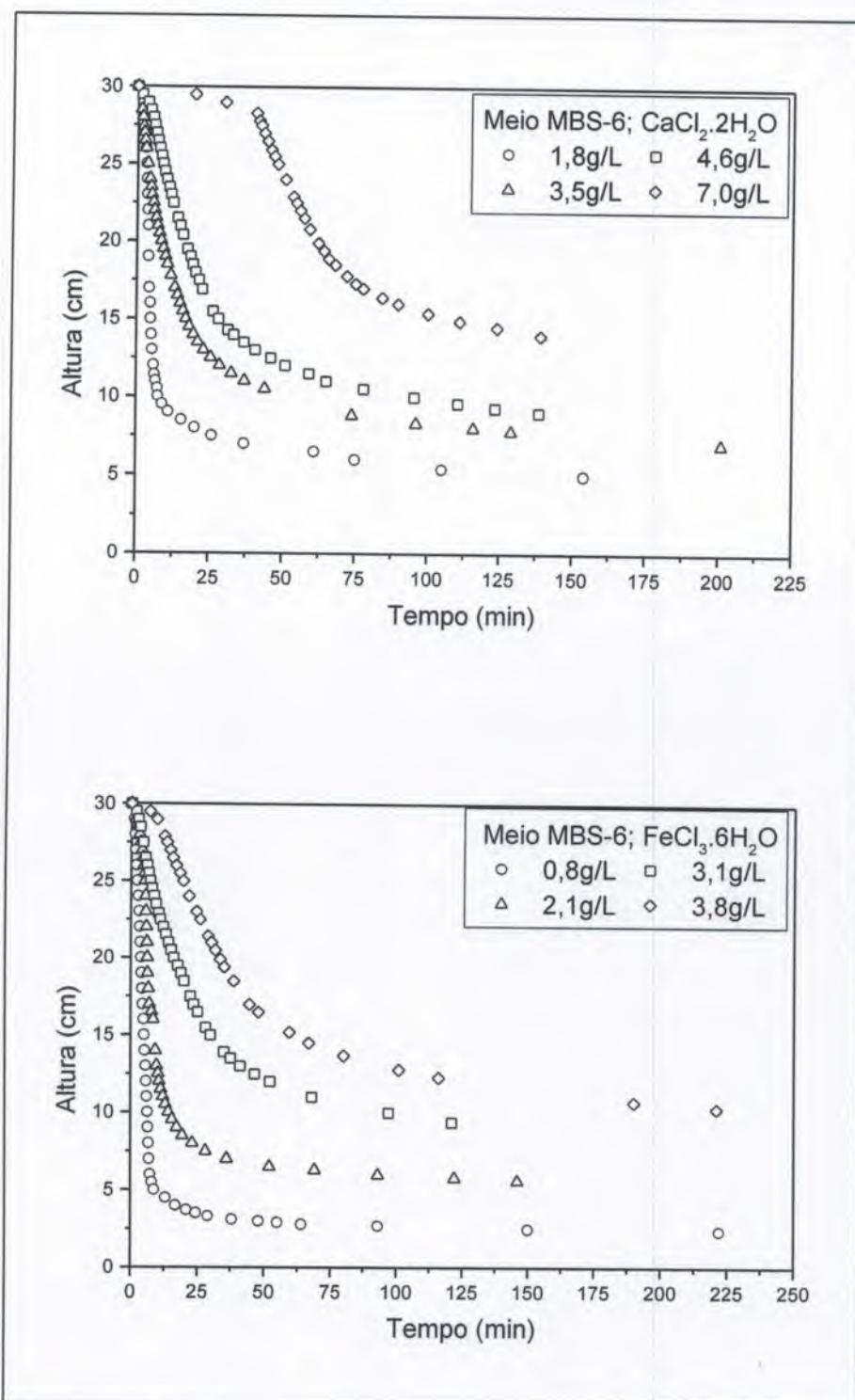


Figura 7.26 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS-6 na presença de 1.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 3.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração de sólidos

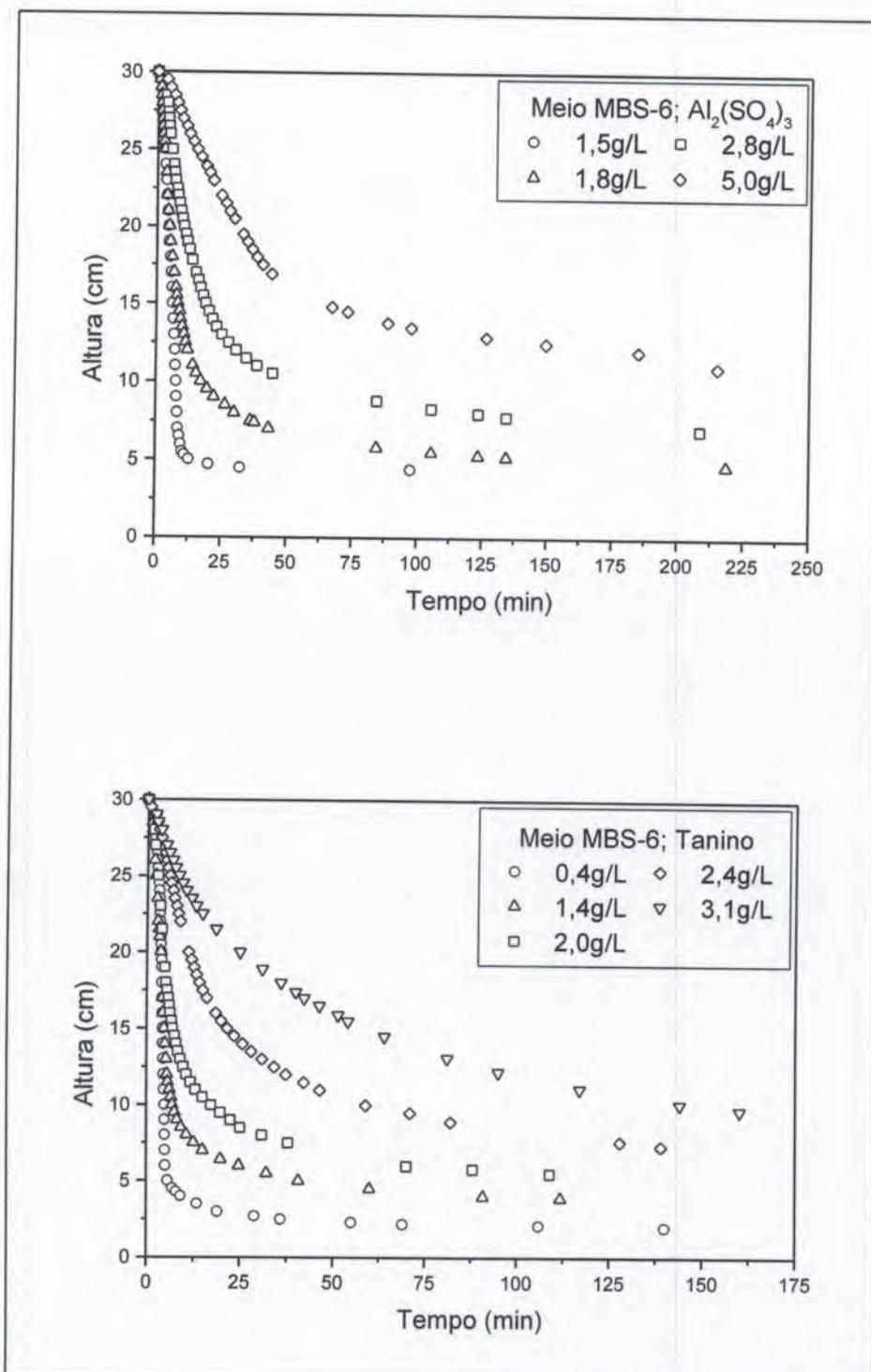


Figura 7.27 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS-6 na presença de 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 1.700ppm de tanino de acordo com a concentração de sólidos

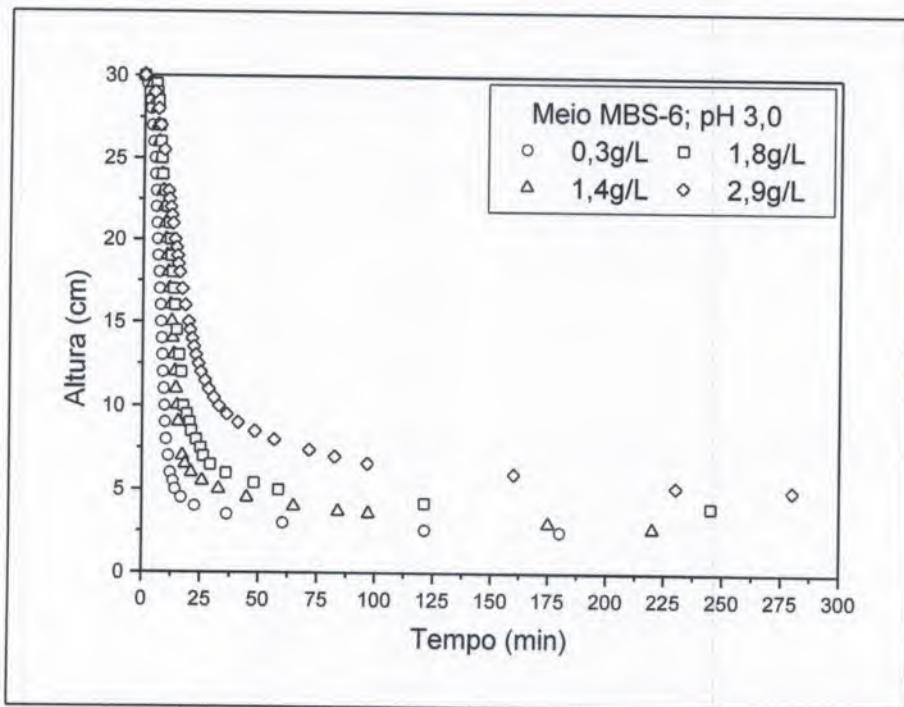


Figura 7.28 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. sphaericus* em meio MBS-6 a pH 3,0 de acordo com a concentração de sólidos

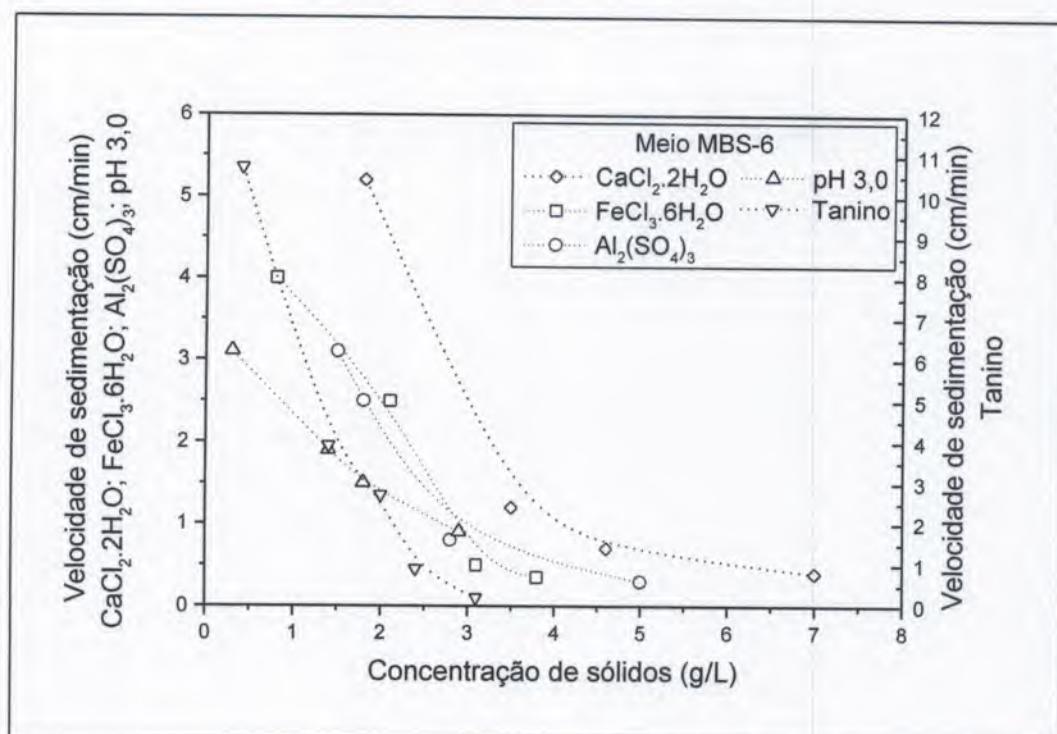


Figura 7.29 – Velocidades de sedimentação das suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS-6 de acordo com a concentração de sólidos

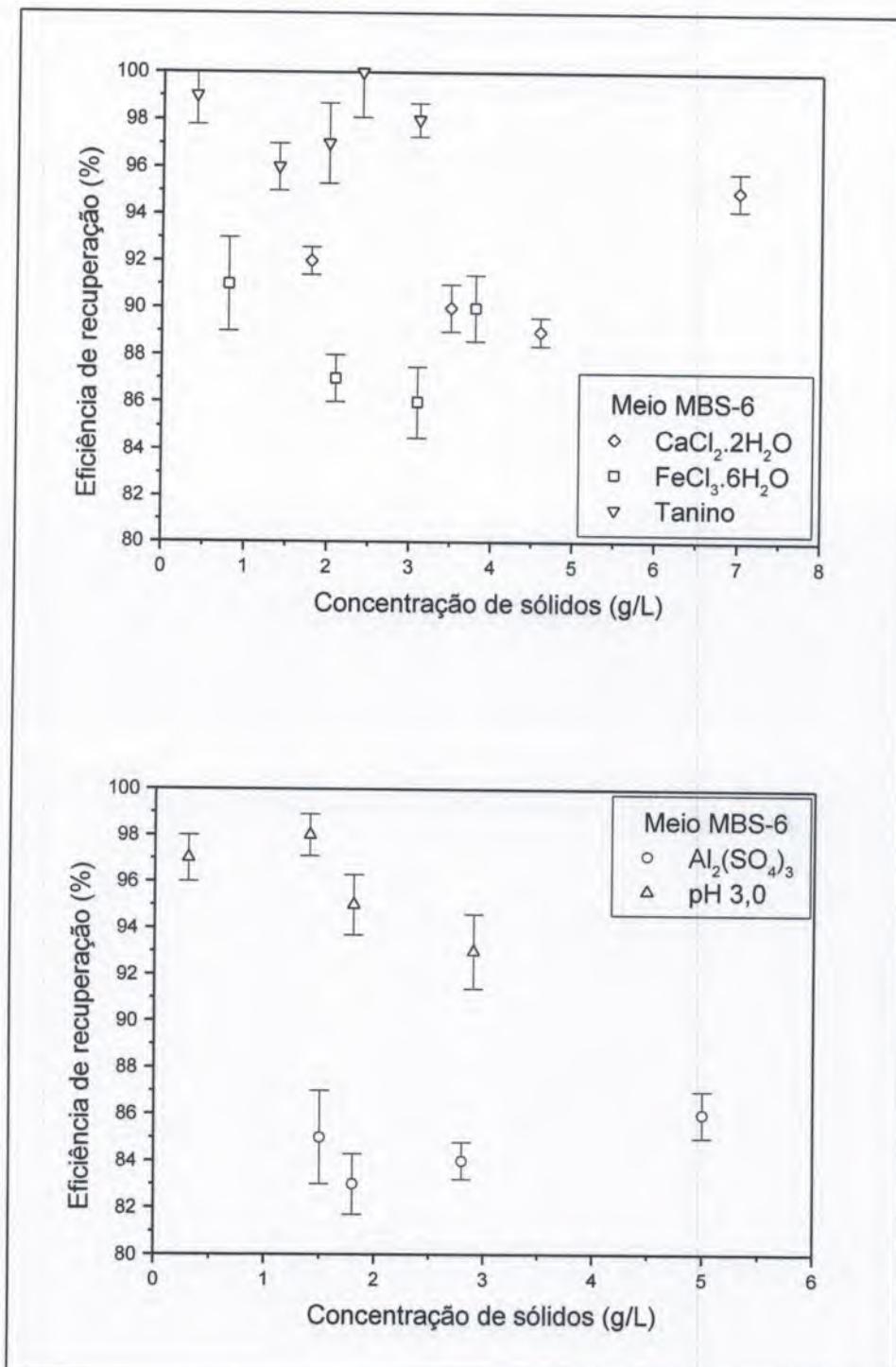


Figura 7.30 – Eficiência de recuperação das suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS-6 de acordo com a concentração de sólidos

7.4.2- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

a) Meio UG

As Figuras 7.31, 7.32 e 7.33 mostram as curvas de sedimentação dos flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG na presença de 2.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 400ppm de tanino e a pH 3,0, em função da concentração de sólidos em suspensão. As máximas velocidades de sedimentação dos flocos são mostradas na Figura 7.34.

Os flocos com tanino apresentaram as maiores velocidades (9,5 a 4,1cm/min) dentro na faixa de concentração de sólidos estudada (1,8 a 5,0g/L). Estas partículas, apesar de possuírem um diâmetro um pouco menor que os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, apresentam a maior densidade dentre os flocos formados neste meio de cultivo, correspondendo a $1,071\text{g/cm}^3 \pm 0,005\text{g/cm}^3$.

Em seguida, sedimentações mais rápidas são observadas para os flocos a pH 3,0, atingindo o valor máximo de 7,2cm/min para 1,1g/L. Os valores decrescem com o aumento da concentração de sólidos, chegando a 0,7cm/min para 16,7g/L. Os flocos a pH 3,0 são os de menor tamanho ($162,2\mu\text{m} \pm 21,4\mu\text{m}$); contudo, apresentam maior densidade que os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Valores intermediários são obtidos para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, onde a velocidade cai rapidamente de 6,7 a 1,1cm/min no intervalo de concentrações entre 1,4 e 6,3g/L.

Os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresentaram as menores velocidades de sedimentação e os menores valores de densidade ($1,030\text{g/cm}^3$), com maior valor de velocidade de cerca de 4,6cm/min para concentrações de 0,9g/L e 1,5g/L, respectivamente.

A Figura 7.35 mostra os percentuais de recuperação para as sedimentações das suspensões floculentas. Os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sedimentam com eficiências de recuperação que variam entre 82 e 90%, enquanto que índices um pouco maiores foram obtidos para os flocos com tanino (85 a 97%). Os resultados de recuperação para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e a pH 3,0 variaram entre 92-96%, 93-100% e 94-99%, respectivamente.

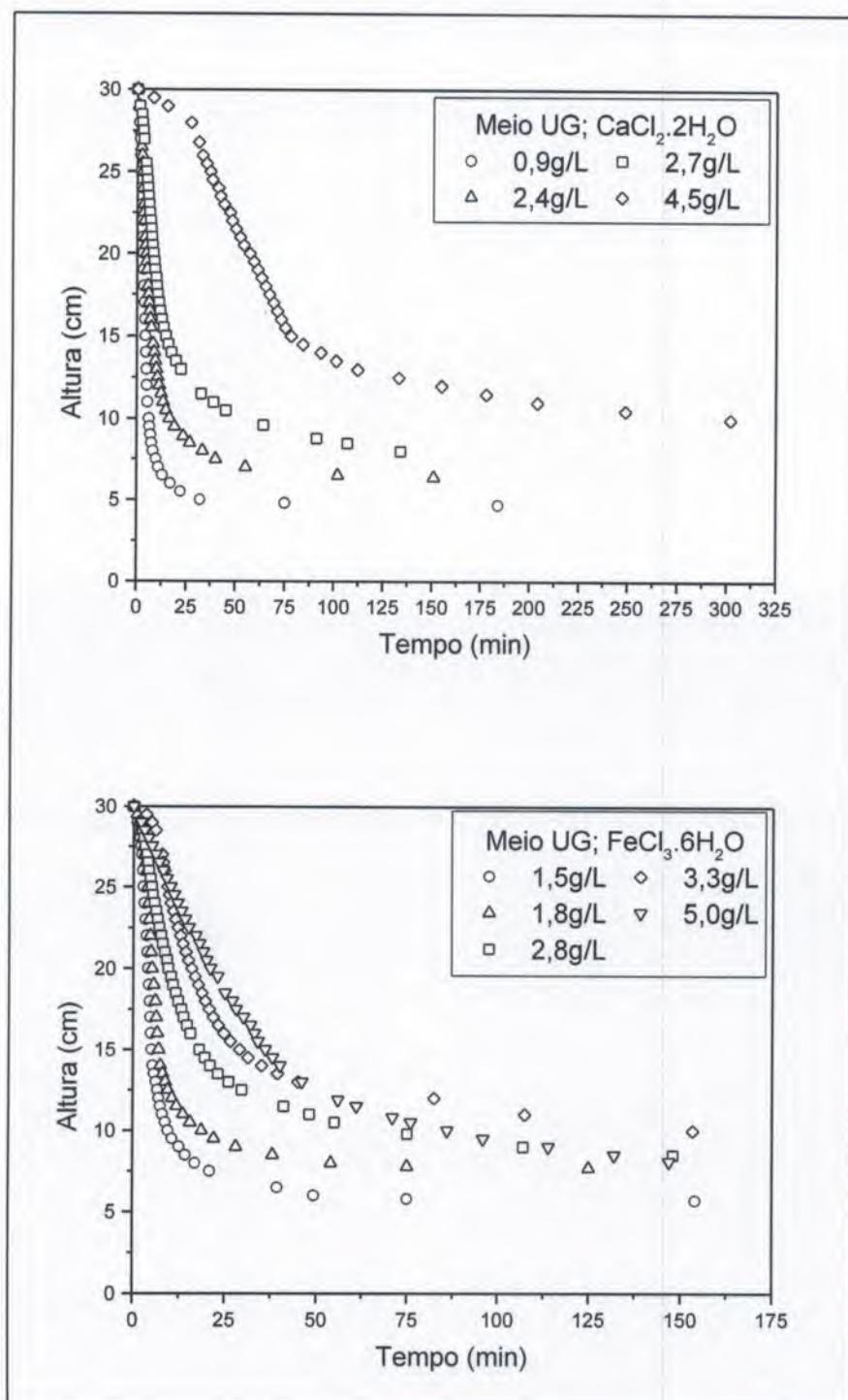


Figura 7.31 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG na presença de 2.000ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 1.000ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração celular

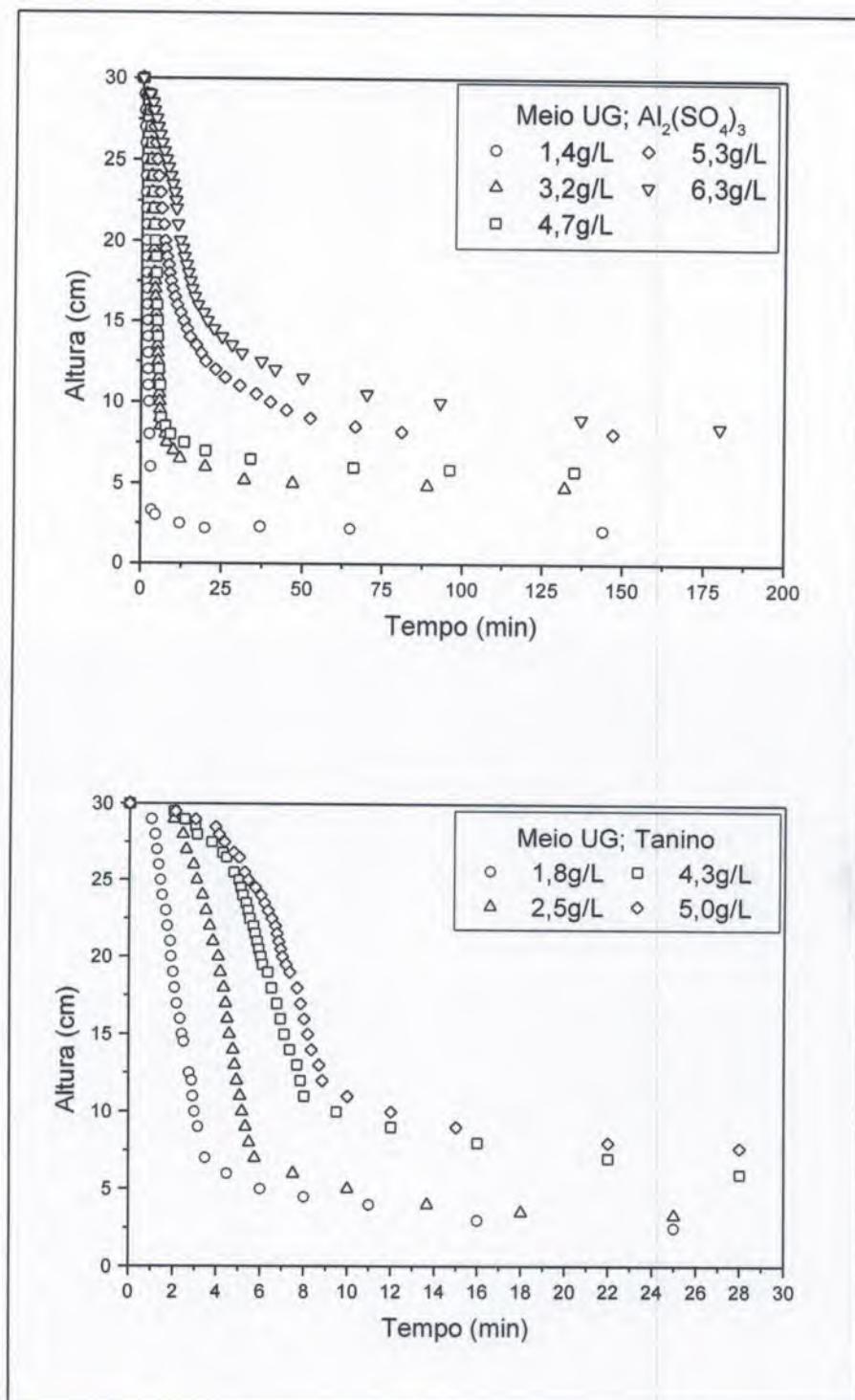


Figura 7.32 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG na presença de 2.000ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 400ppm de tanino de acordo com a concentração celular

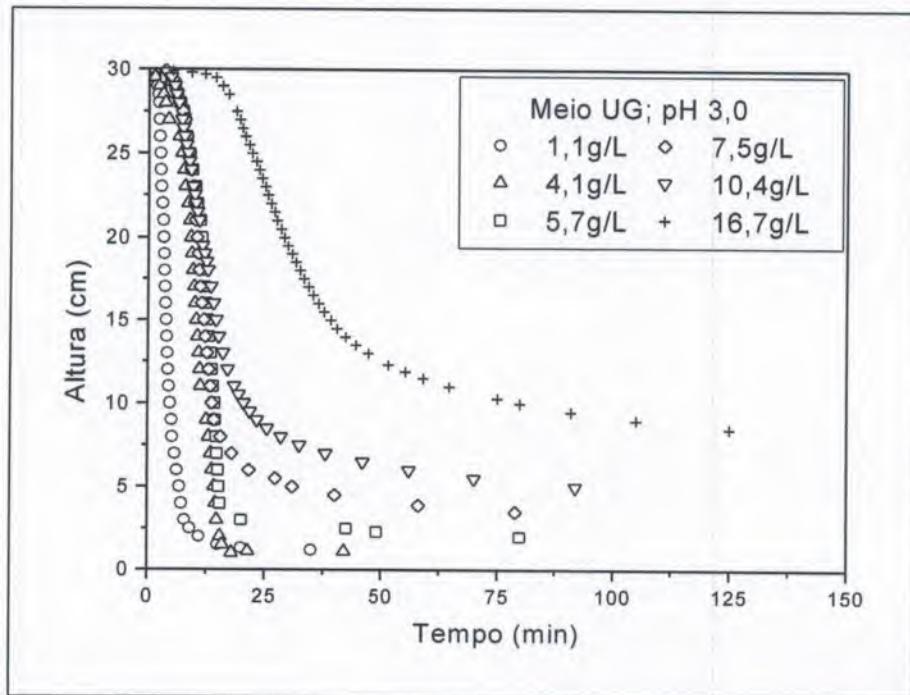


Figura 7.33 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG a pH 3,0 de acordo com a concentração celular

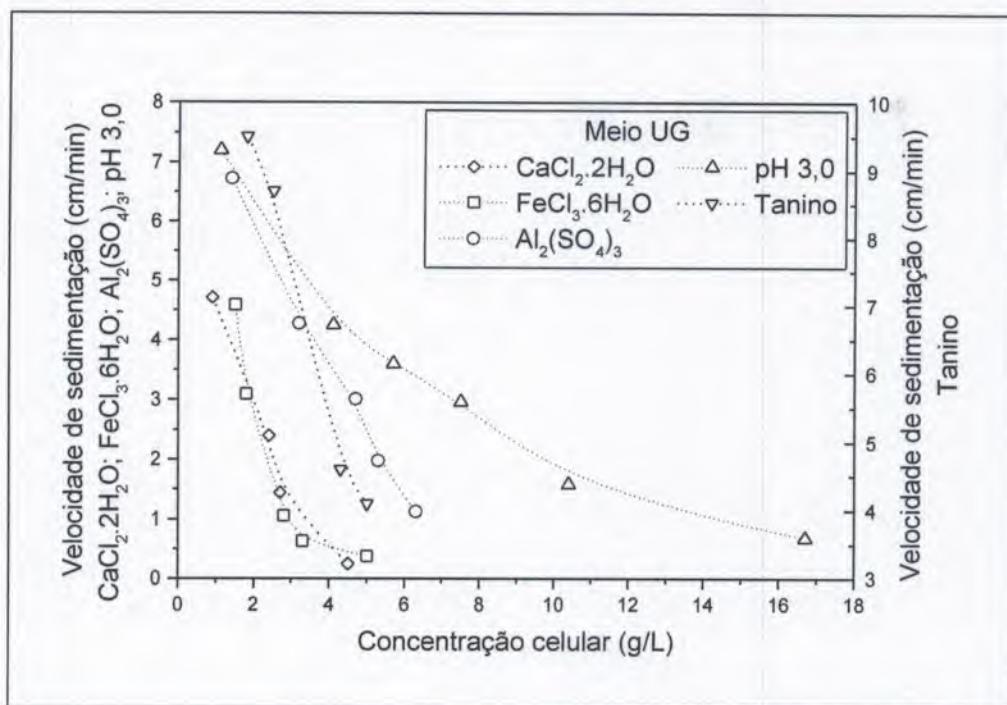


Figura 7.34 – Velocidades de sedimentação das suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG de acordo com a concentração celular

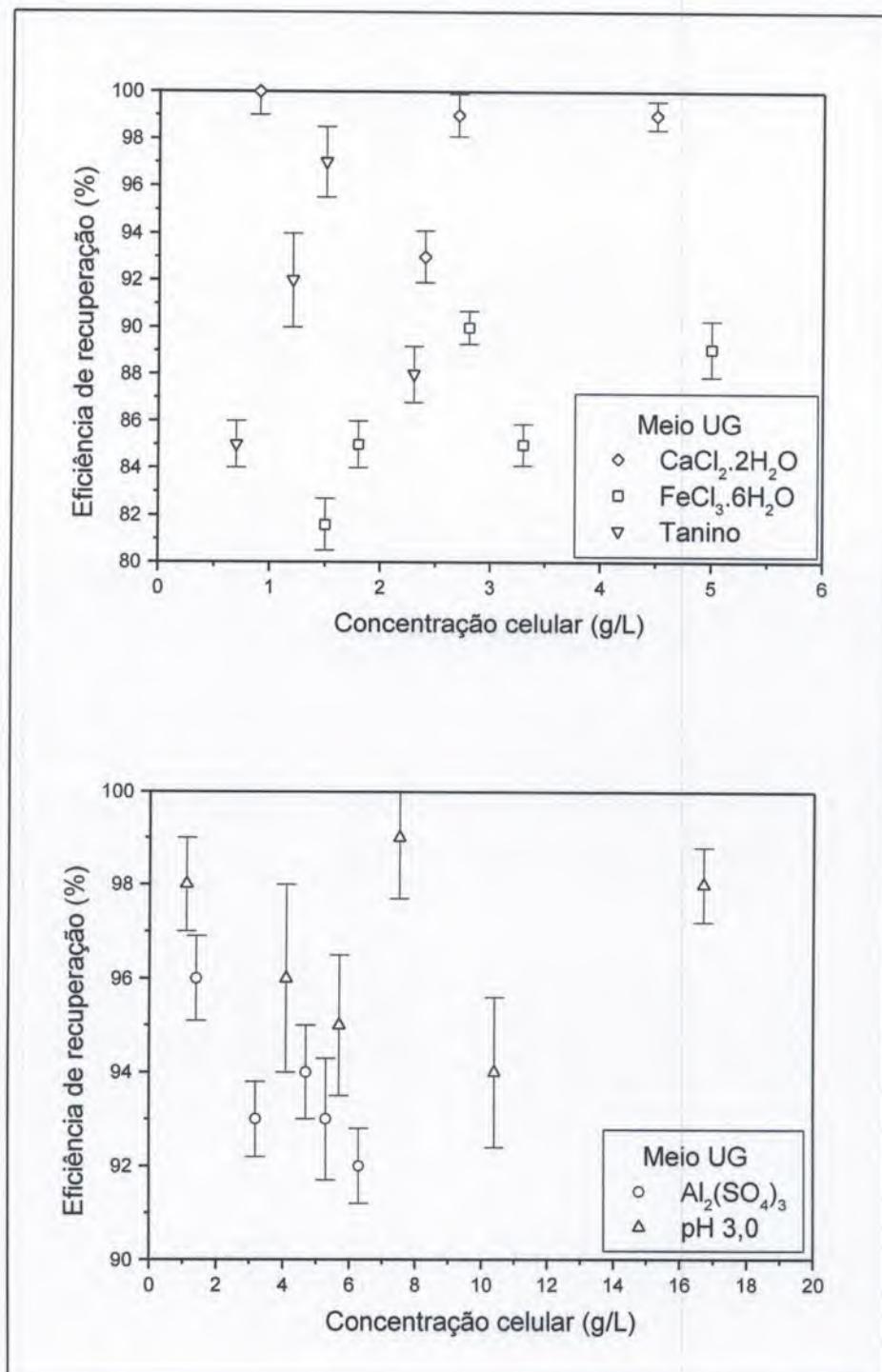


Figura 7.35 – Eficiência de recuperação das suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG de acordo com a concentração celular

b) Meio MBti-Glicose

As curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose na presença de 2.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.500ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 1.000ppm de tanino e a pH 3,0 são mostradas nas Figuras, 7.36, 7.37 e 7.38. A Figura 7.39 mostra as máximas velocidades de sedimentação.

Dentre os sistemas floculentos estudados, os flocos com tanino sedimentam mais rapidamente até uma concentração de sólidos de cerca de 4g/L, atingindo a maior velocidade máxima de sedimentação de 6,6cm/min para uma concentração de 2,1g/L. Para suspensões mais concentradas que 4g/L, os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tendem a apresentar velocidades um pouco maiores.

Em seguida, sedimentações mais rápidas são obtidas para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (4,4 a 0,07cm/min para concentrações entre 2,2 e 6,0g/L) e a pH 3,0 (3,1 a 0,16cm/min para concentrações entre 2,9 e 6,5g/L), com perfis de velocidades muito semelhantes entre si.

As menores velocidades são observadas para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,8 a 0,2cm/min para concentrações de 1,3 a 4,5g/L).

Estes resultados podem ser correlacionados com os valores de densidade e diâmetro. Os flocos com tanino apresentaram o maior valor para a densidade ($1,063\text{g/cm}^3 \pm 0,038\text{g/cm}^3$), com diâmetro de $286,4\mu\text{m} \pm 38,3\mu\text{m}$. As partículas com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ possuem uma densidade menor ($1,036\text{g/cm}^3 \pm 0,015\text{g/cm}^3$) mas um tamanho maior ($295,0\mu\text{m} \pm 25,6\mu\text{m}$).

Os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentam a menor densidade ($1,023\text{g/cm}^3 \pm 0,015\text{g/cm}^3$), mas o maior diâmetro ($313,9\mu\text{m} \pm 21,9\mu\text{m}$). Estes possuem perfil de sedimentação semelhante aos flocos a pH 3,0, que tiveram o menor diâmetro dentre todos os sistemas floculentos ($202,3\mu\text{m} \pm 6,4\mu\text{m}$), mas uma densidade inferior apenas ao valor da densidade dos flocos com tanino ($1,054\text{g/cm}^3 \pm 0,055\text{g/cm}^3$).

Por fim, os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,037\text{g/cm}^3 \pm 0,018\text{g/cm}^3$; $267,4\mu\text{m} \pm 31,3\mu\text{m}$), apesar de possuírem densidade equivalente à densidade dos flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e serem mais densos que os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, possuem o segundo menor diâmetro dentre todos os casos, superando apenas os flocos a pH 3,0.

Os percentuais de recuperação indicados na Figura 7.40 foram de 77-86% para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 86-92% com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 90-95% para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 97-99% a pH 3,0 e de 96-100% para as suspensões floculentas com tanino.

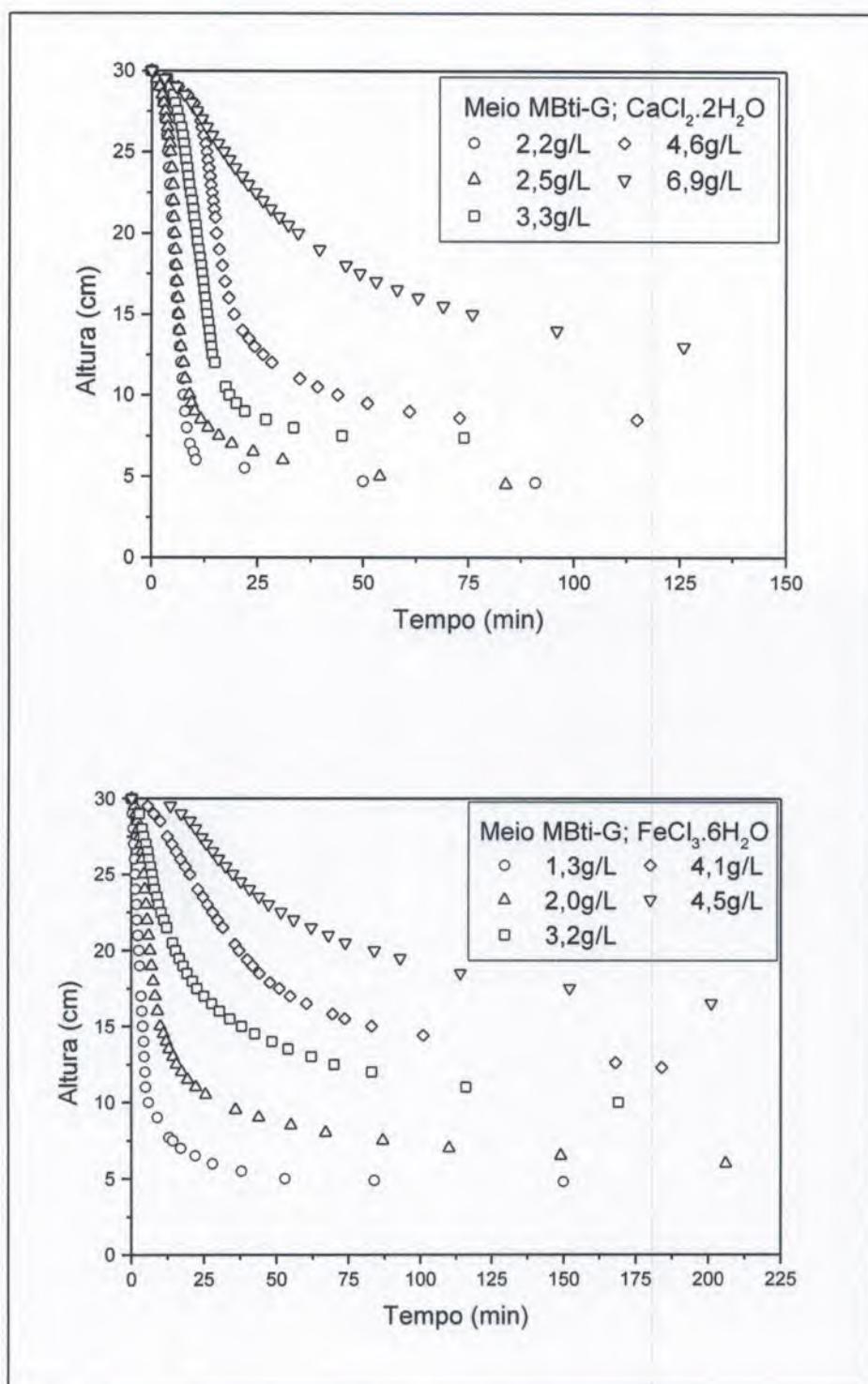


Figura 7.36 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose na presença de 2.500ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 2.500ppm de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração de sólidos

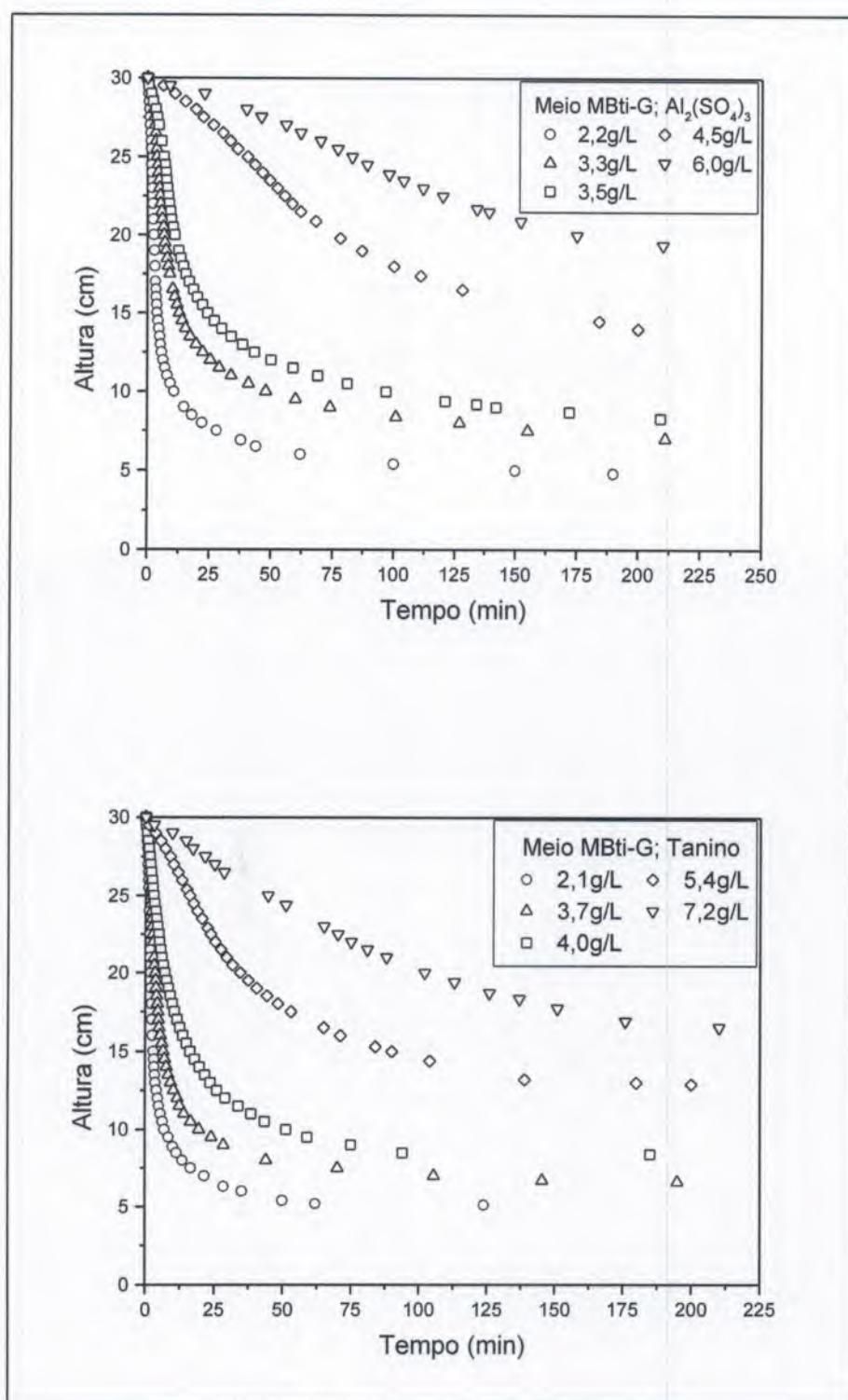


Figura 7.37 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose na presença de 3.500ppm de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e de 1.000ppm de tanino de acordo com a concentração de sólidos

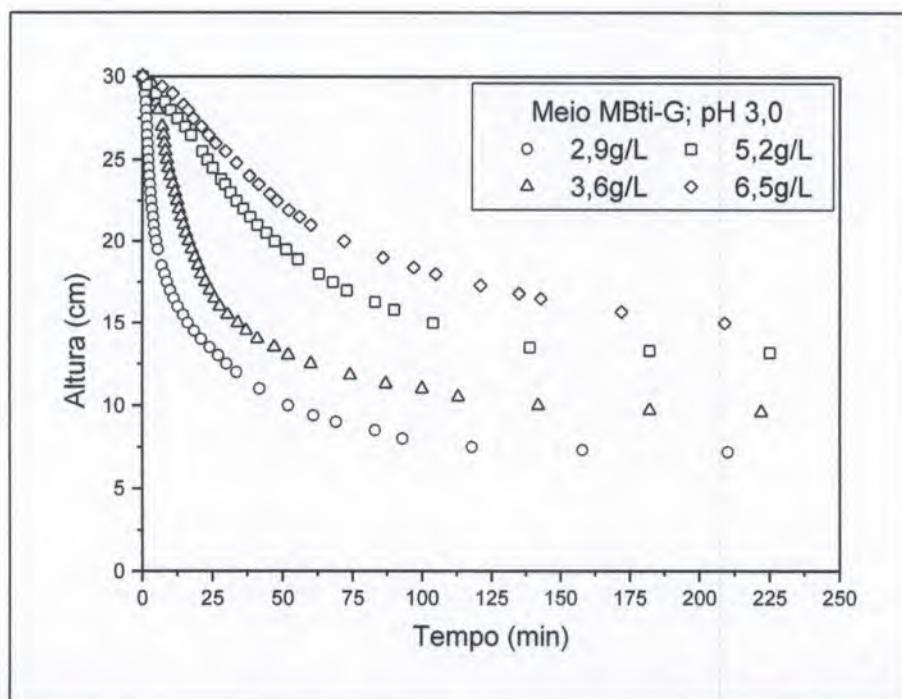


Figura 7.38 – Curvas de sedimentação de flocos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* a pH 3,0 de acordo com a concentração de sólidos

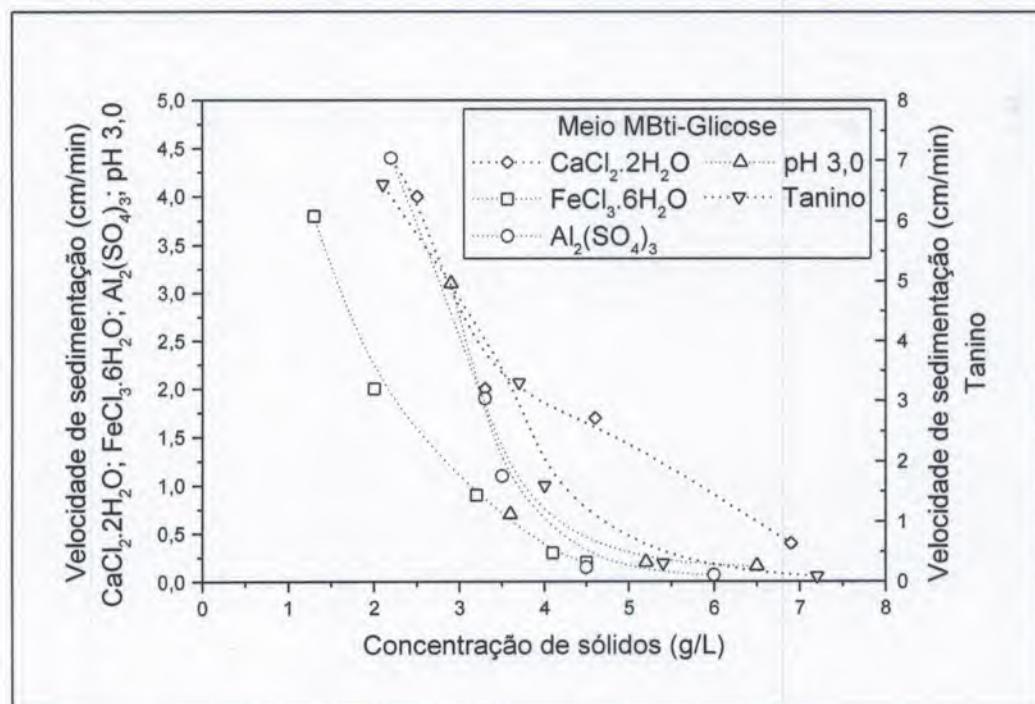


Figura 7.39 – Velocidades de sedimentação das suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose de acordo com a concentração de sólidos

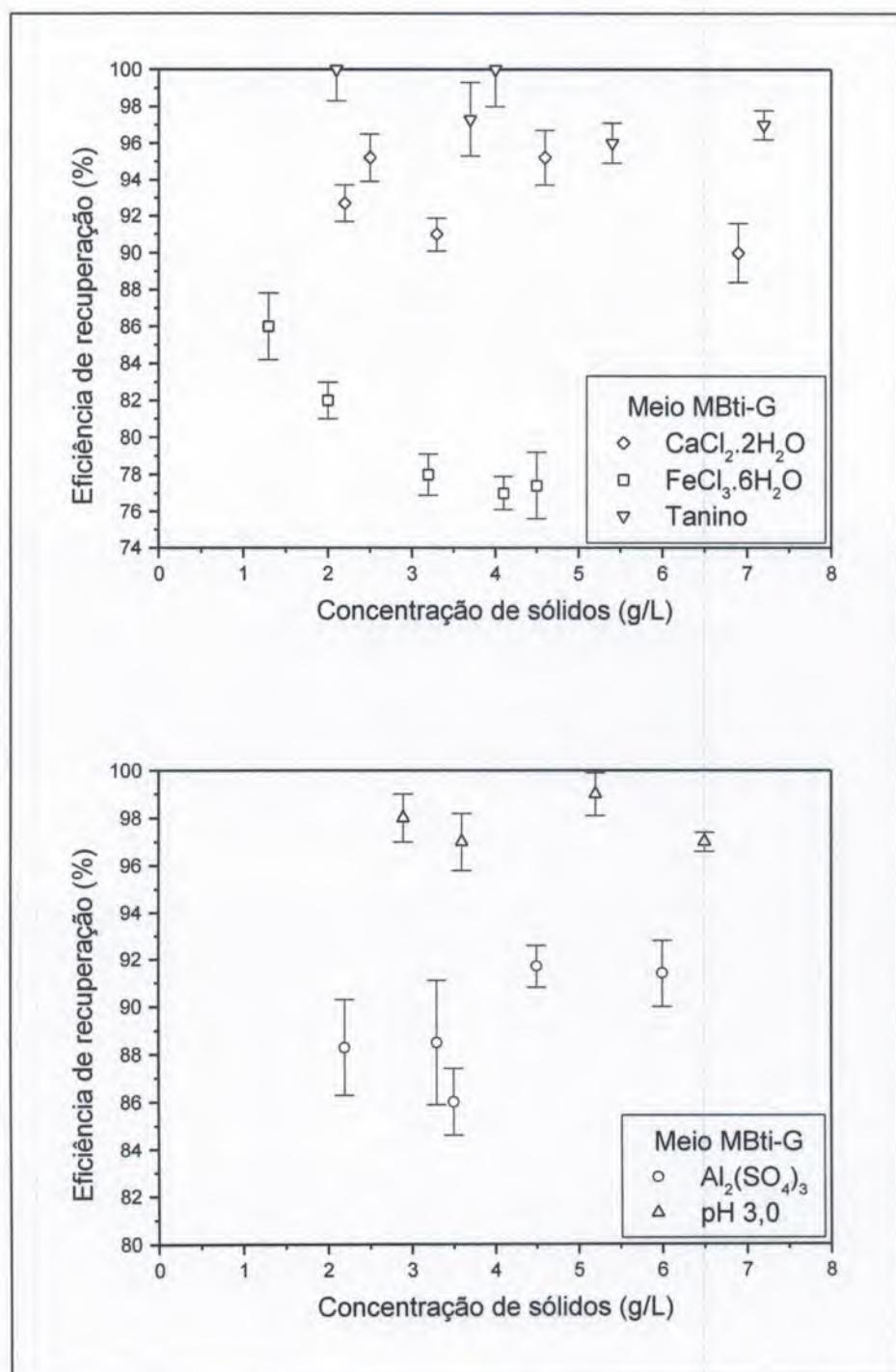


Figura 7.40 – Eficiência de recuperação das suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose de acordo com a concentração de sólidos

7.4.3- Considerações Gerais sobre os Resultados de Sedimentação

Os resultados indicam que a concentração celular e o tipo de floculante influenciam a característica de sedimentação dos flocos, sendo observadas sedimentações mais lentas com o aumento da concentração de partículas em suspensão.

A avaliação da velocidade de sedimentação é de fundamental importância no estudo da separação sólido-fluido. Quando uma suspensão de sólidos é submetida ao processo de sedimentação, a força gravitacional leva as partículas a sedimentarem de várias maneiras, dependendo das características da suspensão. Se a concentração dos sólidos é muito baixa, cada partícula se move separadamente, sendo o movimento exclusivamente devido à força gravitacional; enquanto que em suspensões concentradas a velocidade é influenciada pela interação entre as partículas, sendo uma função da concentração de sólidos.

As Figuras 7.41 e 7.42 mostram a relação entre as máximas velocidades de sedimentação para as suspensões floculentas de *B. sphaericus* e de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, respectivamente, de acordo com o tipo de floculante e o meio de cultivo empregado.

Para suspensões de *B. sphaericus* com concentrações equivalentes a $3,21\text{g/L} \pm 0,41\text{g/L}$, a maior velocidade máxima de sedimentação foi observada para os flocos com tanino em meio MBS (9,4cm/min), muito superior a todos os demais sistemas floculentos. Este valor foi cerca de 10 vezes maior que a velocidade para este floculante em meio MBS-6, indicando uma maior influência dos componentes do meio de cultivo na formação dos flocos com tanino, o que pode ser verificado na diferença entre os diâmetros obtidos ($208,0\mu\text{m} \pm 10,0\mu\text{m}$ para MBS e $157,8\mu\text{m} \pm 29,6\mu\text{m}$ para MBS-6).

As velocidades máximas observadas para os demais floculantes variaram pouco em função do meio de cultivo, e maiores valores foram observados para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e a pH 3,0 em MBS-6, e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ em MBS. Velocidades correspondentes a 0,5cm/min foram obtidas para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em ambos os meios.

Como mostra a Figura 7.42, para suspensões de *B. thuringiensis* var. *israelensis* com concentrações em torno de $3,76\text{g/L} \pm 0,46\text{g/L}$, as maiores velocidades máximas de sedimentação foram obtidas para os flocos com tanino (4,6cm/min), $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e a pH 3,0 (4,3cm/min), todas em meio UG. Em seguida, a maior velocidade foi observada para os flocos com tanino em MBti-Glicose, correspondendo a 3,3cm/min.

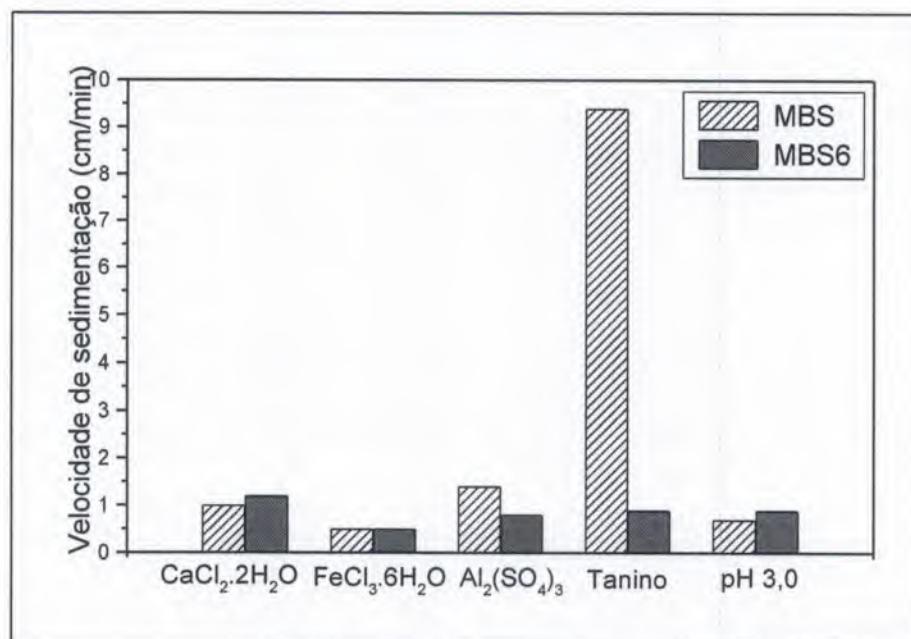


Figura 7.41 – Comparação entre as máximas velocidades de sedimentação para as suspensões floculentas de *B. sphaericus* nos meios MBS e MBS-6
(concentração de 3,21g/L ± 0,41g/L)

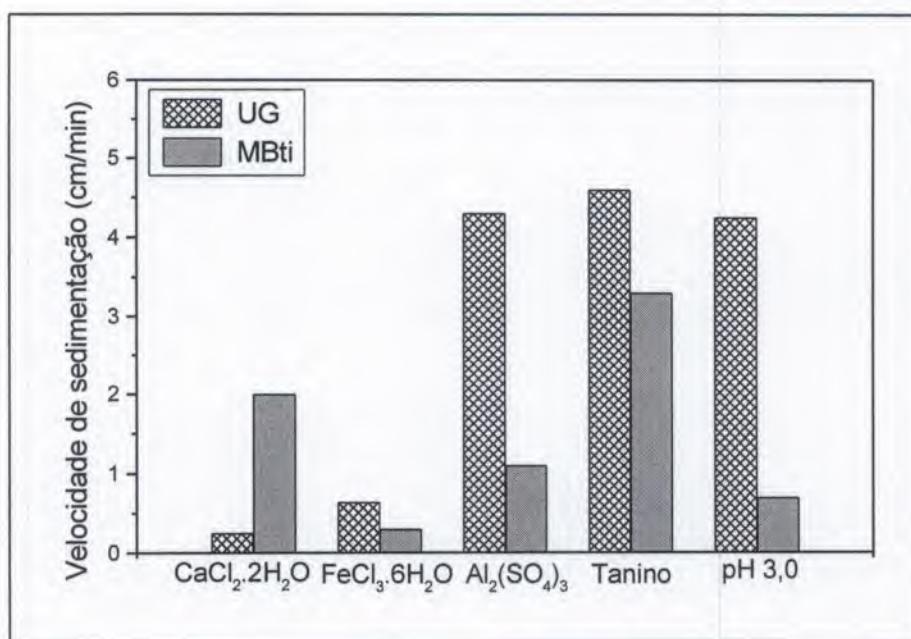


Figura 7.42 – Comparação entre as máximas velocidades de sedimentação para as suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios UG e MBti-Glicose
(concentração de 3,76g/L ± 0,46g/L)

Comparando-se os valores de velocidade para um mesmo floculante, o meio MBti-Glicose apresentou uma maior velocidade apenas quando foi utilizado o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, atingindo o valor de 2cm/min.

Dentre todos os testes de sedimentação realizados, destacam-se aqueles onde foram utilizados o floculante tanino para *B. sphaericus* em meio MBS e *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG. Nestes casos, para as faixas de concentrações ensaiadas (2,5 - 11,8g/L para MBS e 1,8 - 5,0g/L para UG), as sedimentações já eram completas após 8 e 10min para os meios MBS e UG, respectivamente.

As sedimentações se mostraram dependentes do tipo de microrganismo, meio de cultivo e do agente floculante utilizado. As diferenças existentes entre o tamanho dos flocos e densidade também contribuíram para as variações nos perfis de sedimentação. De acordo OSBORNE (1981), o tamanho dos flocos e a velocidade de sedimentação de suspensões floculentas depende do tipo de floculante utilizado e do seu mecanismo de adsorção às partículas.

Três metodologias para o cálculo de projeto de sedimentadores contínuos, baseadas nos trabalhos de COE e CLEVENGER (1916), KYNCH (1952) e TILLER e CHEN (1988), foram discutidas por DAMASCENO e MASSARANI (1993).

Como visto no Capítulo 3, o primeiro método considera que a velocidade de sedimentação independe da concentração inicial de sólidos no ensaio em batelada. A metodologia de Kynch é mais realista por considerar este efeito; entretanto, ambos os métodos baseiam-se na hipótese de formação de sedimentos incompressíveis. O modelo de Kynch, quando aplicado, produz melhores estimativas quanto menos compressível for o sedimento formado. A descrição do processo de sedimentação por TILLER e CHEN (1988) considera o fenômeno da compressão dos sólidos, necessitando de ensaios de permeabilidade e de pressão dos sólidos.

Mesmo considerando que sedimentos floculentos são naturalmente compressíveis, a metodologia de Kynch será utilizada neste trabalho com o objetivo de realizar um estudo comparativo entre as capacidades operacionais do sedimentador contínuo obtidas com as suspensões floculentas investigadas, bem como avaliar o efeito do meio de cultivo sobre os resultados de projeto.

A Figura 7.43 apresenta a curva que relaciona a posição da interface superior (Z) com o tempo (t) durante um ensaio de sedimentação em batelada.

De acordo com KYNCH (1952), a velocidade de sedimentação das partículas na interface e a concentração são dadas pelas Equações 7.1 e 7.2, respectivamente:

$$v_s = \frac{Z_i - Z}{t} \quad (7.1)$$

$$C = \frac{C_0 \times Z_0}{Z_i} \quad (7.2)$$

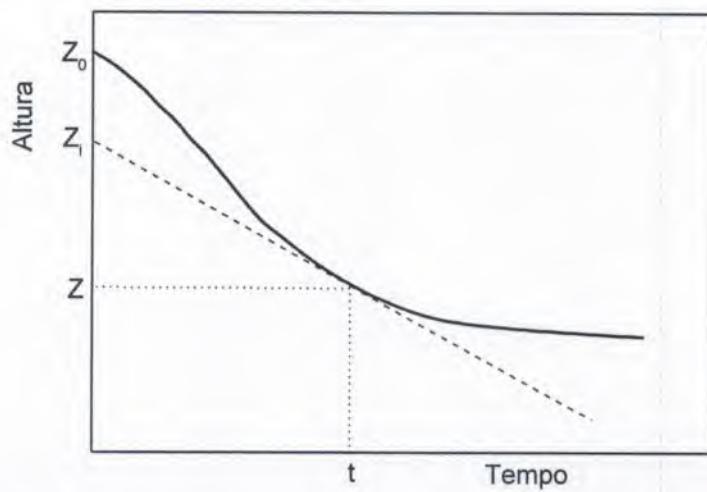


Figura 7.43 – Curva de sedimentação em proveta e os parâmetros utilizados no projeto de sedimentadores de acordo com KYNCH (1952)

onde:

v_s – velocidade de sedimentação [LT^{-1}]

Z_i – interseção da tangente à curva de sedimentação em proveta com o eixo dos Z , num instante t qualquer [L]

Z – posição da interface no instante de tempo t [L]

C – concentração de sólidos [ML^{-3}]

C_0 – concentração de sólidos na alimentação [ML^{-3}]

Z_0 – altura da coluna de suspensão [L]

A Figura 7.44 ilustra um esquema de um sedimentador contínuo operando em regime permanente. Na ausência de sólidos no efluente clarificado, o balanço volumétrico de sólidos é dado pela Equação 7.3:

$$Q_0 \times C_0 = Q \times C = Q_u \times C_u \quad (7.3)$$

onde:

Q_0 – vazão volumétrica da alimentação [L^3T^{-1}]

C_0 – concentração de sólidos na alimentação [ML^{-3}]

Q – vazão volumétrica em um nível arbitrário [L^3T^{-1}]

C – concentração de sólidos em um nível arbitrário [ML^{-3}]

Q_u – vazão volumétrica da lama [L^3T^{-1}]

C_u – concentração de sólidos na lama [ML^{-3}]

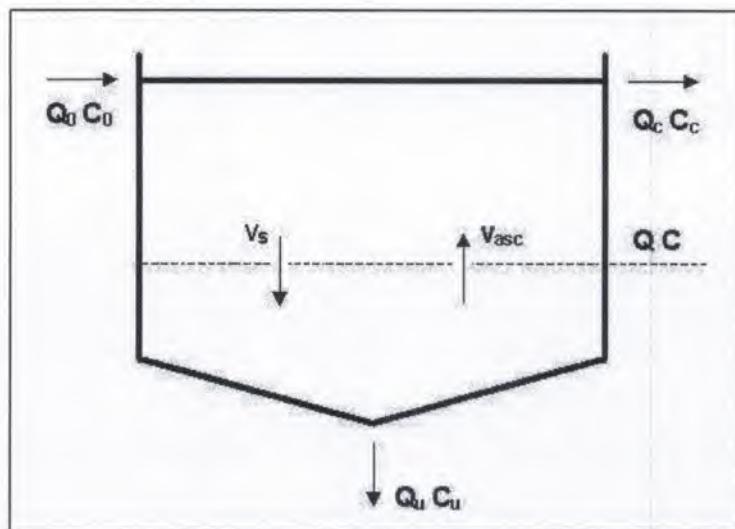


Figura 7.44 – Diagrama de fluxo em um sedimentador contínuo

Para evitar o fluxo de sólidos no overflow, a velocidade de sedimentação dos sólidos (v_s) deve ser maior ou igual à velocidade ascendente de líquido clarificado (v_{asc}), ou seja:

$$v_s \geq v_{asc} = \frac{Q_{asc}}{A} = \frac{(Q - Q_u)}{A} \quad (7.4)$$

onde:

Q_{asc} – vazão volumétrica ascendente de líquido clarificado [L^3T^{-1}]

A – área da seção transversal do sedimentador [L^2]

Combinando as Equações 7.3 e 7.4, tem-se que a velocidade é dada por:

$$v_s = \frac{Q_0 \times C_0}{A} \times \left[\frac{1}{C} - \frac{1}{C_u} \right] \quad (7.5)$$

A máxima quantidade de sólidos (por unidade de área) alimentados em cada camada horizontal de um sedimentador contínuo, operando em regime permanente, é dada por:

$$q_{SO} = \frac{Q_0 \times C_0}{A} \quad (7.6)$$

Combinando as Equações 7.5 e 7.6, tem-se:

$$q_{SO} = \frac{v_s}{\left[\frac{1}{C} - \frac{1}{C_u} \right]} \quad (7.7)$$

onde:

q_{SO} – fluxo de sólidos [$MT^{-1}L^{-2}$]

A área do sedimentador deve ser calculada para o mínimo valor de q_{SO} . Ou seja, o fluxo de projeto corresponde ao menor valor de q_{SO} obtido quando são substituídos os pontos (v_s, c) calculados a partir da curva de sedimentação em proveta com concentração C_0 . Após substituição das Equações 7.1 e 7.2 na Equação 7.7 e diferenciação em relação ao tempo, obtém-se o fluxo operacional mínimo (q_S)_{op}, dado pela Equação 7.8:

$$(q_S)_{op} = \frac{C_0 \times Z_0}{t^*} \quad (7.8)$$

onde t^* é o tempo transcorrido no ensaio em proveta para que a posição da interface clarificada seja dada por:

$$Z^* = Z_0 \times \frac{C_0}{C_u} \quad (7.9)$$

A capacidade do projeto (F/A) pode então ser expressa pela Equação 7.10:

$$\frac{F}{A} = \frac{(q_S)_{op}}{C_0} = \frac{Z_0}{t^*} \quad (7.10)$$

onde:

F – vazão volumétrica da suspensão na alimentação [L^3T^{-1}]

F/A – capacidade operacional do sedimentador [LT^{-1}]

DAMASCENO e MASSARANI (1990) estudaram o efeito da altura da coluna de suspensão no ensaio em proveta sobre o projeto de sedimentadores para suspensões pouco compressíveis (suspensões aquosas de $Ca(OH)_2$, barita ($BaSO_4$) e $CaCO_3$). Os autores verificaram que para concentrações superiores a 1%, o parâmetro (F/A) é uma função decrescente de Z_0 e de C_u .

O cálculo de projeto do sedimentador contínuo foi realizado utilizando-se os resultados das curvas de sedimentação com concentrações de partículas próximas às concentrações de final de fermentação para ambas as bactérias (*B. sphaericus*: meio MBS - 2,33g/L e meio MBS-6 - 4,80g/L; *B. thuringiensis* var. *israelensis*: meio UG - 3,54g/L e meio MBti-Glicose - 4,60) com o objetivo de simular a concentração de alimentação no sedimentador. Para isto, foram realizados alguns ensaios adicionais de sedimentação em batelada.

As Figuras 7.45 a 7.48 mostram as curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas estudadas.

Os resultados das sedimentações de *B. sphaericus* em meio MBS mostram que os maiores valores de capacidade operacional foram verificados para os flocos com tanino, indicando que a suspensão pode ser concentrada em até 9,5 vezes para uma capacidade correspondente a 6,31cm/min (Figura 7.45). PUGET et al. (1999) verificaram que suspensões da bactéria *Zymomonas mobilis* floculadas com tanino poderiam ser concentradas em até 12 vezes para um valor de capacidade equivalente a 5,0cm/min.

Perfis semelhantes foram observados para os flocos com $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e $Al_2(SO_4)_3$, atingindo valor intermediário de capacidade de 2cm/min para concentrar a suspensão em apenas 2,5 vezes, seguindo-se dos flocos com $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e a pH 3,0. Estes apresentaram valores de capacidade equivalentes a 1,36 e 1,14cm/min para a mesma razão de concentração.

A Figura 7.46 mostra as curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS-6.

Foram obtidos valores de capacidade inferiores aos observados para o meio MBS, o que era esperado em virtude das maiores concentrações de alimentação para as suspensões neste meio de cultivo. Para concentrar a suspensão em valor inferior a 2,5 vezes, os maiores valores de capacidade foram obtidos para os flocos com

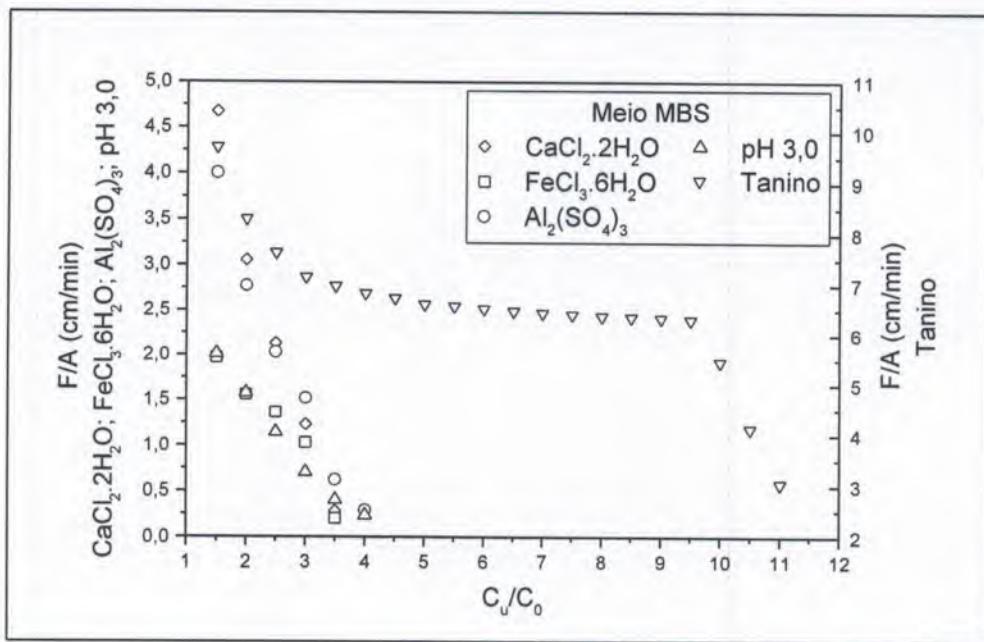


Figura 7.45 – Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS (CaCl₂·2H₂O - 2,5g/L; FeCl₃·6H₂O - 2,7g/L; Al₂(SO₄)₃ - 2,1g/L; pH 3,0 - 2,6g/L; tanino - 2,5g/L)

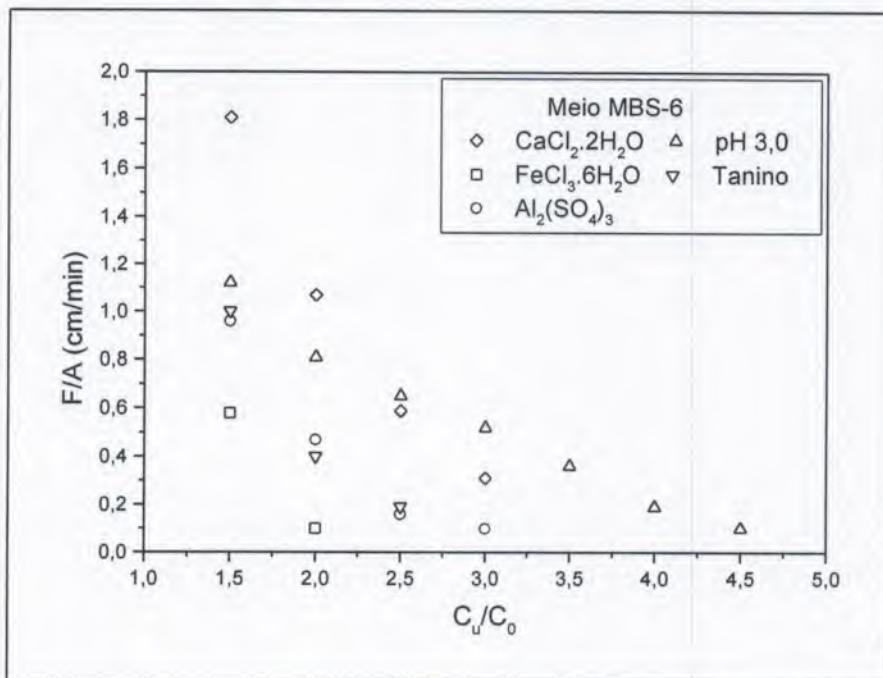


Figura 7.46 – Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS-6 (CaCl₂·2H₂O - 4,6g/L; FeCl₃·6H₂O - 4,8g/L; Al₂(SO₄)₃ - 5,0g/L; pH 3,0 - 4,2g/L; tanino - 4,4g/L)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Para maiores razões de concentração, maiores capacidades foram verificadas para os flocos a pH 3,0; contudo, o maior valor observado foi de apenas 0,52cm/min para uma razão de concentração correspondente a 3,0.

As menores capacidades foram obtidas para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino, seguindo-se das suspensões com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

As Figuras 7.47 e 7.48 mostram as curvas de operação do sedimentador contínuo para as suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios UG e MBti-Glicose, respectivamente.

Para o meio UG, as suspensões de flocos de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentam as maiores capacidades para razões de concentração inferiores a 4, atingindo 4,9cm/min para uma razão C_L/C_A equivalente a 3,5. Os dados apresentam perfil semelhante à curva operacional para os flocos com tanino, com rápido decréscimo nos valores com o aumento da razão de concentração da suspensão.

Para valores de razão de concentração superiores a 4, maiores capacidades são obtidas para a suspensão de flocos a pH 3,0. Nota-se que a suspensão pode ser concentrada em até 12 vezes sem perda significativa na capacidade de operação do equipamento, com valores variando entre 3,8 a 3cm/min neste intervalo.

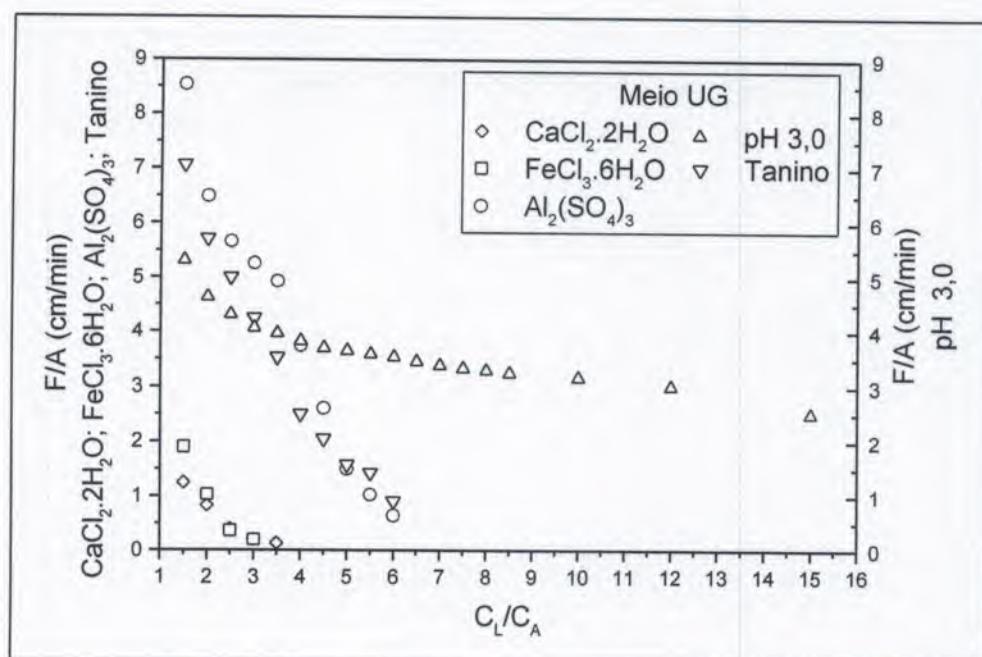


Figura 7.47 – Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 3,8g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3,3g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ - 3,2g/L; pH 3,0 - 3,6g/L; tanino - 3,5g/L)

As menores capacidades são observadas para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os valores decrescem no intervalo de 1,25 a 0,13cm/min com razões de concentração entre 1,5 e 3,5 para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e entre 1,9 a 0,2cm/min com razões de 1,5 a 3 para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Da mesma forma que no caso anterior, menores capacidades foram observadas para as suspensões no meio MBti-Glicose em comparação com o meio UG (Figura 7.48).

Com exceção das razões de concentração de 1,5 e 2, quando a capacidade para os flocos com tanino foi maior (4,3 e 1,9cm/min, respectivamente), valores semelhantes de capacidade operacional foram observados entre este sistema floculento e os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com o aumento da razão de concentração até 3,5. As menores capacidades foram obtidas para os demais flocos em todas as razões de concentração, com valores abaixo de 1cm/min.

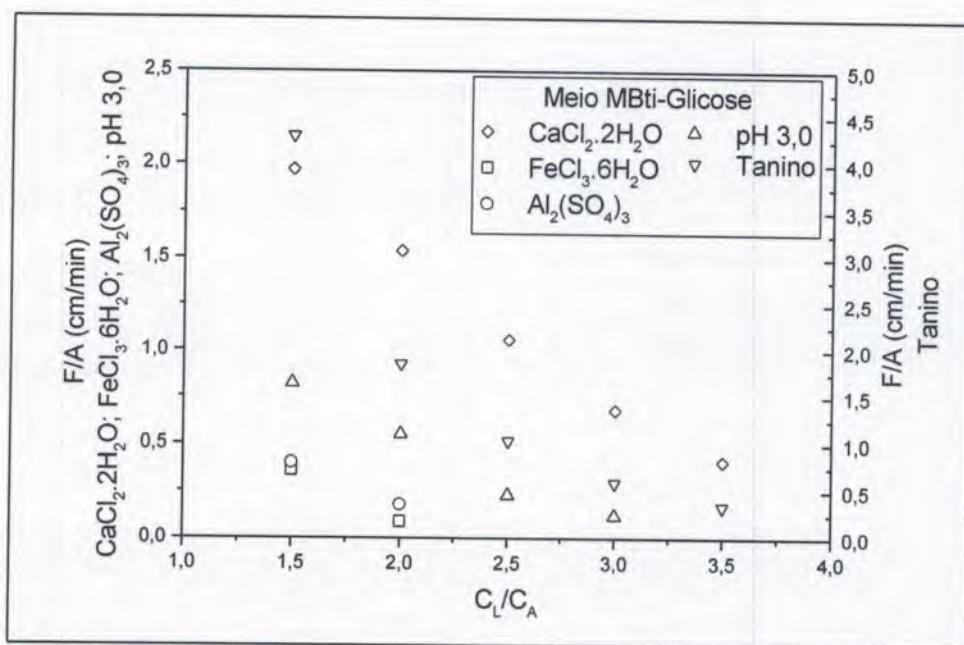


Figura 7.48 – Curvas de capacidade operacional do sedimentador para as suspensões floculentas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 4,6g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 4,5g/L; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ – 4,5g/L; pH 3,0 – 4,4g/L; tanino – 4,0g/L)

7.5- Testes de Flotação de *B. sphaericus*

Os ensaios de flotação com *B. sphaericus* foram realizados em célula mecânica e em coluna, utilizando os caldos fermentados com os meios de cultivo MBS-6 e MBS, respectivamente.

Os caldos fermentados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* não foram submetidos aos testes de separação por flotação pelo fato do cristal protéico não se encontrar associado ao esporo.

7.5.1- Flotação em Célula Mecânica

Com o objetivo de definir os valores de aeração e de agitação mais adequados para os ensaios de flotação, foram realizadas observações do sistema operando com taxas de aeração de 2, 4 e 6L ar/min e rotações variando entre 640 e 1280rpm. Os comentários são mostrados na Tabela 7.6.

As melhores condições de operação foram as que promoviam um sistema em regime turbulento com bolhas uniformes, o que foi observado para valores de aeração de 4 e 6L ar/min e agitações que variavam entre 640 e 1152rpm. Para os ensaios de flotação, foi selecionada a condição de aeração de 6L ar/min, com rotações de 640, 832 e 960rpm.

Tabela 7.6 – Observações da hidrodinâmica do sistema de flotação

Aeração (L ar/min)	Agitação (rpm)	Observação
2	640-704-768-832	regime laminar
4 e 6	640-704-768-832-896-960-1024-1088-1152	regime turbulento; bolhas uniformes
2	896-960-1024-1088-1152	regime turbulento; bolhas de diferentes tamanhos
2, 4 e 6	1216-1280	regime turbulento com arraste de líquido

Uma série de experimentos preliminares foram realizados com o intuito de observar visualmente a ocorrência ou não da flotação das partículas presentes no caldo fermentado, de acordo com a presença do coletor catiônico (amina comercial Flotigan 3135B) e do espumante (tween) a diferentes concentrações, e com a variação do pH do caldo fermentado (Tabela 7.7).

Tabela 7.7 – Testes preliminares de flotação (6L ar/min; 640, 832 e 960rpm)

Concentração do coletor (ppm)	Concentração do espumante (ppm)	pH	Número de experimentos	Observação visual
-	-	8,9 e 7,0	6	Não ocorre formação de espuma; não ocorre flotação
80	-	8,9 e 7,0	6	
120	-	8,9 e 7,0	6	
-	1000	8,9 e 7,0	6	
-	1250	8,9 e 7,0	6	
80	1000	8,9 e 7,0	6	Formação de espuma; aparente flotação

Dentre as condições experimentais mencionadas acima, a única que aparentemente poderia ter ocasionado a separação das partículas foi quando utilizou-se 80ppm do coletor e 1000ppm do espumante. Nos demais casos, não observou-se formação de espuma.

O meio MBS-6, apesar de conter em sua composição elevado teor protéico, não produz espuma suficiente para que o processo de flotação seja realizado, provavelmente devido à adição do antiespumante durante a fermentação. Entretanto, a utilização desta substância em fermentações submersas e aeradas é usual e necessária para evitar uma redução de produtividade do processo fermentativo.

Com base no resultado obtido anteriormente, foram realizados novos ensaios de flotação com menores concentrações do coletor e do espumante, como mostra a Tabela 7.8. Neste caso, a cinética de remoção dos esporos foi avaliada para um maior valor de agitação, correspondente a 960rpm.

Tabela 7.8 – Condições experimentais para os ensaios de flotação (6L ar/min; 960rpm)

Concentração do coletor (ppm)	Concentração do espumante (ppm)	pH	Número de experimentos	Observação visual
40	500	8,9 e 7,0	2	espuma abundante e estável, de coloração clara
80	500	8,9 e 7,0	2	
40	750	8,9 e 7,0	2	
80	750	8,9 e 7,0	2	
40	1000	8,9 e 7,0	2	
80	1000	8,9 e 7,0	2	

Os resultados das concentrações residuais de esporos ao longo do tempo são mostrados nas Figuras 7.49 e 7.50.

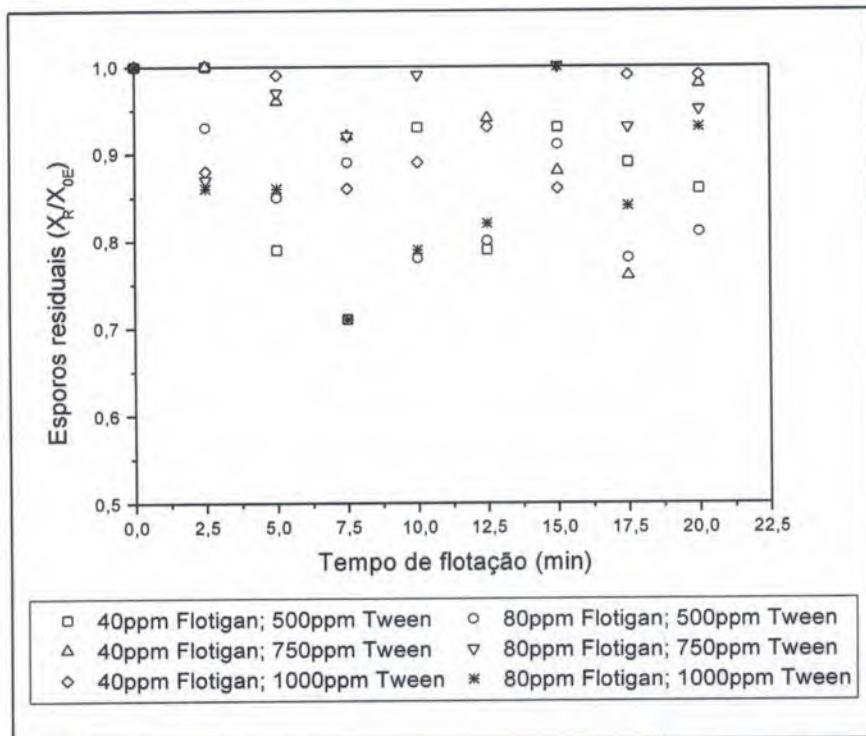


Figura 7.49 – Fração de esporos residuais de *B. sphaericus* em função do tempo de flotação em meio MBS-6 (960rpm; 6L ar/min; pH 8,9).

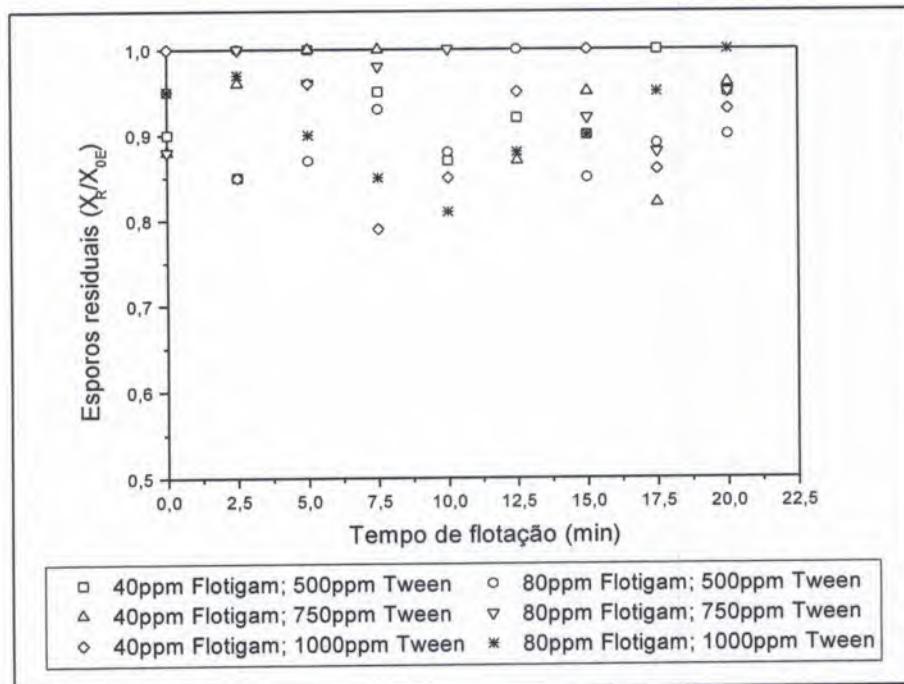


Figura 7.50 – Fração de esporos residuais de *B. sphaericus* em função do tempo de flotação em meio MBS-6 (960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)

Os dados obtidos mostram que não houve a separação dos esporos em nenhuma das condições ensaiadas.

Investigando a flotação de *B. sphaericus* em célula mecânica em meio MBS sem adição de qualquer coletor ou espumante, RIOS (1998) verificou uma redução do número de esporos residuais para o sistema agitado a 640, 960 e 1280rpm, com taxas de aeração variando entre 3 e 7L ar/min. Separações mais eficientes foram observadas com o aumento da agitação, enquanto que a aeração não influenciou de forma significativa a eficiência de remoção dos esporos.

Apesar da reconhecida natureza hidrofóbica dos esporos em espécies de *Bacillus*, como relatado por STABNIKOWA et al. (1991), alguns constituintes de meios de cultura contendo sólidos de naturezas diversas, como o meio MBS-6, podem recobrir os esporos e reduzir sua característica de flotabilidade.

A influência da composição do meio de cultivo sobre a flotação de microrganismos, especialmente em leveduras, tem sido investigada por alguns autores.

Estudando a hidrofobicidade e a flotação de células de *Saccharomyces cerevisiae*, SOUSA et al. (2003) verificaram que as maiores eficiências de separação foram obtidas utilizando-se um meio quimicamente definido em comparação com os meios Sabouraud e YPD, a base de materiais protéicos.

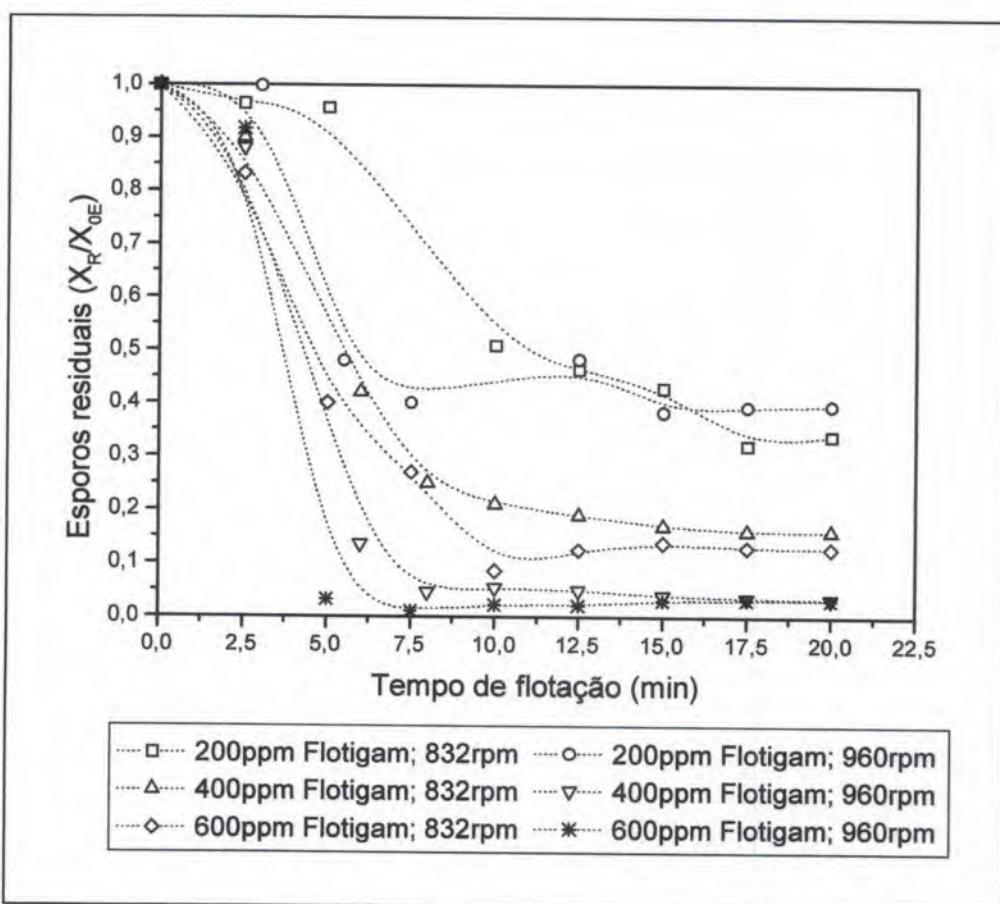
BAHR e SCHÜGERL (1992) investigaram a flotação da levedura *Hansenula polymorpha* em um meio sintético, sendo observada uma maior recuperação das células para o cultivo com limitação em carbono, seguindo-se das condições onde nitrogênio e fósforo eram os substratos limitantes. A eficiência de separação era influenciada pelo teor de espuma do meio, determinado pela quantidade de proteínas extracelulares excretadas pelas células durante o cultivo.

Em todos os ensaios de flotação mostrados nas Figuras 7.49 e 7.50 foi observada a formação de uma espuma abundante e estável, de coloração clara, como pode ser observado na Figura 7.51. Contudo, a produção de grande quantidade de espuma é muitas vezes desnecessária e indesejável, diminuindo a eficiência do processo (OKAMOTO e CHOU, 1980).

Visando um aumento da flotabilidade dos esporos, foram realizados experimentos com maiores concentrações do coletor (200, 400 e 600ppm) para valores de agitação de 832 e 960rpm na condição de pH 7,0. Estes ensaios foram realizados sem adição de espumante, pois apenas a presença do coletor nas concentrações especificadas produzia uma espuma consistente e estável. Os resultados da cinética de remoção dos esporos em função do tempo podem ser observados na Figura 7.52.



Figura 7.51 – Flotação de *B. sphaericus*
(80ppm Flotigan, 750ppm Tween, 960rpm; 6L ar/min; pH 8,9).



Para uma concentração do coletor de 200ppm, foram observadas as menores recuperações dos esporos em ambas as agitações ensaiadas, com valores residuais estabilizando-se em torno de 35% após 20 minutos de processo. Um aumento na concentração do coletor para 400ppm melhora consideravelmente a eficiência de remoção dos esporos, com maior valor residual correspondente a 16% para a menor agitação, enquanto que apenas 3,5% dos esporos permanecem no líquido residual para o sistema agitado a 960rpm.

Utilizando-se 600ppm do coletor, cerca de 13% de esporos residuais são observados para uma agitação de 832rpm após 20 minutos de flotação. Um aumento da agitação para 960rpm leva a uma recuperação próxima a 100% para um tempo de flotação de apenas 5 minutos. Os resultados indicam que o aumento da concentração do coletor e da agitação do sistema melhora a cinética de remoção dos esporos.

Comparando-se as condições de 400ppm-960rpm e 600ppm-832rpm, foi obtida uma melhor eficiência de remoção dos esporos para a maior agitação, mesmo com uma menor concentração do coletor, evidenciando a importância do efeito da agitação sobre a separação das partículas.

Os principais fatores que determinam a eficiência do processo de flotação são: colisão, aderência e retenção entre as partículas e as bolhas de gás. Uma maior agitação e turbulência do sistema proporciona uma redução do tamanho das bolhas, aumentando sua área superficial. Em consequência, aumenta a probabilidade de colisões eficazes bolha-partícula, melhorando a recuperação. Entretanto, um sistema muito turbulento pode ocasionar o efeito inverso, dificultando a adesão sobre a superfície das bolhas e diminuindo a eficiência de separação.

A Figura 7.53 mostra a aparência da espuma formada na condição de 600ppm do coletor a 960rpm. Esta era menos abundante que no exemplo anterior, mas apresentava-se com uma coloração mais escura, indicando o arraste dos esporos.

As Figuras 7.54 e 7.55 mostram os percentuais de recuperação e os fatores de concentração de esporos de *B. sphaericus*, respectivamente, após 20 minutos de flotação a uma taxa de aeração de 6L ar/min, a pH 7,0.

Os maiores índices de recuperação foram observados para as concentrações de coletor de 400 e 600ppm sob agitação de 960rpm, atingindo um percentual de 98%. Recuperações um pouco menores foram obtidas no sistema agitado a 832rpm, com valores de 93 e 94% para 400 e 600ppm do coletor, respectivamente. O menor índice foi observado para uma concentração do coletor de 200ppm em ambas as agitações, correspondendo a 77% de remoção dos esporos do caldo fermentado.



Figura 7.53 – Flotação de *B. sphaericus* (600ppm Flotigan; 960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)

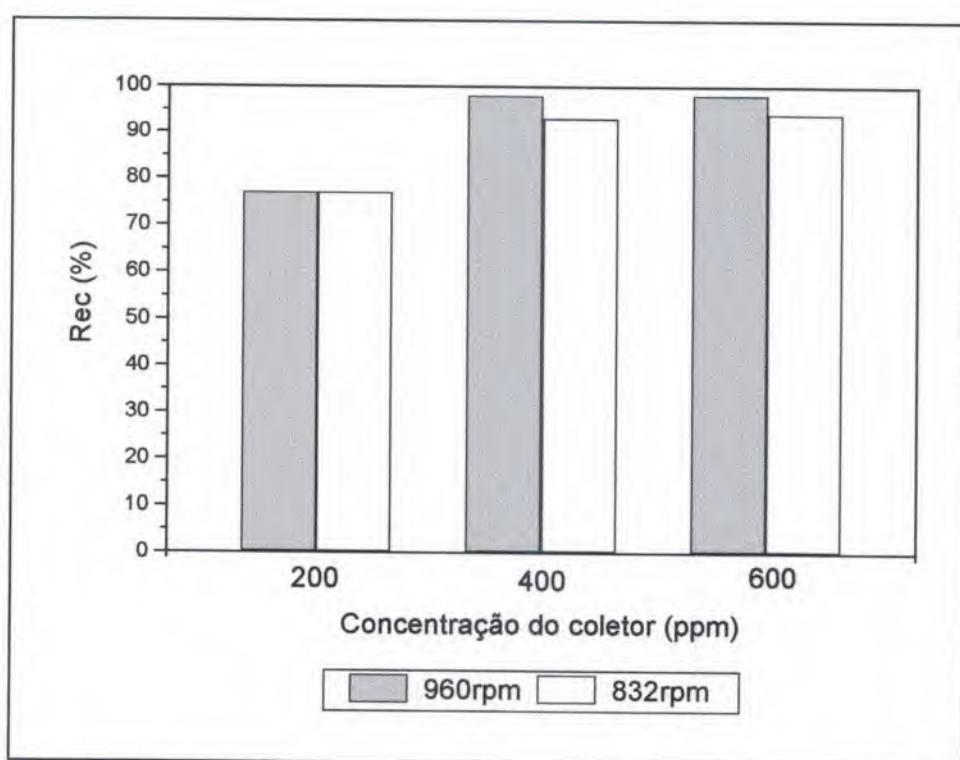


Figura 7.54 – Recuperação de esporos de *B. sphaericus* em meio MBS-6
(6L ar/min; pH 7,0)

Apesar de terem sido obtidos percentuais de recuperação equivalentes entre si para os experimentos de mesma concentração de coletor, variações foram observadas nos

valores do fator de concentração de esporos (Figura 7.55). Para as condições de 400ppm e 600ppm, os maiores concentrações de esporos nos flotados foram observadas no sistema agitado a 960rpm. Em adição, os maiores valores de fator de concentração foram observados na condição de 400ppm (3,0 e 2,6), o que pode ser explicado pelo menor arraste de líquido pela espuma observado nestes casos.

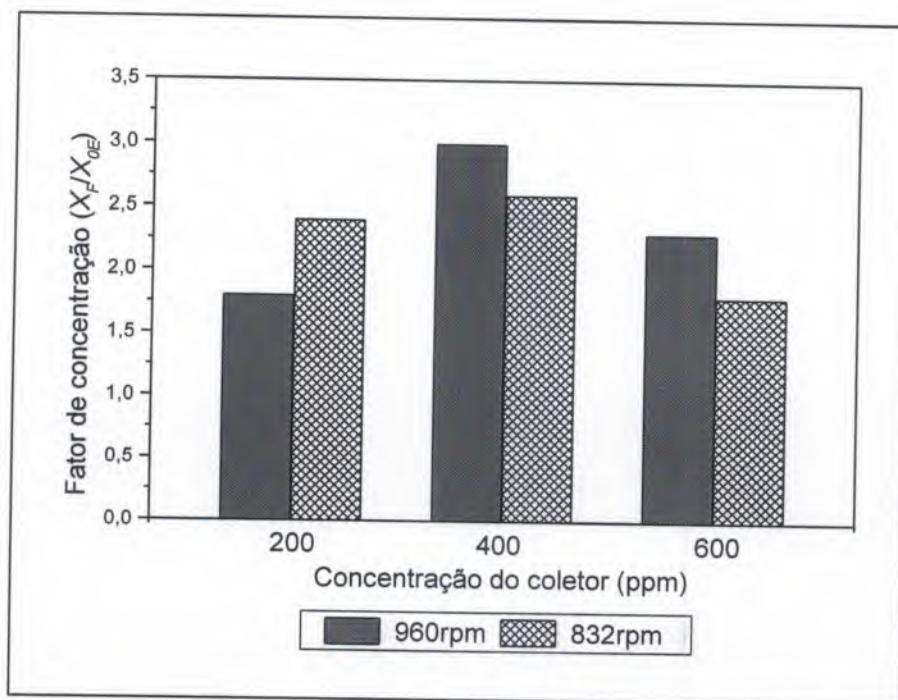


Figura 7.55 – Fator de concentração de esporos de *B. sphaericus* em meio MBS-6
(6L ar/min; pH 7,0)

A Figura 7.56 ilustra o aspecto visual das amostras original e flotada.

Os materiais flotados apresentaram-se homogêneos, sem formação de sedimento compacto.

Testes de viabilidade dos esporos realizados nas amostras flotadas demonstraram que as células permaneciam viáveis após um período de observação de 24h.

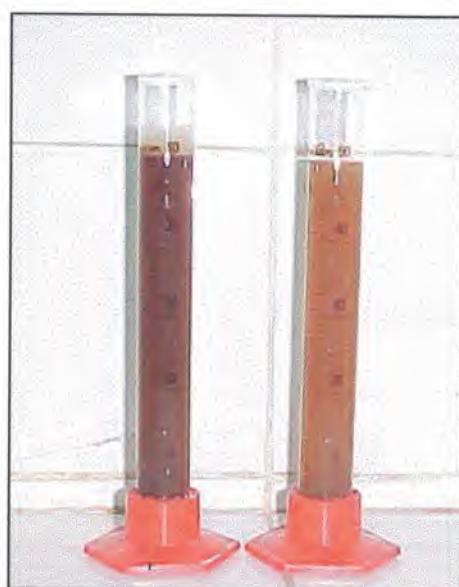


Figura 7.56 – Aspecto visual das amostras de *B. sphaericus* em meio MBS-6 flotada (esquerda) e original (direita) (600ppm Flotigan; 960rpm; 6L ar/min; pH 7,0)

7.5.2- Flotação em Coluna

A Figura 7.57 mostra os resultados para a fração de esporos residuais de *B. sphaericus* durante a operação da coluna em batelada, utilizando o meio MBS na condição de pH de final de fermentação. Foram testadas duas vazões de ar, correspondentes a 977 e 1240mL/min, para verificar a influência deste parâmetro sobre a cinética de remoção dos esporos. Vazões maiores ocasionavam uma maior turbulência do sistema, com formação de bolhas de tamanhos irregulares e transbordamento de líquido da coluna.

Observa-se que a redução do número de esporos residuais foi mais rápida para o maior valor da vazão de ar, atingindo um valor residual abaixo de 30% para um tempo de flotação de 8min, e de apenas 2,5% após 30 minutos. A partir de 40 minutos de processo foi observada a completa remoção dos esporos para ambos os ensaios.

Como verificado na Figura 7.58, o aumento da vazão de ar resulta numa maior constante cinética, isto é, numa maior velocidade de remoção dos esporos. O incremento deste parâmetro resulta numa maior quantidade de bolhas disponíveis para o processo de adesão e remoção das partículas. A hipótese de que a taxa de remoção obedece a uma cinética de primeira ordem mostrou-se adequada.

Em ambas as condições ensaiadas, foi observada a formação de uma espuma de consistência firme, caracterizada pelo arraste de esporos. Observações microscópicas do

material flotado mostraram não haver a formação de aglomerados celulares como observado no meio fermentado.

Apesar dos processos de flotação estudados terem sido realizados em dois sistemas distintos (célula convencional e coluna), vale salientar que não foi necessária a adição de qualquer coletor no processo de flotação em coluna utilizando o meio MBS, o que confirma a natureza hidrofóbica dos esporos desta bactéria e a influência do meio de cultivo sobre a eficiência de recuperação das células.

Como mostra a Figura 7.59, pode ser notada a diferença de coloração existente entre o fermentado e o material flotado. Este apresentou-se como uma suspensão sem formação de sedimento compacto, sendo considerado adequado para a preparação de formulados biolarvicidas.

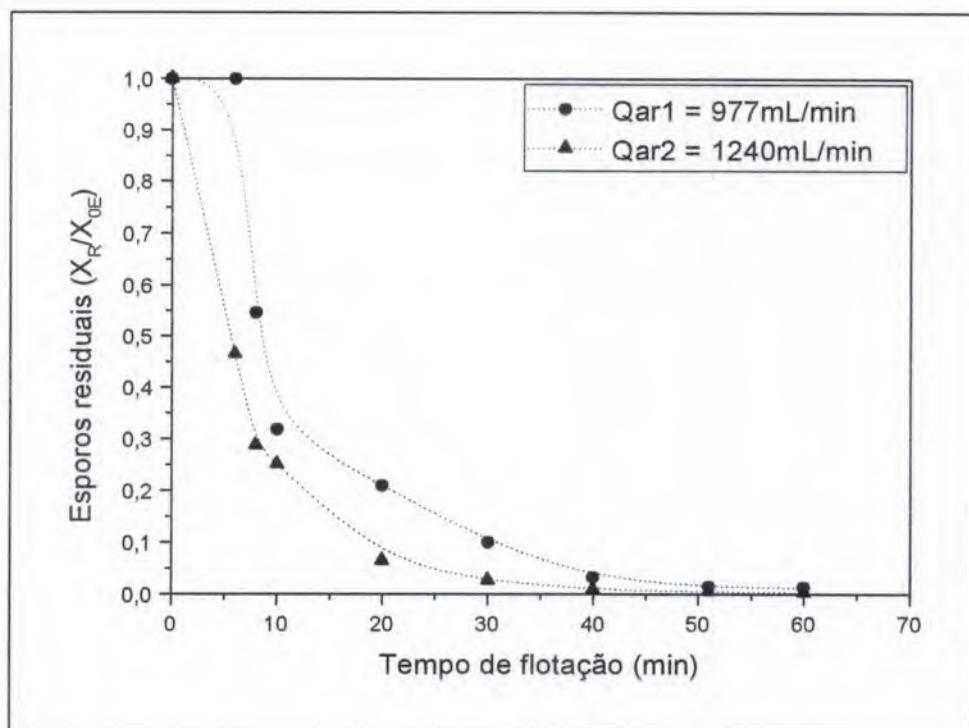


Figura 7.57 – Fração de esporos residuais de *B. sphaericus* em função do tempo de flotação em meio MBS de acordo com a vazão de ar na coluna (pH 8,9)

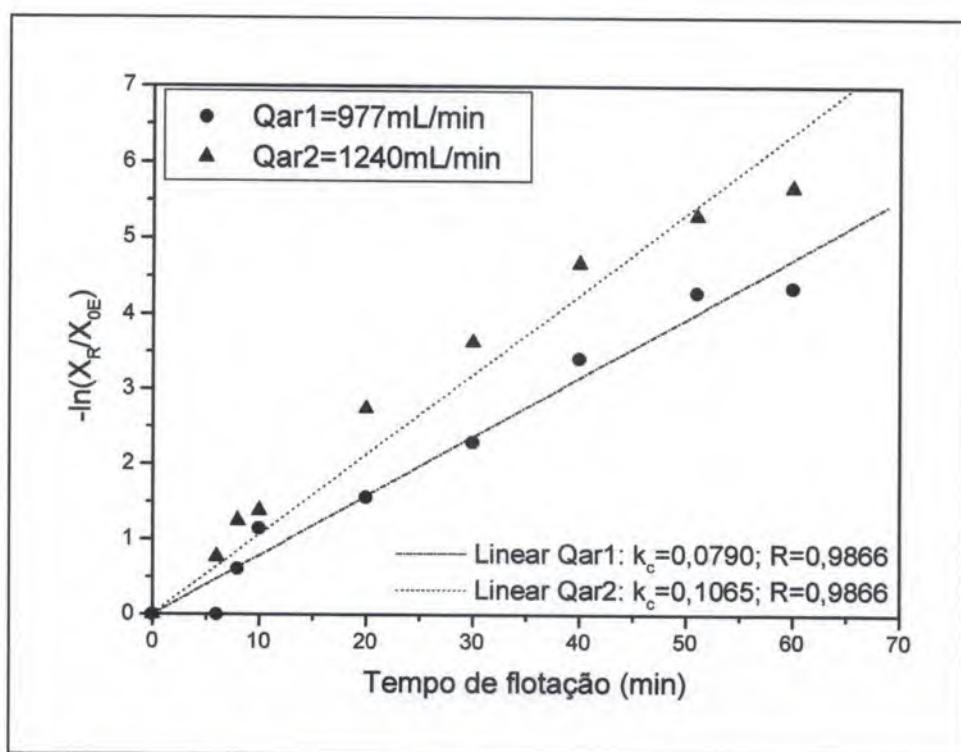


Figura 7.58 – Determinação da constante cinética para a operação em batelada



Figura 7.59 – Amostras de *B. sphaericus* em meio MBS flotada (esquerda) e original (direita) ($Q_{ar}=1240 \text{ mL/min}; \text{pH } 8,9$)

7.6- Pós Ativos e Formulação em Comprimidos

O aspecto visual dos pós ativos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* com cultivo em meio MBti-Glicose obtidos nas condições de floculação testadas é mostrado na Figura 7.60. A Figura 7.61 ilustra o pó ativo obtido com o floculante tanino observado microscopicamente.

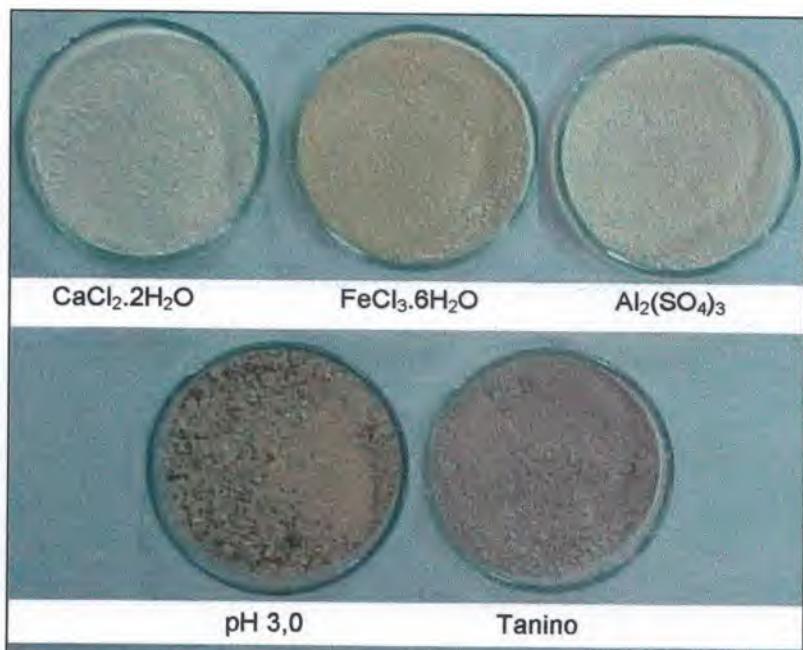


Figura 7.60 – Pós ativos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose

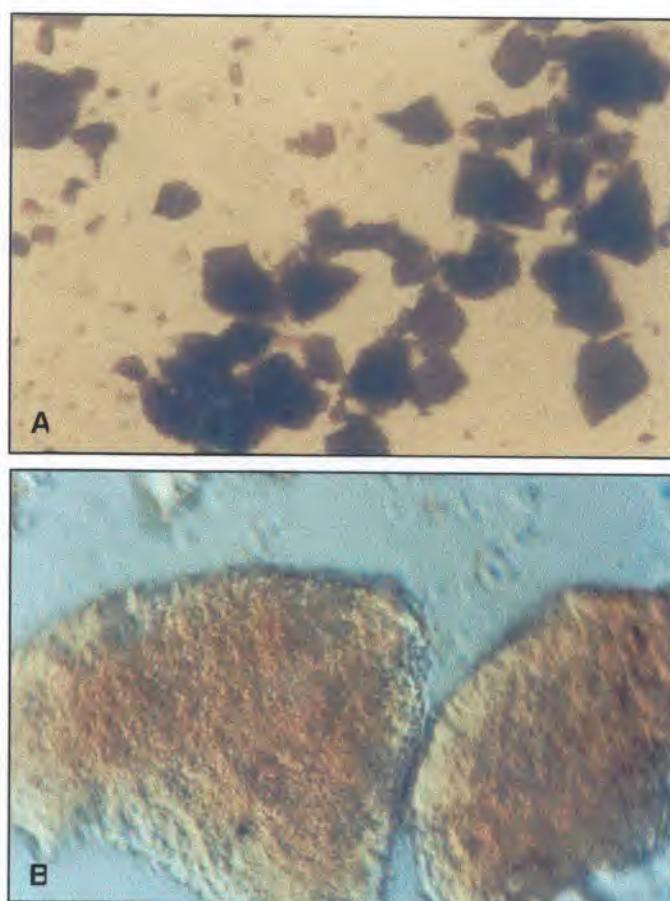


Figura 7.61 – Pó ativo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose na presença de tanino (A - aumento de 40 vezes; B - aumento de 100 vezes)

A formulação em comprimidos foi desenvolvida a partir do pó ativo na presença do floculante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 7.62).

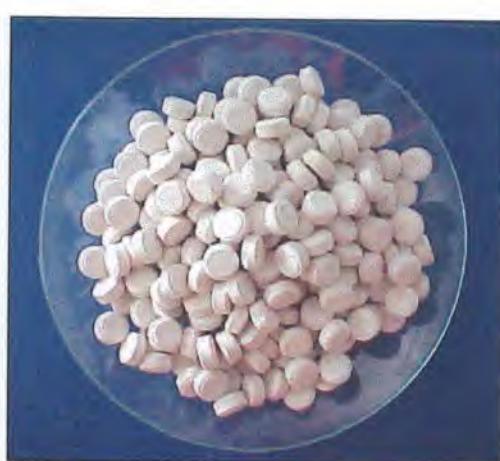


Figura 7.62 – Comprimidos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose, obtidos com o floculante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e utilizados nos testes de campo

Foi obtido um rendimento médio de 5,6g de pó por litro de fermentado. O peso médio dos comprimidos foi de 220mg ± 20mg.

7.7- Atividade Biológica

7.7.1- Atividade Biológica em Laboratório

a) *Bacillus sphaericus*

Os resultados de atividade biológica das amostras do caldo fermentado, suspensões floculentas concentradas e pós ativos de *B. sphaericus* 2362 em meio MBS-6 contra larvas de *Culex quinquefasciatus* são mostrados na Tabela 7.9.

Como pode ser observado, a suspensão concentrada com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentou o maior valor de CL_{50} dentre todos os casos (0,1813ppm). A hipótese de que esta substância possa causar um efeito inibitório sobre a atividade larvicida não é confirmada pela atividade observada quando a amostra testada é o pó ativo. Neste caso, é obtido um valor de CL_{50} semelhante ao verificado para os floculantes $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e tanino. Vale salientar que, apesar de estarem sob a forma de pó, os resultados de atividade para estas amostras não foram superiores aos verificados para as amostras floculentas concentradas.

Estes resultados podem estar relacionados à problemas durante a homogeneização das amostras. Por exemplo, o pó contendo tanino era difícil de ser homogeneizado, apresentando uma característica de rápida sedimentação durante o preparo das amostras.

Pode ser destacado o resultado obtido para a suspensão floculenta com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que apresentou um valor de CL_{50} de 0,0121ppm, o qual corresponde a uma potência larvicida de 1.363UTI/mg.

Comparando-se este resultado com as formulações líquidas comerciais à base de *B. sphaericus* descritas na Tabela 7.10, pode-se notar que o resultado obtido é apenas inferior ao concentrado líquido Spherico® (GERATEC/BRASIL), que apresenta uma potência de 1.700UTI/mg.

Tabela 7.9 – Atividade biológica das amostras do caldo fermentado, suspensões floculentas concentradas e pós ativos de *B. sphaericus* 2362 em meio MBS-6 contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, determinada através de bioensaios completos

Amostra	Nº de concentrações-teste	Nº L4⁽¹⁾	CL₅₀⁽³⁾ ± DP⁽⁴⁾ (ppm)	Potência ± DP⁽⁵⁾ (UTI/mg)⁽⁶⁾
Fermentado	8	540	0,1453	
	8	540	0,1307	
	8	540	0,1274	
			0,1345 ± 0,0095	123,0 ± 8,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	5	360	0,0121	
FeCl ₃ .6H ₂ O	4	300	0,0566	
Al ₂ (SO ₄) ₃	5	360	0,1813	
			0,0121	1.362,8
			0,0566	291,3
			0,1813	91
Tanino	5	360	0,0387	
	5	360	0,0445	
			0,0416 ± 0,0041	398,3 ± 39,3
CaCl ₂ .2H ₂ O	5	360	0,0118	
	5	360	0,0264	
	6	280*	0,0383	
	4	300	0,0180	
	5	360	0,0624	
			0,0363 ± 0,0193	558,9 ± 280,0
Pós				
FeCl ₃ .6H ₂ O				
Al ₂ (SO ₄) ₃	6	420	0,0324	
	6	420	0,0562	
	5	360	0,0505	
	5	360	0,0428	
			0,0443 ± 0,0168	401,2 ± 152,4
Tanino	5	360	0,0467 ± 0,0054	
				355,9 ± 41,5

⁽¹⁾ Número total de larvas de quarto estádio no bioensaio incluindo o grupo controle (20 larvas por concentração, em triplicata)

⁽²⁾ Concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos expostos ($p > 0,05$)

⁽³⁾ Concentração letal média

⁽⁴⁾ Desvio padrão

⁽⁵⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

* Utilizadas 20 larvas por concentração, em duplicata, incluindo o grupo controle

Tabela 7.10 – Informações técnicas de produtos comerciais à base de *B. sphaericus*

<i>B. sphaericus</i>		
Produto (Fabricante/País)	Formulado	Potência (UTI/mg)⁽¹⁾
Sferobac® (FIOCRUZ-INPAL S.A./BRASIL) ⁽²⁾	Concentrado emulsionável	400
Spherico® (GERATEC/BRASIL) ⁽³⁾	Concentrado líquido	1.700
Spherimos® (ABBOTT Lab./EUA) ⁽⁴⁾	Concentrado líquido	120
C3-41 (WUHAN/CHINA) ⁽⁴⁾	Formulação líquida	200
Vectolex CG® (ABBOTT Lab./EUA) ⁽⁴⁾	Granulado	50
Sphericide® (BIOTECH. INTERNATIONAL Ltda./ÍNDIA) ⁽⁴⁾	Pó molhável	450

⁽¹⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

⁽²⁾ CONSOLI et al. (1997)

⁽³⁾ RABINOVITCH et al. (1999)

⁽⁴⁾ SILVA (2000)

Comparando-se as atividades dos pós ativos, os menores valores obtidos foram para as amostras contendo $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino (401 e 356UTI/mg, respectivamente), sendo ainda compatíveis com a maior potência relatada, um pó molhável (Sphericide®; BIOTECH. INTERNATIONAL Ltda./ÍNDIA) que possui potência equivalente a 450UTI/mg.

b) *B. thuringiensis* var. *israelensis*

Os resultados de atividade biológica das suspensões concentradas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em ambos os meios contra larvas de *Ae. aegypti* são mostrados nas Tabelas 7.11 e 7.12. Os resultados obtidos a partir de um único bioensaio completo ou de bioensaios exploratórios foram considerados indicadores potenciais da bioatividade das amostras.

Os valores mais elevados de CL₅₀ foram observados para as amostras dos caldos fermentados. Comparando-se a atividade dos fermentados entre si, o menor valor de CL₅₀ encontrado em meio UG era esperado por se tratar de um meio límpido, sem sólidos em suspensão, o que favorece a ingestão de um quantitativo maior de partículas tóxicas. Contudo, a diferença observada para os valores de CL₅₀ (5,2 para o meio UG e 8,1 para MBti-Glicose) não é considerada relevante quando consideram-se os ganhos econômicos obtidos com a fermentação em MBti-Glicose.

Para as suspensões floculentas concentradas de CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃ e tanino em meio UG, os valores de CL₅₀ foram de doze a vinte vezes menores que a CL₅₀ do caldo fermentado. Uma queda de atividade larvicida foi observada para os flocos a pH 3,0, com uma CL₅₀ cerca de 10 vezes maior que a observada para os flocos com CaCl₂.2H₂O.

Bioensaios exploratórios para as suspensões de flocos em meio MBti-Glicose revelaram que não houve diferença significativa entre os valores de CL₅₀ obtidos com os diferentes agentes floculantes. Ao contrário do observado para o meio UG, não foi verificada uma queda na atividade para os flocos a pH 3,0, cuja CL₅₀ está entre 0,2 e 0,4. Estes resultados indicam que um possível efeito prejudicial da condição de pH 3 sobre a bioatividade não é observado no meio MBti-Glicose, sugerindo a possibilidade de que as partículas presentes neste meio possam exercer um efeito "protetor" sobre as toxinas protéicas.

Excetuando-se os flocos a pH 3,0 em meio UG, as potências encontradas para as suspensões concentradas em ambos os meios podem ser comparadas com alguns formulados líquidos disponíveis comercialmente, como mostra a Tabela 7.13. Os maiores valores foram obtidos para as suspensões com FeCl₃.6H₂O e Al₂(SO₄)₃ em meio UG, correspondentes a 1.275,3 ± 47,3 e 1.345,9 ± 224,7 UTI/mg, respectivamente. Estes resultados são compatíveis com os produtos Vectobac AS® (ABBOT Lab./Brasil) e Aquabac xt® (BECKER MICROBIALS/EUA), que apresentam uma potência equivalente a 1.200.

Tabela 7.11 – Atividade biológica das amostras do caldo fermentado e suspensões floculentas concentradas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG contra larvas de *Aedes aegypti*, determinada através de bioensaios completos

Amostra	Nº de concentrações-teste	Nº L4⁽¹⁾	$\bar{C}L_{50}^{(2)}$ (ppm)	$\bar{C}L_{50}^{(3)} \pm DP^{(4)}$ (ppm)	Potência $\pm DP$ (UT/mg)⁽⁵⁾
Fermentado	7	480	5,3315		
	5	360	4,6686	5,2542 \pm 0,5510	66,2 \pm 7,1
<chem>CaCl2.2H2O</chem>	5	360	5,7624		
	6	420		0,4356	
<chem>FeCl3.6H2O</chem>	5	360	0,2727		
	4	300	0,2600	0,2708 \pm 0,0099	1.275,3 \pm 47,3
<chem>Al2(SO4)3</chem>	5	360	0,2796		
	4	360		0,2318	
Flocos	5	360	0,3174		
	4	300	0,2359	0,2617 \pm 0,0483	1.345,9 \pm 224,7
Tanino	5	360	0,3934		
	6	420	0,3690	0,3770 \pm 0,0142	915,9 \pm 33,7
pH 3,0	5	360	0,3687		
	4	300	5,1546	4,3643 \pm 1,0725	82,9 \pm 23,4
			3,1434		

⁽¹⁾ Número total de larvas de quarto estádio no bioensaio incluindo o grupo controle (20 larvas por concentração, em triplicata)

⁽²⁾ Concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos expostos ($p > 0,05$)

⁽³⁾ Concentração letal média

⁽⁴⁾ Desvio padrão

⁽⁵⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

Tabela 7.12 – Atividade biológica das amostras do caldo fermentado e suspensões floculentas concentradas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose contra larvas de *Aedes aegypti*, determinada através de bioensaios exploratórios

	Amostra	Nº de concentrações-teste	Nº L4⁽¹⁾	CL₅₀⁽²⁾ (ppm)⁽²⁾	Potência ± DP (UTl/mg)⁽³⁾
Fermentado		6	420*	8.0706**	42,7
Flocos	CaCl ₂ .2H ₂ O	7	320	0,5-0,8	431,3 - 690,0
	FeCl ₃ .6H ₂ O	5	240	0,5-0,8	431,3 - 690,0
	Al ₂ (SO ₄) ₃	5	240	0,5-0,8	431,3 - 690,0
	Tanino	7	320	0,5-0,8	431,3 - 690,0
pH 3,0	5	240	0,2-0,4	862,5 - 1.725,0	

⁽¹⁾ Número total de larvas de quarto estádio no bioensaio exploratório incluindo o grupo controle (20 larvas por concentração, em duplicita)

⁽²⁾ Concentração letal capaz de eliminar 50% dos indivíduos expostos ($p > 0,05$)

⁽³⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

* Utilizadas 20 larvas por concentração, em triplicata, incluindo o grupo controle

** Corresponde ao valor encontrado em um bioensaio completo

O meio MBti-Glicose apresenta a vantagem de diminuir os custos de produção dos formulados. Bioensaios exploratórios com as suspensões concentradas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino apresentaram uma potência entre 431 e 690UTI/mg, podendo ser correlacionados com os formulados Teknar® (SANDOZ/ZOECON/EUA) e Biolarkim 14® (COLKIM/BO), que apresentam potência de 600UTI/mg.

Tabela 7.13 – Informações técnicas de produtos experimentais e comerciais à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis*

<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>		
Produto (Fabricante/País)	Formulado	Potência (UTI/mg) ⁽¹⁾
Aquabac xt® (BECKER MICROBIALS/EUA) ⁽⁵⁾	Suspensão aquosa	1.200
VectoBac AS®(ABBOT Lab./BRASIL) ⁽⁴⁾	Solução aquosa	1.200
Biolarkim 14® (COLKIM/BO) ⁽⁵⁾	Suspensão aquosa	600
Teknar® (SANDOZ/ZOECON/EUA) ⁽³⁾	Concentrado emulsionável	600
Bactimos® (BACTIMOS) ⁽³⁾	Pó molhável	3.500
VectoBac WDG®(ABBOT Lab./EUA) ⁽⁵⁾	Grânulo molhável	3.000
VectoBac WP® (ABBOT Lab./EUA) ⁽³⁾	Pó molhável	2.000
C4P1 (Farmanguinhos-FIOCRUZ) ⁽²⁾	Comprimido	1.146
VectoBac G® (ABBOT Lab./EUA) ⁽⁴⁾	Grânulo	200
VectoBac Tablet® (ABBOT Lab./EUA)*	Comprimido	2.200
Culinex® (BECKER MICROBIALS/EUA) ⁽⁵⁾	Comprimido	8.000

⁽¹⁾ Unidades Tóxicas Internacionais/mg

⁽²⁾ MELO-SANTOS et al. (2001a)

⁽³⁾ DIAS (1992)

⁽⁴⁾ AMALRAJ et al. (2000)

⁽⁵⁾ Catálogos dos produtos citados

* Produto experimental

O pó ativo proveniente da secagem da suspensão concentrada floculada com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que foi utilizado para o desenvolvimento da formulação em comprimido, apresentou uma excelente atividade larvicida, com uma CL_{50} de $0,0418 \pm 0,0025\text{ppm}$, o que

corresponde a uma potência de $8.272,6 \pm 487,8$ UTI/mg. Este resultado de potência larvicida é muito superior a maioria dos produtos à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* citados na Tabela 7.13, exceto o Culinex® (BECKER MICROBIALS/EUA), cuja potência declarada é de 8.000UTI/mg.

Foi observado um aumento da atividade larvicida com a concentração das amostras. O material em forma de pó, pelo seu baixo teor de umidade e maior estabilidade, apresenta maior atividade quando comparado com as suspensões concentradas.

De maneira geral, a presença dos floculantes não inibiu a atividade dos materiais testados. A influência da condição dos flocos a pH 3,0 sobre a atividade larvicida não foi conclusiva, pois os resultados demonstraram uma queda de atividade para o meio UG, o que não foi observado para o meio MBti-Glicose. Investigando a influência do pH sobre a viabilidade dos esporos de *B. sphaericus* 2362, ELÇİN (1995) verificou que a atividade tóxica da bactéria não foi alterada em pH ácido; no entanto, os esporos apresentaram uma queda acentuada na viabilidade na condição de pH 3,0, com completa inativação após um período de 15 dias.

7.7.2- Atividade Larvicida em Teste sob Condições Simuladas de Campo (TCS)

Como descrito no item 6.13.7b, a eficácia inicial do produto foi determinada em campo simulado pela mortalidade das larvas após 24h de aplicação, sendo testadas as doses de 1 comprimido para 30, 50 ou 100L de água de poço, contendo 50 larvas (L4) de *Aedes aegypti* por recipiente. Como mostrado na Tabela 7.14, para as condições de 30 e 50 litros de água foi observada uma mortalidade total, enquanto que para o maior volume a mortalidade observada foi de 88%.

Tabela 7.14 – Eficácia inicial de controle dos comprimidos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Antilarv® Ci) contra larvas de 4º estádio de *Aedes aegypti* (Recife-LAB), determinada em testes sob condições simuladas de campo

Volume de água (L)	Eficácia Inicial (%)
30	100
50	100 ⁽¹⁾
100	88 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 75% das larvas morrem até 4h após o tratamento

⁽²⁾ Após 48h a mortalidade atinge 100%

A avaliação da atividade larvicida pela recolonização dos depósitos com 50 L1/semana (teste de persistência), sem alteração do volume de água, mostrou que o produto ocasiona mortalidade larval de 100% durante 60 dias e 94% por até 80 dias após um único tratamento. Estes resultados foram verificados sobretudo quando a dosagem máxima foi de 1 comprimido para 30 ou 50L de água. Por esta razão a dose adotada nos testes subsequentes foi de 1 comprimido para 50L.

Na bateria de testes em que foi avaliada a persistência da atividade residual em função da diluição progressiva do produto, pela reposição de 20% do volume de água a cada dois dias, um controle total (100% de mortalidade) foi observado por seis meses. É importante enfatizar que uma persistência assim nunca foi relatada para um produto à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

A persistência de uma formulação sólida experimental à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (C4P1/Farmanguinhos-FIOCRUZ) foi avaliada contra larvas de *Ae. aegypti* em trabalho realizado por MELO-SANTOS et al. (2001a). Os ensaios foram conduzidos em testes de campo simulado nas condições de incidência de luz solar direta e de sombra, na dose de 1 tablete para cada 10L de água. Os resultados demonstraram que o formulado controlava as larvas de *Ae. aegypti* com uma mortalidade superior a 70% durante 40-50 dias na sombra e por 13-35 dias sob condições de incidência de luz, após o primeiro tratamento.

Verifica-se que a formulação proposta neste trabalho apresenta excelentes resultados de eficácia e persistência para o controle de larvas de *Aedes* spp. Trata-se de uma formulação de fácil manuseio e aplicação, sendo adequada para o controle larvicida em criadouros domésticos.

7.7.3- Testes de Estabilidade

O produto, desenvolvido em dezembro de 2002, foi avaliado nos meses de março e agosto de 2003 e em janeiro de 2004.

Em todos os testes foi verificado um controle total 24 horas após a aplicação, indicando uma excelente estabilidade do produto, com um tempo de prateleira de no mínimo 13 meses.

7.7.4- Atividade Larvícida em Campo

A área piloto do bairro de Nossa Senhora das Graças (município de Moreno-PE) onde os testes de campo foram realizados possui fisionomia rural, abrangendo 16 quarteirões e 97 imóveis, com 177 habitantes (Figura 7.63).

Diferentes tipos de criadouros foram observados na área durante a aplicação do produto (Figura 7.64), sendo testado na dose de 1 comprimido/50 L.



Figura 7.63 – Bairro de Nossa Senhora das Graças, município de Moreno (PE)

Na rotina do Programa Nacional de Controle da Dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, PNCD, 2002), o Índice de Infestação Predial (IIP) reflete o percentual de imóveis contendo depósitos (em toda sua diversidade) positivos para formas jovens (larvas e/ou pupas) do *Ae. aegypti*. Em geral, o levantamento deste parâmetro é feito em 1/3 dos imóveis da área.

De acordo com as informações da Secretaria Municipal de Saúde, 37 dias após o 1º tratamento todos os depósitos estavam negativos. No 2º tratamento foram investigados 32 imóveis, sendo identificados 2 imóveis positivos para *Ae. aegypti*, com um depósito com larvas para cada um deles. É importante ressaltar que os recipientes eram novos e tinham sido colocados na área entre um tratamento e outro, logo não tinham sido submetidos ao último tratamento. Assim, apesar de termos um IIP equivalente a 6,25% para larvas de *Ae. aegypti*, os recipientes tratados com o produto permaneciam negativos. Segundo MELO-SANTOS (2001b), os criadouros de campo podem estar negativos em função da cobertura larvicida do produto ou simplesmente porque não foram colonizados pelas fêmeas da espécie-alvo. Os testes revelaram excelentes resultados no controle populacional de *Aedes spp.*

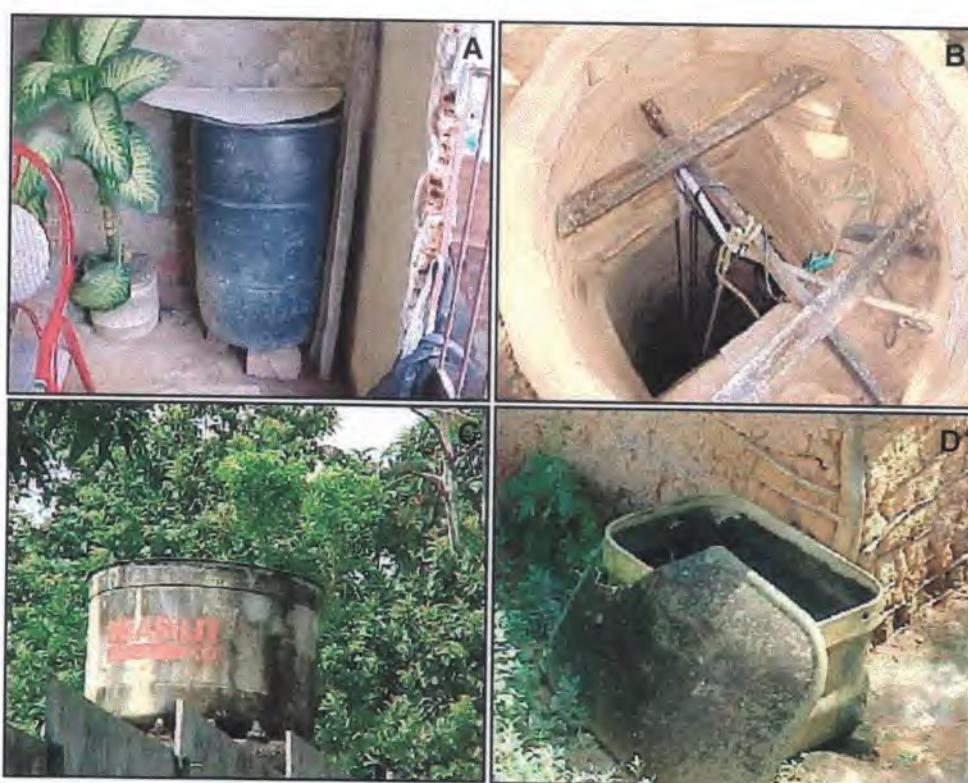


Figura 7.64 – Diferentes tipos de criadouros encontrados no bairro de Nossa Senhora das Graças, município de Moreno (PE)
 (A - tonel; B - cacimba; C - caixa d'água; D - tanque)

Visando uma melhor estimativa do nível de infestação e consequente impacto das medidas de controle sobre a população de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, estes parâmetros foram estimados por índices baseados na coleta de ovos por armadilhas. A utilização de armadilhas é mais eficiente que a pesquisa larvária e tem o objetivo de atrair a fêmea do mosquito para criadouros conhecidos e monitorados, possibilitando um maior controle sobre esta população (BRAGA et al., 2000). A fêmea do mosquito é atraída pela armadilha, geralmente um recipiente preto e de plástico pendurado a 1,5 metro do chão, cujo efeito é potencializado pela adição de infusões de gramíneas (Figura 7.65).

A Tabela 7.15 mostra um resumo dos resultados obtidos para o número total de ovos em cada ciclo de coleta, a densidade de ovos, o número de ovos/ovitrampa/dia e o IPO (Índice de Positividade de Ovitrampas) ao longo dos três ciclos de coleta, realizados após intervenção larvicida com o Antilarv® Ci.

complementar de *Aedes* spp.



Figura 7.65 – Esquema de instalação peridomiciliar de armadilhas de oviposição – ovitrampas (A); armadilha composta por recipiente plástico preto, palheta de eucatex e infusão de gramíneas (B)

Tabela 7.15 – Parâmetros de infestação por *Aedes* spp. estimados a partir de ovos coletados em armadilhas, instaladas no peridomicílio de imóveis residenciais do bairro de Nossa Senhora das Graças – Município de Moreno/PE, no período de novembro de 2002 a abril de 2003

Parâmetros estimados	Ciclos de coleta de ovos			
	Pré	1º	2º	3º
Total de ovitrampas investigadas	37	33	31	41
IPO ⁽¹⁾	89,2%	72,7%	83,9%	97,6%
Total de ovos coletados	4.799	2.114	1.281	10.316
Densidade de ovos ⁽²⁾	129,7	64,1	41,3	251,6
Duração do ciclo de coleta de ovos (dias)	21	18	28	67
Nº ovos/ovitrampa/dia ⁽³⁾	6,2	3,6	1,5	3,7

⁽¹⁾ Índice de Positividade de Ovitrampas = (número total de ovitrampas positivas/número total de ovitrampas instaladas)x100

⁽²⁾ Densidade de ovos = total de ovos coletados/total de ovitrampas instaladas

⁽³⁾ Número de ovos/número de ovitrampas instaladas/número de dias do tratamento

A Figura 7.66 mostra que houve uma clara redução no número de ovos de *Aedes* spp. coletados nas ovitrampas até o segundo ciclo. Este período correspondeu aos dois tratamentos dos depósitos domésticos realizados com o Antilarv® Ci, com intervalo de até 37 dias entre eles. Este intervalo é bem inferior ao preconizado no Programa Nacional (60 dias

úteis ou cerca de três meses) e demonstrou que o impacto sobre a população-alvo foi expressivo e reduziu em até quatro vezes o quantitativo médio de ovos, o que reflete uma diminuição da população do vetor na área.

Ainda que a média de ovos tenha voltado a crescer no 3º ciclo de coleta, seu valor corresponde à metade do observado para o período de pré-intervenção. Entre os aspectos que contribuíram para este aumento destacam-se o aumento da incidência de chuvas no período de março a abril de 2003, o qual favoreceu a eclosão de ovos do vetor que estavam em dormência devido à ausência de água.

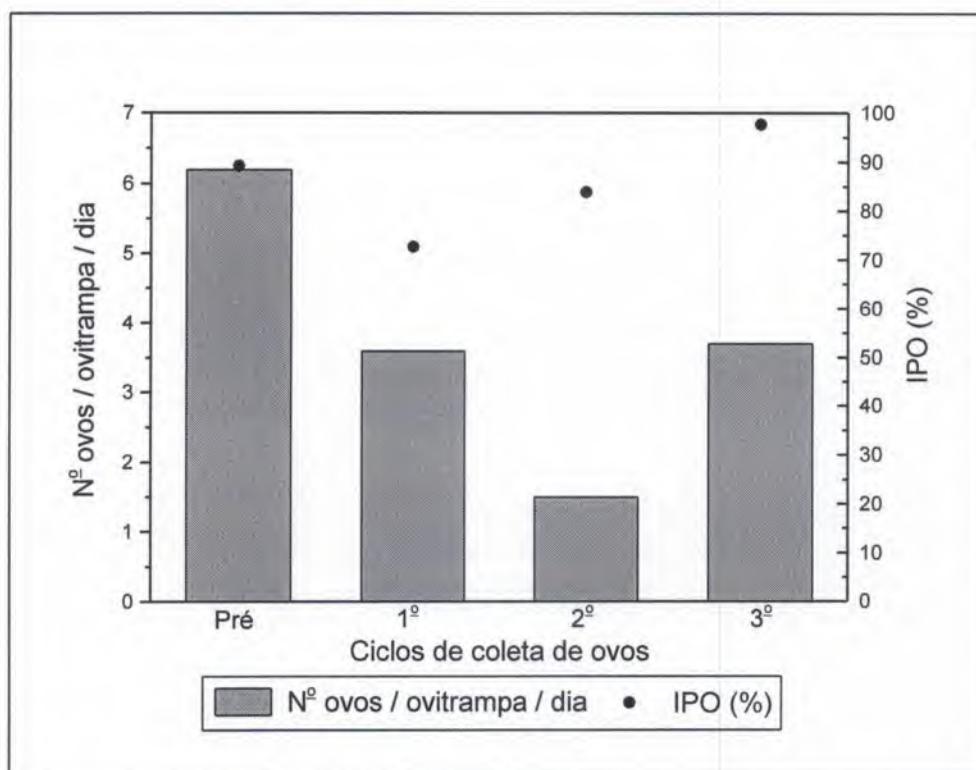


Figura 7.66 – Representação da infestação por *Aedes spp.* do bairro de Nossa Senhora das Graças estimada através de índices baseados na coleta de ovos por armadilhas no período de novembro de 2002 a abril de 2003. O IPO representa o percentual de ovitrampas positivas para ovos de *Aedes spp.*

É possível observar na Figura 7.66 que apesar da redução do número médio de ovos de *Aedes spp.* coletado por ovitrampa por dia, houve um aumento no percentual de armadilhas positivas. Isto sugere que as medidas foram importantes para reduzir a intensidade da infestação na área; mas não produziram um impacto na distribuição das

espécies-alvo. Por outro lado, o fato das armadilhas permanecerem fixas faz delas criadouros preferenciais para as fêmeas do mosquito. Segundo relatos da literatura, as fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* depositam seus ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em mais de um criadouro em campo. Este comportamento nos leva a supor que uma mesma fêmea possa colonizar mais de uma armadilha, o que consequentemente poderia aumentar o número de ovitrampas positivas, sem refletir, necessariamente, um aumento na densidade de fêmeas. Resultados similares aos encontrados neste trabalho são relatados por MELO-SANTOS et al. para populações de *Ae. aegypti* no município de Recife/PE (dados não publicados).

Quanto ao uso do Antilarv® Ci em ovitrampas contendo infusão a 30%, foi possível constatar que 100% delas (15 ovitrampas) permaneceram negativas por um período de até 40 dias. Este resultado de cobertura larvicida é maior do que o relatado para o VectoBac CG®, cujo período máximo de cobertura sob a dose de 1g/L foi de 30 dias (MELO-SANTOS, 2001b). Os resultados sugerem que comprimidos contendo a décima parte do princípio ativo podem ser utilizados com segurança em ovitrampas em esquemas de monitoramento ou mesmo de controle complementar de *Aedes* spp.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

8.1- Conclusões

Nas condições experimentais realizadas, os resultados obtidos nos ensaios de fermentação, floculação, caracterização das partículas, testes de sedimentação, testes de flotação e ensaios de atividade biológica permitem concluir que:

- Os parâmetros cinéticos obtidos para as fermentações em batelada de *B. sphaericus* nos meios MBS e MBS-6 e de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios UG e MBti-Glicose foram os seguintes:

B. sphaericus

- Taxa específica de crescimento celular, μ : $0,58 \text{ h}^{-1}$ (MBS)
- Concentração máxima de células ou de sólidos totais, X_{MAX} ou ST_{MAX} : $2,70 \text{ g/L}$ (MBS) e $5,20 \text{ g/L}$ (MBS-6)
- Tempo para atingir X_{MAX} ou ST_{MAX} , T_{XMAX} ou T_{STMAX} : 15 h (MBS) e 10 h (MBS-6)
- Concentração máxima de esporos viáveis, E_{MAX} : $1,4 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ (MBS) e $8,4 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ (MBS-6)
- Tempo para atingir E_{MAX} , T_{EMAX} : 40 h (MBS) e 48 h (MBS-6)
- Concentração final de células ou de sólidos totais, X_{FINAL} ou ST_{FINAL} : $2,33 \text{ g/L}$ (MBS) e $4,80 \text{ g/L}$ (MBS-6)

B. thuringiensis var. israelensis

- Taxa específica de crescimento celular, μ : $0,35\text{h}^{-1}$ (UG e MBti-G)
- Fator de conversão de substrato em células em relação à concentração máxima de células ou de sólidos totais, Y_{XS} : $0,43\text{g/g}$ (UG) e $0,51\text{g/g}$ (MBti-G)
- Taxa específica de consumo de substrato, q_S : $0,81\text{h}^{-1}$ (UG) e $0,69\text{h}^{-1}$ (MBti-G)
- Concentração máxima de células ou de sólidos totais, X_{MAX} ou ST_{MAX} : $3,77\text{g/L}$ (UG) e $5,04\text{g/L}$ (MBti-G)
- Tempo para atingir X_{MAX} ou ST_{MAX} , T_{XMAX} ou T_{STMAX} : $46,3\text{h}$ (UG) e $47,6\text{h}$ (MBti-G)
- Diferença entre a concentração de substrato em T_{XMAX} e no início do cultivo, ΔS : $8,35\text{g/L}$ (UG) e $8,90\text{g/L}$ (MBti-G)
- Concentração máxima de esporos viáveis, E_{MAX} : $2,4 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ (UG) e $2,1 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}$ (MBti-G)
- Tempo para atingir E_{MAX} , T_{EMAX} : $56,3\text{h}$ (UG) e 65h (MBti-G)
- Concentração final de células ou de sólidos totais, X_{FINAL} ou ST_{FINAL} : $3,54\text{g/L}$ (UG) e $4,60\text{g/L}$ (MBti-G)

Os meios contendo milhocina (MBS-6 e MBti-Glicose) proporcionaram os maiores teores de esporos viáveis para ambas as bactérias.

Os valores de pH nas fermentações de *B. sphaericus* aumentam de forma gradual ao longo dos cultivos, variando entre 7,2-7,3 e 8,9 ao final de 48 horas de processo.

Para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, o pH decresce nas primeiras horas como indicativo da liberação de ácidos orgânicos provenientes da utilização do açúcar. Em seguida, um aumento do pH está relacionado ao processo de esporulação e lise celular. Uma fase de crescimento linear após a fase exponencial de crescimento é observada para as fermentações deste microrganismo.

- Analisando-se a influência das substâncias NaCl, CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, Al₂(SO₄)₃, tanino (Tanfloc SG) e uma poliacrilamida catiônica (Polyfloc CP1600P) sobre a flocação das células de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sem qualquer ajuste de pH, verificou-se que NaCl não induziu à formação de flocos na faixa de concentrações testadas (250 a 6.000ppm). A poliacrilamida não apresentou uma flocação satisfatória devido à formação pequenos filamentos dispersos.

- A avaliação da floculação para *B. sphaericus* conduziu à concentrações ótimas dos floculantes $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino em meio MBS correspondentes a 3.000, 2.000, 2.500 e 150ppm, respectivamente, com índices médios de recuperação das células entre 95 e 100%. Para o meio MBS-6, as concentrações ótimas para os mesmos floculantes foram de 1.500, 3.000, 2.000 e 1.700ppm, respectivamente, com índices de recuperação de 100% para todos os casos.
- A floculação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* com as substâncias $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e tanino induziram à concentrações ótimas de 2.000, 1.000, 2.000 e 400ppm para o meio UG, com máximas eficiências de recuperação de biomassa de 52, 40, 67 e 98%, respectivamente. Para MBti-Glicose, as concentrações foram de 2.500, 2.500, 3.500 e 1.000ppm, com recuperações de 90% para $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 100% para todos os demais floculantes.
- A floculação com ajuste de pH para ambas as bactérias revelaram que o meio ácido favorece a agregação. Isto ocorre provavelmente devido à neutralização da carga líquida negativa na superfície das células, possibilitando a agregação. Para *B. sphaericus*, foram obtidas condições ótimas de floculação para valores de pH entre 3,0 e 4,0 em meio MBS, e entre 2,0 e 4,0 para o meio MBS-6, com total recuperação das partículas em suspensão em todos os casos. Para *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG, foi observada máxima recuperação das células para valores de pH entre 2,0 e 4,0, enquanto que a condição ótima em MBti-Glicose foi obtida a pH 3,0.
- A distribuição de tamanhos das partículas presentes no caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS revelou um diâmetro médio equivalente a $1,15\mu\text{m}$, com distribuição regular. Como esperado, partículas maiores foram observadas no meio MBS-6, com 11,4% das partículas com diâmetro até $0,36\mu\text{m}$, 28% das partículas até $9,0\mu\text{m}$ e 84% delas com tamanho até $351,5\mu\text{m}$.
Para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, um diâmetro médio de $0,98\mu\text{m}$ foi obtido no meio límpido UG, enquanto que em MBti-Glicose observou-se uma distribuição de tamanhos irregular, com 23% das partículas com diâmetro até $1,25\mu\text{m}$, 74% das partículas até $43,8\mu\text{m}$ e 93% com tamanho até $170,0\mu\text{m}$.

- Considerando que os flocos são estruturas caracterizadas pela presença de aglomerados de partículas e de moléculas de água unidas por forças de superfície, os valores obtidos para a densidade destas partículas nos sistemas floculentos estudados são coerentes, sendo muito próximos à densidade da água.
- As variações observadas nos valores de diâmetro médio dos flocos revelaram que este parâmetro é dependente do tipo de microrganismo, da característica da suspensão floculada (meio de cultivo, pH) e do mecanismo de adsorção do agente floculante (eletrólitos ou variação do pH) às partículas. De forma geral, foram obtidos diâmetros variando entre $103,1 \pm 4,3\mu\text{m}$ e $275,6 \pm 9,5\mu\text{m}$ para *B. sphaericus*, e entre $162,2 \pm 21,4\mu\text{m}$ e $313,9 \pm 21,9\mu\text{m}$ para *B. thuringiensis* var. *israelensis*.
- Os testes de sedimentação com as suspensões floculentas de *B. sphaericus* em meio MBS nas faixas de contrações testadas revelaram que os flocos obtidos com tanino sedimentam mais rapidamente, seguindo-se dos flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e a pH 3,0. As maiores recuperações foram observadas para o tanino (90 a 98%) e a pH 3,0 (100%), com valores para $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de 63-84%, 68-93% e 82-91%, respectivamente.
- Os testes de sedimentação de *B. sphaericus* em meio MBS-6 revelaram que as maiores velocidades de sedimentação foram obtidas para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; os flocos com tanino, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentaram velocidades intermediárias, sendo que os primeiros apresentam maiores valores para concentrações abaixo de 2,0g/L. As menores velocidades foram obtidas para os flocos a pH 3,0. Elevados índices de recuperação foram observados para todos os casos: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (83-86%), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (86-91%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (89-95%), pH 3,0 (93-98%) e tanino (96 a 100%).
- A sedimentação das suspensões de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG apresentaram as maiores velocidades para os flocos com tanino, seguindo-se dos flocos a pH 3,0. Valores intermediários são obtidos para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, enquanto que as menores velocidades de sedimentação foram obtidas para os sistemas com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os percentuais de recuperação variaram

de 82 a 90% para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 85 a 97% para os flocos com tanino, 92 a 96% para $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 93 a 100% para $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 94 a 99% para os flocos a pH 3,0.

- Os testes de sedimentação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose revelaram que os flocos com tanino sedimentam mais rapidamente até uma concentração de sólidos de cerca de 4g/L; suspensões mais concentradas tendem a apresentar velocidades um pouco maiores para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Em seguida, maiores velocidades são obtidas para os flocos com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e a pH 3,0, com perfis muito semelhantes entre si. Os menores valores são observados para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os percentuais de recuperação foram de 77-86% para os flocos com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 86-92% com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 90-95% para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 97-99% a pH 3,0 e de 96-100% para as suspensões floculentas com tanino.
- As variações observadas nos perfis de sedimentação das suspensões puderam ser correlacionadas com as diferentes características dos flocos em relação a sua densidade e diâmetro. Maiores velocidades foram obtidas para flocos com maiores diâmetros ou densidades, e vice-versa. Velocidades semelhantes foram observadas para sistemas floculentos com valores de densidade e diâmetro muito próximos. Sedimentações mais lentas são obtidas com o aumento da concentração de partículas em suspensão.
- Os testes de sedimentação com tanino nos meios límpidos MBS para *B. sphaericus* (concentrações entre 2,5 e 11,8g/L) e UG para *B. thuringiensis* var. *israelensis* (concentrações entre 1,8 e 5,0g/L) se destacaram dentre todos os ensaios realizados, já que após 10min todas as sedimentações já eram completas.
- Utilizando-se a metodologia de Kynch para o cálculo de projeto do sedimentador contínuo, as maiores capacidades operacionais para *B. sphaericus* em meio MBS (concentrações em torno de $2,5\text{g/L} \pm 0,2\text{g/L}$) foram verificadas para os flocos com tanino, com concentração da suspensão em até 9,5 vezes para uma capacidade de 6,31cm/min. Para o meio MBS-6 ($4,6\text{g/L} \pm 0,3\text{g/L}$), foram obtidas menores capacidades devido às maiores concentrações de alimentação. Os maiores valores foram observados para os flocos com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para concentrar a suspensão

em até 2,5 vezes. Uma capacidade operacional de apenas 1,1cm/min é obtida para uma razão de concentração de 2,0.

- Para *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio UG (3,5g/L ± 0,2g/L), maiores capacidades são obtidas nos flocos a pH 3,0 para razões de concentração superiores a 4, com valores entre 3,8 e 3cm/min para concentrar a suspensão em até 12 vezes. Assim como para *B. sphaericus* em meio contendo sólidos em suspensão, as suspensões em meio MBti-Glicose (4,4g/L ± 0,2g/L) produziram menores capacidades operacionais. Valores semelhantes foram observados para as suspensões floculentas de tanino e CaCl₂.2H₂O nas razões de concentração entre 2,5 e 3,5, com valores entre 1 e 0,4cm/min.
- O equipamento de célula mecânica de flotação operando com o caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS-6 apresentou bom desempenho hidrodinâmico nas condições de operação que promoviam um sistema em regime turbulento com bolhas uniformes, o que foi observado para valores de aeração de 4 e 6L ar/min e agitações que variavam entre 640 e 1152rpm.
- Testes preliminares de flotação de *B. sphaericus* em meio MBS-6, nas condições de 6L ar/min, agitações de 640, 832 e 960rpm e valores de pH de 8,9 (pH de final de fermentação) e 7,0, revelaram que não ocorre flotação sem qualquer adição de coletor (amina Flotigan) ou espumante (tween), sem adição de espumante e para concentrações do coletor de 80 e 120ppm, e sem adição do coletor e concentrações do espumante de 1000 e 1250ppm. A adição de antiespumante durante a fermentação prejudica a formação de espuma nas condições especificadas.
- A cinética de remoção dos esporos de *B. sphaericus* em meio MBS-6, para 6L ar/min e 960rpm, concentrações do coletor de 40 e 80ppm e de espumante de 500, 750 e 1000ppm, nas condições de pH de 8,9 e 7,0, mostraram a formação de uma espuma abundante e estável. Nas condições testadas, não foi observada a remoção dos esporos após 20min de processo, indicada pela coloração clara da espuma formada. Meios de cultivo contendo sólidos de naturezas diversas, como o meio MBS-6, podem recobrir os esporos e reduzir sua característica de flutuabilidade.

- O caldo fermentado de *B. sphaericus* em meio MBS-6 submetido a ensaios de flotação em célula mecânica com maiores concentrações do coletor (200, 400 e 600ppm) e agitações de 832 e 960rpm, na condição de pH 7,0, mostraram que o aumento da concentração do coletor e da agitação do sistema favorece a remoção dos esporos. Para 600ppm do coletor e 960rpm, é atingida uma recuperação dos esporos próxima a 100% para um tempo de flotação de apenas 5 minutos. Em todos os casos, a espuma formada era menos abundante, mas apresentava-se com uma coloração mais escura, indicando o arraste dos esporos.
- Elevados índices de recuperação foram observados em todas as condições ensaiadas. Um percentual de 98% foi obtido para as concentrações de coletor de 400 e 600ppm sob agitação de 960rpm, seguindo-se do sistema agitado a 832rpm nas mesmas concentrações, com valores de 93 e 94%, respectivamente. O menor índice foi observado para uma concentração do coletor de 200ppm em ambas as agitações, correspondendo a 77% de remoção dos esporos do caldo fermentado.
- Os maiores fatores de concentração de esporos em célula mecânica foram observados na condição de 400ppm, com valores de 3,0 e 2,6 para os sistemas agitados a 960 e 832rpm, respectivamente, o que pode ser explicado pelo menor arraste de líquido pela espuma observado nestes casos.
- Analisando-se a flotação de *B. sphaericus* em meio MBS em coluna operando em batelada, na condição de pH de final de fermentação e sem adição de reagentes, foi observada uma remoção mais rápida dos esporos para o maior valor da vazão de ar, atingindo um valor residual abaixo de 30% para um tempo de flotação de 8min, e de apenas 2,5% após 30 minutos. Estes resultados confirmam a natureza hidrofóbica dos esporos desta bactéria e a influência do meio de cultivo sobre a eficiência de recuperação das células. A hipótese de que a taxa de remoção obedece a uma cinética de primeira ordem mostrou-se adequada.
- Observações microscópicas dos materiais flotados mostraram não haver a formação de aglomerados celulares, apresentando-se como suspensões sem formação de sedimento compacto, adequados para a preparação de formulados biolarvicidas.

- A separação da biomassa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio MBti-Glicose por flocação/sedimentação com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e a secagem do sedimento obtido após centrifugação proporcionou um rendimento de 5,6g de pó ativo por litro de fermentado. Foi possível desenvolver uma formulação sólida em comprimidos, que apresentaram peso médio de 220mg ± 20mg.
- Os excelentes resultados de atividade biológica das amostras do caldo fermentado, suspensões floculentas concentradas e pós ativos de *B. sphaericus* 2362 em meio MBS-6 contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, e das amostras das suspensões concentradas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em ambos os meios de cultivo contra larvas de *Ae. aegypti* demonstram a eficiência do processo de concentração das biomassas por flocação/sedimentação. Os resultados obtidos foram compatíveis com alguns produtos formulados já existentes no mercado.
- A eficácia inicial da formulação em comprimido à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* revelaram uma mortalidade total para as condições de 30 e 50 litros de água, enquanto que para um volume de 100L a mortalidade observada foi de 88%.
- Os testes de persistência do comprimido em função da diluição progressiva do produto, pela reposição de 20% do volume de água a cada dois dias, possibilitaram um controle total (100% de mortalidade) por seis meses. Não há relatos na literatura de uma persistência desta magnitude para um produto à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.
- Testes de estabilidade da formulação têm revelado um controle total de larvas de *Ae. aegypti* 24 horas após a aplicação, indicando uma estabilidade de no mínimo 13 meses.
- Testes em campo realizados em área piloto do bairro de Nossa Senhora das Graças (município de Moreno-PE) revelaram excelentes resultados no controle populacional de *Aedes* spp quando o produto foi aplicado em diferentes tipos de criadouros domésticos.

- A utilização de armadilhas de oviposição foi uma alternativa bem sucedida para a obtenção de uma estimativa adequada do nível de infestação de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na área.
- O emprego de comprimidos contendo a décima parte do princípio ativo nas armadilhas asseguraram um controle de 100% por um período de até 40 dias, podendo ser utilizados com segurança nestes sistemas de monitoramento e controle de *Aedes* spp.

8.2- Sugestões

- Obter os parâmetros cinéticos de fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de taxa específica de consumo de substrato (q_S) para as fermentações de *B. sphaericus* através da determinação do consumo de proteína durante o processo fermentativo em batelada.
- Analisar a influência da presença dos agentes floculantes e da condição de pH 3,0 nas amostras floculadas, bem como da presença do coletor nas amostras flotadas, sobre a viabilidade dos esporos ao longo do tempo.
- Analisar os materiais concentrados obtidos (suspensões floculentas concentradas e pós ativos) em termos da concentração de esporos viáveis.
- Analisar a estrutura dos flocos formados através de microscopia eletrônica de varredura.
- Investigar a utilização da flotação em coluna, operando continuamente, sobre a recuperação das células.
- Investigar a utilização da flotação por ar dissolvido para a separação das células, considerando que nestes sistemas são obtidas bolhas com menores diâmetros,

ideais para aumentar a eficiência de remoção de partículas pequenas como células microbianas.

- Investigar a característica de hidrofobicidade dos esporos de *B. sphaericus* nos meios de cultivo estudados, visando avaliar as diferenças no comportamento de flotabilidade destes caldos fermentados.
- Avaliar a separação dos esporos e cristais protéicos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* através do processo de flotação em célula mecânica convencional e em coluna. A quantificação da concentração das δ-endotoxinas deve ser realizada através da solubilização dos cristais e realização de medidas do conteúdo protéico das amostras flotadas, tendo-se uma linhagem acristalífera da bactéria como ensaio de referência.
- Caracterizar a formulação sólida em termos das especificações farmacopéicas, como dureza, friabilidade e tempo de desintegração dos comprimidos.
- Verificar a influência do pH, presença de compostos tóxicos (Cu, Pb, C₆H₅OH), temperatura e radiação UV sobre a atividade biológica do formulado e dos concentrados obtidos.
- Obter os pós ativos para as formulações sólidas das bactérias entomopatogênicas através de secagem em spray-dryer.

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSOLOM, D.R., LAMBERTI, F.V., POLICOVA, Z. et al., 1983, "Surface Thermodynamics of Bacterial Adhesion", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, pp. 90-97.
- AHIMOU, F., PAQUOT, M., JACQUES, P. et al., 2001, "Influence of Electrical Properties On The Evaluation of the Surface Hydrophobicity of *Bacillus subtilis*", *Journal of Microbiological Methods*, v. 45, pp. 119-126.
- AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F., 1973, *Biochemical Engineering*. 2 ed. New York, Academic Press.
- ALBUQUERQUE, M.F.M., MARZOCHI, M.C., SABROZA, P.C., 1995, "Bancroftian Filariasis in Two Urban Areas of Recife, Brazil: the Role of Individual Risk Factors", *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 37, pp. 225-233.
- ALVES, S.B., 1998, *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. Piracicaba, FEALQ.
- AMALRAJ, D.D., SAHU, S.S., JAMBULINGAM, P. et al., 2000, "Efficacy of Aqueous Suspension and Granular Formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) Against Mosquito Vectors", *Acta Tropica*, v. 75, pp. 243-246.

- ARCHIBALD, A.R., HANCOCK, I.C., HARWOOD, C.R., 1993, "Cell Wall Structure, Synthesis and Turnover". In: Sonenshein, A., Hoch, J., Losick, R. (eds), *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*, 1 ed., Washington, American Society for Microbiology.
- ARONSON A.I., SHAI, Y., 2001, "Why *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins Are So Effective: Unique Features of Their Mode of Action", *FEMS Microbiology Letters*, v. 195, pp. 1-8.
- BAHR, K.H., WEISSER, H., SCHÜGERL, K., 1991, "Investigations on Proteins Excreted by the Yeast *Hansenula polymorpha* and Their Influence on Broth Foaminess and Cell Recovery by Flotation", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, pp. 747-754.
- BAHR, K.H., SCHÜGERL, K., 1992, "Recovery of Yeast From Cultivation Medium by Continuous Flotation and Its Dependence on Cultivation Conditions", *Chemical Engineering Science*, v. 47, pp. 11-20.
- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. Singapore, McGraw-Hill Book Company.
- BARROS, N.M., ROSSATO, M., ONOFRE, S.B., 1999, "Nomuraea rileyi Como Agente de Controle Microbiano da Lagarta-da-soja". In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds), *Controle Biológico* vol. 3, 1 ed., chapter 9, São Paulo, Brasil, Embrapa Meio Ambiente.
- BAUMANN, P., CLARK, M.A., BAUMANN, L. et al., 1991, "*Bacillus sphaericus* as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and Its toxins", *Microbiology Reviews*, v. 55, pp. 425-436.
- BAUTISTA, J., CHICO, E., MACHADO, A., 1987, "Cell Removal From Fermentation Broth by Flocculation and Sedimentation", *Biotechnology Letters*, v. 8, pp. 315-318.

- BECKER, N., MARGALIT, J., 1993, "Use of *Bacillus thuringiensis* Against Mosquitoes and Black Flies". In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, 1 ed., chapter 4, Cambridge, John Wiley & Sons.
- BECKER, N., 1997, "Microbial Control of Mosquitoes: Management of the Upper Rhine Mosquito Population as a Model Programme", *Parasitology Today*, v. 13, pp. 485-487.
- BEDDING, R.A., 1974, "Five New Species of *Deladenus* (Neotylenchidae) Entomophagous-Mycetophagous Nematodes Parasitic in Siricid Woodwasps", *Nematologica*, v. 20, pp. 204-225.
- BEEGLE, C.C., ROSE, R.I., ZINIU, Y., 1990, "Mass Production of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* for Microbial Control of Insect Pests". In: Maramorosch, K.B. (ed), *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*, 1 ed., chapter 7, CRC Press.
- BELTER, P.A., CUSSLER, E.L., HU, W.S., 1988, *Bioseparations – Downstream Processing for Biotechnology*. 1 ed. New York, John Wiley & Sons.
- BOISMENU, D., LEPINE, F., THIBAULT, C. et al., 1990, "Estimation of Bacterial Activity of Cod Fillets With the Disc Flotation Method", *Journal of Food Science*, v. 56, pp. 958-961.
- BOSSIER, P., VERSTRAETE, W., 1996, "Triggers For Microbial Aggregation in Activated Sludge", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, pp. 1-6.
- BRAGA, I.A., GOMES, A.C.C., NELSON, M. et al., 2000, "Comparação entre Pesquisa Larvária e Armadilha de Oviposição para Detecção do *Aedes aegypti*", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, pp. 347-353.
- BRIESE, D.T., PODGWAITE, J.D., 1985, "Development of Viral Resistance in Insect Populations". In: Maramorosch, K.E., Sherman, K.E. (eds), *Viral Insecticides for Biological Control*, 1 ed., Orlando, USA, Academic Press.

- BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., 1991, *Biology of Microorganisms*. 6th ed. London, Prentice-Hall International.
- BULATOVIC, S., WYSLOUZIL, D.M., 1995, "Selection and Evaluation of Different Depressants Systems for Flotation of Complex Sulphide Ores", *Minerals Engineering*, v. 8, pp. 63-76.
- BULL, D., HATHAWAY, D., 1986, *Pragas e Venenos no Brasil e no Terceiro Mundo*. 1 ed. Petrópolis, Ed. Vozes.
- BUSCH, P.L., STUMM, W., 1968, "Chemical Interactions in the Aggregation of Bacteria – Bioflocculation in Waste Treatment", *Environmental Science and Technology*, v. 2, pp. 49-53.
- CALLEJA, G.B., 1984, "Aggregation". In: Mashall, K.C. (ed), *Microbial Adhesion and Aggregation*, 1 ed., Berlin, Springer-Verlag.
- CALLEJA, G.B., 1987, "Cell aggregation". In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds), *The Yeasts*, 2 ed., chapter 7, London, Academic Press.
- CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I. O., 1987, *Histórico da Bactéria Bacillus thuringiensis var israelensis*. In: Boletim de Pesquisas, CNPDA/EMBRAPA.
- CAVADOS, C.F.G., CHAVES, J.Q., QUEIROZ, M.M.C. et al., 1998, "Avaliação da Atividade Biológica de Linhagens de *Bacillus thuringiensis* contra Dípteros Muscoides do gênero *Chrysomya*". In: Anais do VI Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIOL), Rio de Janeiro, RJ, May.
- CHARLES, J.F., NIELSEN-LEROUX, C., DELÉCLUSE, A., 1996, "Bacillus sphaericus Toxins: Molecular Biology and Mode of Action", *Annual Review of Entomology*, v.41, pp. 451-472.
- CHARLES, J.F., FILHA, M.H.S.F., NIELSEN-LEROUX, C. et al., 1997, "Binding of the 51- and 42-kDa Individual Components From the *Bacillus sphaericus* Crystal Toxin to Mosquito Larval Midgut Membranes From *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae)", *FEMS Microbiology Letters*, v.156, pp. 153-159.

- CHEN, Y.M., LIU, J.C., JU, Y.H., 1998, "Flotation Removal of Algae From Water", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 12, pp. 49-55.
- CISTERNAS, E., FRANCE, A., GERDING, M., 1998, "Control de *Listronotus bonariensis* con *Beauveria bassiana* en Praderas en el Sur de Chile". In: *6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBOL)*, pp. 145, Rio de Janeiro, RJ, May.
- COE, H.S., CLEVENGER, G.H., 1916, "Methods of Determining the Capacities of Slime-Settling Tanks", *Trans. Am. Inst. Min. Eng.*, v. 55, pp. 356-384.
- CONSOLI, R.A.G.B., SANTOS, B.S., LAMOUNIER, M.A. et al., 1997, "Efficacy of a New Formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 Against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, pp. 571-573.
- COONEY, C.L., 1981, "Growth of Microorganisms". In: Rehm, H.J., Reed, G. (eds), *Biotechnology*, vol. 1, 1 ed., Weinheim, Verlag Chemie.
- COPPEL, H.C., MERTINS, J.W., 1977, *Biological Insect Pest Suppression*. 1 ed. Berlin, Springer-Verlag.
- COUCH, T.L., 2000, "Industrial Fermentation and Formulation of Entomopathogenic Bacteria". In: Charles, J.F., Delécluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (eds), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*, 1 ed., chapter 5.2, Kluwer Academic Publishers.
- COUTO, H.J.B., 2003, *Tratamento de Efluentes Através da Flotação por Ar Dissolvido*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DAMASCENO, J.J.R., MASSARANI, G., 1990, "Uma Análise do Método de Kynch para o Projeto de Sedimentadores". In: Anais do XVIII Encontro Sobre Escoamento em Meios Porosos, pp. 451, Friburgo, Rio de Janeiro, Oct.
- DAMASCENO, J.J.R., MASSARANI, G., 1993, "Projeto e Análise do Desempenho de Sedimentadores Contínuos", *Ciência & Engenharia/UFU*, ano 2, n. 2, pp. 61-76.

- DEANE, L.M., 1986, "Malaria Vectors in Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, pp. 5-14.
- De BARJAC, H., LARGET-THIÉRY, I., 1984, *Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of Bacillus thuringiensis H-14 preparations*: Mimeographed document WHO/VBC/84.892, World Health Organization, Geneva.
- DIAS, J.M.C.S., 1992, "Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, pp. 59-76.
- DOGNON, A., DUMONTET, A., 1941, "Concentration et Séparation des Microorganismes par Moussage", *C.R. Soc. Biol.*, v.135, pp. 884-887.
- DOYLE, R.J.; NEDJAT-HAIEM, F.; SINGH, J.S., 1984, "Hydrophobic Characteristics of *Bacillus Spores*", *Current Microbiology*, v.10, pp. 329-332.
- DUDENHOV, S.V., SHUBOV, L.Y., GLAZUNOV, L.A. et al., 1980, *Fundamentos de La Teoría Y La Práctica de Empleo de Reactivos de Flotación*, 1 ed. Spain, MIR.
- DULMAGE, H.T., 1970, "Production of the Spore δ-Endotoxin Complex by Variants of *Bacillus thuringiensis* in Two Fermentation Media", *Journal Invertebrate Pathology*, v. 16, pp. 385-389.
- DULMAGE, T., YOUTEN, A.A., SINGER, S. et al, 1990, *Guidelines for Production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus*: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases UNDP/WORLD BANK/WHO, World Health Organization, Geneva.
- ELÇİN, Y.M., 1995, "Bacillus sphaericus 2362-Calcium Alginate Microcapsules for Mosquito Control", *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, pp. 587-591.
- EL-KADI, M.K., 1977, "Produção Comercial de Nematóides Parasitos de Cigarrinhas", *Sociedade Brasileira de Nematologia*, v. 2, pp. 71-74.
- ERIKSSON, L.B., HARDIN, A.M., 1987, "Flocculation of *E. coli* Bacteria With Cationic Polyelectrolytes". In: Attia, Y.A. (ed.), *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*. 1 ed., Amsterdam, Elsevier.

- ESSER, K., KÜES, U., 1983, "Flocculation and Its Implication for Biotechnology", *Process Biochemistry*, v. 18, pp. 21-23.
- FALCON, L.A., 1971, "Use of Bacteria for Microbial Control". In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (ed), *Microbial Control of Insects and Mites*, 1 ed., chapter 3, New York, Academic Press.
- FERRAZ, L.C.C.B., 1986, "Nematóides Entomopatogênicos". In: Alves, S.B. (ed), *Controle Microbiano de Insetos*, 1 ed., São Paulo, Editora Manole Ltda.
- FERREIRA LIMA, L.C.S., 1998, "A Evolução dos Produtos Fitossanitários e o Manejo Integrado de Pragas". In: *Anais do 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIO)*, pp. 328-334, Rio de Janeiro, May.
- FORSTER, C.F., KNIGHT, N.J.B., WASE, D.A.J., 1985, "Flocculating Agents of Microbial Origin", *Adv. Biotechnol. Proc.*, v. 4, pp. 211-240.
- FRANÇA, S.C.A., 2000, *Equações Constitutivas para a Sedimentação de Suspensões Floculentas*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GOCHIN, R. J., 1981, "Flotation". In: Svarovsky, L. (ed), *Solid-Liquid Separation*, 2 ed., chapter 19, London, Butterworths.
- GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J.A., 1977, "A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity Against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*", *Mosquito News*, v. 37, pp. 355-358.
- GUNASEKARAN, K.; PADMANABAN, V.; BALARAMAN, K., 2000, "Development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* that Survived the Exposure of Sub-Lethal Dose of *Bacillus sphaericus* as Larvae", *Acta Tropica*, v.74, pp. 43-49.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H.R., 1989, "Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*", *Microbiology Reviews*, v. 53, pp. 242-255.
- HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D., 2000, "Isolation, Distribution and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Warehouses in China", *Crop Protection*, v. 19, pp. 449-454.

- HUGHES, M.A., 1981, "Coagulation and Flocculation". In: Svarovsky, L. (ed), *Solid-Liquid Separation*, 2 ed., chapter 4, London, Butterworths.
- IEDE, E.T.; PENTEADO, S.R.C.; LEITE, M.S.P., 1998, "Utilização do Nematóide *Deladenus siricidicola* (Nematoda: Neotylenchidae) no Controle Biológico de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), Praga de *Pinus spp.*". In: I Congresso Latinoamericano IUFRO, Valdívia, Chile.
- IVES, K.J., 1982, *The Scientific Basis of Flotation*, 1 ed. Cambridge, NATO ASI Series.
- JEYARATNAM, J., 1990, "Acute Pesticide Poisoning: a Major Global Health Problem", *World Health Statistics Quarterly*, v.43, pp. 139-144.
- KALFON, A., LARGET-THIERY, L., CHARLES, J.F. et al, 1983, "Growth, Sporulation and Larvicidal Activity of *Bacillus sphaericus*", *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, v. 18, pp. 168-173.
- KAMADA, K., MURATA, M., 1984, "On the Mechanism of Brewer's Yeast Flocculation", *Agric. Biol. Chem.*, v. 48, pp. 2423-2433.
- KELLEN, W., CLARK, T., LINDEGREN, J. et al., 1965, "Bacillus sphaericus Neide as a Pathogen of Mosquitoes", *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 7, pp. 442.
- KUMAR, P.A., SHARMA, R.P., MALIK, V.S., 1996, "The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*", *Advances in Applied Microbiology*, v. 42, pp. 1-43.
- KYNCH, G.J., 1952, "A Theory of Sedimentation", *Trans. Faraday Soc.*, v. 48, pp. 166-176.
- LANG, W.K., GLASSEY, K., ARCHIBALD, A.R., 1982, "Influence of Phosphate Supply on Teichoic and Teichuronic Acid Content of *Bacillus subtilis* Walls", *J. Bacteriology*, v. 151, pp. 367-375.
- LANGE, C.E., 1996, "Protistas Patógenos de Insectos Terrestres". In: Lecuona, R.E. (ed), *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*, 1 ed., Castelar, Argentina.

- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G. et al, 1980, "A Newly Revised Classification of the Protozoa", *Journal of Protozoology*, v. 27, pp. 37-58.
- LI, J., CARROL, J., ELLAR, D.J., 1991, "Crystal Structure of Insecticidal δ-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5A° Resolution", *Nature*, v. 353, pp. 815-821.
- LÓPEZ, J.A., CALAZANS, G.M.T., SILVEIRA, M.M. et al., 1996, "The Effect of Carbon Sources on the Settling Behaviour of Flocculent Strains of *Zymomonas mobilis*", *Bioseparation*, v. 6, pp. 229-232.
- LUEDEKING, R., 1967, "Fermentation Process Kinetics". In: Blakebrought, N. (ed), *Biochemical and Biological Engineering Science*, 1 ed., London, Academic Press.
- LUNA, C.L., 1999, *Separação de Esporos de Bacillus sphaericus 2362 por Floculação*. Dissertação de Mestrado, UFPE, Recife, PE, Brasil.
- LUNA, C.L.; RIOS, E.M.M., LOPES, C.E., 2001, "On the Settling of *Bacillus sphaericus* Spores by pH Adjustment", *Biotechnology Letters*, v. 23, pp. 1011-1013.
- MACIEL, M.A.; ROCHA, A.; MARZOCHI, K.B.F. et al., 1996, "Epidemiological Study of Bancroftian Filariasis in Recife, Northeastern Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, pp. 449-455.
- MARDINI, L.B.L.F., SOUZA, M.A.T., RABINOVITCH, L. et al., 1999, "Field Studies With the Bacterial Larvicide INPALBAC for *Simulium* spp. Control in Rio Grande do Sul, Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, pp. 679-681.
- MASSARANI, G., 2002, *Fluidodinâmica em Sistemas Particulados*, 2 ed. Rio de Janeiro, E-papers.
- McLAUGHLIN, R.E., 1971, "Use of Protozoans for Microbial Control of Insects". In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds), *Microbial Control of Insects and Mites*, 1 ed., chapter 6, London, Academic Press.
- MELO, M. V., 2002, "Tratamento de Águas Oleosas por Flotação", Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- MELO-SANTOS, M.A.V., SANCHES, E.G., JESUS, F.J. et al., 2001a, "Evaluation of a New Tablet Formulation Based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for Larvicidal Control of *Aedes aegypti*", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, pp. 1-2.
- MELO-SANTOS, M.A.V., ALBUQUERQUE, C.M.R., SANTOS, S.R.A. et al., 2001b, "Eficiência de Ovitrampas Consorciadas com *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*, em uma Área Infestada por *Aedes sp.*". In: *Anais do 7º Simpósio de Controle Biológico (VII SICONBIO)*, pp. 224, Poços de Caldas, May.
- MENDONÇA, A.F., 1998, "Controle de Cigarrinhas de Cana-de-açúcar com Fungos Entomopatogênicos". In: *Anais do 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIO)*, pp. 398-400, Rio de Janeiro, May.
- MESQUITA, L.M.S., LINS, F.A.F., TOREM, M.L., 2002, *Biobeneficiamento Mineral: Potencialidades dos Microrganismos Como Reagentes de Flotação*, Série Tecnologia Mineral, CETEM/MCT.
- MIGNONE, C.F., AVIGNONE-ROSSA, C., 1996, "Analysis of Glucose Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, pp. 78-84.
- MIKI, B.L.A., POON, N.H., JAMES, A.P. et al., 1982, "Possible Mechanism for Flocculation Interactions Governed by the Gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Bacteriology*, v. 150, pp. 878-889.
- MILLER, G.L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, pp. 426-428.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Programa Nacional de Controle da Dengue*, 2002. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, Brasília.
- MIRANDA, E.A., BERGLUND, K.A., 1993, "Evaluation of Column Flotation in the Downstream Processing of Fermentation Products, Recovery of a Genetically Engineered α -Amylase", *Biotechnology Progress*, v. 9, pp. 411-420.

- MISHLER, R.T., 1912, "Settling Slimes at the Tiger Mill", *Eng. Min. J.*, v. 94, pp. 643-646.
- MISRA, M.; BUKKA, K.; CHEN, S., 1996, "The Effect of Growth Medium of *Thiobacillus ferrooxidans* on Pyrite Flotation", *Minerals Engineering*, v.9, n.2, pp. 157-168.
- MOLINA, M.A.B., SILVEIRA, M.M., SATO, S., 2000, "Estudo Cinético do Crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em Meio Semi-sintético com Diferentes Concentrações Iniciais de Glicose". In: *Anais do 13º Simpósio Nacional de Fermentações (XIII SINAFERM)*, Rio de Janeiro, August.
- MONNERAT, R., BRAVO, A., 2000, "Proteínas Bioinseticidas Produzidas pela Bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de Ação e Resistência". In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds), *Controle Biológico*, 1 ed., v. 3, chapter 7, Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente.
- MONTIEL, M.L.T., TYAGI, R.D., VALERO, J.R., 2001, "Wastewater Treatment Sludge as a Raw Material for the Production of *Bacillus thuringiensis* Based Biopesticides", *Water Research*, v. 35, pp. 3807-3816.
- MOSCARDI, F., 1989, "The Use of Viruses for Pest Control in Brazil: the Case of the Nuclear Polyhedrosis Virus of the Soybean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 4, n. 3, pp. 51-56.
- MOSCARDI, F., 1999, "Assessment of the Application of Baculoviruses for Control of Lepidoptera", *Annual Review of Entomology*, v. 44, pp. 257-289.
- MOZES, N., ROUXHET, P.G., 1990, "Microbial Hydrophobicity and Fermentation Technology". In: Rosenberg, M., Doyle, R.J. (eds), *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, 1 ed., Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- MUMMIGATTI, S.G., RAGHUNATHAN, N., 1990, "Influence of Media Composition on the Production of δ-Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*", *J. Invertebr. Pathol.*, v. 55, pp. 147-151.
- NAVON, A., 2000, "Bacillus thuringiensis Insecticides in Crop Protection – Reality and Prospects", *Crop Protection*, v. 19, pp. 669-676.

- NEIDE, E., 1904, "Botanische Besch Neibung Einiger Sporenbildenden Bakterien", *Zentralblatt fuer Bakteriologie Parasitenkunde Infektions Krankheiten Hygiene Abstracts*, v. 12, pp. 1.
- NOBRE, A., ANTEZANA, D., TAUIL, P.L., 1994, "Febre Amarela e Dengue no Brasil: Epidemiologia e Controle", *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, pp. 59-66.
- NUNOKAWA, Y., TOBA, H., OUCHI, K., 1971, "Froth Flotation of Yeast Cells", *Journal of Fermentation Technology*, v. 49, pp. 959-967.
- OKAMOTO, Y., CHOU, E.J., 1980, "Foam Separation Processes". In: Schweitzer, P.A. (ed.), *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*, 1 ed., chapter 5, McGraw-Hill Book Company.
- OSBORNE, D.G., 1981, "Gravity Thickening". In: Svarovsky, L. (ed), *Solid-Liquid Separation*, 2 ed., chapter 5, London, Butterworths.
- PALHA, M.A.P.F., 1999, *Flocação em Células de Zymomonas mobilis*. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., 1993, *Microbiology – Concepts and Applications*. 1 ed. New York, McGraw-Hill.
- PEREIRA Jr, N., 1991, *Intensification of D-xilose Fermentation Process*. Ph.D. Thesis, The University of Manchester, UK.
- PERRY, J.J., STALEY, J.T., 1997, *Microbiology: Dynamics and Diversity*. 1 ed. EUA, Saunders College Publishing.
- PITTA, F.A.G., 2001, *Influência do Equipamento na Flotação por Espumas: Célula Mecânica Versus Coluna*, Série Rochas e Minerais Industriais-SRMI, Rio de Janeiro, CETEM/MCT.

- POINAR Jr., G.O., 1971, "Use of Nematodes for Microbial Control of Insects". In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds), *Microbial Control of Insects and Mites*, 1 ed., chapter 8, London, Academic Press.
- PUGET, F.P., HALASZ, M.R.T., MASSARANI, G. et al., 1999, "Influence of the Flocculating Agent in Sedimentation and Performance of a Non Flocculent Strain of *Zymomonas mobilis* in the Ethanol Production Process", *Bioseparation*, v. 0, pp. 1-6.
- PUGET, F.P., MENDONÇA, L.A., MASSARANI, G. et al., 2000, "Recuperação de Baixas Concentrações de Metais em Efluentes a Partir da Associação dos Processos de Extração por Solvente e Flotação Líquido-líquido". In: *Anais do XXVIII ENEMP-Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados*, Teresópolis, Rio de Janeiro, RJ, Oct.
- PUGET, F.P., MELO, M.V. e MASSARANI, G., 2001, "Análise do Desempenho de Coluna de Flotação para o Tratamento de Efluentes da Industria Láctea", In: *XXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados*, São João Del Rei, MG, Oct.
- RABINOVITCH, L., SILVA, C.M.B., ALVES, R.S.A., 1999a, "Controle Biológico de Vetores de Doenças Tropicais Utilizando *Bacillus* Entomopatogênicos". In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds), *Controle Biológico*, 1 ed., v. 2, chapter 1, Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente.
- RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C.F.G.; CHAVES, J.Q. et al., 1999b, "A New Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* Very Active Against Blackfly Larvae", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 5, pp. 683-685.
- RÉGIS, L., SILVA-FILHA, M.H., OLIVEIRA, C.M.F. et al., 1995, "Integrated Control Measures against *Culex quinquefasciatus*, the Vector of Filariasis in Recife", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 90, pp. 115-119.
- RÉGIS, L., SILVA, S.B., MELO-SANTOS, M.A., 2000, "The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programmes in Brazil", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, pp. 207-210.

- RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., LYKLEMA, J. et al., 1999, "DLVO and Steric Contributions to Bacterial Deposition in Media on Different Ionic Strengths", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 14, pp. 179.
- RIOS, E.M., 1998, *Recuperação de Esporos de Bacillus sphaericus em Meio Fermentado*. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ROBBS, C.F., BITTENCOURT, A.M., 1998, "O Controle Biológico de Insetos Nocivos à Agricultura com o Emprego de Fungos Imperfeitos ou Hifomicetos", *Biotecnologia*, v. 6, pp. 10-12.
- ROBERTS, D.W., YENDOL, W.G., 1971, "Use of Fungi for Microbial Control of Insects". In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds), *Microbial Control of Insects and Mites*, 1 ed., chapter 5, London, Academic Press.
- RODRIGUES, I.B., TADEI, W.P., DIAS, J.M.C.S., 1998, "Studies on the *Bacillus sphaericus* Larvicidal Activity Against Malarial Vector Species in Amazonia", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, pp. 441-444.
- ROSE, A.H., 1984, "Physiology of Cell Aggregation: Flocculation by *Saccharomyces cerevisiae* As a Model System". In: Marshall, K.C. (ed.), *Microbial Adhesion and Aggregation*, 1 ed., Berlin, Springer-Verlag.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E., 1980, "Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method For Measuring Cell-Surface Hydrophobicity", *FEMS Microbiology Letters*, v. 9, pp. 29-33.
- ROWE, G.E., ARGYRIOS, M., 1987, "Bioprocess Developments in the Production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*", *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v. 6, pp. 87-127.
- RUSSEL, B.L.; JELLEY, S.C.; YUSTEN, A.A., 1989, "Carbohydrate Metabolism in the Mosquito Pathogen *Bacillus sphaericus* 2362", *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, pp. 294-297.

- SADOWSKI, Z.; GOLAB, Z.; SMITH, R.W., 1991, "Flotation of *Streptomyces pilosus* after lead accumulation", *Biotechnology and Bioengineering*, v.37, n.10, pp. 955-959.
- SANTANA, C.C., 1994, "Adsorptive Bubble Separation Processes as a Mean of reducing Surface-Active Contaminants in Industrial Wastewaters", *Revista Brasileira de Engenharia, Química Especial*, v. 5, pp. 7-74.
- SANTHIYA, D.; SUBRAMANIAN S.; NATARAJAN K.A., 2000, "Surface Chemical Studies on Galena and Sphalerite in the Presence of *Thiobacillus thiooxidans* With Reference to Mineral Beneficiation", *Minerals Engineering*, v.13, n.7, pp. 747-763.
- SANTOS, L.C., 1996, *Simulação da Flotação em Coluna*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
- SCHERRER, P., LÜTHY, P., TRUMPI, B., 1973, "Production of δ-Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a Function of Glucose Concentrations", *Applied Microbiology*, v. 25, pp. 644-646.
- SHARMA, V.P.; CHAUDURI, M.; BISWAS, A.K., 1991, "Bacterial Leaching of Zinc From Flotation Tailings", *Journal of General Applied Microbiology*, v.37, n.1, pp. 1-8.
- SHIH, I.L., VAN, Y.T., YEH, L.C. et al., 2001, "Production of a Biopolymer Flocculant From *Bacillus licheniformis* and Its Flocculation Properties", *Bioresource Technology*, v. 78, pp. 267-272.
- SILVA, S.B., 2000, *Avaliação de Produtos à Base de Bactérias Entomopatógenas para o Controle do Vetor da Filariose Linfática, Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)*, Dissertação de Mestrado, Biologia Animal/CCB/UFPE, Recife, PE, Brasil.
- SILVA, S.F., DIAS, D.G.S., MARTINS, E.S. et al., 2002, *Prospecção de Estírces de Bacillus sphaericus Tóxicas Contra Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus*. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

- SILVA-FILHA, M.H., 1994, *Aspectos do Uso do Entomopatógeno Bacillus sphaericus no Controle de Culex quinquefasciatus (Diptera): Efeitos a Longo Término e Desenvolvimento de Resistência*. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVA-FILHA, M.H.; REGIS, L.; NIELSEN-LEROUX, C. et al., 1995, "Low-Level Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Field-Treated Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)", *Journal Economical Entomology*, v. 88, pp. 525-530.
- SINGER, S., 1973, "Insecticidal Activity of Recent Bacterial Isolates and Their Toxins Against Mosquito Larvae", *Nature*, v. 244, pp. 110-110.
- SINGER, S., 1980, "Bacillus sphaericus for the Control of Mosquitoes", *Biotech. and Bioeng.*, v. 22, pp. 1335-1355.
- SMITH, R.A., 1982, "Effect of Strain and Medium variation on Mosquito Toxin production by *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*", *Can. J. Microbiol.*, v. 28, pp. 1089-1092.
- SOMASUNDARANA, P.; RENA Y; RAOB M.Y., 1998, "Applications of biological processes in mineral processing", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.133, n.1-2, pp. 13-23.
- SOUSA, M.F.V.Q., 1998, *Estudo da Produção Descontínua de Actinomicina-D por Streptomyces*. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SOUSA, S.R., OLIVEIRA, K.P., SOUZA, C.S. et al., 2003, "Yeast Flotation Viewed as the Result of the Interplay of Supernatant Composition and Cell-Wall Hydrophobicity", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 29, pp. 309-319.
- STABINIKOVA, E.V., GREGIRCHAK, N.N., TARANENKO, T.O., 1991, "Flotation Characteristics of Bacillary Cells and Spores", *Mikrobiologicheskii Zhurnal*, v. 53, pp. 38-42.

- STOCK, S.P., CAMINO, N.B., 1995, "Nemátodos Entomopatógenos". In: Lecuona, R.E. (ed), *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*, 1 ed., Castelar, Argentina.
- STOCKDALE, H., 1992, "Microbial Insecticides". In: Moo-Young, M. (ed), *Comprehensive Biotechnology, The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. The Practice of Biotechnology*, 1 ed., chapter 3, Current Commodity Products.
- STRATFORD, M., ASSINDER, S., 1991, "Yeast Flocculation: Flo1 and NewFlo Phenotypes and Receptor Structure", *Yeast*, v. 7, pp. 559-574.
- STRATFORD, M., 1996, "Induction of Flocculation in Brewing Yeasts by Change in pH Value", *FEMS Microbiology Letters*, v. 136, pp. 13-18.
- TANZINI, M.R., 1998, "Controle do Percevejo-de-renda-da-seringueira com *Sporothrix*". In: *Anais do 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBOL)*, pp. 393-397, Rio de Janeiro, May.
- THANABALU, T.; HINDLEY, J.; JACKSON-YAP, et al., 1991, "Cloning, Sequencing, and Expression of a Gene Encoding a 100-kilodalton Mosquitocidal Toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1", *J. Bacteriol.*, v.173, pp. 2776-85.
- THIÉRY, I., FRACHON, E., 1997, "Identification, Isolation, Culture and Preservation of Entomopathogenic Bacteria". In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 1 ed., chapter 3, Academic Press Limited.
- TILLER, F.M., CHEN, W., 1988, "Limiting Operating Conditions for Continuous Thickeners", *Chem. Eng. Sci.*, v. 43, pp. 1695-1704.
- VALICENTE, F.H., CRUZ, I., 1991, *Controle Biológico da Lagarta-do-cartucho, Spodoptera frugiperda, com o Baculovírus*. In: Circular Técnica Número 15, EMBRAPA/CNPMS.
- VAN DER MEI, H.C., BOS, R., BUSSCHER, H.J., 1998, "A Reference Guide to Microbial Cell Surface Hydrophobicity Based on Contact Angles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 11, pp. 213.

- VAN DER WAL, A., NORDE, W., ZEHNDER, A.J.B. et al., 1997, "Determination of Total Charge in the Cell Walls of Gram-Positive Bacteria", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 9, pp. 81.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W. et al., 1987, "The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion", *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, pp. 1893-1897.
- VIDYARTHI, A.S., TYAGI, R.D., VALERO, J.R. et al., 2002, "Studies on the Production of *B. thuringiensis* Based Biopesticides Using Wastewater Sludge as a Raw Material", *Water Research*, v. 36, pp. 4850-4860.
- VILARINHOS, P.T.R., DIAS, J.M.C.S., SCHENKEL, R.G.M., HONDA, C.S., 1988, "Utilização de Água de Levedura como substrato para o cultivo de *Bacillus sphaericus*". In: *Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores*, Rio de Janeiro.
- VILLELA, P.O., HONDA, C.S., DIAS, J.M.C.S., 1990, "Estudos Preliminares da Utilização de Glicerol como Fonte de Carbono para *Bacillus sphaericus*". *Simpósio de Controle Biológico*, 102, Brasília, May.
- VOLKMAN, L.E., BLISSARD, G.W., FRIENSEN, P.D. et al, 1985, "Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", *Archives of Virology Suppl.*, v. 10, pp. 104-113.
- WEISER, J.A., 1984, "A Mosquito-Virulent *Bacillus sphaericus* in Adult *Simulium damnosum* From Northern Nigeria", *Zentralblatt fur Mikrobiologie*, v. 139, pp. 57-60.
- WHEELER, D.A., 1988, "Column Flotation – The Original Column, in Froth Column" *Proceedings of the 2nd Latino American Congress on Froth Flotation*, Chile. Aug.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985. *Informal Consultation on the Development of *Bacillus sphaericus* as a Microbial Larvicide*. In: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, Geneva.

YANG, X.M., WANG, S.S., 1998, "Development of *Bacillus thuringiensis* Fermentation and Process Control From a Practical Perspective", *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 28, pp. 95-98.

YOUSTEN, A.A., 1996, "Mosquitocidal Toxins From Bacteria of the Genus *Bacillus*". In: *Anais do 5º Simpósio de Controle Biológico (V SICONBIO)*, pp.304-309, Foz de Iguaçu, PR, May.

YOUSTEN, A.A., WALLIS, D.A., 1987, "Batch and Continuous Culture of the Mosquito Larval Toxin of *Bacillus sphaericus* 2362", *J. Ind. Microbiol.*, 277-283.

APÊNDICE

Relação de trabalhos realizados durante o decorrer da pesquisa:

Artigo completo publicado em periódico

LUNA, C.L., LOPES, C.E., MASSARANI, G., 2003, "Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 Spores From Growth Medium by Flocculation/Sedimentation", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 25, pp. 213-216.

Trabalhos completos em eventos

LUNA, C.L., LOPES, C.E., MASSARANI, G., 2003, "Obtenção de Concentrados Bioativos da Bactéria Bioinseticida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por Sedimentação". In: *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM*, Florianópolis, Aug.

LUNA, C.L., LOPES, C.E., MASSARANI, G., 2002, "Separação de Biomassa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por Floculação/Sedimentação". In: *Anais do 30º Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP*, São Carlos, Oct.

LUNA, C.L., LOPES, C.E., MASSARANI, G., 2002, "Tratamento Downstream Visando a Preparação de Bioinseticidas". In: *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ*, Natal, Aug.

LUNA, C.L., PUGET, F.P., LOPES, C.E., MASSARANI, G., 2000, "Separação de Esporos de *Bacillus sphaericus* 2362 de Meio Fermentativo". In: *Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP*, Teresópolis, Oct.

Trabalhos resumidos em eventos

LUNA, C.L., MELO-SANTOS, M.A.V., LOPES, C.E., MASSARANI, G., REGIS, L., RIOS, E.M., 2003, "Produção, Formulação e Aplicação em Campo de Comprimidos à Base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". VIII Simpósio de Controle Biológico – SICONBIOL, São Pedro, São Paulo, Brasil, 86-86 June.

Artigo submetido a periódico

LUNA, C.L., LOPES, C.E., MASSARANI, G, "Production of Bio-active Concentrates of the Bacterial Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by Sedimentation" (Artigo submetido à revista Journal of Biotechnology)