

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

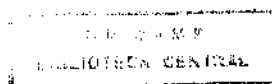
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA FERMENTAÇÃO
CONTÍNUA DE Bacillus thuringiensis

Eng. DEISE MARIA FONTANA CAPALBO

ORIENTADOR: Dr. IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES
Livre Docente

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
E AGRÍCOLA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHA
RIA DE ALIMENTOS.

- 1982 -



Aos meus pais
pela dedicação e entusiasmo.

Ao Roberto, meu marido
pela presença, compreensão,
carinho e amor constante.

E à Raquel, minha filhinha
pelo reconforto e alegria a
todo instante.

ÍNDICE

Pág.

RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Objetivo.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1. Controle microbiano.....	7
2.2. <u>Bacillus thuringiensis</u>	8
2.3. Produção comercial.....	9
2.4. Fermentação contínua.....	12
2.4.1. A fermentação contínua com bactérias...	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Microrganismo.....	18
3.2. Meios de cultura.....	18
3.2.1. Meio de manutenção.....	18
3.2.2. Meio de pré-fermentação.....	19
3.2.3. Meio de fermentação.....	19
3.3. Equipamentos principais.....	20
3.3.1. Frascos agitados.....	20
3.3.2. Minifermentadores.....	20
3.4. Equipamentos auxiliares.....	21
3.5. Processo fermentativo.....	22
3.5.1. Frascos agitados.....	22
3.5.2. Fermentação descontínua em minifermen- tador.....	22
3.5.3. Fermentação contínua em minifermentador	23
3.6. Técnicas de análise.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Etapa descontínua.....	26
4.2. Etapa contínua.....	27
4.2.1. Comportamento do pH.....	28

4.2.2. Consumo de carboidratos.....	29
4.2.3. Taxa de diluição.....	29
4.2.4. Desenvolvimento e esporulação dos micror- ganismos.....	31
4.2.5. Efeitos da aeração e agitação mecânica...	32
5. CONCLUSÕES.....	54
6. RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	55
7. BIBLIOGRAFIA.....	56
8. AGRADECIMENTOS.....	81
APÊNDICE I - Análise de glicose pelo método de antrona - considerações	71

ÍNDICE DE QUADROS, FIGURAS, ANEXOS E APÊNDICE

Pág.

QUADRO I	- Análises de acompanhamento da fermentação descontínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em frascos agitados.....	33
QUADRO II	- Análises de acompanhamento da fermentação descontínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em minifermentador.....	34
QUADRO III	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em dois estágios ($D: 0,15 - 0,30 \text{ h}^{-1}$)...	35
QUADRO IV	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em um estágio ($D: 0,15 - 0,30 \text{ h}^{-1}$).....	36
QUADRO IV a	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em um estágio, com interrupção da alimentação entre 5 e 22 horas ($D: 0,15 - 0,30 \text{ h}^{-1}$).....	37
QUADRO V	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em dois estágios ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$)...	38
QUADRO VI	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em um estágio ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$).....	39

QUADRO VII	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em dois estágios ($D: 0,05 - 0,10 \text{ h}^{-1}$)..	40
QUADRO VIII	- Análises de acompanhamento da fermentação contínua de <u>Bacillus thuringiensis</u> em dois estágios, onde houve injeção de base ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$).....	41
QUADRO IX	- Resultado das análises ao microscópio..	42
FIGURA 1	- Cinética do consumo de glicose em fermentação descontínua de <u>Bacillus thuringiensis</u>	43
FIGURA 2	- Comportamento do pH em fermentação descontínua de <u>Bacillus thuringiensis</u>	43
FIGURA 3.1.	- Crescimento do <u>Bacillus thuringiensis</u> em processo descontínuo (frascos agitados e minifermentador).....	44
3.2.	- Cinética do consumo de glicose em processo descontínuo (frascos agitados e minifermentador).....	44
3.3.	- Comportamento do pH do meio de fermentação em processo descontínuo (frascos agitados e minifermentador).....	44
FIGURA 4.1.	- Crescimento do <u>Bacillus thuringiensis</u> no 1º minifermentador do processo contínuo em 1 e 2 estágios ($D: 0,15-0,30 \text{ h}^{-1}$)	45

4.2. - Cinética do consumo de glicose no 1º mini-fermentador do processo contínuo, em 1 e 2 estágios ($D: 0,15 - 0,30 \text{ h}^{-1}$)....	45
4.3. - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 1 e 2 estágios ($D: 0,15 - 0,30 \text{ h}^{-1}$).....	45
FIGURAS 5.1. - Crescimento do <u>Bacillus thuringiensis</u> no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 1 e 2 estágios ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$).....	
	46
5.2. - Cinética do consumo de glicose no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 1 e 2 estágios ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$)....	46
5.3. - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 1 e 2 estágios ($D: 0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$).....	46
FIGURAS 6.1. - Crescimento do <u>Bacillus thuringiensis</u> no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 2 estágios ($D: 0,05 - 0,10 \text{ h}^{-1}$). 47	
6.2. - Cinética do consumo de glicose no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 2 estágios ($D: 0,05 - 0,10 \text{ h}^{-1}$).....	47
6.3. - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º mini-fermentador do processo contínuo em 2 estágios ($D: 0,05 - 0,10 \text{ h}^{-1}$).....	47

FIGURAS 7.1.	- Crescimento do <u>Bacillus thuringiensis</u> no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios com injeção de base..	48
7.2.	- Cinética do consumo de glicose no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios, com injeção de base.....	48
7.3.	- Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios, com injeção de base.....	48
ANEXO I	- Concentração de ácido dípícolínico.....	49
ANEXO II	- Esquema do minifermentador.....	50
ANEXO III	- Aspecto geral da montagem dos equipamentos para a fermentação contínua com <u>Bacillus thuringiensis</u>	52
ANEXO IV	- Detalhe da etapa de alimentação do primeiro minifermentador do processo de fermentação contínua.....	53
APÊNDICE 1	- Análise de glicose pelo método de antro _{na} - Considerações.....	71

NOMENCLATURA

AM — Análises aos microscópio

D — Taxa de diluição (h^{-1})

DO — Densidade ótica

DPA — Ácido dipicolínico (ácido piridino-2,6-dicarboxílico)

MS — Massa celular seca

TCA — Ácido tricarboxílico

UA — Unidades de absorbância

V/V — Volume/volume

vvm — Volume ar/volume meio/minuto

RESUMO

Das técnicas de fermentação disponíveis para obtenção do inseticida microbiano, a fermentação contínua tem sido pouco utilizada, apesar das tantas vantagens que apresenta.

Visando estabelecer as melhores condições para obtenção desse tipo de inseticida, a partir de Bacillus thuringiensis, pela técnica de cultura contínua, estudou-se o efeito da taxa de diluição e tempo de residência, sobre a esporulação desse bacilo.

Conseguiu-se um aumento na esporulação, com o decréscimo da taxa de diluição; a taxa de diluição mais eficiente esteve entre 0,05 e 0,10 h⁻¹, para as condições estudadas.

Verificou-se também que nessas condições, a fermentação contínua é bem sucedida quando efetivada em múltiplos estágios, com o último deles atuando como fermentador descontínuo.

SUMMARY

The continuous fermentation technique has received little attention for utilization to produce bacterial insecticide by fermentation.

Investigations on the dilution rate and residence time was made to establish the maximum growth and sporulation rate of Bacillus thuringiensis in continuous culture.

The results obtained confirmed that the sporulation rate increased when the dilution rate decreased; the best range of dilution rate was from 0,05 to 0,10 h⁻¹, for the operational conditions used.

The continuous fermentation of Bacillus thuringiensis here developed, run well when it was done in multiple stages, and the last one run as a descontinuous fermentor.

I. INTRODUÇÃO

Desde que se tem conhecimento da história do homem como produtor de seus alimentos, os insetos e pragas das plantações tem sido seus principais inimigos. O controle dessas pragas, estudado e realizado tão intensamente, teve sempre como objetivo, garantir ao homem a sua sobrevivência, através do aumento de suas colheitas e proteção durante o armazenamento de seus produtos.

Com o passar do tempo, no entanto, observou-se que os insetos iam se tornando resistentes aos produtos utilizados e novas e maiores doses precisavam ser aplicadas para garantir a produção. Verificou-se também que tais produtos (geralmente químicos), originalmente usados para favorecer ao homem, estavam se tornando agora fonte de contaminação e doença, além de alterar o equilíbrio ecológico.

Da conscientização dos homens de que um controle químico de pragas e insetos, quando não racionalmente empregado, não era satisfatório, surgiu entre outras alternativas, a idéia do controle biológico. Desde então, vários entomologistas, geneticistas, ecologistas e bioengenheiros entre outros pesquisadores, tem-se dedicado ao estudo da ciência do controle biológico.

No campo do controle microbiano de insetos, destaca-se o inseticida obtido pela fermentação do Bacillus thuringiensis, devido à sua especificidade, potência e eficácia contra vários insetos, além da viabilidade econômica de produção e inocuidade ao homem, vertebrados e insetos benéficos.

As técnicas de fermentação disponíveis para estudo do ciclo vital de muitas bactérias não tem recebido tanta atenção como aquelas usadas para otimização do meio de cultura para o crescimento vegetativo desses microrganismos. Encontram-se, apesar disso, alguns poucos estudos sobre o uso da técnica da cultura contínua para a fase de esporulação de bactérias, através do controle da velocidade de crescimento do microrganismo (32, 51, 109, 126). É o que se verifica com o Bacillus thuringiensis, tão intensamente estudado em cultura descontínua (7, 14, 29, 38, 47, 60, 70, 72, 86, 87, 90, 102, 103, 111, 112), porém com poucos dados sobre seu desenvolvimento em cultura contínua (51).

Devido à escassez de trabalhos nesse sentido, torna-se interessante detectar os parâmetros que controlam cada uma das fases da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis. De-seja-se uma alta taxa de crescimento microbiano, e paralelamente, o estabelecimento de condições favoráveis à esporulação, para que a potência e eficácia dessa biomassa sejam máximas como inseticida.

1.1. Objetivo

Sabe-se que as condições favoráveis ao aumento da população microbiana do Bacillus thuringiensis e à esporulação desse microrganismo se opõem (51, 126). Realizar-se-ão, neste trabalho, fermentações descontínuas em escala de laboratório e piloto, para estudo das características de crescimento desse bacilo. As condições culturais que melhor se apresentarem nesta etapa serão usadas para estudo dos efeitos da variação da taxa de diluição e

tempo de residência, na esporulação de Bacillus thuringiensis a fim de caracterizar-se a cultura contínua.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Controle microbiano

Segundo recentes estimativas (10, 63, 101), cerca de 33% da produção anual de grãos dos Estados Unidos se perde devido às pragas da agricultura, como insetos, patógenos e outros. Essas perdas ocorrem, apesar do uso intensivo de pesticidas químicos.

Sabe-se atualmente que acima de determinados teores, os pesticidas, em particular os inseticidas, são tóxicos a muitos animais, inclusive ao homem e a maioria dos insetos benéficos; além disso, estão perdendo sua efetividade posto que as espécies nocivas estão adquirindo resistência a eles (2, 11, 29, 63, 72, 84).

O assunto assume tal importância, que em estudo sobre prioridades de pesquisa recentemente realizado nos Estados Unidos (69), encontra-se em destaque o controle de pragas e insetos através de métodos que eliminem ou limitem o uso de agentes químicos.

Tendo por base tais fatos, muitos pesquisadores vem tentando viabilizar alternativas para o uso de inseticidas, principalmente daqueles que não causem dano ao equilíbrio ecológico (2, 11, 63, 64, 72). Entre essas alternativas encontra-se o uso de microrganismos entomopatógenos (2, 29, 87, 111).

Há um grande número de bactérias entomopatógenas obriga

tórias e/ou facultativas, que se reproduzem "in vivo", acarretando moléstias aos insetos susceptíveis (2, 11, 84). Há também aquelas entomopatógenas em potencial, cultivadas em meio artificial, "in vitro", que se multiplicam no trato intestinal do inseto quando tem acesso a ele (9, 10, 11, 83, 84, 102, 110, 112). Entre elas, aquelas esporuladas são as que atuam com maior eficiência contra os insetos-praga (9, 51, 84, 87), pois a resistência do esporo a condições adversas do clima favorece a viabilidade desse patógeno, tanto do ponto de vista de seu desenvolvimento como de sua estabilidade (11, 57, 84, 87).

Os inseticidas delas obtidos, chamados microbianos ou bacterianos, são bastante característicos pois apresentam atividade específica e baixa ou nenhuma toxidez a determinados vertebrados e invertebrados (2, 11, 64, 72, 74, 112, 125). Além disso são obtidos de microrganismos que ocorrem naturalmente no ambiente (2, 23, 29, 63, 83, 84, 86).

Na segunda década do nosso século, foram introduzidas com sucesso nos Estados Unidos, bactérias do grupo Bacillus popilliae, cujo desenvolvimento é conseguido apenas "in vivo", para controlar a praga Popillia japonica (2, 7, 74, 84, 118).

Desde então muitos estudos foram realizados com inseticidas microbianos, sendo que já em 1958 surgiram os primeiros produtos comerciais contendo Bacillus thuringiensis, cuja produção "in vitro" é muito mais interessante (29, 63, 83, 84). Procurou-se aperfeiçoar a tecnologia da fermentação, seleção de linhagens e novas formulações de Bacillus thuringiensis, que se estabeleceu nos Estados Unidos e na Europa, como agente contro-

lador dos mais eficazes, especialmente contra lepidópteros dentre outras ordens de insetos (7, 21, 29, 63, 70, 73, 74, 81, 83, 84, 90, 91, 128).

2.2. Bacillus thuringiensis

O Bacillus thuringiensis é uma bactéria mesófila, aeróbica ou anaeróbica facultativa, gram positiva, podendo se apresentar esporulada (11, 29, 43, 83, 84, 92, 93, 121). Suas principais características são: produção de um ou mais cristais paraesporais durante o ciclo de esporulação, e a patogenicidade às larvas de lepidópteros (2, 3, 11, 17, 18, 23, 29, 47, 72, 74, 77, 83, 84, 86, 95, 125, 128).

Os produtos baseados neste bacilo geralmente contêm duas frações ativas: o esporo e o cristal protéico, também chamado complexo endotóxico esporo-cristal (29, 84, 86, 87). O cristal protéico, denominado δ -endotoxina, é formado concomitantemente com o esporo (47, 58, 70) e é a mais importante endotoxina contra lepidópteros, que na forma larval causam tantos danos à horticultura, agricultura e produtos estocados (17, 18, 28, 29, 47, 58, 70, 83, 84, 86, 93, 94, 128).

Durante o crescimento vegetativo dessa bactéria, uma outra toxina pode ser formada, dependendo da linhagem e meio de cultura utilizados (2, 7, 11, 17, 18, 57, 77). Essa toxina que é extracelular, aquosolúvel e termoestável foi denominada β -exotoxina; apresenta toxidez a um grande número de insetos, especialmente Diptera, incluindo alguns Lepidoptera, Orthoptera, Hy-

menoptera e Coleoptera (11, 60, 84, 86, 92, 118), além de relativa toxidez a alguns mamíferos (11, 29, 35, 115, 116).

Toxidez, modo e espectro de atuação da endo e exotoxinas, estão muito bem apresentados nos estudos de LECADET (70), ROGOFF (111), HEIMPEL (58) e ANGUS (11).

O Bacillus thuringiensis é habitante comum da natureza e está presente em diferentes tipos de solo (29). Apresenta algumas características autolimitantes como produto comercial, devido à competitividade com outras bactérias do solo, condições adversas de crescimento na superfície das plantas e à sua susceptibilidade a variações do clima e radiação solar (7, 11, 29, 58, 84, 105, 120).

Quando aplicado antes ou após a colheita, segundo técnicas agronômicas corretas, o Bacillus thuringiensis tem inocuidade garantida pelo FDA (Food and Drug Administration) (71), qualquer que seja o produto agrícola (2, 3, 7, 11, 19, 20, 22, 23, 29, 39, 42, 50, 58, 64, 71, 79, 84, 98, 99, 104, 111, 128).

2.3. Produção comercial

Com respeito à obtenção do inseticida, os vários pesquisadores ratificam a validade de técnicas de fermentação submersa, em escala industrial (14, 29, 35, 38, 40, 41, 42, 43, 46, 54, 55, 78, 83, 84, 86, 102). Conseguem boa velocidade específica de crescimento e esporulação dos microrganismos, associado à produção do cristal tóxico, usando substratos econômicos (55, 83, 84, 86, 87).

Uma das chaves do sucesso na comercialização do Bacillus thuringiensis como inseticida microbiano, tem sido o meio de cultura utilizado para o seu desenvolvimento (29, 83, 84). A maioria dos meios empregados usa produtos naturais ou resíduos industriais de baixo custo, como fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais. Fontes de nitrogênio utilizadas incluem farinha de peixe, torta de algodão, água de maceração de milho e caseína (10, 14, 29, 44, 83, 84, 87, 102). As fontes de carbono podem incluir produtos hidrolisados de milho, amido e dextrose (29, 40, 41, 44).

Para produção no Brasil, é interessante usar o melaço de cana e a água de maceração de milho como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, ambos de baixo custo e em disponibilidade (84, 87). A composição do meio de cultura para produção industrial é determinada, portanto, através de uma análise de custos, comparada com o rendimento das frações endógenas e exotóxicas (10, 14, 29, 44, 83, 84, 85, 87, 100).

Um aspecto das fermentações com Bacillus thuringiensis é que parte significativa do produto final consiste de componentes do meio não utilizados, metabólitos e células mortas (29, 111, 124). Além disso, tem sido demonstrado que a atividade tóxica de uma dada linhagem pode variar significativamente em diferentes meios de cultura, condições operacionais e também de uma para outra batelada de produção (17, 18, 38, 40, 41, 77, 89).

As condições de operação utilizadas em grandes fermentadores, para fermentação em submerso, são descritas por DULMAGE (40), MADDOX (74) e PENDLETON (102), e fermentadores industriais com capacidade superior a 50.000 litros tem sido utilizados (29, 102).

Controlam-se o pH, a agitação, aeração e temperatura ótimos de produção. O pH inicial do meio é ajustado para 7,2 - 7,6. O volume de inóculo está entre 2 e 5% do volume total do meio de cultura no fermentador. A temperatura se encontra em torno de 30°C, e a aeração ao redor de 1 vvm (volume de ar/volume de meio/minuto), posto que uma boa aeração é necessária para que se obtenha uma alta velocidade de esporulação (94). O ciclo de fermentação costuma variar de 14 a 72 horas, o que irá depender de quão rapidamente a esporulação se complete em determinadas condições (29, 51, 83, 84, 87). A agitação realizada de maneira adequada, garante uma perfeita transferência dos nutrientes presentes no meio aos microrganismos (45, 119).

As condições de cultura são estabelecidas em função da máxima produção de esporos associados ao cristal tóxico, porém o que mais interessa no inseticida é a sua potência e eficácia (51, 83, 84, 100).

Após a fermentação o produto obtido deve ser formulado para emprego como inseticida na forma de pó molhável, emulsão, etc. Necessita do uso de agentes molhantes, emulsionantes, adesivos e inertes, que podem ser utilizados sem alterar as características desejáveis do produto. O inseticida microbiano também pode ser utilizado em combinação com fungicidas e outros inseticidas sem redução de sua efetividade (3, 11, 23, 73, 128).

2.4. Fermentação contínua

O grande interesse notado nos últimos trinta anos em relação à técnica de cultura contínua para o crescimento microbiano tem sua origem nos trabalhos de HERBERT (59), MONOD (55) e NOVICK (97) e ganhou força com a realização do Primeiro Simpósio sobre Cultura Contínua realizado em Praga apesar do conceito dessa técnica ser conhecido antes de 1920 (55).

Um estudo e revisão bastante compreensivo abordando todos os aspectos da cultura contínua foi realizado por MALEK e FENCL (76). Esse livro se aprofunda na teoria, técnica e aplicação da cultura contínua e segundo HARRISON (55) permanece como o melhor nesse assunto até hoje. Quanto à prática de tal processo, equipamentos utilizados e equipamentos de controle, tem-se NORTHROP (96) em 1954/1955 que se apresenta bastante atual.

A maioria dos processos industriais atualmente conhecidos, dizem respeito à técnica de produção do inseticida microbiano em bateladas (29, 40, 84, 102). Conhecidas as condições ótimas para tal técnica, pode-se empregá-las num processo contínuo (59).

A cultura contínua usa um sistema de cultivo tal que o crescimento ocorre em condições de equilíbrio que podem ser controladas e/ou alteradas (1, 6, 76, 127). Permite assim, que se estabeleça a cinética do crescimento do microrganismo bem como dos produtos de seu metabolismo (59, 75, 108, 123, 127).

Na cultura contínua as condições transientes observadas no processo de batelada serão usadas indefinidamente como esta

dos estacionários (5, 34, 59, 75, 76, 127). O termo "estado es
tacionário" descreve uma situação na qual as condições de equi
líbrio existem na cultura (6, 48, 127). Convém ressaltar que a
cultura não permanece em estado estacionário porque está inter
namente exaurida e incapaz de mais reproduções, mas porque as
condições externas não permitem maior desenvolvimento.

As vantagens da cultura contínua sobre a tradicional cul
tura em bateladas, para processos industriais, tem sido analisa
das há muito tempo (76). Porém se encontram muito poucas publi
cações sobre aplicações industriais da mesma. As diversas paten
tes de processos contínuos podem indicar o grau de interesse
nas aplicações industriais, porém não refletem necessariamente
a extensão em que a cultura contínua é aplicada em plantas co
merciais (55).

O método clássico de produção de vinagre (27, 103) pode
ser considerado um tipo de fermentação contínua; a cerveja é
produzida por processo contínuo há bastante tempo (52, 53, 61,
66) bem como a fermentação contínua para produção de vinho é es
tudada em vários países (4, 106), sendo um processo popular na
Rússia (36, 55).

Para a produção de leveduras para panificação, proteína
e etanol a cultura contínua tem sido largamente usada (55).

Métodos para produção comercial de aminoácidos, vitami
nas e ácidos nucleicos por cultura contínua, tem sido descritos
na literatura, porém não se tem informações sobre sua utiliza
ção em escala comercial (55).

2.4.1. A fermentação contínua com bactérias

Apesar da técnica de cultura contínua para diversos microorganismos ter sido alvo de muitos estudos (1, 5, 16, 26, 34, 37, 55, 56, 96, 113, 122) e utilizada com sucesso para fermentações industriais, os estudos sobre cultura contínua para microorganismos esporuláveis são raros (32, 33, 51, 62, 85, 107, 109).

A cultura contínua para microrganismos, não formadores de esporos, tem sido desenvolvida com a finalidade de obter uma alta concentração de biomassa, enquanto com microrganismos formadores de esporos, as condições que favorecem o acúmulo de biomassa microbiana diferem daquelas para a máxima esporulação, sendo mesmo antagônicas (51).

O processo de esporulação em bacilos se inicia quando os substratos são esgotados e as células vegetativas desenvolvem seu mecanismo de adaptação às condições desfavoráveis de crescimento, transformando-se em esporângios (11, 109). Tanto a informação genética como as enzimas presentes no esporo, pode não atuar se o esporo for transferido para condições favoráveis (109).

A natureza sequencial de mudanças citológicas que ocorrem durante a esporulação dos bacilos, foi demonstrada para Bacillus cereus e Bacillus subtilis, por diversos pesquisadores. Com Bacillus subtilis, KAY (115) e SCHAEFER (31) descrevem oito estágios de desenvolvimento, iniciando com a célula vegetativa (estágio 0), e finalizando com o estágio VII, quan

do ocorre a autólise da célula mãe e consequente liberação de esporo maduro. MURELL (88) estabelece a mesma sequência, com mesmo número de estágios, para Bacillus cereus, o que é ratificado por ŘIČICA (109). É na fase de maturação do esporo (estágio VI) que ocorre a síntese do ácido dipicolínico (ácido piridino-2,6-dicarboxílico) (109), o qual foi encontrado em esporos de Bacillus cereus, subtilis, niger, megaterium, apiarius, e outros, como também no gênero Clostridium (68, 88). A presença deste ácido em maior quantidade parece ter relação com a termorresistência dos esporos (13, 25, 88) e já se tem conhecimento de que sua produção se dá no protoplasma da célula. A presença desse elemento pode ser utilizada como indicativo da esporulação do Bacillus em estudo (65).

Para estudo da morte térmica, empregando um sistema de cultura contínua em dois estágios, HUMPHREY (109) planejou realizar separadamente as etapas de desenvolvimento vegetativo no primeiro estágio e esporulação no segundo, para produzir uma grande quantidade de esporos de Bacillus stearothermophilus uniformemente formados. O resultado entretanto não confirmou a teoria assumida, pois tanto no primeiro como no segundo estágio havia células vegetativas e esporos, tendo HUMPHREY concluído ser muito difícil produzir esporos em grande quantidade por técnica de cultura contínua, especialmente aqueles que se originam de microrganismos produtores de enzimas líticas (109).

Estudos sobre cultura contínua com bactérias cuja esporulação pode ser afetada pela redução na velocidade de crescimento (12, 32, 109, 126) e também pelo teor de glicose do meio

de cultura, são relatados (62).

Com Bacillus subtilis, o crescimento e esporulação podem ocorrer num mesmo estágio, mesmo a altas taxas de crescimento. E tanto em um sistema de um único estágio como de múltiplos estágios, todas as etapas de esporulação estarão presentes (32, 109, 126).

DAWES (32, 33) estudou a cultura contínua de Bacillus subtilis 168, verificando que o número de esporos no regime estacionário variou com a taxa de diluição segundo uma função contínua, e que a probabilidade das células esporularem foi inversamente proporcional à velocidade de crescimento.

Para microrganismos que não esporulam, a velocidade específica de crescimento é igual à taxa de diluição, o que consiste numa aproximação válida para bactérias formadoras de esporos (33, 59).

ŘIČICA (109) salienta que na fermentação contínua com Bacillus cereus todas as fases de esporulação estão presentes em todos os estágios, concluindo que o desenvolvimento celular acompanha os estágios de fermentação, sendo que no primeiro estágio há um maior número de células vegetativas, que vai crescendo até que no último estágio há um número superior de esporos.

FREIMAN (51) estudando especificamente Bacillus thuringiensis obtido por processo de cultura contínua em dois estágios, obteve resultados positivos com um bom grau de maturação celular no segundo estágio do processo (5-10% de esporos). Seus resultados confirmam os obtidos por ŘIČICA (109), quanto ao de

envolvimento celular nos vários estágios da fermentação.

O estudo de FREIMAN (51) utilizou também um processo contínuo em dois estágios, onde o segundo atuou como um fermentador descontínuo, obtendo uma cultura com máxima maturação cuja biomassa consistia quase que exclusivamente de esporos livres e cristais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Bacillus thuringiensis Berliner, sorotipo 1, isolado do produto comercial BACTOSPEINE, industrializado pela Rhône-Poulenc, foi utilizado para estudos de fermentação.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Manutenção

Para manutenção do microrganismo foi empregado o meio de agar nutriente, em tubos estoque, cuja composição é a seguinte:

COMPOSIÇÃO	g/l
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0

Os tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo aproximadamente 12 ml de meio de cultura cada um, foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após serem resfriados e inclinados, foram inoculados com Bacillus thuringiensis Berliner e levados a incubação por 72 horas a 30°C, após o que foram

mantidos em geladeira ($5^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$). A cada mes eram realizados repiques do microrganismo.

3.2.2. Pré-fermentação

Para cultivo do microrganismo, foi usado meio de pré-fermentação líquido, conforme a seguinte formulação:

COMPOSIÇÃO	g/l
Na_2HPO_4	2,5
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	2,0
Triptose	20,0

pH = 7,3

Foram colocados 50 ml desse meio de cultura em frascos erlenmeyers de 500 ml e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, foram inoculados com uma alça de cultura-estoque e levados a agitador rotativo com temperatura controlada em 30°C . Foram realizadas duas pré-fermentações a 150 rpm de agitação, por 8-12 horas de duração cada uma, sendo que a segunda pré-fermentação foi inoculada com 5% (V/V) da primeira pré-fermentação.

3.2.3. Fermentação

Para fermentação e alimentação da cultura contínua, foi utilizado o seguinte meio:

COMPOSIÇÃO	g/l
Melaço de cana	15,0
Água de maceração de milho	60,0
pH 7,2	

O melaço é utilizado como fonte de carbono (56% de a çúcares totais) e a água de maceração de milho como fonte de nitrogênio (49% de sólidos totais e 2-4% de nitrogênio total).

3.3. Equipamentos principais

3.3.1. Frascos agitados

Foi utilizado Agitador-Incubador (rotativo) "Psycro-therm" da New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo G-27, com as seguintes características:

velocidade 40 a 4.000 rpm (+ 5)
 temperatura 0 a 60°C (+ 0,5°C)
 passo 2,5 cm

3.3.2. Mini Fermentador

Foi utilizado o modelo M 1000 da Fermentation Design Inc. com as seguintes características:

- a) vaso de fermentação: copo de vidro "Pyrex" de 1000ml com volume útil de 600 ml;
- b) agitador magnético: recoberto com "Teflon", com ve locidade variável de 380 a 690 rpm;
- c) aeração: através de compressor, medida sua vazão em

rotâmetro calibrado em litros/minuto (1 atm e 21,19°C);

d) temperatura: mantida com precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por resistência elétrica e/ou circulação de água fria;

e) filtro de ar: com leito de lã de vidro.

Um esquema do mini fermentador é mostrado no Anexo II.

3.4. Equipamentos auxiliares

3.4.1. Espectrofotômetro: Spectronic-20, da Bausch & Lomb.

3.4.2. Balanças de precisão METTLER:

P 160N (máx.= 160 g, div.= 1 mg)

P 1000 (máx.= 1000 g; div.= 1 g)

3.4.3. Autoclave: 'Steroclave' nº 25 X, da Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc.

3.4.4. Microscópios:

Carl Zeiss, aumento $40 \times 12,5 = 500$ vezes

Nikon, de contraste de fase, modelo L-Ke

3.4.5. Potenciômetro: 'pH meter H-5' Horiba, com ajuste automático de temperatura, e precisão de $\pm 0,05$ unidades de pH.

3.4.6. Centrífuga: 'Excelsa Baby' da Fanem Ltda. modelo 208N (0 - 7000 rpm) com cruzeta de 6 lugares de 15 ml cada.

3.4.7. Estufa para secagem à vácuo: Fanem 'Retilínea', modelo 099/A-1, com termostato e painel frontal, ajustada para 60°C.

3.4.8. Bomba peristáltica: 'Hiloflow' da Metering Pumps Ltd., London, modelo W-5.5-SD.

3.4.9. Temporizador: projetado e construído na Universidade Estadual de Campinas - Brasil.

3.5. Processo fermentativo

3.5.1. Frascos agitados

Numa primeira etapa realizou-se a fermentação em frascos agitados, erlenmeyers, de 500 ml com 50 ml de meio de fermentação. Foram levados à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C; então resfriados a 30°C e inoculados com 5% de inóculo (V/V) do Bacillus thuringiensis da segunda pré-fermentação.

As condições de fermentação foram: temperatura a 30°C e agitação a 150 rpm.

A determinados intervalos de tempo foi retirado um frasco, de uma série de quinze, para as necessárias análises.

3.5.2. Fermentação descontínua em minifermentador

A etapa piloto, descontínua, foi realizada colocando 600 ml de meio de fermentação no frasco do minifermentador, sendo o conjunto esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave. Resfriado a 30°C, foi inoculado com 5% (V/V) de inóculo da segunda pré-fermentação. A agitação foi de 450-500 rpm e a temperatura mantida em 30°C±2°C. A taxa de aeração utilizada foi de 1 vvm.

A determinados intervalos de tempo foram retiradas amostras para análises.

3.5.3. Fermentação contínua em minifermentador

A etapa de cultura contínua do Bacillus thuringiensis foi realizada em minifermentador contendo 600 ml de meio de fermentação. O controle de temperatura foi ajustado para $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A agitação variou de 380 a 500 rpm, conforme a necessidade. O fluxo de ar foi mantido entre 0,3 e 1 vvm em consonância com a agitação.

Para garantir uma velocidade de alimentação constante em cada fermentação, foi usada uma bomba peristáltica conectada a um temporizador conforme ilustrado no Anexo IV. As taxas de diluição utilizadas variaram dentro dos seguintes intervalos: $0,05\text{-}0,10\text{ h}^{-1}$, $0,10\text{-}0,15\text{ h}^{-1}$ e $0,15\text{-}0,30\text{ h}^{-1}$.

A passagem de meio fermentado de um para outro estágio de fermentação foi efetuado por diferença de pressão, garantindo assim uma mesma taxa de diluição nos estágios.

Um esquema da montagem do equipamento é mostrado no Anexo III.

Para acompanhar o desenvolvimento do microrganismo bem como para verificar quando o estado estacionário seria atingido, foram retiradas amostras a determinados intervalos de tempo.

Tais amostras foram usadas para determinação de massa seca (MS), densidade ótica (DO), ácido dipicolínico (DPA) e açúcar residual (expresso como glicose).

Conforme citado por MORAES (86), após a etapa de crescimento logarítmico da cultura de Bacillus thuringiensis, o consumo de oxigênio cai a taxas bem baixas; assim sendo, fo

ram realizados dois processos de fermentação contínua. Um primeiro processo onde a fermentação ocorreu num único estágio, com agitação e aeração iguais para os três frascos de fermentação (sendo 500 rpm e 1 vvm, respectivamente). O outro processo, realizado em dois estágios, teve agitação de 500 rpm e aeração de 1 vvm para o primeiro mini fermentador, e para os demais, a agitação foi de 380 rpm, e aeração de 0,3-0,5 vvm.

3.6. Técnicas de análise

Para realização das análises, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação de glicose, e o precipitado para as demais análises.

A análise de açúcares (expresso em glicose) foi efetuada segundo modificação do método original de MORRIS (24), utilizando o reagente antrona. A curva padrão traçada, glicose x UA a 600 nm indicou a correspondência de 1 g/l glicose com 8,25 UA.

Para a determinação da densidade ótica, o precipitado passou por duas lavagens e centrifugações, sucessivas, sendo o precipitado agora obtido, suspenso em 10 ml de água destilada. Feitas as diluições convenientes, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

A massa celular seca (MS) foi determinada pela secagem do precipitado obtido na centrifugação de 10 ml do meio fermentado. A secagem foi efetuada a 60°C por 6 horas em es-

tufa à vácuo.

Para a determinação da concentração celular, a massa celular seca (MS) foi suspensa em 10 ml de água destilada, e então feitas as diluições convenientes para leitura da densidade ótica, dessa suspensão, em espectrofotômetro a 600 nm. A curva padrão obtida, de MS x UA forneceu o valor de 1 g/l de biomassa seca correspondente a 0,86 UA.

A determinação do ácido dipicolínico (DPA) no meio fermentado, foi realizada segundo o método de JANSSEN (65, 84). Traçou-se a curva padrão de DPA x UA a 440 nm, obtendo-se 1 mg/l DPA correspondendo a 3,4 UA.

Para estimativa do número de esporos viáveis pode-se utilizar a curva apresentada em MORAES (84), mostrada no Anexo I.

O acompanhamento da esporulação durante a fermentação foi feita ao microscópio, por coloração de esporos (117) e a observação da formação do complexo esporo-cristal foi efetuada em microscópio de contraste de fase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa descontínua

Do estudo da fermentação do Bacillus thuringiensis em processo descontínuo, tanto em frascos agitados como em mini fermentador, observou-se como característicos, o comportamento do pH do meio e o consumo de carboidratos. Estes resultados são apresentados nos Quadros I e II, e Figuras 1 e 2.

O resultado obtido na Figura 2, está de acordo com MURELL (88), o qual comenta que com a espécie Bacillus, nas fermentações que contam com a glicose como fonte de carbono, esta é geralmente convertida a ácidos orgânicos, com uma marcante queda do pH do meio de cultura. Se a concentração inicial do carboidrato é muito elevada, o pH cairá a níveis inferiores a 5,0. Como o baixo pH é desfavorável à formação adaptativa de enzimas e à ação do ciclo de TCA (ácido tricarboxílico), a queda da concentração do carboidrato além de um determinado nível, interrompe o crescimento exponencial. Assim, a utilização dos ácidos produzidos, faz com que o pH retorne à neutralidade e a célula esporule.

Os melhores resultados se apresentaram quando o carboidrato foi rapidamente utilizado, decrescendo a cerca de 10% do valor inicial, entre 10 e 20 horas de fermentação. Estes resultados, apresentados nos Quadros I e II, estão expostos nas Figuras 1 e 3.2.

Com auxílio do microscópio de contraste de fase, ob

servou-se que a fermentação cujo pH baixou de 7,3 a 5,2 nas primeiras 10-15 horas e retornou à neutralidade ao final da fermentação, apresentou bom grau de esporulação, ao contrário daquele cujo pH permaneceu ao redor de 5,4 sem retornar à neutralidade.

Tais resultados são compatíveis com NICKERSON (91), MORAES (87) e YOUSTEN (129). Segundo MORAES (87), o período de queda do pH corresponde à fase lag e início da fase logarítmica do crescimento vegetativo do Bacillus thuringiensis, e o período subsequente de retorno à neutralidade corresponde à esporulação e formação do cristal. Este comportamento pode ser verificado através das Figuras 2, 3.1 e 3.3.

Pelas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3, pode-se observar que o período de queda do pH corresponde ao de máximo consumo de glicose e de aumento de densidade ótica (DO) do meio de fermentação. Pelo Quadro I, verifica-se que esse período corresponde a um aumento de concentração do ácido dipicolínico (DPA).

ŘIČICA (109) afirma que no estágio de formação do esporo há uma síntese intensiva de DPA, e devido à formação desse esporo o índice de refração aumenta. Portanto, o aumento de DO do meio não se deve apenas ao aumento do número de microrganismos presentes na fermentação.

4.2. Etapa contínua

Baseado nas conclusões da etapa de processo descontínuo, tornou-se possível dar início à etapa de fermentação con

tínua, onde foram utilizadas apenas as culturas cujo pH retornou à neutralidade após 10 a 20 horas de fermentação.

Alguns autores (15), pesquisando Penicillium sp, sugerem que se realize a fermentação a pH constante. Como as condições normais desta pesquisa eram diferentes, foi efetuada uma fermentação em minifermentador onde o pH após o período de queda, retornou à neutralidade pela injeção de base. Foi notado que a fase vegetativa do microrganismo se desenvolveu e o processo entrou em regime rapidamente, conforme se observa pelo Quadro VIII ou Figuras 7.1, 7.2 e 7.3. Porém, quanto à esporulação e formação do cristal protéico, com auxílio de microscópio de contraste de fase, verificou-se que praticamente não o correu, conforme apresentado no Quadro IX.

Devido a tais resultados, optou-se pelo estudo da fermentação do Bacillus thuringiensis sem controle do pH.

4.2.1. Comportamento do pH

Será denominado 'pH de conexão' ao valor do pH do meio de fermentação no instante em que se inicia a alimentação do processo contínuo.

Conforme se observa nas Figuras 4.3 e 5.3, qualquer que seja o pH de conexão, este tende a se estabilizar ao redor do valor 6,0. O que se verifica é apenas uma variação no tempo que a cultura demora para atingir este valor.

Para todos os experimentos, tanto em 1 como em 2 estágios, observou-se que o pH do meio se manteve após algumas horas, estável e ao redor de 6,0.

4.2.2. Consumo de carboidratos

Quanto à glicose, observou-se que houve um aumento do seu teor no meio fermentado após início da alimentação, conforme os Quadros III e VIII, e Figuras 4.2, 5.2, 6.2 e 7.2.

Com respeito a este fato, dois pontos são importantes: a taxa de diluição, comentada em 4.2.3 e o método de análise utilizado. A questão do método de análise utilizado para glicose, está comentado separadamente, no APÊNDICE I, que permite a discussão seguinte. Os resultados duvidosos obtidos ocorreram devido a erros oriundos de análises efetuadas sem os devidos cuidados:

4.2.2.1. O reagente antrona era preparado e usado imediatamente, ou seja, antes de 4 horas de preparo.

4.2.2.2. O banho frio para a reação usava água à temperatura ambiente 23-27°C e não 15°C conforme metodologia.

4.2.2.3. Não se empregava um padrão, paralelamente às análises.

4.2.2.4. Existência de impurezas nas fontes de carboidratos (melaço e água de maceração de milho) que interferiram nos resultados.

4.2.3. Taxa de diluição (D)

Quanto à taxa de diluição, sabe-se que sendo ela elevada, estará fornecendo glicose em excesso ao microrganismo, quantidade esta que não sendo metabolizada, permanece no meio, dando altas leituras. Ao mesmo tempo, quando o microrganismo não

consome essa glicose em excesso, poderá não estar se multiplicando e o meio estará sendo "lavado" de seus microrganismos . Além disso, a esporulação não ocorrerá num meio em que há excesso de nutrientes (33, 88).

Assim, uma indicação de que o microrganismo não está se desenvolvendo satisfatoriamente numa determinada taxa de diluição, é esse excesso de glicose residual.

Pelas Figuras 4.2 e 5.2, observou-se que taxas acima de $0,10 \text{ h}^{-1}$ estavam apresentando um teor excessivo de glicose residual no meio de cultura. Para taxas ao redor de $0,05 - 0,10 \text{ h}^{-1}$ conforme se apresenta na Figura 6.2, esse teor apesar de ter se elevado inicialmente, estava retornando aos níveis iniciais, indicando assim que o microrganismo estava se desenvolvendo satisfatoriamente, após um período de adaptação, o que foi comprovado através de testes de coloração de esporos, conforme verificado no Quadro IX.

A cautela nessas análises é importante, pois conforme verificado pelo Quadro VIII e Figura 7.2, onde o pH foi mantido pela adição de base, o teor de glicose praticamente se manteve ao nível inicial, porém, conforme Quadro IX se observou que os microrganismos não estavam esporulando.

Notou-se também que a fermentação efetuada em um único estágio apresentou um consumo mais rápido de glicose, conforme os Quadros IV e VI e Figuras 4.2 e 5.2.

Outro ponto que se destacou ao observar os Quadros III a VII é que do primeiro minifermentador para o segundo e o terceiro, estava havendo um consumo de glicose, o que está

de acordo com o observado por FREIMAN (51) e ŘIČICA (109), de que temos microrganismos em todas as fases de desenvolvimento presentes em todos os estágios da fermentação contínua.

Conforme Quadro IX pode-se observar que o terceiro minifermentador apresentou maior número de esporos do que o segundo minifermentador, e este mais do que o primeiro, sendo que neste, praticamente se observou apenas células vegetativas.

Nos Quadros III e IV, onde foi utilizada uma maior taxa de diluição, observou-se uma diminuição do valor de DO do primeiro para o segundo minifermentador, sendo que o 'frasco' apresentou um valor bem superior. O que pode explicar tal fato é que a taxa de diluição teria provocado uma lavagem do meio, e os microrganismos se acumularam no 'frasco'.

4.2.4. Desenvolvimento e esporulação dos microrganismos

Os resultados de DO e MS devem ser analisados conjuntamente, pois um aumento de MS significará um aumento do número de microrganismos, e um aumento de DO poderá indicar além disso, que o índice de refração do meio está variando devido à presença de esporos, metabólitos, etc.

Observou-se nas Figuras 4.1 e 5.1, que a DO e MS estavam diminuindo com o tempo de fermentação. Isso vem reforçar o observado com o comportamento do consumo de glicose, de que o microrganismo não estava esporulando satisfatoriamente.

Pelo Quadro IVa, que correspondeu ao experimento com

interrupção da alimentação para aumentar o tempo de residência do microrganismo no meio de cultura, notou-se que o aumento e estabilização da DO foram acompanhados de uma estabilização de MS num valor elevado além de uma boa esporulação, conforme se pode verificar pelo Quadro IX.

Quanto a presença de DPA, sabe-se que o nível do mesmo é indicativo do estágio de esporulação do microrganismo; observou-se que os Quadros IV a VII apresentaram resultados concordantes com o Quadro IX, que apresenta resultados ao microscópio.

4.2.5. Efeitos da aeração e agitação mecânica

Outro ponto a ressaltar é que mesmo na ausência de agitação e aeração mecânica (reservatório de meio fermentado do Anexo IV, denominado 'frasco'), o microrganismo se desenvolveu, conforme observado pelos Quadros III, IV, VI, VII. Este fato concorda com afirmações de Mc CONNELL (77) relativas à produção por fermentação estática.

Comparando os Quadros III, V e VII (onde a fermentação ocorreu em dois estágios) com os Quadros IV e VI (cuja fermentação ocorreu em um único estágio) observou-se que no segundo mini fermentador ocorreram as mesmas oscilações verificadas no primeiro, defasadas apenas no seu tempo de observação. Observou-se assim que a diminuição da aeração no segundo mini fermentador em nada afetou o desenvolvimento do microrganismo, o que confirma o observado por MORAES (86).

Quadro I. Análises de acompanhamento da fermentação descontínua de Bacillus thuringiensis em frascos agitados.

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)
0	6,5	88	3,0	7,3	0,98	39,5
3	5,9	76	3,0	4,3	0,60	41,0
4	5,6	62	3,8	4,5	0,64	41,8
5	5,5	54	4,5	4,4	0,68	45,4
6	5,4	46	6,6	5,2	0,98	55,4
7	5,5	44	7,0	5,7	0,92	47,5
8	5,5	58	8,0	6,9	0,98	41,8
9	5,6	19	10,0	6,7	0,98	43,0
24	8,0	12	9,6	10,8	0,88	23,9

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro II. Análises de acompanhamento da fermentação descontínua de Bacillus thuringiensis em minifermentador.
(Valores médios)

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)
0	7,1	159	1,9	-	-	-
3	6,1	144	2,0	-	-	-
5	5,9	105	2,8	-	-	-
7	5,6	68	3,3	-	-	-
8	5,8	75	3,7	-	-	-
23	6,9	14	6,4	-	-	-
26	7,5	13	14,5	-	0,92	16,1

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro III. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em dois estágios.

(Valores médios)

D: 0,15 - 0,30 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	6,0	28	5,2	3,5	0,15	12,6	1º
2	6,0	28	3,8	3,6	0,11	8,9	2º
2,5	6,0	27	5,0	3,1	0,24	22,8	2º
3,5	6,2	39	5,4	3,6	0,22	18,0	1º
	6,2	27	4,6	2,3	0,10	12,8	2º
4,5	5,6	50	4,6	2,6	0,15	17,0	1º
	5,6	36	4,6	1,2	0,09	22,0	2º
5,5	5,6	38	4,6	1,2	0,10	24,5	1º
	5,6	43	4,2	1,1	0,07	18,7	2º
	5,6	35	4,2	1,4	0,08	16,8	frasco
21,0	5,5	21	-	2,9	0,09	9,1	aliment.
	5,4	52	5,0	1,3	0,07	15,8	1º
	5,5	50	4,8	1,0	0,10	29,4	2º
	5,5	39	5,8	1,0	0,11	32,3	frasco

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro IV. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em 1 estágio.

(Valores médios)

D: 0,15 - 0,30 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	7,0	21	6,4	-	-	-	19
2	5,7	24	7,5	6,7	0,45	19,7	19
5,5	5,5	34	8,5	4,9	0,46	27,6	19
	6,0	22	8,0	6,9	0,49	20,9	29
21,8	5,9	39	6,0	6,3	0,62	28,9	19
	5,5	40	5,0	2,8	0,25	26,3	29
	6,0	25	7,0	4,2	0,76	53,0	frasco
25,3	5,7	120	5,0	4,2	0,72	50,0	19
	5,5	68	5,5	2,8	0,37	38,8	29
	5,5	25	6,5	2,1	0,24	33,6	frasco
30,2	5,7	62	5,0	3,9	0,46	34,7	19
	5,5	62	5,0	2,5	0,47	55,0	29
	5,5	22	7,5	2,9	0,25	25,3	frasco
44,5	6,2	21	5,5	3,7	-	-	19
	6,0	39	2,7	0,9	-	-	29
	5,5	35	6,0	2,3	0,24	30,7	frasco

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro IV a. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em 1 estágio, com interrupção da alimentação entre 5 e 22 horas.

(Valores médios)

D: 0,15 - 0,30 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	7,5	20	5,8	8,5	-	-	19
2	7,1	20	6,8	9,7	-	-	19
5	7,0	20	10,5	-	-	-	19
7	6,9	23	14,0	-	-	-	19
22	5,9	37	13,5	9,9	-	-	19
	6,0	20	13,0	10,7	-	-	29
24	5,5	40	14,0	-	-	-	19
	5,5	23	12,0	-	-	-	29

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro V. Análises de acompanhamento da fermentação contínua
de Bacillus thuringiensis em 2 estágios.

(Valores médios)

D: 0,10 - 0,15 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	6,5	20	4,6	4,2	0,4	28,0	19
2	6,4	25	7,0	-	-	-	19
4	6,0	38	6,8	-	-	-	19
6	5,7	50	7,0	-	-	-	19
8	6,0	56	5,8	-	-	-	19
	6,0	26	7,0	-	-	-	29
24	6,0	70	4,4	-	-	-	19
	6,0	46	4,8	-	-	-	29
	6,0	35	5,2	6,1	0,68	32,3	39

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro VI. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em 1 estágio.

(Valores médios)

D: 0,10 - 0,15 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	7,0	17	8,6	9,6	-	-	1º
2	6,5	17	7,0	-	-	-	1º
4	6,0	21	7,4	-	-	-	1º
6	6,0	25	6,2	-	-	-	1º
23	6,0	84	3,3	-	-	-	1º
	5,7	38	4,4	-	-	-	2º
	6,0	20	5,8	-	-	-	3º
28	6,0	80	3,2	1,9	0,21	32,5	1º
	5,7	64	4,6	2,2	0,13	13,6	2º
	6,0	30	4,7	2,4	0,32	39,2	3º
	6,0	24	6,4	2,3	0,38	40,9	frasco

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro VII. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em 2 estágios.

(Valores médios)

D: 0,05 - 0,10 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	7,0	23	10,4	-	-	-	1º
2,5	6,0	22	10,0	-	-	-	1º
29	6,0	52	6,6	-	-	-	1º
	6,0	23	10,8	-	-	-	2º
34	6,0	45	5,2	-	-	-	1º
	6,5	21	11,0	-	-	-	2º
38	6,0	45	5,2	-	-	-	1º
	6,5	19	8,5	-	-	-	2º
53	6,5	34	7,5	-	-	-	1º
	5,5	20	7,0	-	-	-	2º
	6,0	19	10,0	-	-	-	3º
57	6,0	27	7,5	6,3	0,37	17,3	1º
	5,5	18	7,5	5,0	0,33	19,4	2º
	6,0	19	8,5	6,8	-	-	3º
	6,5	15	8,0	7,0	-	-	frasco

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro VIII. Análises de acompanhamento da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em 2 estágios onde houve injeção de base.

(Valores médios)

D: 0,10 - 0,15 h⁻¹

TEMPO (h)	pH	GLICOSE (UA*)	DO (UA**)	MS (g/l)	DPA (UA***)	DPA (mg/g)	MINIFERM.
0	7,5	16	6,2	7,9	1,08	40	1º
3	5,9	33	6,0	-	-	-	1º
7	6,0	32	6,0	-	-	-	1º
	6,0	25	5,5	-	-	-	2º
27,5	6,0	24	8,0	-	-	-	1º
	5,7	24	7,0	-	-	-	2º
	5,7	22	5,5	-	-	-	3º
	6,0	22	2,9	-	-	-	frasco

(*) 1 g/l glicose = 8,25 UA

(**) 1 g/l MS = 0,86 UA

(***) 1 g/l DPA = 0,0034 UA

Quadro IX. Resultado das análises ao microscópio.

QUADRO	MINIFERM.	A.M. (*)
I	—	X
II	—	+, ++
	1º	0
III	2º	0
	frasco	0
	1º	0
IV	2º	+
	frasco	+
IV A	1º	0
	2º	++
	1º	0
V	2º	+
	3º	+
VI	1º	X
	1º	+
VII	2º	++
	3º	++
	frasco	++
VIII	1º	0, □

(*) com auxílio de microscópio de contraste de fase e/ou coloração de esporos.

Chave: X - não foi efetuado acompanhamento ao microscópio
 0 - ausência de esporos e cristais
 + - poucos esporos, e cristais ausentes ou em pequeno número
 ++ - mais esporos e cristais
 □ - presença de microrganismos estranhos

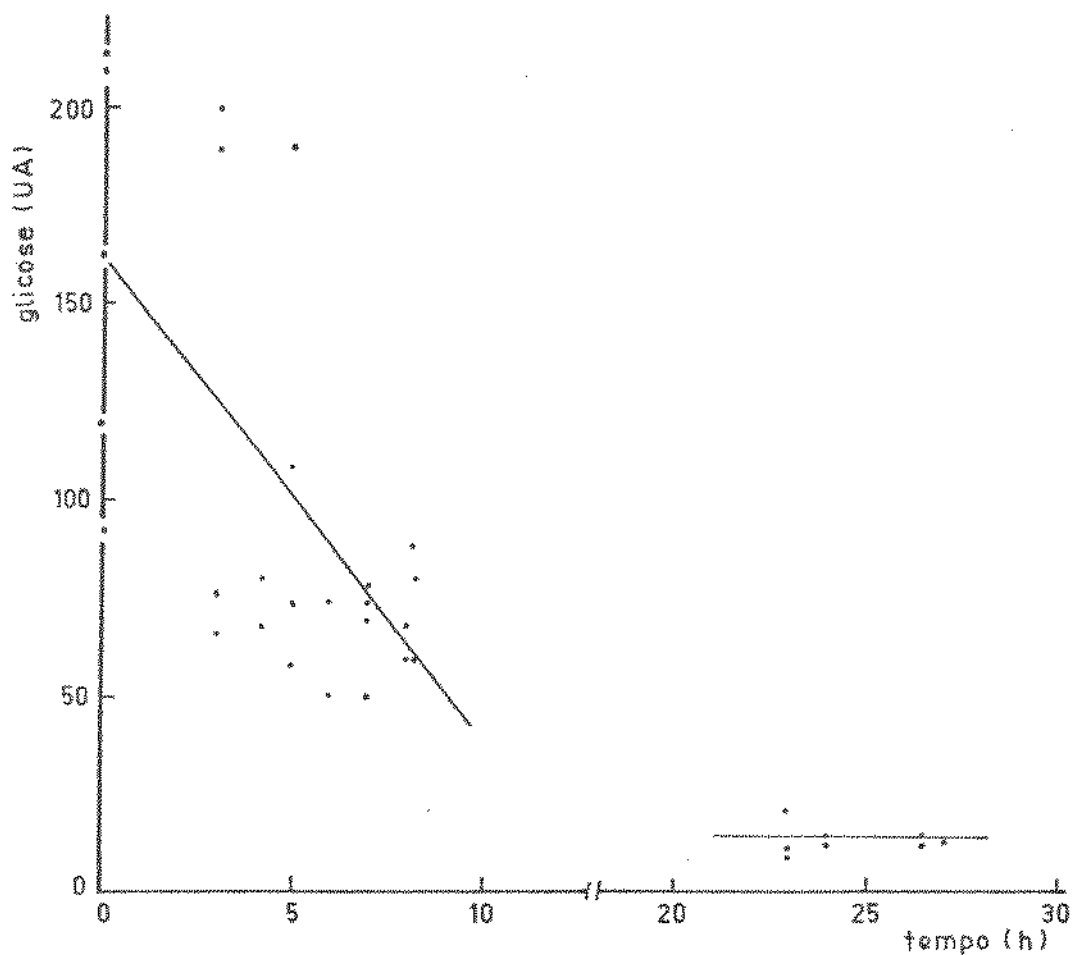


FIGURA 1 - Cinética do consumo de glicose em fermentação descontínua de Bacillus thuringiensis.

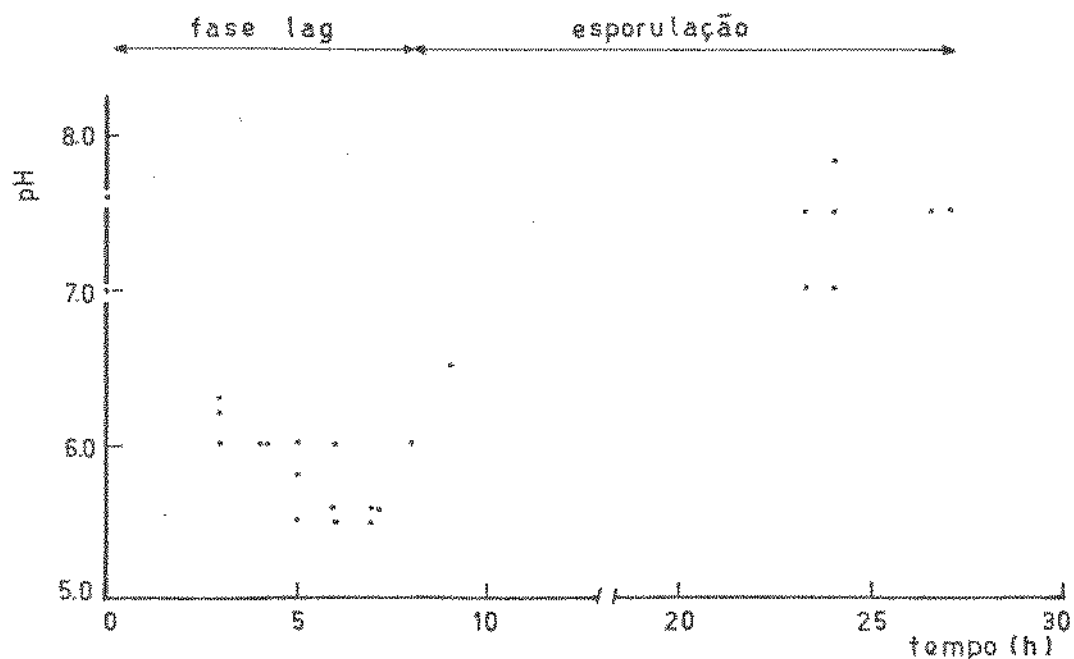


FIGURA 2 - Comportamento do pH em fermentação descontínua de Bacillus thuringiensis.

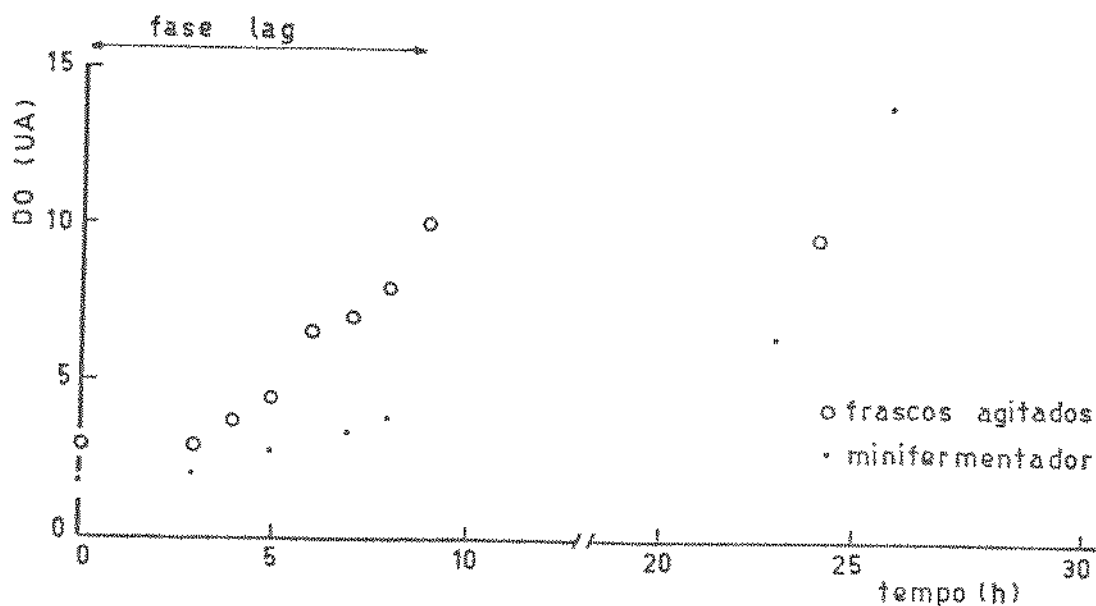


FIGURA 3.1 - Crescimento do *Bacillus thuringiensis* em processo descontínuo.

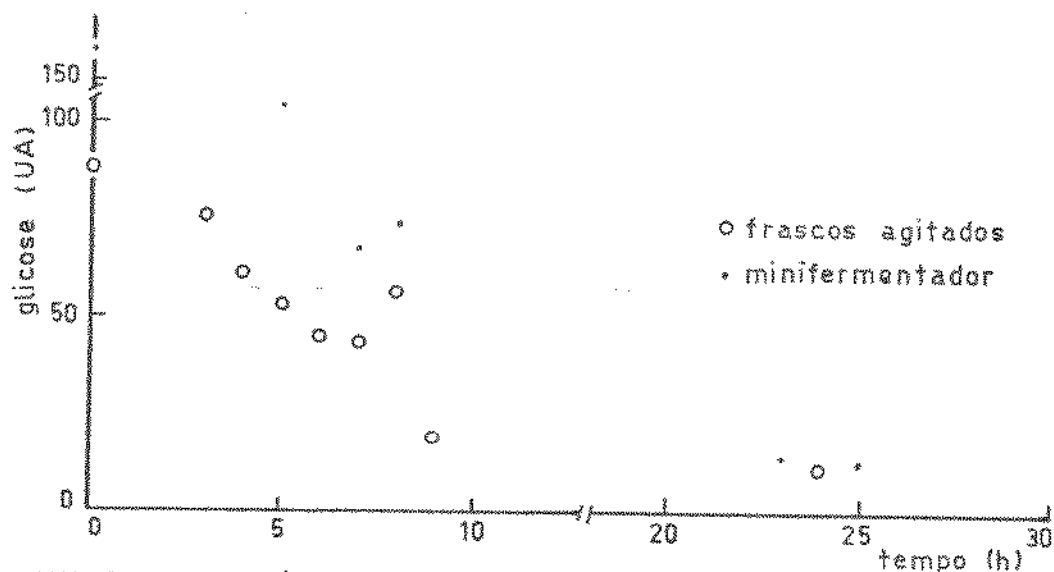


FIGURA 3.2 - Cinética do consumo de glicose em processo descontínuo.

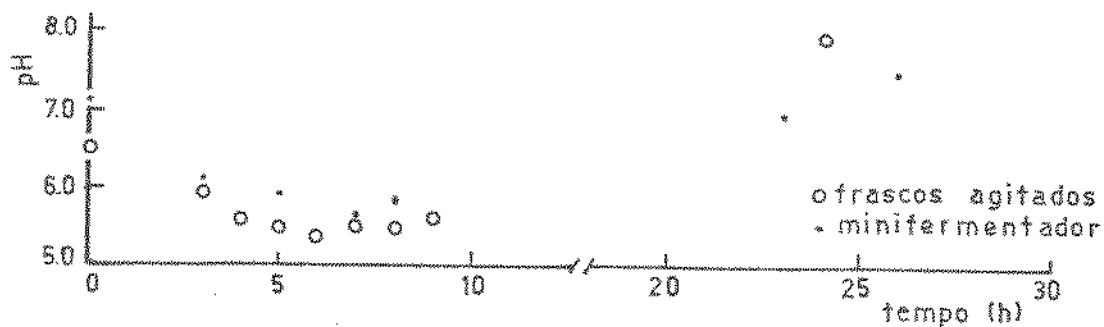


FIGURA 3.3 - Comportamento do pH do meio de fermentação, em processo descontínuo.

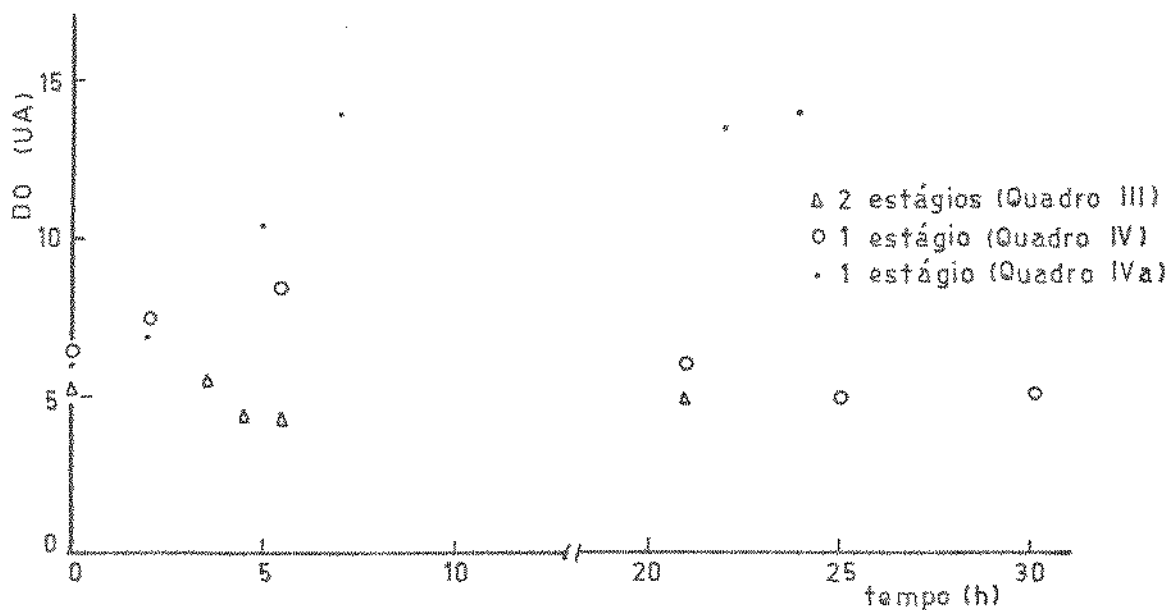


FIGURA 4.1 - Crescimento do *Bacillus thuringiensis* no 1º minifermentador, processo contínuo, $D: 0.15 - 0.30 \text{ h}^{-1}$.

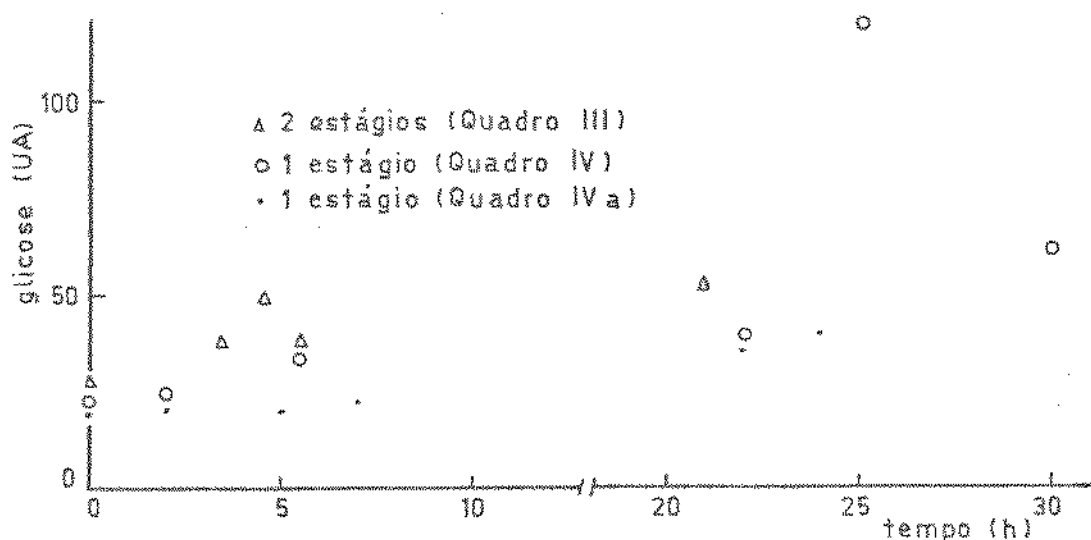


FIGURA 4.2 - Cinética de consumo de glicose no 1º minifermentador, processo contínuo, $D: 0.15 - 0.30 \text{ h}^{-1}$.

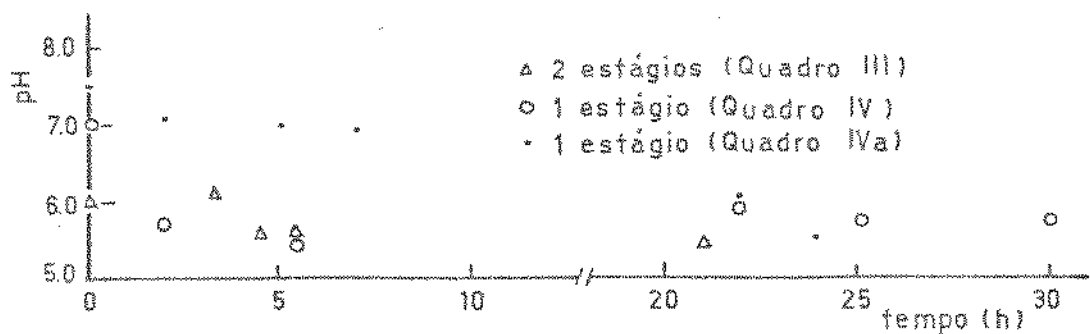


FIGURA 4.3 - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º minifermentador, processo contínuo, $D: 0.15 - 0.30 \text{ h}^{-1}$.

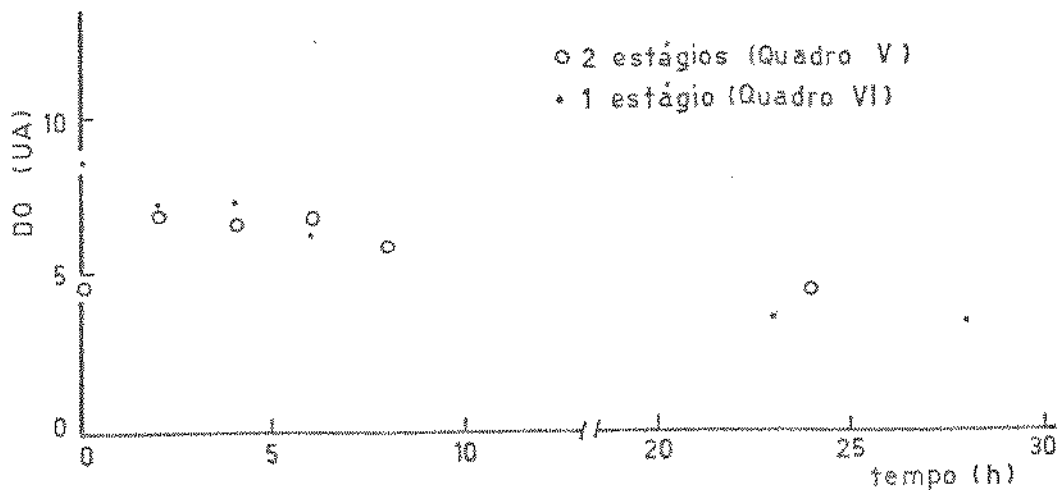


FIGURA 5.1 - Crescimento do *Bacillus thuringiensis* no 1º minifermentador do processo contínuo, $D : 0.10 - 0.15 \text{ h}^{-1}$.

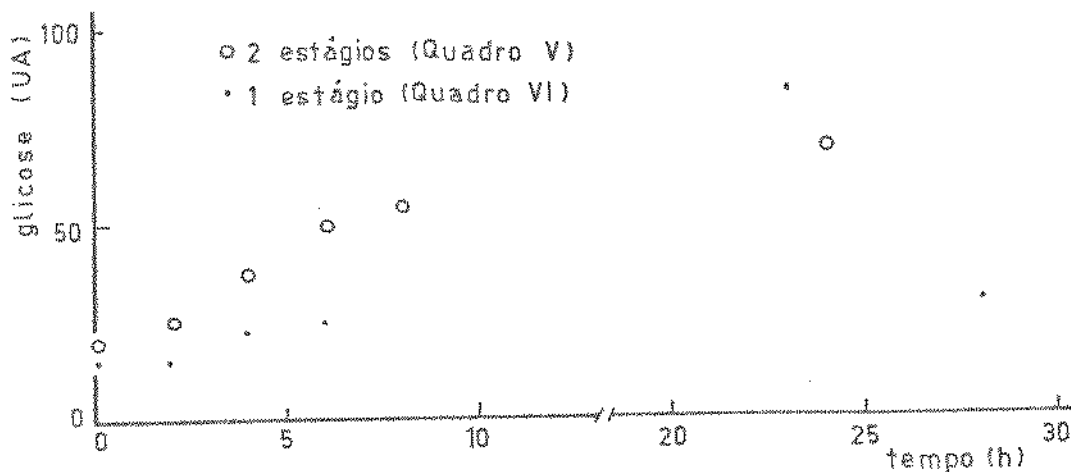


FIGURA 5.2 - Cinética do consumo de glicose no 1º minifermentador do processo contínuo, $D : 0.10 - 0.15 \text{ h}^{-1}$.

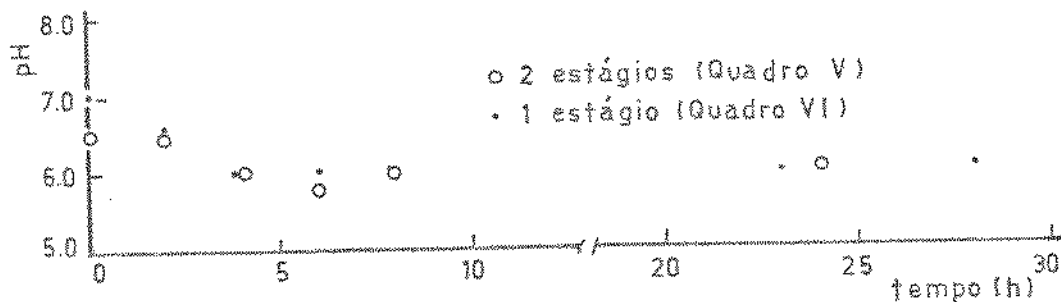


FIGURA 5.3 - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º minifermentador do processo contínuo, $D : 0.10 - 0.15 \text{ h}^{-1}$.

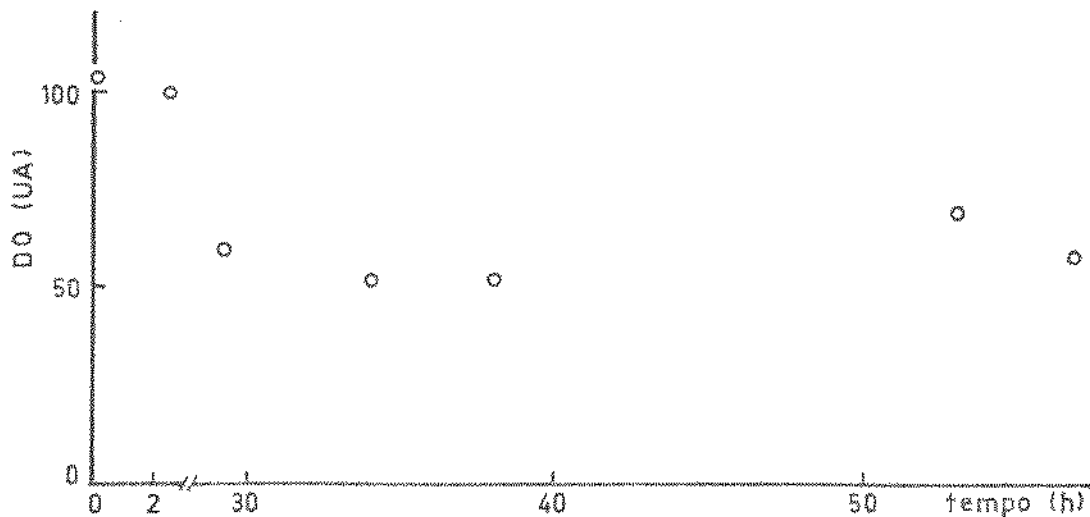


FIGURA 6.1 - Crescimento do *Bacillus thuringiensis* no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios com $D: 0.05 \text{ h}^{-1}$ (Quadro VII)

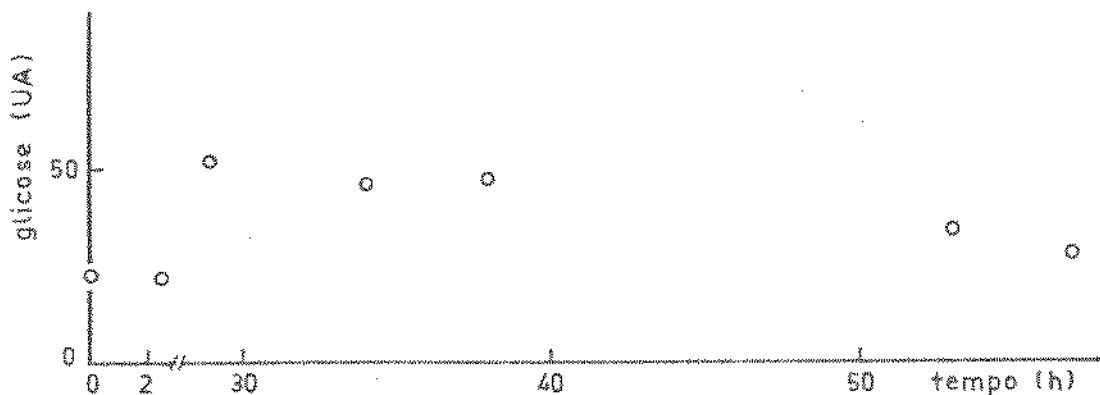


FIGURA 6.2 - Cinética do consumo de glicose no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios com $D: 0.05 \text{ h}^{-1}$ (Quadro VII)

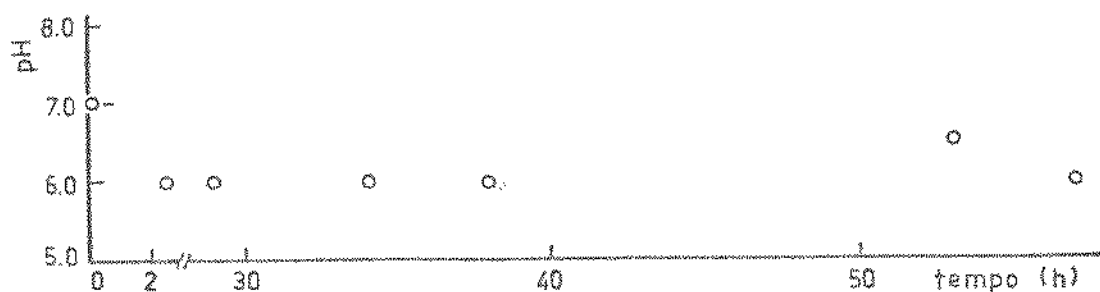


FIGURA 6.3 - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º minifermentador do processo contínuo em 2 estágios com $D: 0.05 \text{ h}^{-1}$ (Quadro VII)

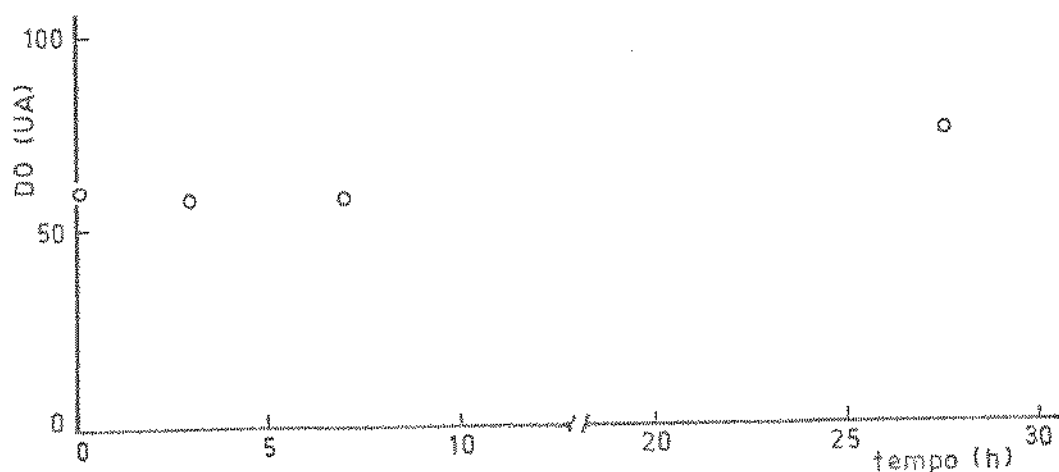


FIGURA 7.1 - Crescimento do Bacillus thuringiensis no 1º minifermntador do processo contínuo em 2 estágios, com injeção de base (Quadro VIII)

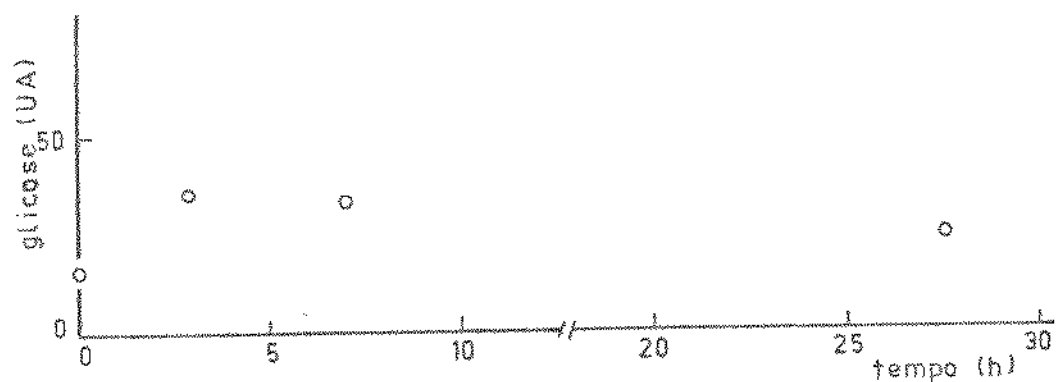


FIGURA 7.2 - Cinética do consumo de glicose no 1º minifermntador do processo contínuo em 2 estágios, com injeção de base (Quadro VIII)

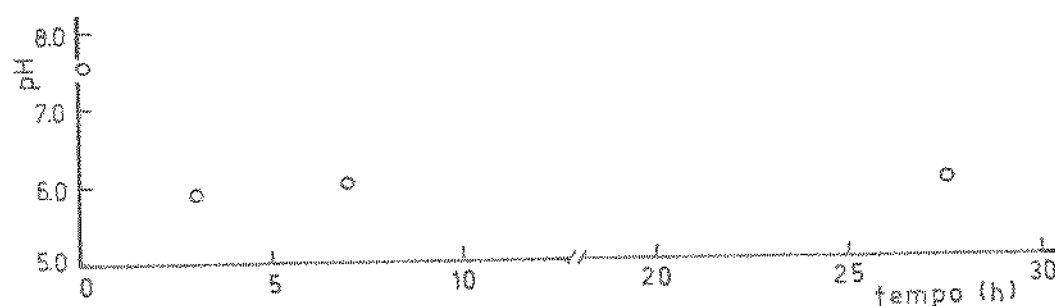
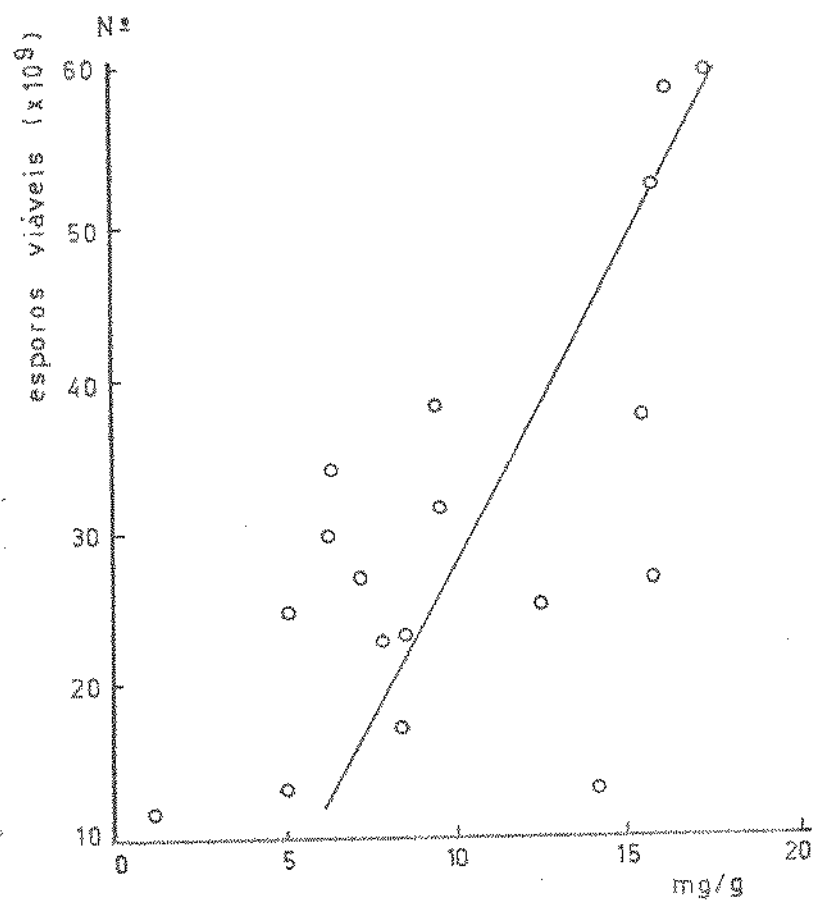
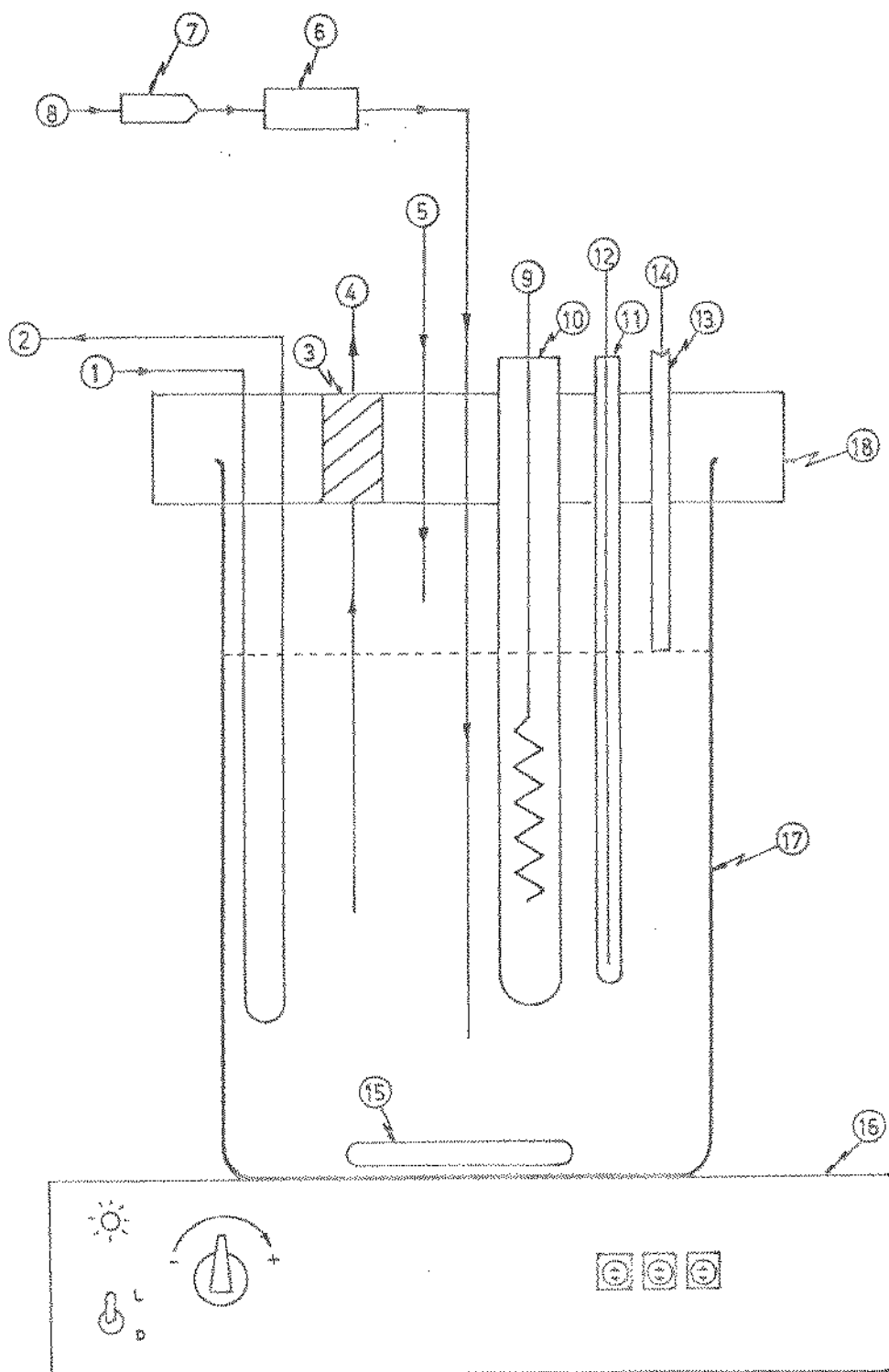


FIGURA 7.3 - Comportamento do pH do meio de fermentação no 1º minifermntador do processo contínuo em 2 estágios, com injeção de base (Quadro VIII)

ANEXO I

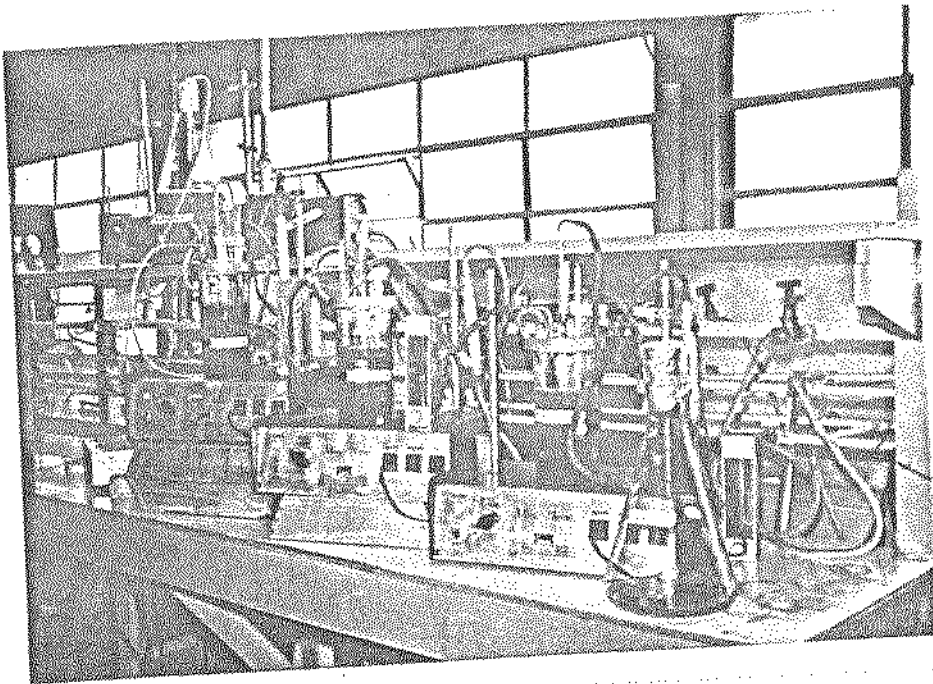


Concentração de Ácido Dipicolínico (DPA)
(Moraes, I.O. (84))



ESQUEMA DO MINIFERMENTADOR

1. Entrada de água para resfriamento
2. Saída de água do resfriamento
3. Diafragma de borracha para introdução de seringas: inoculação, controle de pH, espuma, retirada de amostra
4. Retirada de amostra através de seringa
5. Entrada de meio (alimentação)
6. Filtro de ar com leito de lã de vidro
7. Rotâmetro
8. Linha de entrada de ar
9. Termostato
10. Tubo pirex para termostato
11. Falso pirex para termômetro
12. Termômetro
13. Falso pirex para saída de meio fermentado
14. Linha de saída de meio fermentado
15. Agitador magnético
16. Base do fermentador
17. Vaso pirex 1000 ml
18. Tampa



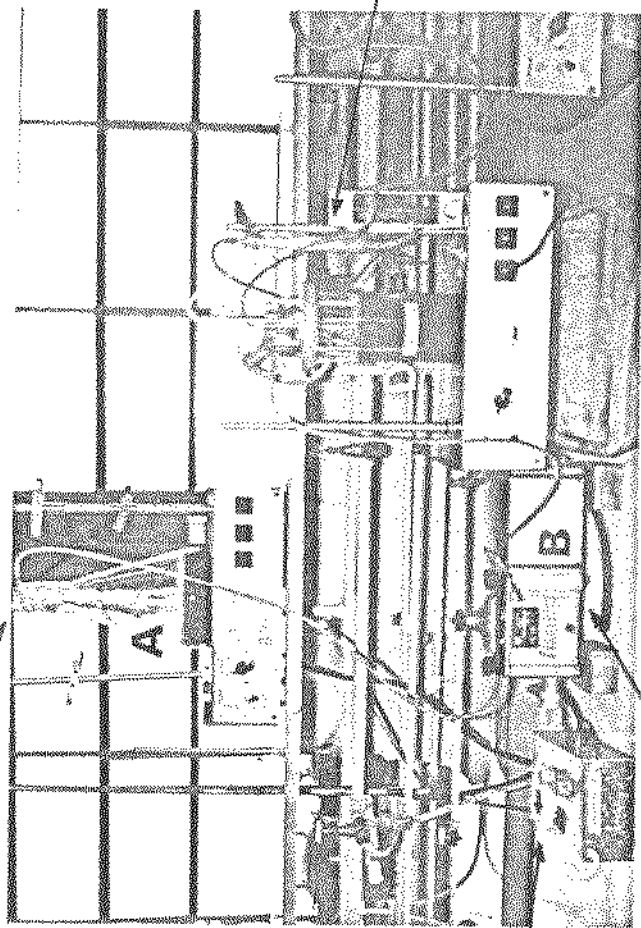
ANEXO III. Aspecto geral da montagem dos equipamentos para fermentação contínua com Bacillus thuringiensis.

Alimentação

Minifermentador

Temporizador

Bomba
peristáltica



ANEXO IV. Detalhe da etapa de alimentação do primeiro minifermentador no processo contínuo.

5. CONCLUSÕES

5.1. O valor do pH de conexão embora não influencie na obtenção do estado estacionário, é um importante parâmetro na minimização do tempo para atingir esse estado. O valor ótimo encontrado neste trabalho foi na faixa de 6,0 a 6,5.

5.2. A fermentação contínua de Bacillus thuringiensis nas condições estudadas é bem sucedida para sistemas com mais de um estágio. Com um único estágio não se conseguiu tempo de residência (1/taxa de diluição) suficiente para que o crescimento e esporulação do microrganismo coexistam.

5.3. A fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em um único estágio deve ser seguida de uma etapa descontínua para maturação dos esporos.

5.4. A cinética do consumo de carboidrato é um dos fatores importantes na caracterização da fermentação contínua de Bacillus thuringiensis.

5.5. A diminuição da aeração do segundo estágio da fermentação contínua, bem como dos que o seguem, não afeta a maturação dos esporos, e portanto constitui um fator econômico relevante no processo contínuo em estudo.

6. RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

6.1. Realizar a fermentação contínua de Bacillus thuringiensis em fermentadores de maior volume afim de reduzir a taxa de diluição, aumentando consequentemente o tempo de residência. Com o sistema empregado - minifermentadores de 1000ml de volume nominal, e bomba peristáltica com vazão mínima de 0,4 ml de meio/minuto, foi impossível reduzir a taxa de diluição abaixo de $0,05 \text{ h}^{-1}$.

6.2. Testar outras fontes de carboidrato de consumo mais lento e novas formulações de meio de cultura usando o carboidrato como substrato limitante.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ADAMS, S.L. and HUNGATE, R.E. - Continuous fermentation cycle times - Prediction from growth curve analysis. Ind. Eng. Chem. 42(9): 1815-18, 1950.
2. AGRICULTURE HANDBOOK Nº 512 - The basic principles of insect population suppression and management. United States Department of Agriculture, 1979.
3. AGRICULTURE HANDBOOK Nº 554 - Guidelines for the control of insect and mite pests of foods, fibers, feeds, ornamentals, livestock, forests and forest products. U.S.D.A., 1979.
4. AMERINE, M.A.; BERG, H.W. and CRUESS, W.V. - The technology of wine making. AVI Publ. Comp., 1972.
5. ANAGNOSTOPOULOS, G.D. - Unbalanced growth in a semicontinuous culture system designed for the synchronization of cell division. J. Gen. Microb. 65: 23-32, 1971.
6. ANDERSON, P.A. - Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms. J. Gen. Physiol. 36: 733-737, 1953.
7. ANDERSON, R.F. and IGNOFFO, C.M. - Microbial insecticides. In: "Microbial Technology". H.J. Peppler Ed., p. 172-181, 1967.
8. ANGUS, T.A. - A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, 173: 545, 1954.

9. ANGUS, T.A., Symposium on Microbial Insecticides. I- Bacterial pathogens of insects as microbial insecticides. Bact. Review 29(3): 364-371, 1965.
10. _____, The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. World Review of Pest Control, 7(1): 11-26, 1968.
11. _____, Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. In: "Naturally occurring insecticides" Marcel Dekker Inc., N. York, 1971.
12. BASCHNAGEL-DE PAMPHILLS, J. and HANSON, R.S. - Relationship between glucose utilization and growth rate in Bacillus subtilis. J. Bacteriol, 98(1): 222-5, 1969.
13. BERG, P.E. and GRECZ, N. - Relationship of dipicolinic acid content in spores of Bacillus cereus T to ultraviolet and gamma radiation resistance. J. Bacteriol., 103(2): 517-19, 1970.
14. BRIGGS, J.D. - Commercial production of insect pathogens. In: "Insect Pathology: An Advanced Treatise". Vol.2, p. 519-548. Acad. Press Inc., N. York, 1963.
15. BROWN, W.E. and PETERSON, W.H. - Factor affecting production of penicillin in semi-pilot plant equipment. Industrial Engineering Chemistry 42: 1769, 1950.
16. BRYSON, V. - The turbidostatic selector - A device for automatic isolation of bacterial variants. Science 116: 48, 1952.
17. BURGESS, H.D. - The standardization of products based on Bacillus thuringiensis. Medelingen Rijkswetenschapp. Landbouwwetenschappen Gent XXXI(3): 536, 1966.

18. BURGESS, H.D. - Standardization of Bacillus thuringiensis products: homology of the standard. Nature 215: 664, 1967.
19. _____.- Stability of Bacillus thuringiensis in beeswax and bee comb. Pest Infestation Control Laboratory, Slough, England.
20. _____, and BAILEY, L. - Control of the greater and lesser wax moths (Galleria mellonella and Achroia grisella) with Bacillus thuringiensis. J. Invert. Pathol. 11(2): 184, 1968.
21. BURGERJON, A. and GRISON, P. - Sensibilité de différents Lépidoptères à la souche "Anduze" de Bacillus thuringiensis. Entomophaga 4(3): 207-9, 1959.
22. _____, and BIACHE, G. - The activity of the heatstable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner used in nature against larvae of Diprion pini. J. Insect Pathol. 6: 538, 1964.
23. CAVERO, E.S., GUERRA, M.S. and SILVEIRA, C.P.D. - Manual de Inseticidas e Acaricidas - Aspectos toxicológicos. p. 246. Ed. Aimara Ltda. - Pelotas, Brasil, 1976.
24. CHAYKIN, S. - Biochemistry Laboratory Techniques. John Wiley & Sons Inc., NY, 1966, p.88.
25. CHURCH, B.D. and HALVORSON, H. - Dependence of the heat resistance of bacterial endospores on their dipicolinic acid content. Nature 183: 124-5, 1959.
26. CLEGG, R.A. and LIGHT, P.A. - Growth yields of Torulopsis utilis grown in continuous culture with glycerol or iron as the growth-limiting nutrient. Biochem. J. 124: 152-4, 1971.

27. COHEE, R.F. and STEFFEN, G. - Makes vinegar continuously.
Food Eng. 31(3): 58-59, 1959.
28. COOKSEY, K.E. - The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis - Biochemistry and mode of action. In: "Microbial control of Insects and Mites" p. 247-74. Acad. Press Inc., London, 1973.
29. COUCH, T.L. and ROSS, D.A. - Production and utilization of Bacillus thuringiensis. Biotechn. Bioeng. 22(7): 1295-1334, 1980. Symposium on Microbial Agents for the Control of Insects Pests.
30. DABUROV, K.N. - Establishment of hygienic guidelines for use of bacterial insecticides in agriculture and permissible residual amounts of their producer, Bacillus thuringiensis, in vegetable products. Food Sci. Techn. Abstracts 12(1) - 1J54, 1980.
31. DAWES, I.W.; KAY, D. and MANDELSTAN, J. - Sporulation in Bacillus subtilis. Establishment of a time scale for the morphological events. J. Gen. Microb. 56: 171-179, 1969.
32. _____ and MANDELSTAM, J. - Chemical of sporulation of Bacillus subtilis 168: continuous culture studies. In: "Continuous cultivation of microorganisms". Proceedings of the 4th Symposium, Prague, 1968. p. 157-162. Academic Press, 1969.
33. _____, _____ - Sporulation of Bacillus subtilis in continuous culture. J. Bacter. 103: 529-535, 1970.
34. DAWSON, P.S.S. - Continuous synchronous culture - The production of extracellular enzymes by continuous phased culture of Bacillus subtilis. In: "Fermentation Techno-

logy Today" - Proceedings of the IVth Intern. Ferm. Symp., Japan, 1972, p. 121-128.

35. DE BARJAC, H. and RIOU, J.Y. - Action de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis administrée à des souris. Revue de Path. Comparé et de Médecine Expér. 6: 367-374, 1968.
36. DENSHCHIKOV, M.T.; SHASHILOVA, V.P. and GVELESIANI, R.K. - Continuous flow production of Russian semisweet wine. Chem. Abstr. 72: 11374n, 1970.
37. DOUGALL, D.K. and WEYRAUCH, K.W. - Growth and anthrocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. Biotech. Bioeng. 22(2): 337, 1980.
38. DUBOIS, N.R. - Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis spores and crystals. Appl. Microbiol. 16: 1098, 1968.
39. DULMAGE, H.T. - Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus thuringiensis var. alesti. J. Inv. Path. 15: 232, 1970.
40. _____. - Production of endotoxin by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media. J. Inv. Path. 16: 385-9, 1970.
41. _____. - Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of Bacillus thuringiensis serotype 3, in 3 fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 18: 353-8, 1971.
42. _____ et alli. - Field tests with the HD-1 formulation of the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis against

the cabbage looper on cabbage. J. Econ. Entom. 64: 1421, 1971.

43. DULMAGE, H.T. et alli - Proposed standardized bioassay for formulation of Bacillus thuringiensis based on the International Unit. J. Inv. Pathol. 18: 240-5, 1971.
44. _____ and RHODES, R.A. - Production of pathogens in artificial media. In: "Microbial Control of Insects and Mites". Acad. Press, London 24, 507-540, 1973.
45. FAN, L.T.; ERICKSON, L.E.; SHAH, P.S. and ISAI, B.I. - Effect of mixing on the washout and steady-state performance on continuous cultures. Biotechn. Bioeng. 12: 1019-69, 1970.
46. FAST, P.G. and ANGUS, T.A. - The δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis var. sotto: A toxic low molecular weight fragment. J. Inv. Path. 16: 465, 1970.
47. FAUST, R.M. - 'In vitro' chemical reaction on the δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus with other proteins. J. Inv. Pathol. 11: 465-75, 1968.
48. FENCL, Z.; MACHEK, F.; NOVÁK, M. and SEICHERT, L. - Control of the culture activity as a function of growth rate in continuous cultivation. In: "Continuous Cultivation of Microorganisms". Proceedings of the 4th Symp. Prague, 1968. Acad. Press Inc. p. 173-188, 1969.
49. _____; RÍČICA, J. and KODESOVA, J. - The use of the multi-stage chemostat for microbial product formation. In: "Environmental Control of the Cell Synthesis and Functions". 1971, Ed. A.C.R. Dean, S.J. Pirt and D.W. Tempest.

50. FILGUEIRA, F.A.R. - Manual de Olericultura: cultura e comercialização de hortalças. Ed. Agron. Ceres, S. Paulo, 1972.
51. FREIMAN, V.B. and CHUPIN, A.A. - Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group Bacillus thuringiensis. Advances in Microbial Eng.- Part I. Biotechn. Bioeng. Symposium, nº 4, p. 259, 1973.
52. GUTCHO, M. - "Alcoholic Malt Beverages". Food Review nº 7. Noyes Devel. Corp., N. Jersey, p. 181, 1969.
53. _____. - Alcoholic beverage processes. In: "Food Technology Review" nº 29. Noyes Data Corp., p. 129, 1976.
54. HALL, I.M. - Microbial control. In: "Insect Pathology: An Advanced Treatise" II, p. 477-517. Acad. Press, N.Y., 1963.
55. HARRISON, D.E.F. - Advances in the development and application of continuous culture, p. 33. Collected Reprints 1971-1974. Ferm. Div. Woodstock Lab. - Shell Research Ltd.
56. _____ and LOVELESS, J.E. - The effect of growth conditions on respiratory activity and growth efficiency in facultative anaerobes grown in chemostat culture. J.Gen. Microb. 68: 35-43, 1971.
57. HEIMPEL, A.M. - A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Review of Entom. 12: 287-322, 1967.
58. _____ and ANGUS, T.A. - Diseases caused by certain spore forming bacteria. In: "Insect Pathology: An Advanced Treatise", p. 21-73. Acad. Press, N.Y., 1963.

59. HERBERT, D.; ELSWORTH, R. and TELLING, R.C. - The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. J. Gen. Microb. 14: 01, 1956.
60. HOLMBERG, A.; SIEVÄNEM, R. and CARLBERG, G. - Fermentation of Bacillus thuringiensis for exotoxin production - Process analysis study. Biotechn. Bioeng. 22(8): 1707, 1980.
61. HOUGH, J.S.; BRIGGS, D.E. and STEVENS, R. - "Malting and Brewing Science". Chapman and Hall Ltd., London, 1971.. p. 505-35.
62. HSU, E.J. and ORDAL, Z.J. - Sporulation of Clostridium thermosaccharolyticum under conditions of restricted growth. Journal of Bact. 97(3): 1511-12, 1969.
63. HUANG, H.T. - Introduction. Biotechn. Bioeng. 22(7): 1295-1334, 1980. Symposium on Microbial Agents for the Control of Insects Pests.
64. IGNOFFO, C.M. - Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. New York Acad. Sciences 217(22): 141-164, 1973.
65. JANSEN, F.W.; LUND, A.J. and ANDERSON, L.E. - Colorimetric assay for DPA in bacterial spores. Science 127: 26, 1958.
66. KAHLER, M. and LEJSEK, T. - Continuous production of beer. Chem. Abst. 74: 123703s, 1971.
67. KAY, D. and WARREN, S.C. - Sporulation in Bacillus subtilis Morphological changes. Biochem. J. 109:819, 1968.
68. KNAYSI, G. - A study of some environmental factors with control endospore formation by a strain of Bacillus mycoides. J. Bact. 49: 473-493, 1945.

69. KROCHTA, J.M.; RUMSEY, T.R. and FARKAS, D.F. - Defining food R&D needs as a guide for the future. Food Techn. 29(10): 74, 1975.
70. LECADETT, M.M. - Bacillus thuringiensis toxins - The proteaceous crystal. In: Microbial Toxins - vol. III. Bacterial protein toxins. p. 437-471. Academic Press, 1970.
71. LUCKMANN, W.H. and METCALF, R.L. - The pest-management concept. In: "Introduction to insect pest management". p. 3-35. John Wiley & Sons, NY. 1975.
72. LUTHY, P. - Insecticidal toxins of Bacillus thuringiensis Fed. of European Microb. Soc. - Microb. Letters 8: 1-7, 1980.
73. LYSENKO, O. and KUCERA, M. - Microorganisms as sources of new insecticidal chemicals: Toxins. In: "Microbial Control of Insects and Mites". p. 206. Academic Press, 1971.
74. MADDOX, J.V. - Use of diseases in pest management. In: "Introduction to insect pest management". p. 189-233. Ed. R.L. Metcalf and W.H. Luckmann.
75. MALEK, I. and FENCL, Z. - Continuous cultivation of microorganisms. A review. Folia Microb. 6(3): 193-209, 1961.
76. _____; _____. - "Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms". Acad. Press, 1966.
77. Mc CONNEL, E. and RICCHARDS, A.G. - The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat stable substan-

ce toxic for insects. Can. J. Microb. 5: 161-8, 1959.

78. Mc GARR, R.L. - The δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis HD-1 and chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm. J. Econ. Entom. 63: 1357-8, 1970.
79. _____; DULMAGE, H.T. and WOLFENBARGER, D.A. - Fields tests with HD-1 δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis and with chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm in 1970. J. Econ. Entom. 65: 897-9, 1972.
80. MEGNA, J.C. - US Patent 3076922, 1963. In: "Microbial Control of Insects and Mites". Acad. Press, London, 1973.
81. METCALF, R.L. - Insecticides in pest management. In: "Introduction to insecticide pest management" p. 235-273. Ed. R.L. Metcalf and W.H. Luckmann.
82. MONOD, J. - citado em Methods in Microbiology - 2. Acad. Press, 1970.
83. MORAES, I.O. - Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. MSc., thesis. FEA-UNICAMP, Brasil, 1973.
84. _____. - Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini fermentador. PhD, thesis, FEAA - UNICAMP, Brasil, 1976.
85. _____. - Produção, separação e bioensaio da exotoxina termoestável de Bacillus thuringiensis, obtida por fermentação submersa. Livre docência, thesis, FEAA-UNICAMP Brasil, 1981.

86. MORAES, I.O. and CHAIB, M.A. - Bioassay for microbial insecticide. Process Biochem. 13(10): 23, 1978.
87. _____; HOKKA, C.O. and NAKAMURA, I.M. - Kinetic studies on growth and sporulation of Bacillus thuringiensis. International Congress of Food Science and Technology Abstracts, p. 241, 1978.
88. MURELL, W.G. - The biochemistry of the bacterial endospore. In: "Advances in Microbial Physiology" p. 133. Acad. Press, 1967.
89. NAGAMMA, M.V. et alli - A new medium for Bacillus thuringiensis Berliner. J. Appl. Bact. 35: 367, 1972.
90. NICKERSON, K.W. - Structure and function of the Bacillus thuringiensis protein crystal. Biotechn. Bioeng. 22(7): 1295-1334, 1980. Symp. on Microb. Agents for the control of insects pests.
91. _____ et alli. - Sporulation of Bacillus thuringiensis without concurrent derepression of the tricarboxilic acid cycle. J. Bact. 117(1): 321, 1974.
92. NORRIS, J.R. - Biological methods of insect control. Pest Articles and News Summaries 14: 505-522, 1968.
93. _____. - Spore formers as insecticides. Journal of Applied Bacteriology 33: 192, 1970
94. _____. - The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis and physical structure. In: "Microbial control of Insects and Mites". Acad. Press, 1971, p. 229.
95. _____ and WATSON, D.H. - An electron microscope study of sporulation and protein crystal formation in Bacillus

- cereus var. alesti. J. Gen. Microb. 22: 744, 1960.
96. NORTHROP, J.H. - Apparatus for maintainning bacterial cultures in the steady-state. J. Gen. Physiol. 38(1): 105-115, 1954/55.
97. NOVICK, A. and SZILARD, L. - Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 36: 708-719, 1950.
98. NUTRILITE Products Inc. BIOTROL. Biological Insect Control Products. Technical Bulletins, California, 1973.
99. OATMAN, E.R. et alli. - Control of the corn ear worm on sweet corn in Southern California with a nuclear polyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis. J. Econ. Entom. 63(2): 415-21, 1970.
100. PÁDUA, L.E. et alli. - Serological and bacteriological studies of the three isolates of Bacillus thuringiensis serotype 10. Ann. Repts. Intern. Center of Coop. Res. Develop. Microbial Eng. V. 1, 1978. Fac. Eng. - Osaka, Japan.
101. PASCHOAL, A.D. - "Pragas, praguicidas e a crise ambiental" Ed. Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro, 1979.
102. PENDLETON, I.R. - Insecticides of crystal forming bacteria. Process Biochem. 4(12): 29-32, 1969.
103. PEPPLER, H.J. and PEALMAN, D., Editors. - "Microbial Technology". Vol. II. Ferm. Techn. 2nd ed. Academic Press, 1979.
104. PINNOCK, D.E. et alli. - Control of the California oakworm with Bacillus thuringiensis. Preparations. J. Econ. Entom. 64(2): 510-513, 1971.

105. PINNOCK, D.E.; BRAND, R.J. and MILSTEAD, J.E. - The field persistence of Bacillus thuringiensis spores. J. Inv. Pathol. 18: 405-11, 1971.
106. RIBÉREAU-GAYON, J. and PEYNAUD, E. - "Trattato di enologia". Vol. 1 e 2, 1971.
107. RIBIER, J. and LECADET, M.M. - Étude ultrastructural et cinétique de la sporulation de Bacillus thuringiensis var. Berliner. Ann. Microb. (Inst. Pasteur) 124A: 311, 1973.
108. ŘIČICA, J. - Multi-stage systems. In: "Methods in Microbiology" Vol. II, p. 329-348. Acad. Press, London, 1970.
109. _____, - Sporulation of Bacillus thuringiensis in multi-stage continuous cultivation. In: "Continuous cultivation of microorganisms" - Proceed. 4th Symp., Prague, 1968. Acad. Press, 1969. p. 163-172.
110. RIVIERE, J. - "Les applications industrielles de la microbiologie". p. 171. Ed. Masson et Cie., Paris, 1975.
111. ROGOFF, M.H. - Crystal forming bacteria as insect pathogens. Adv. Appl. Microb. 8: 291, 1966.
112. _____ and YOUSTEN, A.A. - Bacillus thuringiensis: microbiological considerations. Ann. Review Microb. 23: 357-85, 1969.
113. RYU, D.Y. et alli. - Production of 3-ketosteroid-delta-1 - dehydrogenase by a two stage continuous culture system. In: "Fermentation Technology Today" - Proceed. IVth Intern. Perm. Symp. Kyoto, Japan, p. 219, 1972.

114. SANTANA, M.H.A. - Estudo da aeração e agitação na fermentação com Bacillus thuringiensis. Tese de Mestrado. Fac. Eng. Alimentos/UNICAMP. 1980.
115. SEBESTA, K. and HORSKÁ, K. - Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin on Bacillus thuringiensis var. gelechiae. Bioph. Biochim. Acta 169: 281-2, 1968.
116. _____; _____ and VANKOVA, J. - Inhibition of 'de novo' RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of the Bacillus thuringiensis var. gelechiae. Coll. Czech. Commun. 34: 1786-91, 1969.
117. SHARF, J.M. - Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos. Ed. Polígono. p. 54-5. São Paulo, Brasil, 1972.
118. SHARPE, E.S. - Propagation of Bacillus popilliae in laboratory fermentors. Biotechn. Bioeng. 8(2): 247-58, 1966.
119. SINCLAIR, C.G. and BROWN, D.E. - Effect of incomplete mixing on the analysis of the static behavior of continuous cultures. Biotechn. Bioeng. 12: 1001-17, 1970.
120. SMIRNOFF, W.A. - Effects of volatile substances released by foliage of Abies balsamea. J. Inv. Pathol. 19: 32, 1972.
121. STOKES, J.L. and LARKIN, J.M. - Comparative effect of temperature on the oxidative metabolism of whole and disrupted cells of a psychrophilic and a mesophilic species of Bacillus. Journal of Bacteriology 95(1): 95-98, 1968.
122. TANGNU, S.K. and GHOSE, T.K. - Continuous production of salicylic acid: effect of dilution rate, pH, substrate concentration and cell recycle. Process Biochem. 16(1): 22, 1980.

123. TEMPEST, D.W. - The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat. In: "Methods in Microbiology". II, p. 259-276. Academic Press, 1970.
124. UEDA, K. - Continuous Fermentation. In: "The Microbial Production of Amino-acids". p. 181-202. John Wiley & Sons, Inc., 1972.
125. VAN EMDEN, H.F.- Newers methods of control with biological principles. In: "Pest control and its Ecology," p. 26 . Edward Arnold Publ. Ltd., 1977.
126. WATSON, D.V. and BERRY, D.R. - Use of an exchange filtration technique to obtain synchronous sporulation in an extended batch fermentation. Biotechn. Bioeng. 21: 213, 1979.
127. WILSON, G. - Continuous culture of plant cells using the chemostat principle. Advances in Biochem. Eng. 16: 1-25 1980.
128. WORTHING, C.R. Editor - The pesticide manual: A world compendium. The British Crop Protection Council, 6th ed., p. 26, 1979.
129. YOUSTEN, A.A. and ROGOFF, M.H. - Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation. Journal of Bacteriology 100: 1229-36, 1969.

A P Ê N D I C E I

ANÁLISE DE GLICOSE PELO MÉTODO DE ANTRONA

— CONSIDERAÇÕES —

O teste colorimétrico de antrona, inicialmente utilizado por DREYWOOD (5) para determinação qualitativa de polissacarídeos, tem as vantagens de ser simples e sensível, além de não requerer a hidrólise prévia dos açúcares (3, 9).

Devido a tais vantagens, utiliza-se em nosso laboratório a determinação de açúcares pelo método de antrona, conforme sugerido por CHAYKIN (3). Esse método consiste na utilização de 2ml de amostra devidamente diluída, acrescidos de 8 ml do reagente antrona (0,2% de antrona em ácido sulfúrico concentrado). O tubo é levado a banho-maria por 10 minutos, após o que é resfriado em água fria e então efetuada a leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

Nesse método, os carboidratos são desidratados pelo ácido sulfúrico concentrado, a furfural e uma variedade de outros produtos de degradação, conforme apresentado na Fig. I.

As reações químicas com antrona (9,10-dihidro-9-oxan-traceno), são explicadas conforme Fig. II, em que a substância, furfural, reagindo ou com a forma enol (antranol) ou com a forma cetônica (antrona) condensa para dar o composto colorido.

Esse complexo formado, está sujeito à quantificação por colorimetria (1,2,3,4, 6, 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18.19, 20).

Como os vários carboidratos apresentam diferentes disposições quanto à formação do furfural, o campo de cores varia de um para outro carboidrato.

A primeira adaptação quantitativa foi realizada por

MORRIS (12), aplicada para determinação de monossídeoestreptomina; para glicose no sangue, foi usada por KOEHLER (9), e para glicogênio, por SIEFTER (18).

Entre outras aplicações, temos estudos de determinação de amilase no sangue e urina, descrito por KIBRICK (8) e dextrana por SCOTT (17). KOEHLER (9) fez uma comparação entre grande número de carboidratos para desenvolver padrões para aplicação do método de antrona em misturas naturais de polissacarídeos obtidos do microrganismo Serratia marcescens. SAMSEL (14) utiliza o método para determinação de metilcelulose, enquanto BLACK Jr. (2), determina carboximetilcelulose em misturas de detergentes; MORSE (13) utiliza o método para determinação de sacarose a baixas concentrações, Mc CREADY (11) determina amido e amilose em vegetais, e VILES Jr. (19) utiliza o método para determinação de celulose.

No estudo realizado por SCOTT (17), ele analisa os métodos utilizados pelos diversos autores quanto à faixa de erro em que incorrem. Os métodos usados por MORSE (13), MORRIS (12) SAMSEL (14) e VILES Jr. (19), são bons porém para uma faixa de erro de $\pm 5\%$. Já SIEFTER (18), Mc CREADY (11) e BLACK Jr. (2), trabalharam com maior precisão ($\pm 1\%$).

DUBOIS (6) comenta que o método de antrona não se aplica à separação de açúcares por cromatografia de partição, visto que o fenol presente interfere na reação de antrona, além do método não ser satisfatório para açúcares metilados e pentoses.

Em todos esses trabalhos são feitas análises quanto ao

efeito da temperatura e tempo de reação, comprimento de onda da leitura, estabilidade da cor, tempo de preparo do reagente antrona e sua estabilidade. Com pequenas variações, pode-se verificar que se estabelece, via de regra, a temperatura de 95°C para o banho-maria, por 10-12 minutos e a leitura é realizada a 620 nm. A temperatura do banho frio, para imersão dos tubos no início da reação, é de 15°C, sendo que tal prática é sugerida para evitar erros devidos à desigualdade de diâmetro dos tubos (17, 18). Deve-se evitar que a temperatura de reação se eleve (4, 11, 13, 19), pois a 135°C (17) produzirá uma variação na cor desenvolvida (18).

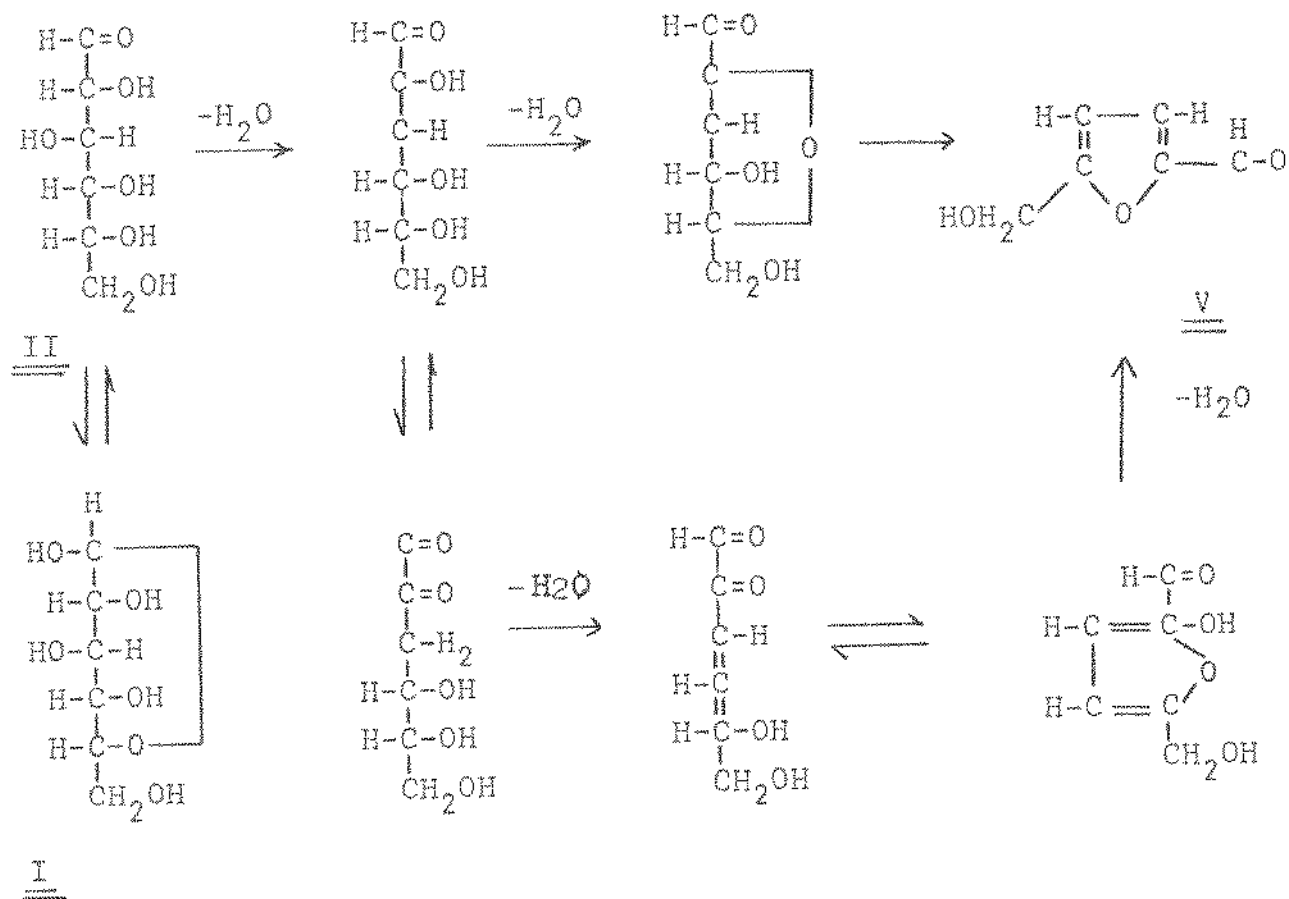
Quanto à estabilidade da cor desenvolvida, SCOTT (17) verificou que há uma variação de +1% da leitura por hora decorrida após resfriamento dos tubos depois do aquecimento. Ele comenta que variações devidas à quantidade de reagente utilizado, não trarão problemas na análise, visto que uma quantidade maior de reagente adicionada, tende a aumentar a absorção, efeito este equilibrado pelo fato desse aumento de reagente ocasionar uma maior diluição da amostra.

Quanto à estabilidade do reagente antrona, LOEWUS (10), sugere a preparação da antrona em etil acetato, visto que tal solução pode ser estocada por várias semanas em vidro ambar com tampa. SCOTT (17) cita que o reagente preparado normalmente, tem pouco tempo de estabilidade, porém a solução utilizada por LOEWUS (10) acrescenta um trabalho extra, que é a padronização dos frascos de reagente em estoque.

VILES Jr. (19) verificou que o reagente antrona pre

parado em intervalo de tempo menor que 2 horas, antes do uso, causa resultados inconsistentes e por isso sugere que se utilize a antrona com pelo menos 4 horas decorridas do momento do preparo. Ele sugere ainda o uso de um padrão, além do branco, para cada grupo de análises realizadas.

De todos os trabalhos, o de SCOTT (17) é o mais completo em relação a fontes de erro extra-método. Segundo ele, além da necessidade de padronização da temperatura de banho frio, tempo de preparo do reagente antrona, tempo e temperatura de aquecimento dos tubos, faixa de leitura ótima e leitura realizada antes de uma hora de reação, as maiores fontes de erro estariam nas impurezas tanto dos reagentes utilizados como do próprio carboidrato em análise. Isso pode ser facilmente verificado na Tabela I, que ele apresenta em seu trabalho.



I - Glicose

II - D-glicose

V - hidroximetilfurfural

Figura I. Reação da antrona segundo WOLFROM (20) e KARRER (7).

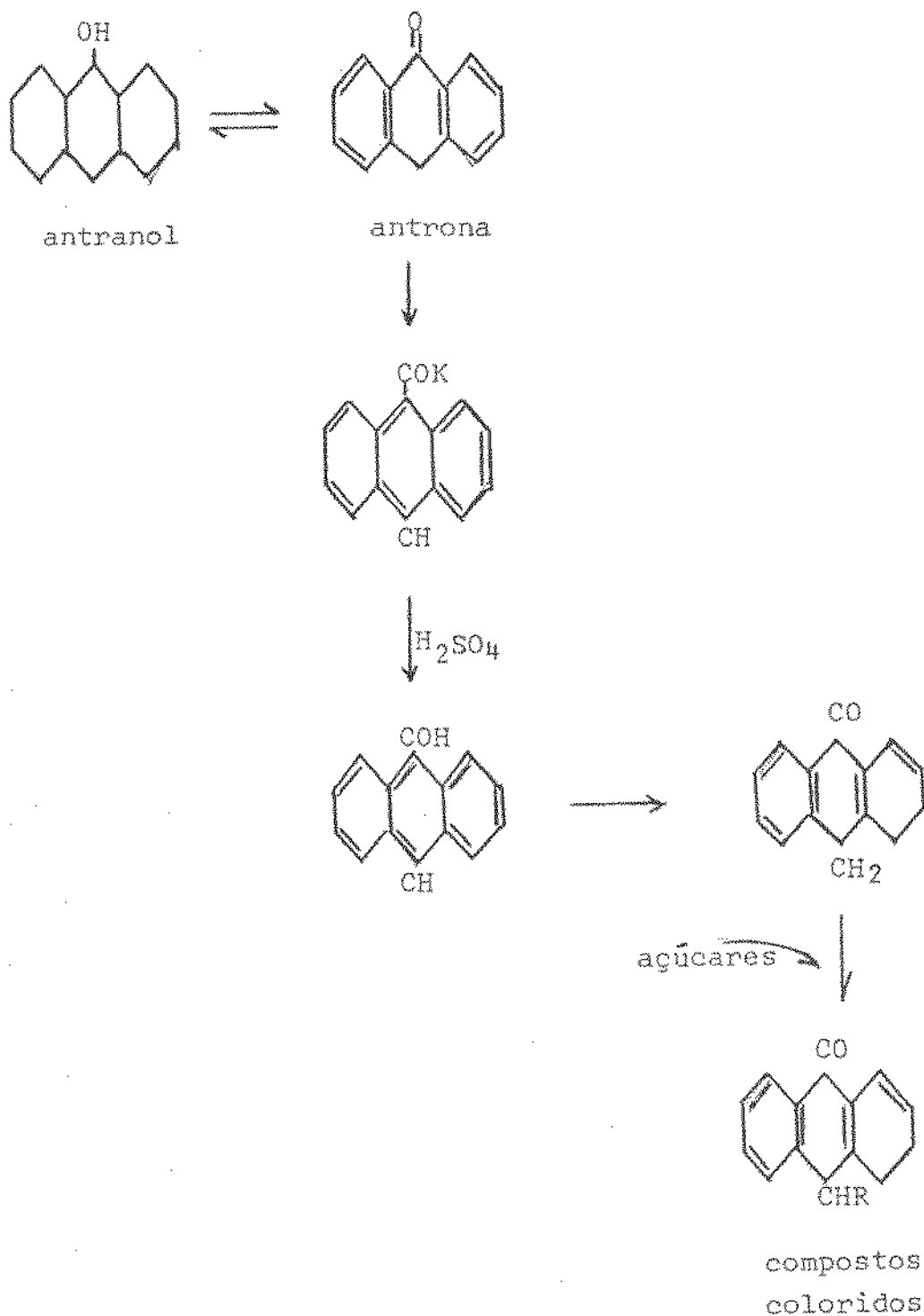


Figura II. Reação de antrona segundo KARRER (7).

Tabela I. Efeito de materiais estranhos na determinação de dextranas pelo método de antrona (SCOTT, 17).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (g/100ml)	ERRO %
	NUMA SOLUÇÃO DE DEXTRANA 3 mg/100 ml	
Ácido acético	1	-3,7
	0,3	-1,1
Acetona	2,5	-1,5
	1	<1 *
Benzaldeído	20% de saturação	+1,9
Benzeno	20% de saturação	-1,1
Ácido benzóico	80% de saturação	+3,4
	20% de saturação	<1 *
Butanol	0,08	-9,1
	0.008	-1,5
Etanol	3	+3,3
	1	<1 *
Formaldeído	0,0001	-3,5
	0,00005	<1 *
HCl	0,36	+13,3
Metanol	3	+1,5
	1	<1 *
Fenol	0,0006	-3
	0,0001	<1 *
Saliva	86 mg (na reação de mistura)	+10
NaCl	0,1	+9,5
	0,05	+6,0
	0,01	+1,2
	0,005	<1 *
Na ₂ SO ₄	0,32	<1 *
Tolueno	20% de saturação	-8,0
	10% de saturação	-2,2
	5% de saturação	-1,2
	2% de saturação	<1 *

(*) - <1 indica que não afeta a leitura, praticamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES AO APÊNDICE I

1. ASHWELL, G. - Colorimetric analysis of sugar. In: "Methods in Enzymology". Vol. III. Acad. Press Inc. Publ. pg. 73. 1957.
2. BLACK Jr., H.C. - Determination of sodium carboxymethyl - cellulose in detergent mixtures. By the anthrone method. Anal. Chem. 23: 1792, 1951.
3. CHAYKIN, S. - "Biochemistry Laboratory Techniques" - John Wiley & Sons Inc. p. 88, 1966.
4. DIMLER, R.J.; SCHAEFFER, W.C.; WISE, C.S. and RIST, C.E. - Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharids. Anal. Chem. 24: 1411, 1952.
5. DREYWOOD, R. - Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chem. Analytical Edition 18: 499, 1946.
6. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 (3): 350, 1956.
7. KARRER, P. In: "Organic Chemistry" Els. Comp. Inc. 2nd ed. pg 317, 1946.
8. KIBRICK, A.C.; ROGERS, H.E. and SKUPP, S. - The saccharific determination of amylase in blood plasma and urine. J. Biol. Chem. 190: 107, 1951.
9. KOEHLER, L.H. - Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. Anal. Chem. 24: 1976, 1952.
10. LOEWUS, F.A. - Improvement in anthrone method for determi

nation of carbohydrates. Anal. Chem. 24: 219, 1952.

11. Mc CREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. and OWENS, H.S.
Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem. 22: 1156, 1950.
12. MORRIS, D.L. - Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 107: 254, 1948
13. MORSE, E.E. - Anthrone in estimating low concentration of sucrose. Anal. Chem. 19: 1012, 1947.
14. SAMSEL, E.P. and De LAP, R.A.- Colorimetric determination of methylcellulose with anthrone. Anal. Chem. 23: 1795, 1951.
15. SATTLER, L. - The Dreywood anthrone reaction as affected by carbohydrate structure. Science 108: 207, 1948.
16. _____ and ZERBAN, F.W. - Limitations of anthrone test for carbohydrates. J. Am. Chem. Soc. 72: 3814, 1950.
17. SCOTT, T.A. and MELVIN, E.H. - Determination of dextran with anthrone. Anal. Chem. 25: 1656, 1953.
18. SIEFTER, S.; DAYTON, S.; NOVIC, B. and MUNTWYLER, E. - The estimation of glicogen with the anthrone reagent. Arch. Biochem. Bioph. 25: 191, 1950.
19. VILES, Jr.; and SILVERMAN, L. - Determination of starch and cellulose with anthrone. Anal. Chem. 21: 950, 1949.
20. WOLFROM, M.L.; SCHUETZ, R.D. and CAVALIERI, L.F. - Chemical interactions of amino compounds and sugars. III - The conversion of D-glucose to 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. Journal of Am. Chem. Soc. 70: 514, 1948.

8. AGRADECIMENTOS

À professora Iracema de Oliveira Moraes pela dedicação e orientação eficiente.

Aos técnicos Antonio José Quirino Simões, Maria Isabel Rodrigues e Fátima Aparecida de Almeida Costa pela colaboração nas análises de laboratório.

Ao Wilson Sami Cury pelos desenhos realizados.

Aos funcionários e colegas que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.