

ESTUDO DA CINÉTICA DE DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DE ABACAXI  
E UTILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL PARA  
PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA

**RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO - 2013

ESTUDO DA CINÉTICA DE DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DE ABACAXI  
E UTILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL PARA  
PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA

**RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES**

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

Orientador: Prof. Pedro Amorim Berbert

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO - 2013

ESTUDO DA CINÉTICA DE DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DE ABACAXI  
E UTILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL PARA  
PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA

**RAPHAEL CARDOSO RODRIGUES**

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

Aprovada em 27 de Agosto de 2013

Comissão examinadora:

---

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

---

Professor Fabrício Siqueira Boniolo DSc. Biociências e Biotecnologia. PURAC SYNTHESIS

---

Professora Marília Amorim Berbert de Molina (Co-orientador) DSc., Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. UENF

---

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

À minha esposa Natalia, ao meu pai Paulo (*in memoriam*); à minha mãe Helena e aos meus irmãos Paula, Guilherme e Matheus.

## **Agradecimentos**

Agradeço a UENF, pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho, a FAPERJ e FINEP, pelo suporte financeiro;

Agradeço ao Professor Pedro Amorim Berbert e à Professora Marília Amorim Berbert de Molina pela grande oportunidade, por todos os ensinamentos, conselhos e sempre eficiente orientação no desenvolvimento deste trabalho de Tese. Agradeço também pela amizade. Vocês são especiais;

Ao Professor Arnaldo Marcio Ramalho Prata e ao Dr. Fabrizio Siqueira Boniolo por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Agradeço ao Professor José Tarcício Lima Thiebaut pela ajuda nas análises estatísticas da tese;

Agradeço a Deus por me ajudar a completar mais essa etapa da minha vida;

Ao meu pai Paulo (*in memoriam*), à minha mãe Helena, à minha irmã Paulinha, aos meus irmãos Guilherme e Matheus, por acreditarem em mim, pelos ensinamentos e por todo amor. Obrigado mesmo! Mesmo distante, vocês estarão sempre no meu coração e sem a força de vocês eu não teria conseguido;

À minha esposa Natalia, por tudo que você tem feito por mim. Você me deu força, me fez crescer e me ajudou sempre quando eu mais precisava e estava sempre pronta para me escutar. Sempre do meu lado, em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins. Te amo!

Aos meus amigos Rozana, Scheila, Marcia e Franciele, agradeço pela ajuda, sempre disponíveis nas horas em que precisei. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês;

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

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

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	xi
<b>ABSTRACT.....</b>	xiv
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xvii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xxii
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES.....</b>	xxv
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	5
2.1 - Desidratação Osmótica de Alimentos.....	6
2.1.1 – Aspectos Gerais e Vantagens do Processo.....	6
2.1.2 – Fatores que afetam o processo.....	9
2.1.3 – Aproveitamento do xarope osmótico residual.....	17
2.2 - O fruto do abacaxizeiro.....	19
2.3 - <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
2.3.1 - Aspectos gerais e atividade entomopatogênica.....	20
2.3.2 – Aspectos fisiológicos.....	23
2.3.3 - Uso como bioinseticida.....	24
2.3.4 - Processo fermentativo com a bactéria – meios de cultivo.....	26
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	33
3.1 – Desidratação Osmótica.....	33

3.1.1 – Obtenção dos frutos.....	33
3.1.2 – Desidratação Osmótica.....	35
3.1.3 – Métodos analíticos.....	38
3.1.3.1 – Perda de água, ganho de sólidos e redução de massa.....	38
3.1.6.2 – Análises estatísticas.....	38
3.2 – Ensaio de Fermentação.....	39
3.2.1 – Microrganismo.....	39
3.2.2 - Meios de Cultivo.....	39
3.2.3 - Condições de Cultivo.....	41
3.2.3.1 - Preparo da cultura estoque.....	41
3.2.3.2 - Preparo de inóculo.....	41
3.2.3.3 - Ensaio de fermentação.....	41
3.2.4 - Métodos analíticos.....	44
3.2.4.1 - Coleta de amostras.....	44
3.2.4.2 - Morfologia celular.....	44
3.2.4.3 - Concentração celular.....	45
3.2.4.4 - Contagem de células e esporos.....	46
3.2.4.5 - Concentração de açúcares.....	46
3.2.4.6 – Bioensaios.....	46
3.2.4.7 – Obtenção da suspensão de esporos-cristais para bioensaios	47
3.2.4.8 – Cálculos de parâmetros fermentativos.....	48
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1 - Desidratação Osmótica.....	49
4.1.1 - Caracterização do Abacaxi ( <i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill) in natura.....	49
4.1.2 - Cinética da desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose e maltodextrina.....	50
4.1.2.1 - Sacarose.....	50
4.1.2.1.1 – Perda de água.....	53

4.1.2.1.2 – Ganho de sólido.....	57
4.1.2.1.3 – Redução de massa.....	60
4.1.2.2 - Maltodextrina.....	62
4.1.2.2.1 – Perda de água.....	64
4.1.2.2.2 – Ganho de sólidos.....	65
4.1.2.2.3 – Redução de massa.....	67
4.1.2.3 – Comparação dos perfis cinéticos com sacarose e maltodextrina.....	68
4.1.3 - Cinética da desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo (FOS).....	74
4.1.3.1 - Sacarose.....	74
4.1.3.1.1 – Perda de água.....	76
4.1.3.1.2 – Ganho de sólidos.....	79
4.1.3.1.3 – Redução de massa.....	81
4.1.3.2 - Sorbitol.....	83
4.1.3.2.1 – Perda de água.....	85
4.1.3.2.2 – Ganho de sólidos.....	87
4.1.3.2.3 – Redução de massa.....	88
4.1.3.3 - Frutooligossacarídeo.....	89
4.1.3.3.1 - Perda de água.....	90
4.1.3.3.2 - Ganho de sólidos.....	93
4.1.3.3.3 - Redução de massa.....	94
4.1.3.4 – Comparação da cinética de desidratação em sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo.....	95
4.1.3.4.1 - Perda de água.....	95
4.1.3.4.2 - Ganho de Sólidos.....	100
4.1.3.4.3 - Redução de Massa.....	103
4.2 – Processo Fermentativo.....	108
4.2.1 - Meios formulados com resíduos obtidos da desidratação	108

osmótica de abacaxi com diferentes solutos.....	
4.2.2 – Meios formulados com concentrações crescentes de solução osmótica residual de maltodextrina.....	118
4.2.3 – Influência da suplementação de nitrogênio orgânico e de oxigênio no crescimento celular e na atividade tóxica.....	129
<b>5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>130</b>
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>

## RESUMO

RODRIGUES, Raphael Cardoso; DSc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2013. Estudo da cinética de desidratação osmótica de abacaxi e utilização da solução residual para produção de bioinseticida. Professor Orientador: Pedro Amorim Berbert. Coorientadora: Professora Marília Amorim Berbert de Molina.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Agrícola do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, em conjunto com o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. Foram objetivos do trabalho: (1) avaliar a cinética de desidratação osmótica de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) utilizando sacarose, maltodextrina, sorbitol e frutooligossacarídeos em diferentes concentrações e níveis de temperatura; (2) avaliar a aplicabilidade do xarope residual da desidratação para produção de bioinseticida com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) destinado ao controle de *Aedes aegypti*. A desidratação foi realizada em agitadora-incubadora, a  $60 \text{ min}^{-1}$ , por 4 h, empregando-se relação fruta:xarope de 1:10 (p/p). Foram avaliados os solutos maltodextrina (MAL), nas concentrações 20, 30 e 40 °Brix, sacarose (SAC), nestas concentrações e a 50 e 70 °Brix, sorbitol (SOB) e frutooligossacarídeo (FOS) a 30, 50 e 70 °Brix, em três níveis de temperatura (30, 40 e 50 °C). Em todos os casos, foi

determinada a cinética de perda de água ( $\omega$ ), de ganho de sólidos ( $\delta$ ) e de redução de massa ( $\mu$ ) nas amostras de abacaxi. Nos ensaios de fermentação foi utilizado biorreator New Brunswick (BioFlo/CelliGen 115) de 2 L, operado em sistema descontínuo, com controle da temperatura (30 °C), agitação (600 min<sup>-1</sup>) e aeração (1 vvm). O volume de meio foi de 1,5 L, o pH inicial foi corrigido para 7,0 e mantido acima de 5,5 com NaOH 3M. Meio GYS foi utilizado como referência para a composição dos demais meios. Inicialmente, os diferentes xaropes foram diluídos para concentração inicial de açúcar ( $S_0$ ) de 30 g/L, gerando os meios MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>. Em uma segunda etapa foram avaliados meios formulados com solução de maltodextrina diluída para valores de  $S_0$  de 30, 50, 75 e 100 g/L (meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>). Foram ainda avaliados os meios MAL<sub>50</sub>2N (MAL<sub>50</sub> contendo o dobro de nitrogênio), sem controle de oxigênio, ou com controle de oxigênio em 50% da saturação (MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>)). Os resultados obtidos mostraram que, na faixa de concentração estudada, maltodextrina foi mais eficiente que sacarose para a desidratação osmótica de abacaxi, uma vez que levou ao menor valor da relação  $\delta/\omega$  (0,6), que representa menor ganho de sólido e maior perda de água pelas amostras. Comparando-se o uso de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo, as melhores condições para desidratação foram solução a 30 °Brix, temperatura de 30 ou 50 °C, nas quais foram encontrados, respectivamente, valores de  $\delta/\omega$  de 0,22 e 0,21 (SAC), 0,28 e 0,28 (SOB) e 0,27 e 0,29 (FOS). Os dados obtidos nos ensaios de fermentação mostraram que o crescimento foi amplamente favorecido no meio (MAL<sub>30</sub>), que também levou a maiores concentrações de esporos e à atividade tóxica (LC<sub>50</sub>=2,19 mg/L) similar à do meio controle (LC<sub>50</sub>=2,52 mg/L). No meio SOB<sub>30</sub>, ao contrário, o crescimento e a esporulação foram reprimidos e a atividade tóxica foi 80 vezes menor que no controle. Nos meios com concentrações crescentes de maltodextrina foram obtidas concentrações celulares semelhantes, em tempos distintos, mas não houve consumo total de substrato em nenhum deles. Concentrações de 75 e 100 g/L afetaram negativamente a produtividade em células, a esporulação e a atividade tóxica (LC<sub>50</sub>=85,33 e 87,33 mg/L, respectivamente). O meio MAL<sub>50</sub>, ao contrário, apresentou desempenho compatível ao de MAL<sub>30</sub> em

relação ao crescimento celular, mas embora tenha levado à maior produção de esporos, apresentou menor atividade larvicida ( $LC_{50}=14,6$  mg/L). A suplementação deste meio com nitrogênio ( $MAL_{50}2N$ ) permitiu o consumo quase total do substrato, favorecendo significativamente o crescimento. O tempo de processo foi, no entanto, ampliado, afetando negativamente a produtividade em células. A esporulação também foi favorecida, mas a atividade tóxica foi significativamente inferior ( $LC_{50}=69,62$  mg/L) àquela obtida em  $MAL_{50}$ . No entanto, quando fermentado sob condições de maior disponibilidade de oxigênio (meio  $MAL_{50}2N(O_2)$ ), o tempo de processo foi reduzido em 5 horas, com aumento de 45% na produtividade em células. Estas condições também permitiram uma melhora expressiva da atividade tóxica, embora esta ainda tenha sido menor que a obtida no meio  $MAL_{50}$ . Concluiu-se que a solução osmótica residual de maltodextrina tem grande potencial para composição do meio de cultivo de Bti, sendo indicada a diluição para concentrações iniciais de 30 g/L.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Raphael Cardoso, DSc; *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*. August, 2013. Study of kinetic of osmotic dehydration pineapple and use of residual solution for bioinsecticide production. Professor Advisor: Pedro Amorim Berbert. Co-Advisor: Professor Marília Amorim Berbert Molina.

This work was carried out at the Agricultural Engineering Laboratory, Animal and Agricultural Sciences and Technologies Centre, and at Laboratory of Biotechnology, Biosciences and Biotechnology Centre, *Universidade Estadual do Norte Fluminense*, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, with the following objectives: (1) to assess the osmotic dehydration of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) using sucrose, maltodextrin, sorbitol and fructooligosaccharides in different concentrations and temperature levels; (2) evaluate the applicability of the residual syrup of dehydration process to produce *Bacillus thuringiensis israelensis* based on bioinsecticides for the control of *Aedes aegypti*. Osmotic dehydration was performed in incubator shakers operating at  $60 \text{ min}^{-1}$ , employing a fruit to syrup ratio of 1:10, and immersion time of 4 h. There were assessed maltodextrina (MAL) solutes at concentrations of 20, 30 and 40 °Brix, and sucrose (SAC), sorbitol (SOB) and fructooligosaccharides (FOS) at 30, 50 and 70 °Brix at three temperature levels (30, 40, and 50 °C). In all cases, it was followed the kinetics of water loss ( $\omega$ ), solid gain ( $\delta$ ) and reduced mass ( $\mu$ ). The

fermentation assays were performed in New Brunswick (Bioflo/CelliGen 115) bioreactor with 2 L, operated in batch mode, with automatic control of temperature (30 °C), agitation (600 min<sup>-1</sup>) and aeration (1 vvm). The volume medium was 1.5 L. Initial pH was adjusted to 7.0 and maintained above 5.5 with 3M NaOH. GYS medium was used as a reference. Initially, the different syrups were diluted to initial sugar concentrations of 30 g/L, obtaining the media MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>. In a second stage it was evaluate media formulated with maltodextrin solution diluted to S<sub>0</sub> values of 30, 50, 75 and 100 g/L (MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> and MAL<sub>100</sub>). I was also assessed the medium MAL<sub>50</sub>2N (MAL<sub>50</sub> containing a double nitrogen concentration) without oxygen control, or with control of dissolved oxygen in 50% (MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>)). Considering the range of solute concentration tested, the results showed that maltodextrin was more efficient than sucrose for osmotic dehydration of pineapple, since they led to the lower  $\delta/\omega$  ratio (0.6), meaning lower solid gain and increased water loss of samples. Comparing the use of sucrose, sorbitol and fructooligosaccharide, the best conditions for dehydration were solution at 30 °Brix, temperature of 30 or 50 °C, in which it was found,  $\delta/\omega$  ratio of 0,22 and 0,21 (SAC), 0,28 and 0,28 (SOB) and 0,27 and 0,29 (FOS), respectively. Fermentation assays showed that the bacterial growth was greatly enhanced with MAL<sub>30</sub> medium, which also led to higher spores concentrations and higher toxic activity (LC<sub>50</sub>=2.19 mg/L), which is similar to that obtained with control medium (LC<sub>50</sub>=2.52 mg/L). On the other hand, the growth and sporulation were suppressed in SOB<sub>30</sub> medium, leading to toxic activity 80 times lower than in the control. In media with increasing maltodextrin concentrations, similar cell concentrations were reached at different times but the substrate was not completely consumed. Concentrations of 75 and 100 g/ affect negatively the cell productivity, sporulation and toxic activity (LC<sub>50</sub>=85.33 and 87.33 mg/L, respectively). Taking into account the cell growth, the performance of MAL<sub>50</sub> medium was similar to that of MAL<sub>30</sub>, but although it has led to spores increased production, the larvicidal activity was lower (LC<sub>50</sub>=14.6 mg/L). The enrichment of this medium with nitrogen (MAL502N) allowed almost complete consumption of the substrate, favoring significantly the cell growth. The process time was, however,

extended, which affected negatively the cell productivity. Sporulation was also enhanced, but the toxic activity was significantly lower ( $LC_{50}=69.62$  mg/L) than that obtained with MAL<sub>50</sub> medium. However, when the fermentation was carried out under increased oxygen availability (MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>)), the process time was reduced by 5 hours and cell productivity was enhanced (45%). These conditions also led to a significant improvement of toxic activity, although this was still lower than that obtained in MAL<sub>50</sub>. It was concluded that the residual maltodextrin osmotic solution has great potential for the composition of *Bti* culture medium, and must be diluted to initial concentration of 30 g/L.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fenômenos de transporte de massa durante o processo osmótico (Fonte: Lenart, 1996). 7
- Figura 2 - Ultraestrutura da (A) célula esporulada de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e (B) do esporo purificado. Sp: Esporo; E: Exoesporo; e PB: Corpo paraesporal (Fonte: Federici et al., 2003). 21
- Figura 3 - Seleção dos frutos utilizados nos experimentos de desidratação osmótica: (a) Frutos de Abacaxi colhidos em campo; (b) Seleção dos frutos de acordo com as suas características; (c) Armazenamento dos frutos em BOD. 34
- Figura 4 - Frutos de abacaxi cortados em formato de arco de coroa circular. 35
- Figura 5 - Fermentador de bancada New Brunswick modelo BioFlo/CelliGen 115. 42
- Figura 6 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 55
- Figura 7 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 58
- Figura 8 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 60
- Figura 9 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 65

- Figura 10 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 66
- Figura 11 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 68
- Figura 12 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (x), 30 °Brix (\*) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C). 69
- Figura 13 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (x), 30 °Brix (\*) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C). 70
- Figura 14 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (x), 30 °Brix (\*) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C). 71
- Figura 15 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 77
- Figura 16 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 80
- Figura 17 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 82
- Figura 18 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 85
- Figura 19 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 87

- Figura 20 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 89
- Figura 21 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeos a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲). 92
- Figura 22 - Ganho de Sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeo a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 93
- Figura 23 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeo a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 40 °Brix (▲). 95
- Figura 24 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 96
- Figura 25 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 97
- Figura 26 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 98
- Figura 27 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 101
- Figura 28 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 102
- Figura 29 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 103
- Figura 30 - Redução de Massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 104

- Figura 31 - Redução de Massa, Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 105
- Figura 32 - Redução de Massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●). 105
- Figura 33 – Concentração celular em função do tempo na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada. 110
- Figura 34 – Velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), em função do tempo, na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada. 111
- Figura 35 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada. 113
- Figura 36 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (■), FOS<sub>30</sub> (■) e SOB<sub>30</sub> (■). EL - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais. 116
- Figura 37 – Concentração de células (■) e de Maltodextrina (□), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (A), MAL<sub>50</sub> (B), MAL<sub>75</sub> (C) e MAL<sub>100</sub> (D) em biorreator de bancada. 121
- Figura 38 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada. 122
- Figura 39 – Velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada. 123
- Figura 40 – Máximas velocidades específicas de crescimento, em função da concentração de maltodextrina, Meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub> em biorreator de bancada. 124
- Figura 41 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada. 125

- Figura 42 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>75</sub> (■) e MAL<sub>100</sub> (■). EL - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais. 127
- Figura 43 – Concentração de células (■) e de Maltodextrina (□), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (A), MAL<sub>50</sub>2N(B) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (C) em biorreator de bancada. 132
- Figura 44 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (▲) em biorreator de bancada. 133
- Figura 45 – Velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (▲) em biorreator de bancada. 134
- Figura 46 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) em biorreator de bancada. 135
- Figura 47 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (■) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (■). EL - Esporos livres; CV - Células vegetativas; CE - Células esporuladas; ET - Esporos totais; CT - Células totais. 136
- Figura 48 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação do meio MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) em biorreator de bancada. 138

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Tratamentos utilizados para desidratação osmótica de abacaxi com sacarose e maltodextrina (Ensaio DO1).	36
Tabela 2: Tratamentos utilizados para desidratação osmótica de abacaxi com sacarose e sorbitol (Ensaio DO2) e sacarose e frutooligossacarídeo (Ensaio DO3).	37
Tabela 3: Composição do meio de cultivo Ágar Nutriente.	39
Tabela 4: Composição do meio de cultivo GYS modificado.	40
Tabela 5: Meios de cultivos utilizados nos diferentes ensaios de fermentação.	43
Tabela 6: Propriedades dos frutos de abacaxi ( <i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill) utilizados nos experimentos de desidratação osmótica.	50
Tabela 7: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sacarose a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	51
Tabela 8: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	53
Tabela 9: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em solução em soluções de maltodextrina a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	62

Tabela 10: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de maltodextrina a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	63
Tabela 11: Perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ), redução de massa ( $\mu$ ) e relação $\delta/\omega$ após 4h de desidratação osmótica de pedaços de abacaxi em solução de sacarose e de maltodextrina.	73
Tabela 12: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sacarose a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	75
Tabela 13: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	76
Tabela 14: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sorbitol a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	83
Tabela 15: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sorbitol a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	84
Tabela 16: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de frutooligossacarídeos a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	90
Tabela 17: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeos a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.	90
Tabela 18: Perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ), redução de massa ( $\mu$ ) e relação $\delta/\omega$ após 4h de desidratação osmótica de pedaços de abacaxi em solução de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo (FOS).	107
Tabela 19: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> nos meios GYS <sub>30</sub> , MAL <sub>30</sub> , FOS <sub>30</sub> e SOB <sub>30</sub> .	109
Tabela 20: Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> meios MAL <sub>30</sub> , MAL <sub>50</sub> , MAL <sub>75</sub> e MAL <sub>100</sub> .	119

Tabela 21: Resultados gerais obtidos no cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>50</sub>2N e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>).

130

## LISTA DE ABREVIações

$\omega$	Perda de água
$\delta$	Ganho de sólidos
$\mu$	Redução de massa
CV (%)	Coeficiente de variação
CONC	Concentração
TEMP	Temperatura
TP	Tempo
R <sup>2</sup>	Coeficientes de determinação
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
DII	Desidratação por Imersão e Impregnação
ES	Esporos livres
CV	Células Vegetativas
CE	Células Esporuladas

ET	Esporos Totais
CT	Células Totais
$T_{SP}$	Taxa de Esporulação (%)
$t_f$	Tempo Final de Fermentação
$t_{gr}$	Tempo de formação de grumos
$X_0$	Concentração inicial de células (g/L)
$X_m$	Máxima concentração celular (g/L)
$\Delta X$	Diferença entre a concentração celular em $t_{x,m}$ e no início do cultivo (g/L)
$t_{x,m}$	Tempo necessário para obtenção da máxima concentração celular (h)
$S_0$	Concentração inicial de Substrato (g/L)
$S_{x,m}$	Concentração de substrato em $t_{x,m}$ (g/L)
$\Delta S_{x,m}$	Substrato consumido até $t_{x,m}$ (g/L)
$\Delta S_f$	Substrato consumido até o final do cultivo (g/L)
$\Delta S_f$ (%)	Substrato consumido até o final do cultivo (%)
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em células (g/g), calculado em $t_{x,m}$
$p_x$	Produtividade em células, calculada em $t_{x,m}$ (g/L.h)
$\mu_m$	Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário mundial no setor de fruticultura, com uma produção anual de 40 milhões de toneladas de frutas. O País ocupa a terceira posição entre os principais produtores, a China e a Índia, que produzem 154 e 54 milhões de toneladas/ano, respectivamente. As frutas mais produzidas no Brasil são uva, manga, banana, abacaxi e mamão (IBGE, 2008). O consumo ainda é menor que em muitos países, mas vem crescendo nos últimos anos, registrando-se, também, um aumento no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) nos principais polos de fruticultura do País (Gomes et al., 2007).

Por se tratar de um produto altamente perecível, uma parcela significativa da produção de frutas é perdida no Brasil, principalmente devido ao clima quente do país, à falta de técnicas de processamento mais eficazes para prolongar o tempo de preservação e conservação, ao manuseio inadequado na colheita e na pós-colheita e ao despreparo dos profissionais do ramo da agroindústria (Dias, 2003). A busca por novas técnicas de preservação que mantenham o máximo dos componentes nutricionais e das propriedades sensoriais de alimentos é considerada uma forma de viabilizar o seu aproveitamento racional. Uma das alternativas para reduzir as perdas pós-colheitas seria a industrialização, principalmente no pico da safra, quando os alimentos alcançam menores preços pelo excesso de oferta (Andrade et al., 2003). Hoje, a demanda por produtos naturais, saudáveis e saborosos que sejam a base de frutas tem crescido cada vez mais. O uso de técnicas que preservem as características sensoriais e a estrutura física dos alimentos é uma das alternativas que tem tido grande atenção no mercado (Lima et al., 2004).

A técnica de desidratação osmótica, que possibilita a obtenção de produtos levemente transformados vem sendo indicada como uma potencial alternativa tecnológica para o processamento de frutas (Sousa et al., 2003a, 2003b; Azeredo e Jardine, 2004; Souza-Neto et al., 2004; Andrade et al., 2003; Mota, 2005; Dionello et al., 2007; Queiroz et al., 2007; Queiroz et al., 2008). O processo consiste na imersão de frações do alimento em uma solução hipertônica, de sal ou açúcares, que permite a remoção parcial de água e a incorporação limitada de solutos em função da diferença de pressão osmótica (Lazarides et al., 1994). É, mais precisamente, uma etapa de pré-tratamento, uma vez que é seguida por processos complementares como secagem com ar quente ou congelamento (Torreggiani, 1993).

A desidratação osmótica favorece a obtenção de produtos com qualidade sensorial e nutricional superior à de produtos desidratados unicamente por secagem convectiva, uma vez que as mudanças físicas, químicas e biológicas provocadas pelas altas temperaturas empregadas nos secadores ocorrerão em menor intensidade (Torreggiani, 1993; Raoult-Wack, 1994; Lenart, 1996; Sereno et al., 2001; Chenlo et al., 2002). Possibilita, além disso, a obtenção de produtos diferenciados, devido à possibilidade de emprego de ingredientes ou aditivos com propriedades antioxidantes, conservantes ou de interesse nutricional e sensorial (Torreggiani e Bertolo, 2001; Chenlo et al., 2002; Khoyi e Hesari, 2007). Outras grandes vantagens do processo são a inibição do escurecimento enzimático, a retenção da cor natural do alimento sem a necessidade de adição de sulfitos e a alta retenção de compostos voláteis (Falade et al., 2007).

Apesar de vantajosa sob diversos aspectos, a grande limitação da desidratação osmótica é a geração de grande volume de xarope após o término do processo. Embora possa ser reciclada algumas vezes, a solução hipertônica é considerada, na maioria das vezes, um resíduo industrial, representando um dos maiores entraves para a maior aplicação do processo em escala comercial (Gomes et al., 2007). O descarte da solução residual, que contém altas concentrações do soluto, exerceria um impacto ambiental negativo, além de inviabilizar economicamente o processo.

Algumas alternativas têm sido citadas para o aproveitamento do xarope residual da desidratação osmótica visando a estabelecer uma tecnologia que não gere resíduos e sim co-produtos. Dentre estas se inclui seu emprego em processos fermentativos para produção de vinagres e bebidas alcoólicas (Gomes et al., 2007). Por ser rico em carboidratos e outros nutrientes lixiviados do vegetal durante a desidratação, o xarope residual constitui uma matéria-prima com grande potencial para a obtenção de outros produtos biotecnológicos. Uma das eventuais opções seria a produção de inseticidas biológicos com a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), usados com sucesso em várias partes do mundo para controle de mosquitos de interesse para a Saúde Pública. A bactéria produz toxinas com efeito letal sobre larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, *Anopheles sp*, transmissor da malária e espécies de simúlideos responsáveis pela oncocercose (Lacey et al., 2001; Petry et al., 2004; Rydzanicz et al., 2010; Iburg et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre 50 milhões e 100 milhões de pessoas contraem doenças como dengue e malária anualmente, sendo este um dos principais problemas de saúde pública no mundo (WHO, 1999). Até junho de 2010, foram notificados 830 mil casos de dengue no Brasil, um recorde na história do país (Coelho, 2010).

Diversas variáveis influenciam o processo fermentativo de produção de bioinseticidas à base *Bti*, mas a composição do meio de cultivo é um dos fatores que mais afeta o crescimento microbiano e a síntese de toxinas (Maldonado-Blanco et al., 2003). Os meios devem conter em sua composição uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de  $\delta$ -endotoxinas (Maldonado-Blanco et al., 2003). Como o custo do processo é ainda considerado elevado, o emprego de resíduos agroindustriais para a formulação do meio de cultivo tem sido uma das alternativas mais indicadas para viabilizar economicamente a produção (Vimala Devi et al., 2005). Diversas matérias-primas naturais, subprodutos e resíduos agroindustriais têm sido avaliados como fonte de nutrientes para a fermentação com a bactéria (Yang e Wang, 1998; Poopathi et al., 2002; Pessanha, 2005, 2008; Ramada, 2008). Resultados obtidos anteriormente (Rodrigues et al.,

2009a, 2009b) demonstraram que o xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi com açúcar invertido pode se tornar um potencial candidato para o cultivo da bactéria, tendo sido obtidas elevadas atividades tóxicas contra *Aedes aegypti* em condições ainda não otimizadas.

No contexto apresentado, o presente trabalho visa atender a dois objetivos gerais. Primeiramente, será estudado o processo de desidratação osmótica de abacaxi com solutos pouco convencionais, como sorbitol, maltodextrina e frutooligossacarídeos. Na sequência, o potencial do xarope gerado no processo de desidratação com um dos solutos testados será avaliado como base para a formulação de meios de cultivo para a produção de bioinseticida com *Bti*. Como base para a escolha, será levado em conta a composição da solução osmótica e a capacidade da bactéria de assimilar a fonte de carbono empregada na desidratação. A composição em minerais essenciais ao crescimento da bactéria, à esporulação e à síntese de toxinas também será um fator determinante na seleção do xarope a ser empregado. Visto que o xarope apresenta as vantagens de constituir uma fonte de carbono assimilável pela bactéria e possuir minerais como ferro, cálcio, cobre e potássio (Peiró et al., 2006), os quais são importantes para o metabolismo da bactéria (Yao, 2002a, 2002b e 2003 e Anderson e Jayaraman, 2003). Os resultados obtidos em trabalho anterior (Rodrigues et al., 2008) servirão de referência para o aprofundamento do estudo do processo fermentativo.

Considera-se que, além de representar uma opção para a produção de um bioinseticida economicamente viável, o aproveitamento da solução osmótica residual na produção de bioinseticida com *Bti* pode vir a se tornar uma alternativa à viabilização da própria tecnologia de desidratação osmótica. Neste sentido, justifica-se também a obtenção de dados que possam auxiliar no maior conhecimento sobre essa tecnologia de desidratação de frutas.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A alta perecibilidade dos alimentos, associada às dificuldades de armazenamento nos meses de safra, contribui para uma grande perda da produção nacional, gerando a necessidade do desenvolvimento de processos de conservação e preservação (Neves Filho, 1994; Gomes, et al., 2007). O controle da atividade de água do alimento, de fatores do ambiente como a temperatura e o pH, bem como a inativação térmica de micro-organismos e de fontes de deterioração bioquímica, são alguns dos princípios básicos da conservação de alimentos (Azeredo, 2004). Algumas técnicas baseadas nestes princípios, como o uso de calor, resfriamento, desidratação e secagem, aditivos químicos, defumação, fermentação e irradiação, já são utilizadas para a preservação de alimentos (Gomes et al., 2007).

Um dos métodos mais antigos para a conservação dos alimentos é a redução do conteúdo de umidade, visto que a água é um componente essencial para a proliferação de micro-organismos que levam à deterioração (Greensmith, 1998). Esta técnica é utilizada desde tempos imemoriais por povos mediterrâneos, asiáticos e ameríndios, que, por meio de secagem solar, preservavam leite, carnes, peixes, frutas e hortaliças. Outras técnicas, tais como a desidratação osmótica de peixes com sal, fermentação, congelamento (nas regiões frias) e redução de atividade de água pela adição de sal ou mel também eram de conhecimento destes povos (Hulse, 2004).

Nos últimos anos, a desidratação de alimentos vem sendo tema de inúmeros trabalhos de pesquisa, com foco em métodos que sejam de baixo custo e conservem, ao máximo, as características sensoriais e nutritivas do produto (Cohen

e Yang, 1995; Mota, 2005; Farkas, 2007; Sagar e Kumar, 2010). A remoção, parcial ou total, de água de um alimento inibe o crescimento de micro-organismos contaminantes, previne reações bioquímicas responsáveis pela deterioração e implica em menores custos de transporte, embalagem e estocagem, constituindo um método importante para prolongar a vida útil de diversos produtos (Park et al., 2002).

## **2.1 - Desidratação Osmótica de Alimentos**

### **2.1.1 – Aspectos Gerais e Vantagens do Processo**

A técnica da desidratação osmótica, também denominada desidratação por imersão e impregnação (DII), consiste na imersão de pequenas frações do alimento in natura em soluções concentradas de solutos, geralmente um açúcar, sob condições controladas de temperatura, tempo e agitação. A diferença de pressão osmótica entre a solução e o alimento leva à remoção parcial de água, ocorrendo difusão de solutos para o interior do alimento (Torreggiani, 1993; Dhingra et al., 2008).

Diferentes mecanismos de transporte estão envolvidos no processo de desidratação osmótica, como osmose, difusão, mecanismos hidrodinâmicos, penetração e outros fenômenos específicos (Lenart e Piotrowski, 2001). De acordo com Lenart (1996), três tipos de transferência de massa são observados durante a imersão do alimento na solução hipertônica: (1) fluxo de água do produto para a solução; (2) transferência de soluto da solução para o produto; (3) saída de solutos do próprio alimento para a solução (Figura 1).

A complexa estrutura celular do alimento, formada pela membrana e parede celular, age como uma superfície semipermeável, o que permite a entrada de solutos. Por outro lado, a transferência de água do alimento para a solução é geralmente acompanhada pela saída de substâncias naturais, como açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais, vitaminas, pigmentos e outros (Dhingra et al., 2008). Mesmo que muito baixa, em termos quantitativos, essa transferência pode ser

importante para a qualidade do produto final (Heng et al., 1990; Lerici et al., 1985; Rastogi et al., 2002).

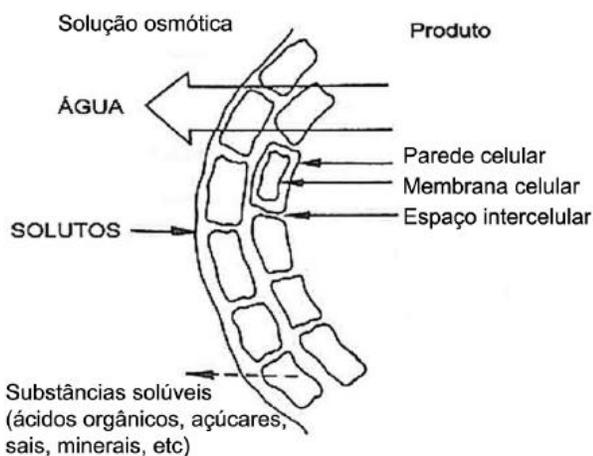


Figura 1 – Fenômenos de transporte de massa durante o processo osmótico (Fonte: Lenart, 1996).

Como a redução do teor de água do alimento desidratado osmoticamente não é, na maioria dos casos, suficiente para garantir a estabilidade do produto durante a estocagem, há a necessidade de emprego de um processo subsequente de estabilização (Torregiani e Bertolo, 2001). Esta técnica de desidratação é, portanto, geralmente utilizada como um pré-tratamento em processos de desidratação como liofilização, secagem em micro-ondas, secagem a vácuo e secagem com ar quente (Mastrangelo et al., 2000; Sereno et al., 2001). O uso combinado destes processos permite uma melhora na qualidade do produto final e a redução dos custos de energia, além da possibilidade de obtenção de produtos diferenciados (Sereno et al. 2001; Souza-Neto et al., 2004; Gomes et al., 2007).

O processo de desidratação osmótica envolve, basicamente, três variáveis durante a imersão da fruta na solução desidratante: redução de massa ( $\mu$ ), perda de água ( $\omega$ ) e ganho de sólidos pelo produto ( $\delta$ ). A redução da massa ( $m$ ) corresponde

ao percentual de diminuição de massa da amostra em relação à sua massa inicial; a perda de água ( $w$ ) refere-se à quantidade de água (g ou mL) que sai da amostra para cada 100 g de sua massa total inicial; o ganho de sólidos ( $d$ ) é designado pela massa de sólidos solúveis e insolúveis transportada para o interior do produto em relação à massa inicial da amostra. Os valores de  $\mu$ ,  $\omega$  e  $\delta$  são determinados, respectivamente, pelas Equações (1), (2) e (3) (Bolin et al., 1983; Silveira, et al., 1996; Viberg et al., 1998).

$$\mu = \left( \frac{m_i - m_t}{m_i} \right) 100 \quad (1)$$

$$\omega = \left( \frac{m_i X_{ai} - m_t X_{at}}{m_i} \right) 100 \quad (2)$$

$$\delta = \left( \frac{m_i X_{st} - m_t X_{si}}{m_i} \right) 100 \quad (3)$$

Em que:

$m_i$  = massa inicial do produto, g;

$m_t$  = massa do produto no tempo  $t$ , g;

$X_{ai}$  = fração de água na amostra no tempo inicial, adimensional;

$X_{at}$  = fração de água na amostra no tempo  $t$ , adimensional;

$X_{si}$  = fração de sólidos totais da amostra no tempo inicial, adimensional;

$X_{st}$  = fração de sólidos totais da amostra no tempo  $t$ , adimensional.

A desidratação osmótica vem ganhando espaço para a conservação de alimentos e redução das perdas pós-colheitas (Gomes, et al., 2007). Em virtude de suas vantagens, tem se apresentado como uma prática tecnológica importante para

a obtenção de produtos derivados de frutas com maior valor agregado (Torreggiani e Bertolo, 2001).

Como um pré-tratamento, o processo melhora as propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais do alimento sem alteração na sua integridade (Brandão et al., 2003) e possibilita a formulação de produtos estáveis e mais próximos aos alimentos frescos que produtos desidratados unicamente por secagem convencional (Torreggiani e Bertolo, 2001). Também em comparação com a secagem por calor, a desidratação osmótica permite a redução da injúria térmica, melhora a textura, a retenção de vitaminas e a estabilização da cor do alimento sem adição de sulfitos (Mavroudis et al., 1998; Reppa et al., 1999; Torreggiani e Bertolo, 2001). Além disso, compostos fisiologicamente ativos, antimicrobianos ou solutos com características específicas podem ser incorporados para aumentar a vida útil do produto e/ou suas propriedades nutricionais e sensoriais (Mujica-Paz et al., 2003). Ainda de acordo com Sousa et al. (2003a; 2003b), trata-se de um método de baixo custo energético e de um processo que pode ser adequado a qualquer escala de produção.

### ***2.1.2 – Fatores que afetam o processo***

O fenômeno de transferência de massa que ocorre entre o produto e o meio osmótico é amplamente afetado pelas variáveis do processo, as quais estão associadas tanto à natureza da matéria-prima quanto às condições operacionais empregadas. Interferem no desempenho da desidratação a espécie vegetal utilizada, a variedade, o grau de maturação e a forma e o tamanho do alimento a ser desidratado. O processo também é afetado pela composição e concentração da solução osmótica, pela temperatura e pelo tempo de contato da fração sólida com o xarope, pela razão massa de meio/produto e pela utilização ou não de pré-tratamentos (Azuara et al., 1992; Torreggiani, 1993; Lazarides et al., 1997; Rastogi et al., 2002; Lenart e Pietrowsk, 2001; Escobar et al., 2007; Queiroz et al., 2007).

Segundo Torreggiani (1993), a composição e a concentração da solução osmótica empregadas na desidratação são um dos fatores chave para o sucesso do

processo. As principais exigências para que um soluto possa ser usado como agente osmótico são alta solubilidade em água, baixo custo e efeito positivo sobre as propriedades sensoriais e a estabilidade final do produto (Singh et al., 2007). Durante a desidratação, a cinética de remoção de água, o ganho de sólidos e o teor de água na condição de equilíbrio são fortemente afetados pelo tipo de agente osmótico, sua concentração, sua massa molecular e seu comportamento iônico (Nahimana et al., 2010; Yadav e Singh, 2012).

A escolha da solução desidratante dependerá do material a ser desidratado e está relacionada com o sabor, o custo e a capacidade de remoção de água que cada um desses solutos possui (Torreggiani e Bertolo, 2001). Açúcares como sacarose, glicose, frutose, maltodextrinas e lactose, xaropes de glicose e frutose, açúcar invertido e polióis como sorbitol, manitol e xilitol têm sido avaliados na desidratação osmótica de frutas (Torreggiani e Bertolo, 2001; Souza-Neto et al., 2004; Dionelo et al., 2007; Queiroz et al., 2007). No caso de hortaliças, o agente desidratante mais utilizado é o cloreto de sódio (Collignan e Raoult-Wack, 1994; Alves e Silveira, 2002; Jokic et al., 2007; Sutar e Gupta, 2007; Correa et al., 2008), que apresenta alta capacidade de redução da atividade de água, e aumenta a força motriz de saída de água do produto. No entanto, em função de sua baixa massa molecular, os produtos tratados com este soluto apresentam elevado ganho de sólidos, o que acentua o sabor salgado, fator que limita seu uso a alguns frutos e vegetais (Tonon et al., 2006). A utilização de misturas de sais e açúcares para preparo da solução osmótica é outra alternativa viável, pois permite a obtenção de altos níveis de perda de água, com pequena incorporação de solutos (Torreggiani e Bertolo, 2001; Baroni, 2004; Telis et al., 2004). Há, porém, limitações à sua aplicação prática devido às alterações no sabor do alimento (Sachetti et al., 2001).

A sacarose é o açúcar mais utilizado na desidratação de frutas, pois é de fácil obtenção e de baixo custo (Gomes, 2007). Seu sabor especialmente agradável, mesmo em soluções altamente concentradas, é uma característica de destaque dentre os demais açúcares, apresenta influência positiva sobre a manutenção de substâncias aromatizantes do alimento (Be Miller e Whistler, 2000). Outra vantagem

decorrente do uso de sacarose é a redução do escurecimento enzimático do produto, uma vez que a camada residual na superfície do material desidratado representa um obstáculo ao contato com o oxigênio (Tonon et al., 2006). Ao avaliar a desidratação de abacaxi utilizando glicose e sacarose, Saputra (2001) observou que sacarose foi o agente desidratante mais eficiente, com maior capacidade de transferência de massa, maior perda de água e menor ganho de soluto. Na desidratação de mamão utilizando os mesmos solutos, El-Aouar et al. (2006) verificaram que a perda de massa e de umidade, bem como o ganho de sólidos, foram maiores com sacarose.

O sorbitol é um poliol edulcorante encontrado em numerosos produtos alimentícios processados em algumas frutas como a ameixa e a maçã. Na indústria alimentícia é utilizado como agente umectante e como aditivo para melhorar a textura. Seu poder adoçante é 50% menor que o da sacarose e possui um terço das calorias existentes neste açúcar. Apresenta paladar suave, sabor doce, fresco e agradável, além de ser não cariogênico e poder ser consumido por pessoas com diabetes. Quando ingeridos em doses maiores que 50 a 80 g ao dia têm poder laxante (Sicard e Leroy, 1983; Carvalho e Zanette, 2006). Como agente osmótico, é eficiente na retirada de água e na aceitabilidade sensorial do produto final (Moura, 2004). Tregunno e Goff (1996) observaram melhores resultados sobre as características físicas, como cor e rehidratabilidade, e a retirada de água na desidratação osmótica de maçãs utilizando sorbitol em lugar de xarope de milho. Ao desidratar morangos com solução de sacarose ou sorbitol, a 60%, Rizzolo et al. (2007) observaram que o ganho de sólidos e a perda de água foram maiores em fatias da fruta desidratadas com sorbitol, sendo o resultado atribuído à mais baixa massa molecular do sorbitol (182,2) em relação à da sacarose (342,3). Erba et al. (1994) concluíram, ao contrário, que a utilização de sorbitol na solução osmótica, utilizada na desidratação de pêssegos e damascos, levou a um menor ganho de sólidos e maior redução da massa das amostras.

Maltodextrina é uma mistura de vários oligômeros da glicose, compostos por 5 a 10 unidades, obtida pela hidrólise de amido ou fécula. Possui poder adoçante 50% maior que o da sacarose (IDEC, 2006) e é comumente utilizado como suplemento

alimentar (Aoki et al., 2003; Sapata et al., 2006). Ao desidratar damascos com soluções de sacarose, sorbitol, maltodextrina ou frutose a 70 °Brix, Ispir e Togrul (2009) verificaram maior perda de água com sacarose e maior ganho de sólidos com maltodextrina. Poucos trabalhos são descritos na literatura a respeito do uso deste soluto na desidratação osmótica.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de ocorrência natural formados por oligômeros de frutose (Yun, 1996). Estão presentes como compostos de reserva energética em mais de 36.000 espécies de vegetais, sendo muitos destes utilizados na alimentação humana (Passos e Park, 2003). As principais fontes naturais de frutooligossacarídeos incluem trigo, cebola, cebolinha, ameixa, banana, alcachofra, alho e raízes de chicória (Gibson et al., 1994; Roberfroid et al., 1993; Van Loo et al., 1995; Campbell et al. 1997; Hogarth et al., 2000). Os FOS comerciais consistem em uma mistura de 1-kestose, nistose e fructofuranosil nistose, nos quais uma das três unidades fructosil está ligada na posição  $\beta$ -2,1 à sacarose (Támbara et al., 1999). Apresentam propriedades físicas e fisiológicas que os tornam compostos de grande potencial para aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. Constituem açúcares não digeridos pelo organismo humano, sendo seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microbiota intestinal no intestino grosso (Mitsouka, 1990). Os FOS apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e são pouco calóricos. Têm solubilidade maior que a da sacarose, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sensação de areia ou secura na boca. Não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados em frutose, em condições muito ácidas e em exposição prolongadas ao binômio tempo/temperatura (Bornet, 1994; Yun, 1996). Matusek et al. (2008) desidrataram osmoticamente maçã com soluções de FOS e sacarose em diferentes concentrações (40, 50 e 60%) e diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C), observando menor perda de água e o ganho de sólidos com FOS como agente osmótico.

Quanto maior a massa molecular do agente osmótico menor é o ganho de sólidos e maior é perda de água, favorecendo, assim, a redução de massa e o processo de desidratação (Torreggiani, 1993). A impregnação do alimento com o

soluto é, de forma contrária, favorecida com o uso de açúcares com menor massa molecular (glicose, frutose, sorbitol e outros) em função da maior velocidade de penetração das moléculas no produto (Torreggiani, 1993; Raoult-Wack, 1994). Agnelli et al. (2005), ao estudar a desidratação osmótica de peras e maçãs utilizando sacarose e glicose como agentes osmóticos (69 e 47 °Brix, respectivamente), observaram que a penetração de glicose foi maior que a da sacarose, apesar da maior concentração da solução de sacarose. Matusek et al. (2008) verificaram que sacarose, em duas concentrações distintas (40 e 60%), foi mais eficiente na perda de água que FOS como agente osmótico.

A concentração da solução utilizada na desidratação osmótica influencia diretamente a perda de água e de massa do alimento (Fito et al., 1998), sendo também fator importante no processo de difusão do soluto na fruta e nas mudanças ocorridas no valor nutricional e propriedades sensoriais do produto (Rastogi et al., 2002). O emprego de xaropes altamente concentrados favorece a transferência de massa (Souza-Neto et al., 2004) e reduz as perdas de solutos hidrossolúveis, como o ácido ascórbico, mediante formação de uma camada periférica concentrada em soluto, prevenindo o arraste dos mesmos (Raoult-Wack et al., 1992). Segundo Ferrari (2009), um elevado ganho de sólido pode afetar o perfil nutricional e sensorial do alimento. Marques et al. (2007) observaram que quanto maior a concentração de sacarose na solução osmótica, maior a perda de água e o ganho de solutos, na desidratação de cajus. O mesmo comportamento foi observado por Lima et al. (2004) na desidratação de melão com solução de sacarose (55, 60 e 65 °Brix), sendo o aumento na taxa de perda de água atribuído ao aumento na pressão osmótica no exterior da fruta. Em contrapartida, Khoyi e Hesari (2007) verificaram que solução de sacarose a 60 °Brix promoveu maior perda de água de damascos desidratados osmoticamente que solução a 70 °Brix. Segundo os autores, a maior viscosidade da solução mais concentrada influenciou a redução da taxa de perda de água.

A faixa de temperatura normalmente utilizada no estudo no processo de desidratação osmótica está entre 20 e 40 °C (García-Martínez et al., 2002; Peiró et al., 2006; Dionello et al., 2007; Peiró-Mena et al., 2007; Queiroz et al., 2007, 2008;

Singh et al., 2007). A temperatura ótima de processo depende da estrutura do tecido celular da fruta e das etapas posteriores de conservação. Temperaturas acima de 40 °C devem ser evitadas em alguns alimentos (Torreggiani, 1993). As taxas de transferência de massa (perda de água e ganho de sólidos) aumentam com o aumento da temperatura (Raoult-Wack, 1994; Themelin et al., 1997). A viscosidade da solução diminui com o aumento da temperatura, elevando o coeficiente de difusividade da água, favorecendo a transferência de massa e consequente aumento da difusividade mássica efetiva no fruto (Lenart, 1996; Lazarides et al., 1997; Khoiyi e Hesari, 2007). Tal comportamento foi observado por Mercali et al. (2010) na desidratação osmótica de mirtilo em soluções de sacarose com temperaturas de 30 e 50 °C. A maior temperatura influenciou na maior perda de água.

Quanto mais alta a temperatura empregada na desidratação osmótica, maiores serão as perdas dos componentes nutricionais, as alterações da cor e da estrutura do alimento (Dhingra et al., 2008). Em temperaturas próximas a 50 °C as membranas e paredes celulares do vegetal começam a passar por mudanças irreversíveis, comprometendo a permeabilidade seletiva das mesmas. Isso faz com que enzimas responsáveis pelo metabolismo celular sejam inativadas, ocorrendo reações que afetam a qualidade sensorial e nutricional do produto final (Alzamora et al., 1997; Sachetti et al., 2001). Como resultado da perda da permeabilidade seletiva, haverá uma maior impregnação do soluto no produto, o que pode não ser desejável (Spieb e Behsnilian, 1998). Temperaturas acima de 60 °C modificam as características do tecido da fruta, favorecendo a impregnação e o ganho de sólidos (Torreggiani, 1993).

Ao avaliar a cinética de transferência de massa em maçãs utilizando diferentes concentrações de soluto e diferentes temperaturas, Lazarides et al. (1994) observaram que o aumento da temperatura e da concentração da solução elevou as taxas de retirada de água e de ganho de sólidos, sendo o aumento da concentração o maior responsável pelo aumento do conteúdo de sólidos totais nos frutos. O mesmo foi observado por Park et al. (2002), que ao avaliar a cinética de desidratação osmótica de cubos de pera, em soluções de sacarose de 40, 55 e 70 °Brix e

temperaturas de 40, 50 e 60 °C, observaram que a perda de água e o ganho de sólidos aumentaram com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração da solução de sacarose, em experimentos independentes. No entanto, ao utilizar a temperatura mais elevada (60 °C), o aumento da concentração da solução osmótica não influenciou a taxa de transferência de massa.

O tempo de imersão dos pedaços de alimentos na solução osmótica é determinante para a manutenção da integridade da estrutura da parede celular (Torregiani, 1993). Quanto maior o tempo do contato do alimento com a solução desidratante, maior será a taxa de perda de água (Souza et al.; 2003; Nahimana et al., 2010; Yadav e Singh, 2012), Porém, existe um limite para o conteúdo final de água no alimento, sendo este o seu valor de equilíbrio com a solução osmótica. Alguns alimentos, por apresentar uma parede celular menos rígida e pouco resistente ao processo de desidratação, necessitam de um tempo menor em contato com a solução osmótica. Com o passar do tempo, a membrana celular não fornece uma barreira efetiva para o soluto, ficando este livre para penetrar em todas as estruturas do tecido (Mauro et al., 2003). Segundo Lenart (1996), o processo de desidratação deve ser realizado em um curto espaço de tempo, para que se alcance um alto grau de desidratação com um ganho de sólidos relativamente pequeno.

O processo de perda de água pode ser dividido em duas etapas. No período inicial (aproximadamente 2 horas) ocorre alta taxa de remoção de água, sendo o ganho de sólido mais intenso nos primeiros 30 minutos. Em uma segunda etapa, de 2 a 6 horas, o processo torna-se cada vez mais lento, ocorrendo um decréscimo da taxa de remoção de água (Torreggiani, 1993; Raoult-Wack, 1994; Angelini, 2002; Antonio, 2002). Períodos mais longos favorecem a incorporação excessiva de sólidos, alterando, assim, o fenômeno de transferência de massa (Mauro et al., 2003).

A desidratação osmótica é, normalmente, realizada com agitação, fator que também desempenha importante papel no processo, por torná-lo mais rápido, Ponting et al. (1966) e por minimizar os efeitos da resistência externa à transferência de massa (Tonon et al., 2003). A desidratação é favorecida pelo aumento da relação

de perda de água e ganho de solutos e aumento da taxa global de transferência de massa, especialmente durante a primeira hora de tratamento (Mavroudis et al., 1998; Moreira e Sereno, 2003). Segundo Lazarides (1994), este parâmetro do processo permite um melhor contato do alimento com a solução, mas níveis de agitação elevados podem levar a desintegração do tecido vegetal. Dionello et al. (2007) observaram que a utilização de agitação ( $60 \text{ min}^{-1}$ ) favoreceu a redução de massa, a perda de água e o ganho de sólidos na desidratação de pedaços de abacaxi utilizando sacarose e açúcar invertido. Para a desidratação osmótica de pedaços de maçã, em soluções de sacarose (40 °Brix) com níveis de agitação de 0, 60 e 120 rpm, Eler et al. (2009) observaram que a cinética de desidratação foi fortemente afetada pela aplicação da agitação no meio. Segundo os autores, os resultados mostraram que à medida que a agitação foi aumentada a perda de água foi maior. Também na desidratação de maçã, Moreira e Sereno (2003) verificaram que a taxa de desidratação aumentava com o aumento da agitação.

Outra variável importante no processo de desidratação osmótica é a razão produto:solução (p:p). De modo geral, a fim de assegurar uma taxa constante de troca de água/soluto é aconselhável trabalhar com alta razão alimento:solução, por exemplo 1:5 (Dalla Rosa e Giroux, 2001). Razões mais baixas, na faixa de 1:10 a 1:20, foram empregadas na maioria dos trabalhos, visando minimizar a variação da composição da solução. Porém, para aplicações industriais esta razão deve ser a mais alta possível, a fim de reduzir os custos de produção (Raoult-Wack, 1994). A razão produto:solução também está relacionada à eficiência do processo, interferindo diretamente na perda de água e ganho de sólidos (Sousa et al., 2003a, 2003b; Souza-Neto et al., 2004; Lima et al., 2004). Quanto mais alta a razão produto:solução, maior a perda de água e o ganho de sólidos (Sousa et al., 2003a, 2003b). Kohyi e Hesari (2007) ao desidratar osmoticamente damasco utilizando solução de sacarose a 50 °C e 60 °Brix, em diferentes razões (1:5 e 1:10), observaram que com a razão de 1:10 houve maior perda de água. Ispir e Togrul (2009) também verificaram que a perda de umidade e o ganho de sólidos foram

inversamente proporcionais à diminuição da proporção produto:solução na desidratação de damasco com soluções de glicose e maltodextrina a 70 °Brix.

### **2.1.3 – Aproveitamento do xarope osmótico residual**

Apesar de poder ser reutilizado em ciclos sucessivos de desidratação, o xarope residual é geralmente considerado um resíduo industrial, o que contribui para aumentar o custo de produtos osmo-desidratados (García-Martínez et al., 2002; Peiró et al., 2006; Peiró-Mena et al., 2007). Por outro lado, além dos nutrientes nobres lixiviados do alimento imerso na solução, tais como vitaminas e minerais (Queiroz et al., 2008), este resíduo possui elevado valor energético, podendo constituir uma potencial matéria-prima para outros processos industriais, por exemplo, como ingrediente na formulação de outros produtos (Valdez-Fragoso et al. 1998; Valdez-Fragoso e Mujica-Paz, 2002). A produção de bebidas, geleias, frutas em calda, frutas açucaradas, produtos cristalizados e conservas, produção de flavorizantes naturais, bebidas fermentadas e enriquecimento de ração animal, são alguns dos produtos sugeridos para o reaproveitamento de soluções provenientes dos processos osmóticos (Spiess e Behnlian, 1998, Dalla Rosa e Giroux, 2001; Oliveira et al., 2012). A viabilidade da utilização da solução osmótica residual em outros processos biotecnológicos tem sido demonstrada. Rodrigues (2009) utilizou solução osmótica residual da desidratação de abacaxi na formulação de bioinseticidas no combate ao mosquito da dengue. A possibilidade de reciclar as soluções osmóticas ou o seu uso em outras formulações de alguns alimentos é muito importante para tornar o processo econômico e ambientalmente correto (Peiró-Mena et al., 2007). Apesar de frequentemente sugeridos, poucos trabalhos têm sido realizados sobre o estudo das propriedades das soluções reconcentradas e reaproveitadas visando o aspecto da economia de energia no processo de desidratação osmótica (Szymczak et al., 1998; García-Martínez et al., 2002; Moranga et al., 2010).

Vários autores analisaram a concentração de minerais lixiviados para a solução osmótica. Moranga et al. (2010) verificaram que após cinco ciclos sucessivos de desidratação de *grapefruit* a solução osmótica apresentou elementos como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  em concentração de 5, 1,08, 12,9 e 1,2 mg/100g, respectivamente. Ainda neste trabalho os autores observaram que os teores de ácido ascórbico foram de aproximadamente 4 mg/100g de solução osmótica. Ao avaliar a desidratação osmótica de goiaba utilizando xarope de açúcar invertido ou sacarose, em diferentes concentrações (0,3, 0,4 e 0,5 g.mL<sup>-1</sup>). Queiroz et al. (2008) mostraram que houve redução significativa no teor da maioria dos minerais da fruta. Os autores verificaram que o xarope de açúcar invertido foi menos eficiente na manutenção dos minerais na fruta, com exceção de  $\text{K}^+$ . A solução de sacarose a 0,5 g.mL<sup>-1</sup> provocou maior redução nos teores de  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que a solução a 0,3 g.mL<sup>-1</sup> e maior redução no teor de  $\text{K}^+$  e menor no de  $\text{Zn}^{2+}$  que a diluição a 0,4 g.mL<sup>-1</sup>. Peiró et al. (2006), trabalhando com desidratação osmótica de *grapefruit*, mostraram que há perda de minerais e dos ácidos ascórbico, cítrico e galactônico para a solução osmótica residual. Em trabalho com desidratação osmótica de abacaxi, Peiró-Mena et al. (2007) observaram que  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}^{5-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foram encontrados na solução osmótica residual após 15 ciclos de desidratação utilizando a mesma solução.

O emprego do xarope residual da desidratação osmótica em processos fermentativos de produção de vinagres e bebidas alcoólicas foi citado como alternativa para aumentar o valor agregado dos alimentos desidratados por este método (Gomes et al., 2007). O resíduo é rico em nutrientes, principalmente carboidratos e minerais, o que o torna um meio de cultivo em potencial para cultivo de micro-organismos. É o caso da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, utilizada na produção de bioinseticidas para controle de pragas e vetores. Estudos para avaliar seu desempenho em meio formulado com solução osmótica residual da desidratação de abacaxi mostraram alta produção das proteínas tóxicas responsáveis pelo efeito bioinseticida (Rodrigues et al., 2009a, 2009b).

## 2.2 - O fruto do abacaxizeiro

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

A Tailândia é o maior produtor mundial de abacaxi. Logo a seguir, com um volume bastante próximo, aparece o Brasil e, na sequência, Filipinas, Índia, China e Indonésia (Antoniali e Sanches, 2008). Segundo o IBGE (2012), o Brasil produziu 1.464.939t frutos de abacaxi em 2012. A região Nordeste é a maior produtora, responsável por 39,4 % da produção nacional, seguido pelo Sudeste (35,1 %), Norte (16,9 %), Centro-Oeste (7,9 %) e pela região Sul (0,7 %). Os principais Estados produtores em 2012 foram Paraíba, Minas Gerais, Bahia, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Norte.

As cultivares Smooth Cayenne e Pérola lideram o mercado brasileiro, sendo esta última muito apreciada para o consumo tanto in natura como industrializada, em função da ótima qualidade sensorial. A cultivar Pérola é a mais plantada comercialmente no Brasil, representando aproximadamente 80% da produção nacional. É largamente produzida no estado da Paraíba e muito apreciada pelos mercados do Sul e Sudeste, mostrando também potencial para exportação para países da América Latina (Martins et al., 2007). A cultivar Smooth Cayenne, conhecida também como abacaxi havaiano, é a mais plantada no mundo (70% da produção mundial). Suas características de sabor e aroma, com um bom equilíbrio entre acidez e açúcar, a tornam muito apreciada nas regiões produtoras e nos países importadores (Antoniali e Sanches, 2008).

O fruto do abacaxizeiro fornece uma grande diversidade de sais minerais e vitaminas, e um teor considerável de fibras dietéticas (cerca de 1,4%). Entre os sais minerais, destaca-se o potássio, com 104 mg/100 g do fruto. Com relação às vitaminas, uma fatia de 150 g fornece mais do que 7% do recomendado

internacionalmente para ingestão diária das vitaminas B1 e B2. O teor de vitamina C é, no entanto, pequeno em relação a outras fontes, e as concentrações de proteína e de matéria graxa são inferiores a 0,5% (NEPA, 2007). Porém, em função de sua atividade proteolítica, o abacaxi constitui um coadjuvante da digestão dos alimentos, ao mesmo tempo em que é matéria-prima para a extração da enzima bromelina, de larga aplicação na indústria de alimentos (Matsuura e Rolim, 2002).

## **2.3 - *Bacillus thuringiensis***

### **2.3.1 – Aspectos gerais e atividade entomopatogênica**

Pertencente à família *Bacillaceae*, a qual engloba a maioria das espécies formadoras de esporos, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, com células vegetativas de 1,0 a 1,2 µm de diâmetro por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, lineares ou ligeiramente curvadas, com extremidades arredondadas, ocorrendo geralmente em pares ou em cadeias curtas. Não formam cápsula e são geralmente móveis em função da presença de flagelos peritríqueos. O esporo da bactéria possui formato elipsoidal e localiza-se na região central ou paracentral quando no interior da célula-mãe (Stahly et al., 1990; Glare e O'Callaghan, 2000; Xiaoyan et al., 2005; Ibrahim et al., 2010). Esporos de *Bt* podem ser isolados a partir de diversos ambientes, tais como o solo, a rizosfera, o filoplano, a água potável, o pó de grãos e de insetos, os crustáceos, os anelídeos e os mamíferos insetívoros (Hendriksen et al., 2002; Bizzarri et al., 2008).

A principal característica de *Bacillus thuringiensis* é sua capacidade de sintetizar, durante o processo de esporulação, diferentes proteínas cristalinas, coletivamente denominadas δ-endotoxinas ou proteínas Cry, as quais apresentam atividade tóxica elevada e seletiva contra larvas de vários insetos (Bravo et al. 2007; Kurt e Özcengiz, 2011). Estas proteínas são depositadas em grande quantidade (20-

30% do peso seco das bactérias) no esporângio (célula-mãe), na forma de inclusões cristalinas adjacentes ao esporo (Figura 2) (Bulla et al., 1980; Regis et al., 2001). Os cristais são liberados no meio, por lise celular, quando a esporulação é concluída (Schnepf et al., 1998; Glare e O'Callaghan, 2000; Federici et al., 2003). Em algumas variedades de *Bt*, outro tipo de toxina, denominada Cyt, também é produzido durante a esporulação e depositado no cristal intracelular (Schnepf et al., 1998).

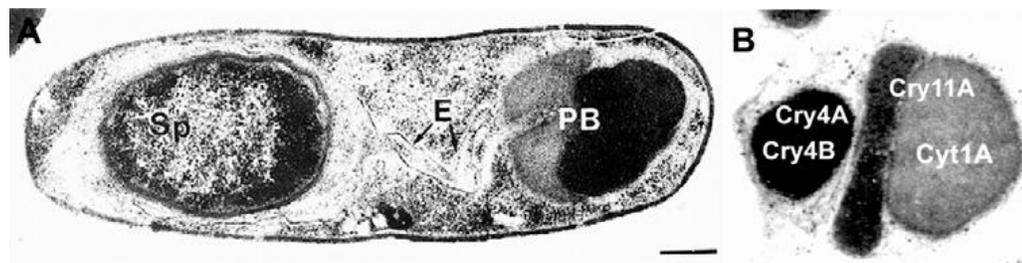


Figura 2 - Ultraestrutura da (A) célula esporulada de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis e (B) do esporo purificado. Sp: Esporo; E: Exoesporo; e PB: Corpo paraesporal (Fonte: Federici et al., 2003)

A formação de proteínas Cry é determinada por genes denominados *cry* e uma mesma variedade de *B. thuringiensis* pode conter um único gene *cry* ou várias cópias de um mesmo gene, ou mesmo vários genes *cry* diferentes, determinando a formação de diferentes proteínas Cry. Um ou mais cristais intracelulares podem ser formados por uma variedade de *Bt* (Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007). As proteínas Cry de *Bti* são codificadas por genes localizados em um grande plasmídeo, denominado pBtoxis, cuja sequência completa de nucleotídeos apresenta um número total de pares de bases de 172.923 (Berry et al., 2002).

As proteínas Cry são classificadas pela sua sequência primária de aminoácidos, havendo mais de 500 diferentes sequências de genes *cry* já classificados em 67 grupos (*cry1-cry67*) (Crickmore et al., 2010). Até 2011, 563 proteínas Cry haviam sido descritas, as quais foram classificadas em Cry1 a Cry68, de acordo com o grau de homologia da sequência de aminoácidos (Kurt e Özcengiz,

2011). Além disso, 35 genes Cyt de 3 grupos (Cyt1-Cyt3) também foram sequenciados e identificados (Crickmore et al., 2010).

As proteínas Cry são sintetizadas na forma de protoxinas e sua ação depende de processos de ativação que ocorrem no interior do aparelho digestivo do inseto-alvo. As protoxinas apresentam massa molecular entre 40 e 160 kDa. São constituídas de duas partes distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal, mais conservada entre as proteínas, associada geralmente à formação do cristal (Cooper, 1994; Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2005).

Os cristais produzidos por *Bti* são constituídos por quatro polipeptídeos, com massas moleculares de 123, 135, 72 e 28 kDa, formando as proteínas denominadas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa, respectivamente (Schnepf, et al., Federici, 2005). A proteína Cyt1Aa, uma citolisina de 27 kDa, é acumulada no cristal juntamente com as  $\delta$ -endotoxinas (Ruud et al., 2003). Uma característica interessante destas quatro toxinas de Bti é que elas mostram um efeito sinérgico. A toxicidade do cristal integral de *Bti* é muito maior do que a soma das toxicidades individuais de cada uma das proteínas Cry e Cyt neste cristal (Crickmore et al., 1995; Bravo et al., 2005; Beltrão e Silva-Filha, 2007).

*Bti* apresenta alta toxicidade para *Aedes aegypti*, vetor da dengue e da febre amarela, e espécies de *Culex sp.* (Lacey, 2007; Després et al., 2011), mas toxicidade moderada para *Anopheles gambiae*, vetor de malária (Margalith e Ben-Dov, 2000). A toxina Cry11Aa é a responsável por apresentar a maior toxicidade em *A. aegypti* (Crickmore et al., 1995), *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens* (Fernández et al., 2006). Cry4Ba é ativo principalmente contra *Anopheles* e *Aedes*, e não apresenta qualquer toxicidade para espécies *Culex*, em contraste com a toxina Cry4Aa que é tóxica para larvas de *Culex* (Després et al., 2011).

A especificidade das proteínas tóxicas de *Bt* é o resultado da eficiência de várias etapas envolvidas na produção das toxinas ativas e suas subsequentes interações com as células do epitélio do trato digestivo dos insetos alvos (Koziel et al., 1993; Bravo et al., 2005). Após a ingestão dos cristais, esses são solubilizados

no intestino do inseto, que tem pH alcalino, liberando as protoxinas que são clivadas por proteases do próprio inseto, resultando em toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina. A toxina ativa liga-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das células intestinais do inseto, criando poros que interferem no sistema de transporte de íons, causam lise do epitélio, interrompem a ingestão de alimentos e culminam com a morte da larva (Gill et al., 1992; Knowles, 1994; Glare e O'Callaghan, 2000; Bravo et al., 2007).

Bt é quase exclusivamente ativa contra estágios larvais de diferentes ordens de insetos e mata o inseto pela ruptura do tecido do intestino médio, seguida por septicemia causada, provavelmente, não apenas por Bt, mas também por outras espécies bacterianas (Raymond et al., 2010).

### **2.3.2 – Aspectos fisiológicos**

A faixa de temperatura para crescimento de diversas linhagens de *Bt* encontra-se entre 15 e 30 °C, sendo a faixa entre 26 e 30 °C considerada ideal para o cultivo. Com relação ao pH, os valores ótimos para a multiplicação celular encontram-se entre 6,5 e 7,5, mas a bactéria pode crescer em valores entre 5,5 e 8,5 (Bernhard e Utz, 1993). Valores de pH abaixo de 5,0 podem impedir a esporulação de *Bacillus* (Murrell, 1967), sendo a síntese do cristal proteico mais eficiente na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 (Içgen et al., 2002a).

O suprimento adequado de oxigênio é essencial no processo fermentativo com Bt, influenciando não só o crescimento e a esporulação, como também a produção de  $\delta$ -endotoxinas (Flores et al., 1997, Abdel-Hameed, 2001; Maldonado-Blanco et al., 2003, Rowe et al., 2003; Sarrafzadeh e Navarro, 2006; Boniolo et al., 2012). A quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura é dependente de diversos fatores como osmolaridade do meio e os níveis de aeração e a agitação do sistema (Couch e Ross, 2000). Este é um fator bastante crítico para biossíntese das proteínas Cry por *B. thuringiensis* e deve ser bem analisado, pois em grandes

volumes de fermentação o suprimento adequado de oxigênio torna-se ainda mais difícil e custoso.

A bactéria assimila glicose pela via glicolítica para produzir principalmente piruvato e acetato (Nickerson et al., 1974; Lüthy et al., 1982). Quando glicose é exaurida do meio, acetato passa a ser assimilado, pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), para o fornecimento de energia necessária ao crescimento e à esporulação (Benoit et al., 1990; Liu et al., 1994; Mignone e Avignone-Rossa, 1996). Além de glicose, algumas linhagens podem metabolizar outros carboidratos, incluindo sacarose, frutose, lactose, galactose e maltose (Sachidanandham et al. 1997; Özkan et al., 2003), assim como açúcares mais complexos, como inulina e dextrina (Özkan et al., 2003). Bt também produz amilases e proteases, possibilitando o emprego de matérias-primas amiláceas e proteicas para a composição do meio de cultivo (Yang e Wang, 1998).

### **2.3.3 – Uso como bioinseticida**

Há ampla evidência dos efeitos adversos sobre o ambiente e a saúde humana associados ao uso de inseticidas sintéticos, o que tem levado à busca de métodos mais seguros de controle de pragas e vetores, além de medidas regulamentadoras que visem à redução de riscos, como a proibição de muitos pesticidas sintéticos (Glare et al., 2012). Inseticidas de base biológica, por outro lado, são produzidos com recursos renováveis e não contêm ingredientes ativos sintéticos, exercendo um impacto muito mais positivo sobre o meio ambiente. Por outro lado, a resistência aos inseticidas químicos contribui diretamente para a reemergência de doenças transmitidas por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal para garantir a proteção da população humana. Algumas destas doenças são muito disseminadas em várias partes do mundo, estando em expansão devido ao aumento da urbanização e ao aquecimento global (Després et al., 2011). A malária é o caso mais dramático, pois afeta cerca de 250 milhões de pessoas no mundo (Mittal, 2003). Estima-se que a dengue, outra grave doença transmitida por

mosquitos, atinja anualmente cerca de 390 milhões de pessoas (BHATT, 2013). No Brasil, as condições socioambientais favorecem o desenvolvimento de *Aedes aegypti*, vetor da doença, e a utilização dos métodos tradicionalmente empregados no seu combate não têm sido eficientes. *Aedes aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, está sempre associado ao domicílio humano e proximidades, embora possa ser encontrado longe dos aglomerados urbanos (Ministério da Saúde, 2012). A única forma eficaz de reduzir a incidência dessas doenças é controlar o mosquito vetor, principalmente pela aplicação de inseticidas em seus locais de reprodução (Després et al., 2011).

*Bacillus thuringiensis* é considerado o patógeno de insetos mais bem-sucedido para o controle de pragas agrícolas e urbanas, representando atualmente aproximadamente 2 a 2,5% do mercado total de inseticidas (Ibrahim et al., 2010; Bravo et al., 2011). Mais de 200 produtos baseados em *Bt* respondem por 53% do mercado mundial de bioinseticidas, gerando receitas anuais de 120-140 milhões de dólares (CAB, 2010). O mercado mundial atual de pesticidas (herbicidas, inseticidas, fungicidas, nematicidas e fumigantes) está avaliado em 25,3 bilhões de dólares. A expectativa é de que a participação dos bioinseticidas neste mercado aumente cerca de 4,0% (Ibrahim et al., 2010).

Produtos à base de *Bti* apresentam baixo risco para a saúde humana, seja pela exposição direta ou indireta. Estudos em laboratório demonstraram que *Bt* não é infeccioso ou tóxico para os mamíferos (Siegel, 2001). O pH e a presença de receptores no intestino determinam a especificidade da ação larvicida de *Bti*. Desde a descoberta do seu potencial inseticida em 1976, a inocuidade de *Bti* para micro e macroinvertebrados, peixes e outros vertebrados que partilham os mesmos habitats com as larvas do mosquito, está bem estabelecida em dosagens utilizadas em escala operacional (Després et al., 2011). De acordo com Lacey (2007), a pulverização de toxinas produzidas *Bti* em criadouros de mosquitos, além de representar a melhor alternativa aos inseticidas químicos para controle destes

dípteros, constitui uma escolha segura, pois o produto tem baixa persistência no ambiente.

Um dos produtos biológicos de maior comercialização é o Vectobac® DT (Abbott Laboratories, EUA), que é uma formulação de *Bti* (ABG-6499) em forma de tablete contendo 3,4% dos ingredientes ativos. Este produto apresentou alta eficiência contra larvas de *Aedes albopictus*, *A. aegypti* e *Culex pipiens*, levando a 100% de mortalidade em cerca de 24 horas (Toma et al., 2003). Outro produto à base de Bti, Teknar® (Valent Biosciences, EUA), foi utilizado em larga escala pela OMS para o controle de oncocercose na África (Federici et al., 2003).

Nenhuma resistência consistente foi detectada em populações naturais de mosquitos, mesmo depois de longos períodos de tratamento repetido com toxinas de *Bti*, mas estudos recentes sugerem que a resistência moderada a Bti pode ocorrer localmente (Paris et al., 2010). Ensaio de seleção em laboratório mostraram que a evolução da resistência está correlacionada com o número de toxinas presentes no material de seleção. A resistência pode ocorrer às toxinas individuais de *Bti*, mas quando a totalidade do complexo de toxina é utilizada, apenas um baixo nível de resistência foi verificado. Isso explica por que nenhuma resistência de campo à *Bti* já ocorreu, estas toxinas que agem em sinergia e, aparentemente, com moléculas-alvo diferentes (Després et al., 2011). Como as toxinas atuam em conjunto, a probabilidade do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos-alvo é reduzida (Becker, 2000; Regis et al. 2001).

#### **2.3.4 – Processo fermentativo com a bactéria – meios de cultivo**

O sucesso de bioinseticidas com *Bti* é também atribuído à capacidade de ser produzido em massa em meios artificiais. A fermentação submersa descontínua é a forma mais utilizada para a produção de biomassa da bactéria (Angelo et al., 2010).

Neste processo, o meio de cultura líquido é inoculado com o microrganismo, não havendo acréscimo ou retirada do meio fermentado durante o cultivo, sendo o produto retirado apenas no final do processo. Em geral, os esporos de *Bt* são formados nas fases finais da fermentação, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis (Moraes, et al., 2001). Na maioria dos casos, os parâmetros monitorados durante todo o processo fermentativo são: temperatura, pH e concentração e oxigênio dissolvido (Couch e Ross, 2000). Devido à importância econômica do *Bt* como agente de controle biológico, atenção especial tem sido dada por diversos grupos de pesquisas para elucidar e otimizar as condições de crescimento que levam aos maiores rendimentos em toxinas. A aplicação comercial da bactéria depende do custo das matérias-primas, da eficiência da estirpe, do ciclo de fermentação, da manutenção dos parâmetros do processo, de bioprocessamento do meio de fermentação, e da formulação do produto final (El-Bendary, 2006).

Apesar das muitas vantagens de bioinseticidas à base de *Bti*, os altos custos de produção ainda representam um fator limitante para sua aplicação (Poopathi et al., 2002; El-Bendary, 2006). O custo de produção depende de muitos fatores, mas segundo Poopathi et al. (2009), o custo da matéria-prima pode representar mais de 70% do custo total da produção. Para El-Bendary (2006), esse custo varia entre 30 e 40% do custo total, dependendo da capacidade de produção das plantas, e por isso, a produção local desse inseticida nos países em desenvolvimento deve depender do uso de meios de produção baseados em fontes baratas e disponíveis localmente, incluindo subprodutos agroindustriais. Vimala Devi et al. (2005) também ressaltam que o custo do processo de produção de *Bt* é ainda elevado e reafirmam a necessidade de emprego de resíduos agroindustriais para a formulação do meio. Portanto, a seleção do meio de crescimento ou matéria-prima é crítica para a produção comercial de bioinseticidas com *Bt*.

A preocupação com o custo da matéria-prima é também relevante em outro sentido, uma vez que a composição do meio de cultivo constitui um dos fatores mais importantes para a otimização do processo fermentativo de produção de bioinseticidas à base de *Bt*. A formulação deve conter uma fonte de carbono, uma

fonte de nitrogênio e sais minerais específicos, em concentrações adequadas à obtenção de elevadas concentrações celulares, altas taxas de esporulação e de síntese de  $\delta$ -endotoxina (Poopathi et al., 2002; Maldonado-Blanco et al., 2003). Embora a síntese do cristal proteico esteja intrinsecamente ligada ao processo de esporulação, diversos autores sustentam que elevadas concentrações de esporos não implicam necessariamente em alta atividade tóxica do meio fermentado (Lacey et al., 2001; Boniolo et al., 2012). Desta forma, para aperfeiçoar a composição dos meios de cultivo é preciso investigar separadamente a fase de crescimento vegetativo da bactéria, a esporulação e a síntese de toxinas (Yang e Wang, 1998).

Diversos resíduos da agroindústria têm sido avaliados como fontes alternativas de nutrientes para o processo fermentativo com *Bt*, dentre eles farelo e farinha de soja (Farrera et al., 1998; Vidyarthi et al., 2002, Öskan et al.; 2003; Soccol et al., 2009), água de maceração de milho (Liu e Bajpai, 1995; Abdell-Hameed et al., 1990; Maldonado-Blanco et al., 2003), levedura de cervejaria (Saksinchai et al., 2001), soro de queijo (Abdell-Hameed et al., 1990; Öskan et al.; 2003), melão de cana-de-açúcar (Abdell-Hameed et al., 2001; Maldonado-Blanco et al., 2003; Ramada, 2008), caldo de cana-de-açúcar (Pessanha, 2008), farinha de peixe (Salama, 1983), farinha desengordurada de semente de algodão, linho e amendoim (Vora e Shetna, 1999), farelo de trigo (Vimala Devi et al., 2005; Prakabaran e Balaraman, 2006), resíduos de indústria farinheira de mandioca (Del Bianchi, 1998). Vários outros materiais também têm sido avaliados, incluindo extrato de batata (Poopathi et al., 2002) e batata-doce (Salama et al., 1983), sangue proveniente de abatedouros (Ernandes, 1998), cama de aviários (Salama et al., 1983; Adams et al., 1999), esterco de galinha (Poopathi e Abidha, 2007), lodos de estações de tratamento de esgoto doméstico (Vidyarthi et al., 2002; Yezza et al., 2005), casca de café (Poopathi e Aabidha, 2011), entre outros.

Rodrigues (2009) mostrou que o xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi apresenta grande potencial para ser usado na formulação do meio de cultivo de *Bti*. O xarope diluído para concentrações de açúcares redutores totais (ART) entre 30 e 100 g/L levou à obtenção de um valor médio de  $LC_{50}$  (concentração letal para

matar 50% da larvas de *Aedes aegypti*) de 8 mg/L. Concentrações celulares de cerca de 30 g/L foram alcançadas em meio com ART de 75 g/L e suplementação de nutrientes no curso da fermentação.

O emprego de diferentes fontes de carbono no meio de cultivo pode influenciar o crescimento de *Bt* (Maldonado-Blanco et al., 2003), assim como a produção de endotoxinas (Yang e Wang, 1998; Sachidanandham et al., 1997; Özkan et al., 2003; Panarotto, 2006). Na maior parte dos trabalhos já realizados com a bactéria, foi empregada glicose como fonte de carbono e energia (Saksinchai et al., 2001; Khuzhamshukurov et al., 2001; Chen et al., 2003; Berbert-Molina et al., 2008), mas diversos outros açúcares e substratos têm sido avaliados para o processo fermentativo com diferentes linhagens da bactéria. Segundo İçgen et al., (2002), a fonte de carbono para cultivo de *B. thuringiensis* varia muito conforme o objetivo da fermentação, bem como qual linhagem está sendo cultivada.

Özkan et al. (2003) verificaram que maltose, lactose, sacarose, glicerol e dextrina influenciaram positivamente o crescimento e a biossíntese de toxinas por *Bti* HD 500. Os níveis máximos das proteínas Cry4Ba e Cry11Aa foram obtidos com dextrina. Ao comparar o processo fermentativo com *Bti* IPS82 em meios contendo glicose, sacarose, maltose ou lactose, Panarotto (2006) verificou que as maiores concentrações celulares foram obtidas com glicose, mas a concentração de esporos foi semelhante à obtida com sacarose ou maltose. No meio com lactose não houve uma expressão favorável das endotoxinas. Para a variedade *Bt* var. *galleriae*, Sachidanandham et al. (1997) verificaram que glicose foi o carboidrato mais eficiente para o cultivo, seguido de maltose, frutose, galactose, sacarose e lactose. Pessanha (2008) verificou maiores concentrações de células e de esporos no cultivo de *Bti* IPS82 em meios com glicose ou frutose, mas em meios com sacarose foram obtidas taxas de esporulação elevadas e análogas às obtidas com estes carboidratos.

Arcas et al. (1987) relatam que, em muitos casos, elevadas concentrações de nutrientes são necessárias para a obtenção de altas concentrações de esporos e do cristal proteico. Berbert-Molina et al. (2008) verificaram que concentrações de glicose

de até 75 g/L não afetam as máximas velocidades específicas ( $\mu_{x,m}$ ) de crescimento de *Bti*. Com concentrações mais elevadas (100 e 150 g/L), os valores de  $\mu_{x,m}$  foram reduzidos, mas as concentrações celulares finais não foram afetadas, apesar de não ter havido consumo total de substrato. Ao realizar um pulso de nutrientes no curso do processo, o crescimento foi retomado e toda a glicose foi consumida, levando a uma concentração muito superior de biomassa.

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

Alguns autores relatam que, além de uma fonte de nitrogênio orgânico, a presença de uma fonte de nitrogênio inorgânico é essencial para o desenvolvimento do processo (Farrera et al., 1998; Saksinchai et al., 2001; Anderson e Jayraman, 2003). Zouari e Jaoua (1999) e Öskan et al. (2003) relatam que o uso de apenas nitrogênio inorgânico não é aconselhável para o cultivo de *B. thuringiensis*, pois há diminuição de crescimento, esporulação e biossíntese, em relação aos meios com nitrogênio orgânico e inorgânico.

O sal sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foi utilizado em trabalhos com as variedades *Bt* var. *kurstaki* (Kang et al., 1992; Saksinchai et al., 2001), *Bt* var. *israelensis* (Mignone e Avignone-Rossa, 1996; Berbert-Molina et al., 2008), *Bt* var. *galleriae* (Anderson e Jayraman, 2003), *Bt* var. *darmstadiensis* (Wu e Chen, 2001). Rodrigues (2006) demonstrou que nitrato de amônio interfere negativamente no crescimento de *Bti*, enquanto citrato de amônio e ferro III favorecem a produção de biomassa e a esporulação da bactéria. Öskan et al. (2003) mostraram que o uso de cloreto de amônio ( $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ), em substituição a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , aumentou significativamente a taxa de esporulação de *Bti* HD 500. O sal fosfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) estimulou fortemente a produção da proteína Cry4Ba e a esporulação.

Rodrigues (2006) mostrou, ao contrário do observado por Öskan et al. (2003) que a esporulação de *Bti* IPS82 foi inibida quando cloreto de amônio foi usado como fonte inorgânica de nitrogênio.

Íons metálicos como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  são considerados importantes no cultivo de *Bt* (Yang e Wang, 1998). Sikdar et al. (1991) relatam que  $\text{Ca}^{+2}$  é necessário para o desenvolvimento celular, para a estabilidade térmica dos esporos e para a produção de  $\delta$ -endotoxina. İçgen et al. (2002a) também destacam que  $\text{Ca}^{+2}$  exerce papel importante na esporulação. Rowe (1987) afirma que este íon é necessário para a ativação de amilases e exoproteases na fase vegetativa de crescimento e na transição para a esporulação. Por outro lado, Pessanha (2005) verificou que estes íons influenciaram negativamente o crescimento de *Bti* IPS82 em meios formulados com caldo de cana-de-açúcar. Öskan et al. (2003) também constataram que  $\text{Ca}^{+2}$ , em concentrações de  $5,5 \cdot 10^{-4}$  M, não foi favorável ao crescimento e à formação de esporos, mas favoreceu a síntese das proteínas Cry4Ba e Cry11Aa.

Os íons  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  atuam como elementos-traço essenciais, podendo estimular ou inibir o crescimento de *Bt* de acordo com as concentrações empregadas (Yao et al., 2002b, 2003). Öskan et al. (2003) mostraram que  $10^{-6}$  M de  $\text{Mn}^{+2}$  favoreceu a esporulação e a síntese de toxina por *Bti* H500, mas concentrações de  $10^{-2}$  M foram tóxicas para o microrganismo. Para *Bti* IPS82 İçgen et al. (2002a) mostraram íons  $\text{Mn}^{+2}$  em concentração de  $3 \cdot 10^{-4}$  M tóxicos para o crescimento e inibiram a formação do cristal proteico. O uso de  $10^{-7}$  M de  $\text{Cu}^{+2}$  estimulou significativamente a síntese do cristal, mas o aumento da concentração para  $10^{-6}$  ou  $10^{-5}$  M levou a uma diminuição drástica na concentração de proteína, sem qualquer efeito sobre o crescimento. Öskan et al. (2003), ao contrário, verificaram que concentrações de  $\text{Cu}^{+2}$  acima de  $10^{-7}$  M afetaram significativamente a esporulação e o crescimento microbiano.

Içgen et al. (2002a) mostraram que a presença de  $\text{Zn}^{+2}$  no meio de cultivo auxilia a produção de toxina por *Bti* IPS82. Yao et al. (2002a) verificaram que concentrações de  $\text{Zn}^{2+}$  de  $60 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  inibiram totalmente o crescimento da bactéria.

Segundo Öskan et al. (2003), a presença de  $Zn^{+2}$  em concentrações acima de  $10^{-7}$  M afetou significativamente a esporulação e o crescimento microbiano.

Obeta e Okafor (1984) relatam que a presença de íons  $K^{+}$  é essencial para a formação do cristal proteico. Wakisaka et al. (1982) destacam também que este íon desempenha um papel fundamental na esporulação da bactéria e que íons  $Mg^{+2}$  em concentrações de  $8 \times 10^{-5}$  a  $4 \times 10^{-3}$  M favoreceram o crescimento, a esporulação e a síntese do cristal proteico.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

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

#### **3.1 – Ensaio de Desidratação Osmótica**

##### **3.1.1 – Obtenção dos frutos e preparo das amostras**

Para a realização dos experimentos de desidratação, foram utilizados abacaxis da cultivar Pérola (Figura 3a), cultivados no Município de São Francisco do Itabapoana – RJ, gentilmente doados por um produtor local. Ao chegar ao LEAG, os frutos foram selecionados e separados a fim de homogeneizar o lote de acordo com atributos de qualidade, como cor, grau de maturação e ausência de injúrias ou doenças (Figura 3b). Depois de selecionados, os frutos foram armazenados em câmaras do tipo BOD (MARCONI modelo MA 415) a 8 °C com o objetivo de manter sua qualidade, até o momento de sua utilização (Figura 3c).



Figura 3 - Seleção dos frutos utilizados nos experimentos de desidratação osmótica: (a) Frutos de Abacaxi colhidos em campo; (b) Seleção dos frutos de acordo com as suas características; (c) Armazenamento dos frutos em BOD.

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

Depois de descascados com uma faca de aço inoxidável, os frutos foram cortados manualmente em formato de coroa circular com 10 mm de espessura (Figura 4). A fim de evitar o escurecimento enzimático, as amostras de fruta foram submetidas ao processo de branqueamento, por exposição das fatias ao vapor d'água por 1 min. O processo foi realizado em um béquer de 1.000 mL contendo cerca de 400 mL de água destilada, aquecido em chapa aquecedora. Após o branqueamento, as fatias foram colocadas em sacos plásticos e resfriadas em banho de gelo por 1 min, sendo, em seguida, colocadas em solução de ácido ascórbico a 1%, por 5 min, para evitar o escurecimento não enzimático.

### 3.1.2 – Desidratação osmótica

A desidratação foi feita pela imersão das fatias de fruta, previamente branqueadas, pesadas e identificadas, na solução osmótica contida em béqueres de vidro de 1.000 mL, dispostos aleatoriamente em agitadora-incubadora de bancada de movimento orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB). Ao todo foram 11 béqueres de vidro distribuídos em duas agitadoras-incubadoras. Cada béquer continha 5 amostras da fruta, distribuídas aleatoriamente na solução, perfazendo um total de 55 amostras. Em todos os tratamentos foi utilizada relação fruta:xarope de 1:10 (p/p), frequência de agitação de  $60 \text{ min}^{-1}$  e tempo de imersão de 4 h. O tempo de imersão foi escolhido com base nos dados obtidos na literatura, onde diferentes autores afirmam que a perda de água e o ganho de sólidos atingem o equilíbrio com 4 h de processo osmótico (Palau et al., 1993; Askar et al., 1996; . Panagiotou et al., 1999).

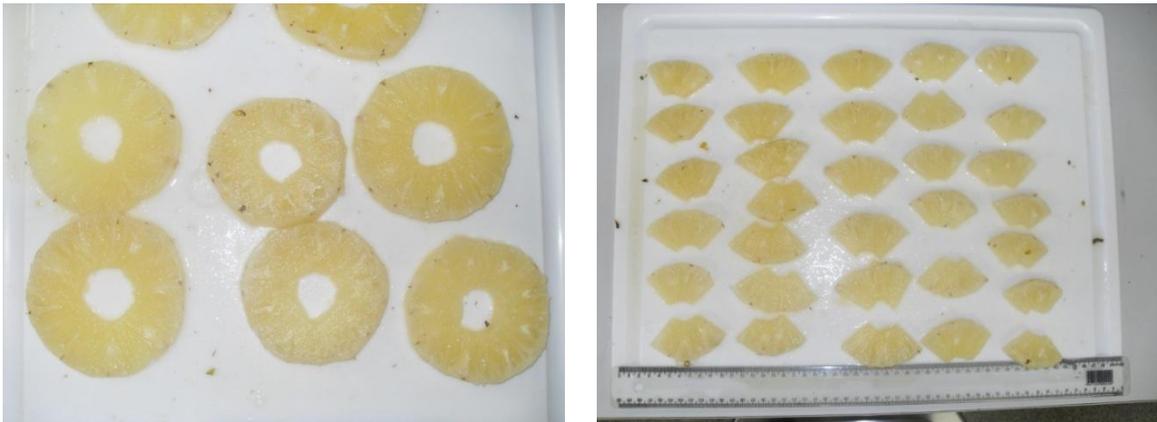


Figura 4 - Frutos de abacaxi cortados em formato de arco de coroa circular

As soluções osmóticas foram preparadas no mesmo dia do experimento, utilizando água destilada e recipiente de vidro previamente higienizado. Foram preparados cerca de 7 L de solução por experimento. Foram avaliados quatro agentes desidratantes: sacarose, sorbitol, maltodextrina e frutooligossacarídeo. A sacarose comercial, do tipo cristal da marca UNIÃO, foi adquirida no comércio local.

Os demais solutos foram adquiridos na empresa Corn Products do Brasil e têm os seguintes nomes comerciais: Sorbitol cristalino CX30-RD750, Maltodextrina MOR-REX<sup>®</sup> 1910 e Frutooligossacarídeo sólido SP25- NFP95. Três diferentes concentrações, de cada soluto, foram avaliadas. No **Ensaio DO1** comparou-se o processo feito com soluções de sacarose e maltodextrina nas concentrações de 20, 30 e 40 °Brix. Nos **Ensaio DO2**, avaliou-se o emprego de sorbitol e frutooligossacarídeo, respectivamente, nas concentrações de 30, 50 e 70 °Brix, comparando ambos com a solução de sacarose nas mesmas condições. Para todas estas condições, três temperaturas foram também avaliadas: 30, 40 e 50 °C. As Tabelas 1, 2 e 3 resumem as condições empregadas nestes ensaios.

Tabela 1: Tratamentos utilizados para desidratação osmótica de abacaxi com sacarose e maltodextrina (Ensaio DO1).

Soluto	Concentração do Soluto (°Brix)	Temperatura (°C)	Experimento
SACAROSE	20	30	SAC20(1)
		40	SAC20(2)
		50	SAC20(3)
	30	30	SAC30(1)
		40	SAC30(2)
		50	SAC30(3)
	40	30	SAC40(1)
		40	SAC40(2)
		50	SAC40(3)
MALTODEXTRINA	20	30	MAL20(1)
		40	MAL20(2)
		50	MAL20(3)
	30	30	MAL30(1)
		40	MAL30(2)
		50	MAL30(3)
	40	30	MAL40(1)
		40	MAL40(2)
		50	MAL40(3)

Apesar de relatos na literatura do uso de soluções de maltodextrina em concentrações de 50% (Hawkes e Flink, 1978, Khan et al., 2011) ou maiores (Ispir e

Togrul, 2009), não foi possível, no presente trabalho, preparar este soluto com concentração superior a 40%, razão que explica a menor faixa de concentração testada em relação aos outros dois solutos.

Tabela 2: Tratamentos utilizados para desidratação osmótica de abacaxi com sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo (Ensaio DO2).

<b>Soluto</b>	<b>Concentração do Soluto (°Brix)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Experimento</b>
SACAROSE	30	30	SAC30(1)
		40	SAC30(2)
		50	SAC30(3)
	50	30	SAC50(1)
		40	SAC50(2)
		50	SAC50(3)
	70	30	SAC70(1)
		40	SAC70(2)
		50	SAC70(3)
SORBITOL	30	30	SOB30(1)
		40	SOB30(2)
		50	SOB30(3)
	50	30	SOB50(1)
		40	SOB50(2)
		50	SOB50(3)
	70	30	SOB70(1)
		40	SOB70(2)
		50	SOB70(3)
FOS	30	30	FOS30(1)
		40	FOS30(2)
		50	FOS30(3)
	50	30	FOS50(1)
		40	FOS50(2)
		50	FOS50(3)
	70	30	FOS70(1)
		40	FOS70(2)
		50	FOS70(3)

Durante a desidratação foram retiradas amostras aleatoriamente, previamente identificadas com um alfinete de cabeça colorida, aos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min. A cada intervalo foram retiradas 5 amostras, que foram

lavadas com água destilada, secas com papel absorvente e pesadas em balança analítica (SARTORIUS, modelo BL 210 S). Três amostras foram trituradas e armazenadas em cadinhos de aço para posterior (quanto tempo? Como foi armazenado?) análise do teor de água e duas delas foram imediatamente utilizadas para determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST).

### **3.1.3 - Métodos analíticos**

#### **3.1.3.1 – Perda de água, ganho de sólidos e redução de massa**

O cálculo de perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) foi determinado por diferença entre as massas do produto úmido e seco, obtidos a partir do teor de água da amostra. O teor de água foi determinado por método gravimétrico (AOAC, 1990), onde cerca de 10 g de amostra triturada foram colocadas em cadinhos de aço, previamente secos e tarados, e levados à estufa 105 °C por 6 h. Depois do resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas em balança analítica (SARTORIUS, modelo BL 210 S). As determinações da perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ), foram feitas em três repetições em cada intervalo de tempo, utilizando-se as amostras preparadas conforme descrito em 3.1.5. Os valores de  $\mu$ ,  $\omega$  e  $\delta$  foram calculados com as equações (1), (2) e (3) (item 2.1.1)

#### **3.1.3.2 - Análises estatísticas**

Para cada etapa dos ensaios de desidratação foi feito um planejamento de acordo com delineamento experimental inteiramente casualizado, com arranjo fatorial (2 soluções x 3 níveis de concentração x 3 níveis de temperatura x 11 períodos de amostragem), com três repetições. As interações significativas pelo teste “F” da ANOVA foram desdobradas e as médias dos tratamentos para cada período de amostragem foram comparadas por análise de regressão. O melhor modelo de regressão foi escolhido pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e pela significância dos

coeficientes da regressão ( $\hat{\beta}_1$ ) que foram testados pelo teste t de Student. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o aplicativo computacional SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), versão 9.0, em ambiente Windows.

## 3.2 – Ensaio de Fermentação

### 3.2.1 - Microrganismo

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

### 3.2.2 - Meios de Cultivo

Para manutenção das culturas foi utilizado o meio Ágar Nutriente (Tabela 3). Os componentes foram dissolvidos em água destilada e levados ao forno de micro-ondas para fusão do ágar-ágar, sendo o meio acondicionado em tubos de ensaio com rolha de algodão e gaze e autoclavados a 121 °C por 20 min. Os tubos foram inclinados e, após completa solidificação, foram acondicionados sob refrigeração a 4 °C até o momento da repicagem.

Tabela 3: Composição do meio de cultivo Ágar Nutriente.

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

Para o preparo de inóculos foi empregado o meio GYS (Rogoff et al.,1969) modificado (Tabela 4) com 10 g/L de glicose. Para o preparo dos meios de fermentação dos ensaios do **Grupo F1** (item 3.2.3.2), as soluções osmóticas resultantes dos processos de desidratação com maltodextrina, sorbitol e frutooligossacarídeo foram diluídas de modo a obter-se concentração inicial de substrato ( $S_0$ ) de, aproximadamente, 30 g/L. Após autoclavação, estas foram suplementadas com os nutrientes do meio GYS modificado, nas mesmas concentrações previstas na formulação original, gerando os meios MAL<sub>30</sub>, SOB<sub>30</sub> e FOS<sub>30</sub>, respectivamente. Para os ensaios de fermentação do **Grupo F2**, a solução osmótica de maltodextrina foi diluída de modo a obter-se valores de  $S_0$  de, aproximadamente, 30, 50, 75 e 100 g/L, sendo também suplementadas com os nutrientes de GYS, gerando os meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, respectivamente. Nos ensaios do **Grupo F3**, o meio MAL<sub>50</sub> foi suplementado com o dobro da concentração de nitrogênio orgânico, gerando o meio MAL<sub>50</sub> 2N. Ainda neste grupo de ensaio, o meio MAL<sub>50</sub> 2N teve a concentração de oxigênio controlada em valores acima de 50 % de saturação durante todo o processo de fermentação (meio MAL<sub>50</sub> 2N(O<sub>2</sub>)).

Tabela 4: Composição do meio de cultivo GYS modificado.

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

Nos meios a base de solução osmótica, os componentes de GYS foram autoclavados (121 °C/20 min) separadamente e adicionados à solução no momento da fermentação. O procedimento de preparo dos meios foi feito em cabine de fluxo laminar (PACHANE modelo Classe II – tipo A/B3).

### **3.2.3 - Condições de Cultivo**

#### **3.2.3.1 - Preparo da cultura estoque**

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

#### **3.2.3.2 - Preparo de inóculo**

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

#### **3.2.3.3 – Ensaios de Fermentação**

Os ensaios dos **Grupos F1, F2 e F3** foram realizados em biorreator de bancada (New Brunswick modelo BioFlo/CelliGen 115), Figura 5, operado em sistema descontínuo, equipado com controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração, oxigênio dissolvido e nível de espuma. A cuba do fermentador (2 L de volume útil), contendo o meio de fermentação (1,8 L), e já instalados o condensador, os filtros de ar, as sondas para controle no nível de espuma e temperatura e as tubulações de silicone utilizadas para a retirada de amostras e

adições de meio, antiespumante e base, foi autoclavada a 121 °C por 20 min. Os eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido foram tratados com álcool etílico 70% (v/v) e enxaguados com água destilada esterilizada antes da instalação na cuba do reator. A temperatura foi controlada em 30 °C. O pH inicial foi corrigido para 7,0 e, durante o processo, foi automaticamente controlado, com adição de KOH 5 M, para não atingir valores inferiores a 5,5. Foi utilizada agitação em 600 min<sup>-1</sup> e aeração de 1 vvm, correspondente a um valor inial de  $K_{La}$  (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) de 140 h<sup>-1</sup>. Em apenas um ensaio do Grupo 3, a concentração de oxigênio dissolvido no meio, após atingir 50% da saturação, foi controlada automaticamente neste valor até o final do processo. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada com o emprego de um eletrodo polarográfico esterilizável (INGOLD, InPro 6000).

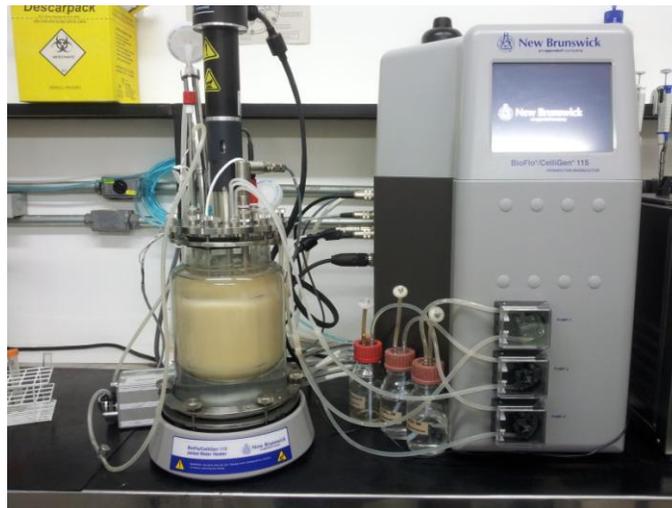


Figura 5 - Fermentador de bancada New Brunswick modelo BioFlo/CelliGen 115

Os ensaios do **Grupo F1** tiveram como objetivo comparar o desempenho da bactéria em meios de cultivo formulados com os xaropes residuais obtidos com os diferentes solutos usados nos ensaios de desidratação osmótica (maltodextrina,

sorbitol e frutooligossacarídeo). A concentração inicial de substrato de, aproximadamente, 30 g/L, foi escolhida com base nos resultados obtidos por Rodrigues (2009). Os resultados da fermentação de Meio GYS, contendo glicose nesta mesma concentração, foram usados para comparação. Os parâmetros para avaliação dos resultados foram a cinética de crescimento, as concentrações finais de células e de esporos, e a atividade tóxica do meio.

Os ensaios do **Grupo F2** visaram avaliar o processo fermentativo em meios com concentrações crescentes de maltodextrina (30, 50, 75 e 100 g/L), soluto que apresentou os melhores resultados nos ensaios do Grupo F1. Foram quantificadas as concentrações finais de células e esporos, a taxa de esporulação e a atividade larvívora dos meios fermentados. Também foi acompanhada a cinética da fermentação, calculando-se, em cada caso, as velocidades específicas de crescimento e de consumo de substrato.

Tabela 5: Meios de cultivos utilizados nos diferentes ensaios de fermentação.

	<b>Meio</b>	<b>Solução Residual Utilizada</b>	<b>Concentração (g/L )</b>
<b>Ensaio F1</b>	GYS <sub>30</sub>	Meio GYS (Controle)	30
	MAL <sub>30</sub>	Maltodextrina	30
	FOS <sub>30</sub>	Frutooligossacarídeo	30
	SOB <sub>30</sub>	Sorbitol	30
<b>Ensaio F2</b>	MAL <sub>30</sub>	Maltodextrina	30
	MAL <sub>50</sub>	Maltodextrina	50
	MAL <sub>75</sub>	Maltodextrina	75
	MAL <sub>100</sub>	Maltodextrina	100
<b>Ensaio F3</b>	MAL <sub>50</sub>	Maltodextrina	50
	MAL <sub>50</sub> 2N	Maltodextrina	50
	MAL <sub>50</sub> 2N(O <sub>2</sub> )	Maltodextrina	50

Os ensaios do **Grupo 3** foram feitos com dois objetivos: 1) avaliar o efeito do aumento da concentração inicial de nitrogênio no meio MAL<sub>50</sub> que, nos ensaios do Grupo F2, mostrou consumo incompleto de substrato, mas atividade tóxica relativamente elevada; 2) avaliar o processo realizado com o meio MAL<sub>50</sub>2N em condições não limitadas em oxigênio. A concentração escolhida (50%) foi baseada nos resultados obtidos por Boniolo et al. (2012) em fermentação de meio GYS com *Bti*. Assim como nos demais ensaios, foi avaliada a cinética do processo, bem como a contagem de células e esporos e atividade tóxica. Na Tabela 5 estão resumidas as condições empregadas nos diferentes ensaios.

### **3.2.4 - Métodos analíticos**

#### **3.2.4.1 - Coleta de amostras**

Nos ensaios em biorreator de bancada o sistema utilizado para retirada de amostras consistiu de um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situa-se próxima ao fundo da cuba, conectado a uma mangueira de silicone que, após passagem por uma bomba peristáltica (WATTSON-MARLOW modelo SCI 400), retorna à cuba do biorreator. As amostras foram retiradas com seringa e agulha descartáveis, através de um septo de silicone adaptado à tubulação. Amostras do tempo final de fermentação foram acondicionadas em tubos de plástico de 2 mL (tipo *Eppendorf*) ou 15 mL (tipo *Falcon*) e armazenadas sob congelamento para posterior análise da concentração de substrato e atividade larvicida.

#### **3.2.4.2 - Morfologia celular**

A morfologia celular foi avaliada pela observação de preparações a fresco do meio fermentado. Uma alíquota da amostra foi colocada sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula de vidro e observada em microscópio de contraste de fase (JENA modelo Jenamed 2) com aumento de 400x.

### 3.2.4.3 - Concentração celular

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

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

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

#### **3.2.4.4 - Contagem de células e esporos**

O número de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) foi obtido por contagem em câmara de Neubauer. Alíquotas do meio fermentado, convenientemente diluídas em solução salina, foram aplicadas sobre a superfície da câmara, cobertas com lamínula e observadas em microscópio de contraste de fase (JENA mod. Jenamed 2) com aumento de 400x. O número total de células (CT) foi obtido pelo somatório do número total de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) ( $CT=CV+CE+ES$ ). O número total de esporos foi calculado pela soma de CE e ES ( $ET=CE+ES$ ). A taxa de esporulação (%) foi calculada dividindo-se o número total de esporos pelo número total de células [ $T_{SP}=(ET/CT)\times 100$ ].

#### **3.2.4.5 - Concentração de açúcar**

A concentração de maltodextrina foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC Shimadzu modelo LC10A VP) usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com os solventes: Água miliQ (solvente A) e acetonitrila 100% (solvente B), coluna CLC-NH<sub>2</sub> (Shimadzu Shim-pack, 250 x 4,6mm) e temperatura de 25°C. A corrida foi feita em gradiente isocrático de 45% do solvente B durante 10 min, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O detector ELSD foi ajustado para a temperatura de 50°C e a pressão de 350 KPa, com ganho 1 e filtro 4s. As áreas e os tempos de retenção dos diferentes compostos foram avaliados por comparação com padrão em diferentes concentrações.

#### **3.2.4.6 - Bioensaios**

Para avaliar a atividade larvicida do meio fermentado foi empregada a metodologia de bioensaios proposta por Misch et al. (1992), com algumas modificações. Para cada formulação de meio de cultivo a ser testada, foram necessárias 160 larvas, acondicionadas individualmente em tubos de ensaio de vidro contendo 6 mL de água desclorada. A cada tubo foi adicionado um volume adequado

da suspensão de esporo-cristal (Item 3.2.4.7), de modo a obter 4 diferentes concentrações (em mg/L).

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

#### **3.2.4.7 - Obtenção da suspensão de esporos-cristais para bioensaios**

Para calcular as concentrações que foram utilizadas nos bioensaios, foi utilizado como base o valor da massa seca (concentração celular) obtida por gravimetria (Item 3.2.4.3).

O preparo da suspensão foi feito conforme metodologia proposta por Dulmage (1982), com modificações. Uma alíquota de 2 mL da amostra de meio fermentado foi centrifugada a 14.000 x g por 10 min, o sobrenadante descartado e o sedimentado lavado duas vezes com água destilada e centrifugado a 14.000 rpm para remover resíduos do meio de cultura. Foi adicionada ao sedimento uma solução NaCl 0,5M, correspondente a 1/10 do volume inicial (200  $\mu$ L), agitando-se a mistura por 10 min para promover a lise das células esporuladas e conseqüentemente liberar os cristais proteicos. A suspensão foi centrifugada a 14.000 xg por 10 min e o sedimento lavado duas vezes com água destilada para remover os resíduos de NaCl. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de água destilada e esta suspensão foi utilizada nos bioensaios.

#### 3.2.4.8 – Cálculos de parâmetros fermentativos

O cálculo da produtividade em células ( $p_X$ ) foi feito utilizando-se a equação 4, em que  $X_m$  é a concentração celular máxima,  $X_0$  a concentração celular inicial e  $t_{Xm}$  o tempo necessário para obtenção da máxima concentração celular.

$$p_X = (X_m - X_0) / t_{Xm} \quad (4)$$

O cálculo do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi feito utilizando-se a equação 5, em que  $S$  é concentração de substrato em um instante  $t$  e  $S_0$  é a concentração inicial de substrato.

$$Y_{X/S} = (X_m - X_0) / (S_0 - S) \quad (5)$$

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

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma das finalidades do trabalho foi investigar a viabilidade de emprego de solutos não convencionais (maltodextrina, sorbitol e frutooligossacarídeo) para a desidratação osmótica de abacaxi, buscando contribuir com o conhecimento científico relativo a esse processo e à sua aplicação na geração de produtos voltados para um mercado diferenciado. Os resultados obtidos na avaliação da cinética de desidratação com sacarose e maltodextrina, nas concentrações de 20, 30 e 40 °Brix, são apresentados no item 4.1.2. Os dados obtidos no processo realizado com sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo, nas concentrações de 30, 50 e 70 °Brix são apresentados no item 4.1.3.

O segundo objetivo do trabalho foi investigar a aplicabilidade da solução osmótica residual, obtida na desidratação dos frutos com cada um dos solutos testados, para a composição do meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* visando à produção de bioinseticida. Os resultados desta etapa do trabalho são apresentados no item 4.2.

### 4.1 - Desidratação Osmótica

#### 4.1.1 - Caracterização dos frutos de abacaxi in natura

A caracterização dos frutos de abacaxi *Ananas comosus*(L.) (Merrill) in natura utilizados nos ensaios de desidratação é apresentada na Tabela 6. Dados da literatura mostram que esses valores podem variar de acordo com a região do cultivo, tipo de solo e adubação empregada (Spironello et al., 2004). Brito et al. (2005) encontraram valores de teor de sólidos totais de 15,7 °Brix na caracterização de *Ananas comosus* (L.) Merrill. Viana et al. (2013), ao avaliar as características físico-químicas de diferentes variedades de abacaxi, observaram que para a variedade Pérola valor de sólidos totais de 12,33. Já para outras variedades como a Smooth Cayenne e Vitoria, foram observados 14,75 e 14,32, respectivamente. Para Ramallo e Mascheroni (2012), as características físico-químicas dos frutos de abacaxi estão diretamente ligadas ao seu grau de maturação, à variedade e ao local de origem.

Tabela 6: Propriedades dos frutos de abacaxi (*Ananascomosus*(L.) Merrill) utilizados nos experimentos de desidratação osmótica.

Propriedade	Especificação
Massa (g)	1.776,1
Comprimento c/ coroa (cm)	41,5
Comprimento s/ coroa (cm)	23,5
Diâmetro (cm)	36,8
Sólidos Solúveis (°Brix)	13,9

#### **4.1.2–Cinética da desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose e maltodextrina**

##### **4.1.2.1 - Sacarose**

Na Tabela 7, apresenta-se um resumo da análise fatorial (ANOVA) referente aos efeitos dos fatores concentração da solução, temperatura e tempo, e suas interações, sobre a perda de água ( $\omega$ ), o ganho de sólidos ( $\delta$ ) e a redução de massa ( $\mu$ ) das amostras de abacaxi submetidas à desidratação em soluções de sacarose nas concentrações de 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Observa-se que houve efeito significativo de todos os fatores sobre a perda de água pelo teste F ( $p < 0,01$ ). Porém, o efeito não foi significativo para as interações entre temperatura e tempo, bem como na interação conjunta entre os fatores. Com relação ao ganho de sólidos, observou-se efeito significativo tanto dos fatores isolados quanto da interação entre eles. Para a variável redução de massa, apenas a interação entre concentração e tempo não mostrou efeito significativo.

Tabela 7: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sacarose a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	GL	Quadrado Médio		
		Perda de Água	Ganho de Sólidos	Redução de Massa
<b>CONC</b>	2	1412.929 (*)	306.961 (*)	457.45150 (*)
<b>TEMP</b>	2	145.0666 (*)	13.42246 (*)	87.53487 (*)
<b>TP</b>	10	317.6815 (*)	59.49072 (*)	127.19160 (*)
<b>CONC*TEMP</b>	4	63.02616 (*)	2.120352 (*)	41.82449 (*)
<b>CONC*TP</b>	20	16.9439 (*)	7.375366 (*)	6.85410 (ns)
<b>TEMP*TP</b>	20	5.043965 (ns)	1.283397 (*)	11.47023 (*)
<b>CONC*TEMP*TP</b>	40	4.960227(ns)	0.895753 (*)	9.90158 (*)
<b>CV (%)</b>	-	22,1	20,6	23,8
<b>Resíduo TOTAL</b>	<b>396</b>	<b>6.435073</b>	<b>0.5312447</b>	<b>4.982054</b>

CONC – Concentração; TEMP – Temperatura; TP – Tempo. \* Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

A Tabela 7 mostra ainda que o coeficiente de variação, em percentual, CV (%), foi ligeiramente maior que 20, evidenciando que a eficiência de tomada dos dados foi regular. De acordo com Gomes (2000), o CV (%) dá uma ideia da precisão dos experimentos e quanto menor o coeficiente de variação, mais conciso é o experimento. De acordo com sua classificação, os valores de CV são considerados baixos quando inferiores a 10%, médios e altos quando estiverem na faixa de 10 a 20% e de 20 a 30%, respectivamente, e muito altos quando superiores a 30%.

Tendo em vista o fato de várias interações terem se mostrado significativas para os fatores que influenciaram a cinética de desidratação osmótica, procedeu-se a análise de regressão múltipla para todos os experimentos, optando-se por testar o modelo quadrático. Este tipo de análise ajuda a entender como determinadas variáveis influenciam outra variável, ou seja, verifica como o comportamento de uma variável pode mudar o comportamento de outra (Rodrigues, 2008). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) fornece uma informação auxiliar ao resultado da análise de variância da regressão, visando verificar se o modelo proposto é adequado ou não para descrever o fenômeno (Lima, 2007). Quanto maior o valor de  $R^2$ , mais explicativo é o modelo, melhor ele se ajusta à amostra (Rodrigues, 2008).

As equações de regressão quadrática estabelecidas para a perda de água, o ganho de sólidos e a redução de massa são apresentadas na Tabela 8, podendo ser utilizadas para a predição da cinética de desidratação osmótica de abacaxi utilizando sacarose nas concentrações testadas. Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) calculados para os parâmetros  $\omega$ ,  $\delta$  e  $\mu$  foram 90,97, 93,29 e 73,73%, respectivamente. Assim, considera-se que as equações obtidas são adequadas para descrever a relação entre as variáveis do processo (tempo, temperatura e concentração da solução) na desidratação osmótica de abacaxi quando sacarose é utilizada como soluto.

Tabela 8: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	Equação Quadrática	R (%)
Perda de água ( $\omega$ )	$\omega = -19,0352 + 0,036136 \alpha + 1,08653 \beta - 0,0921898 \gamma - 0,000145887 \alpha^2 - 0,00891523 \beta^2 + 0,0113806 \gamma^2 - 0,00883399 \beta \cdot \gamma + 0,00128973 \alpha \cdot \gamma$	90,97
Ganho de sólidos ( $\delta$ )	$\delta = 4,15714 - 0,0153214\alpha + 0,195096 \beta - 0,608855 \gamma - 0,0000370516 \alpha^2 - 0,00232591 \beta^2 + 0,0110172 \gamma^2 + 0,000172599 \beta \cdot \gamma + 0,00114807 \alpha \cdot \gamma + 0,0002856 \alpha \cdot \beta - 0,00000332312 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	93,29
Redução de massa ( $\mu$ )	$\mu = -20,7794 + 0,0507521 \alpha + 0,964011 \beta + 0,309254 \gamma - 0,000143316 \alpha^2 - 0,00820038 \beta^2 + 0,00298122 \gamma^2 - 0,00823911 \beta \cdot \gamma - 0,000201502 \alpha \cdot \beta + 0,0000130422 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	73,72

$\alpha$  - tempo;  $\beta$  - Temperatura;  $\gamma$  - Concentração

#### 4.1.2.1.1 – Perda de água

De acordo com Shi e Le Maguer (2002), durante a desidratação a saída de água e a entrada de solutos ocorrem principalmente nas primeiras 2 a 3 horas de imersão do alimento na solução osmótica. Depois disso, o teor de água entre o alimento e a solução osmótica diminui gradualmente, até que finalmente o sistema atinja um estado de equilíbrio dinâmico de transferência das moléculas. No presente trabalho, conforme pode ser visto na Figura 6, independente da concentração da solução de sacarose e da temperatura, as maiores taxas de saída de água ocorreram nos primeiros 30 a 40 min de processo, período que foi seguido por decréscimo gradual dos valores de  $\omega$ . Este mesmo comportamento foi descrito por Kowalska e Lenart (2001) em relação à desidratação de maçã, abóbora e cenoura em soluções de sacarose a 61,5%. Park et al. (2002) verificaram valores mais

elevados de  $\omega$  nos primeiros 40 min de imersão de cubos de pera em soluções osmóticas de sacarose a 40, 55 e 70 °Brix e temperatura de 40 °C. Tendência similar a esta foi verificada no trabalho de Dionello et al. (2007) sobre a desidratação de abacaxi em soluções de sacarose a 40 °C, na qual os aumentos dos valores de  $\omega$  foram significativos apenas nos 45 minutos iniciais do processo. Porém, ao elevar a temperatura para 50 °C, os autores constataram aumentos significativos no valor de  $\omega$  até 75 minutos depois de iniciado o processo. Ao utilizar concentrações de sacarose de 30, 50 e 70 °Brix, a 30 °C, na desidratação de jenipapo, Andrade et al. (2007) observaram maior perda de água nas duas primeiras horas de imersão.

Os resultados também evidenciaram que a perda de água das amostras foi favorecida em soluções mais concentradas de açúcar, comportamento característico do processo (Raoult-Wacket al., 1991; Rastogi et al., 2005) e relatado para frutas como manga (Souza-Neto et al., 2005), tomate (Telis et al., 2004), pera (Park et al., 2002), banana (Sousa et al., 2003), jenipapo (Andrade et al., 2007), maçã (Kaymak-Ertekin e Sultanoglu, 2000), goiaba (Queiroz et al., 2010) desidratadas com diferentes solutos.

Considerando as duas primeiras horas de processo, verificou-se que, com aumento da concentração da solução de 20 para 40 °Brix, a perda de água aumentou de 8 para 22%, a 30 °C, de 13 para 23%, a 40 °C e de 12 para 25%, a 50 °C. Valores de  $\omega$  de aproximadamente 38% foram observados por Dionello et al. (2007) após duas horas de desidratação de abacaxi em soluções de sacarose a 0,47 g.mL<sup>-1</sup>. Em outro trabalho sobre a desidratação osmótica de abacaxi, verificou-se também que soluções mais concentradas de sacarose levaram a maiores valores de  $\omega$ . Com 40, 50 e 60 °Brix, na temperatura de 40 °C, os valores de  $\omega$  foram de 19,6, 21,7 e 23,4% (Valente, 2007).

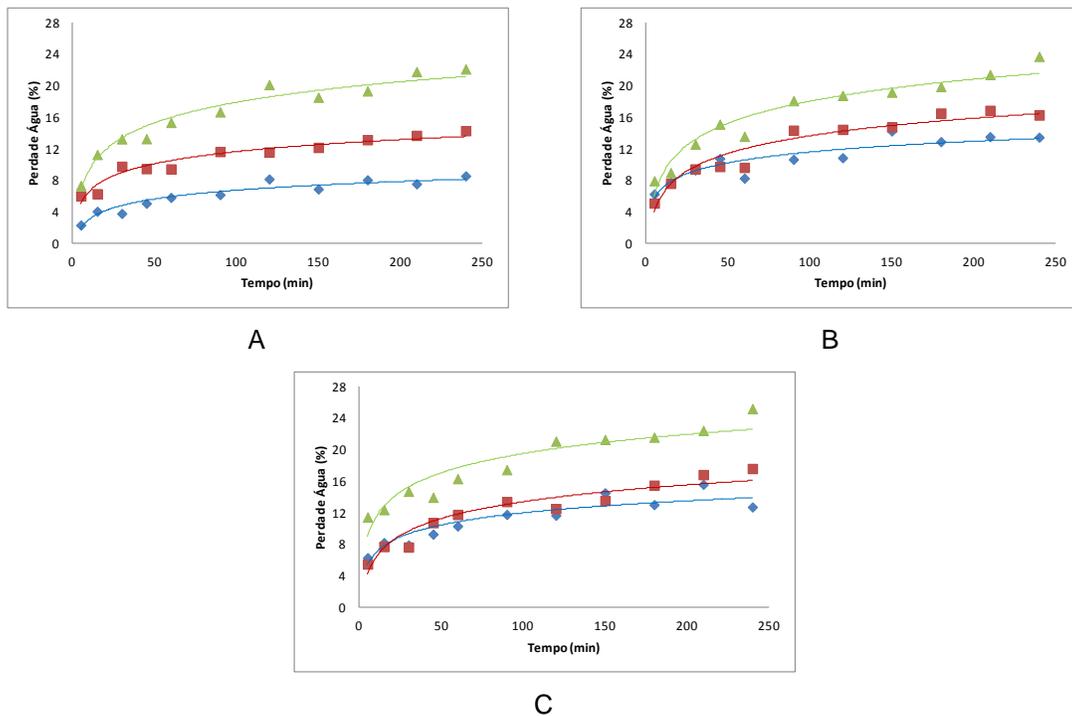


Figura 6- Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

Os dados obtidos também mostraram influência significativa da temperatura sobre a perda de água (Tabela 7), o que está de acordo com o comportamento esperado para o processo (Tortoe, 2010; Dhingra et al., 2008). O aumento da temperatura, até certo limite, aumenta a taxa de osmose, mas um aumento adicional afeta a permeabilidade das paredes das células e reduz a taxa de osmose. Quanto maior a temperatura, maiores serão as perdas dos componentes nutricionais, das alterações na cor, da estrutura e da deterioração da membrana celular (Dhingra et al., 2008). Souza (2007) também afirma que a temperatura empregada no processo influencia as propriedades do produto final, sendo considerada ótima a faixa entre 20 e 50 °C. No entanto, a faixa de 25-60 °C é citada como a mais utilizada no processo (Matusek e Meresz, 2002; Pan et al., 2003, Ade-Omowaye et al., 2002; Peiró-Mena et al., 2007; Singh et al., 2007). De acordo com Torregiani (1993), pode ocorrer o escurecimento enzimático e a alteração do sabor

de alimentos desidratados osmoticamente em temperaturas acima de 45 °C. Porém Contudo, Germer et al. (2010) verificaram que temperaturas no intervalo de 50 a 54,1 °C, para soluções de sacarose de 55 a 65 °Brix, proporcionaram maior perda de água na pré-secagem de pêssegos e os melhores resultados sensoriais dos produtos finais.

Verificou-se, no presente trabalho, que o efeito da concentração da solução foi mais evidente que o da temperatura (Figura 6). A perda de água aumentou de 8,5% para 12,7%, e de 22,1 para 25,2%, com o aumento da temperatura de 30 °C para 50 °C, nas soluções a 20 e 40 °Brix, respectivamente. Este resultado coincide com o comportamento relatado por Argandoña (1999), que mostra que a concentração da solução de sacarose influenciou mais fortemente as taxas de perda de água que a temperatura, na desidratação osmótica de goiabas. Heng et al. (1990) verificaram, por outro lado, que quanto maior a concentração da solução de sacarose (45, 55, 65 e 72 °Brix) e mais alta a temperatura (30, 50, 60 e 70 °C) empregada, maior a perda de água de amostras de mamão desidratados osmoticamente. Na desidratação de pera com o mesmo soluto em três concentrações (40, 55 e 70 °Brix) e 3 temperaturas (40, 50, 60 °C), Park et al. (2002) constataram que para a mais alta temperatura, a influência da concentração foi reduzida ao mínimo.

Singh et al. (2007) estudaram a cinética de transferência de massa durante a desidratação osmótica de cubos de cenoura a 35, 45 e 55 °C. Houve um aumento na taxa de perda de água, mas a taxa de ganho de soluto ficou relativamente estável com o aumento da temperatura da solução. O efeito do aumento da temperatura, em soluções altamente concentradas, pode ser devido à diminuição da viscosidade da solução osmótica, resultando em altas taxas de difusão de água e soluto.

As diferenças nas taxas de perda de água observadas entre os diferentes trabalhos podem ser justificadas não apenas pelas diferenças operacionais empregadas, mas também pelas características do tecido vegetal em cada caso (Rastogi e Raghavarao, 2004; Borin et al., 2008). A composição química (teores de proteína, carboidratos, lipídios e sais) e a estrutura física (porosidade, arranjo das células, orientação das fibras e tipo de casca) são fatores importantes para a cinética

de osmose de alimentos. A espécie, a variedade do fruto e o índice de maturação exercem influência significativa sobre a estrutura natural dos tecidos, no que concerne a estrutura da membrana celular, quantidade de sólidos insolúveis, espaços intercelulares, grau de compactação e grau de retenção de ar. Estas diferenças estruturais afetam substancialmente as trocas de massa por difusão entre o produto e o meio osmótico (Tortoe, 2010).

#### **4.1.2.1.2 – Ganho de sólido**

Na desidratação osmótica, a perda de água é acompanhada pela incorporação de sólidos em decorrência das trocas difusionais entre o produto e a solução durante todo o processo, devido aos gradientes de concentração (Torreggiani, 1993).

A Figura 7 apresenta os perfis de variação de  $\delta$  nas diferentes condições testadas. Fica evidente que o ganho de sólidos foi intensificado com o aumento da concentração da solução, à exceção do processo realizado a 50 °C, no qual não houve diferença nos perfis de  $\delta$  com 20 ou 30 °Brix. Constata-se também que, para qualquer temperatura testada, o emprego de solução com maior concentração de sacarose (40 °Brix) influenciou de forma mais decisiva o ganho de sólidos. Nesta solução, os valores de  $\delta$  foram de 7,1, 7,3 e 8,5% nos processos realizados a 30, 40 e 50 °C, respectivamente. O valor de  $\delta$  foi de apenas 1,5% a 30 °C e 20 °Brix e não passou de 4% quando a desidratação foi feita a 50 °C e 30 °Brix. Resultado similar foi observado por Lombard et al. (2008) na desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose de 45, 55 e 65 °Brix, temperatura de 30, 40 e 50 °C, por 240 min. O ganho de sólidos aumentou com o aumento da concentração e da temperatura, mas o efeito da concentração foi mais acentuado que o da temperatura. Waliszewski et al. (2002) e Ramallo et al. (2004) concluíram que o efeito da temperatura na desidratação osmótica de abacaxi não foi tão importante quanto o

aumento da concentração da solução, tanto para perda de água quanto para o ganho de sólidos.

Azoubel e Nurr (2004) relatam que na desidratação osmótica de tomate cereja com sacarose, o aumento dos gradientes de pressão osmótica com o aumento da concentração da solução resultou em maior perda de água e incorporação de sólido ao longo do tempo. Na desidratação de jenipapo, Andrade et al. (2007) também verificaram que concentrações mais altas de sacarose (50 e 70%) favoreceram a perda de água para a solução osmótica, com simultâneo ganho de sólidos. Percentuais de ganho de sólidos de 10 e 12% foram observados por Antônio (2002) na desidratação osmótica de mamão formosa e banana nanica, respectivamente, com soluções de sacarose entre 45 e 65 °Brix.

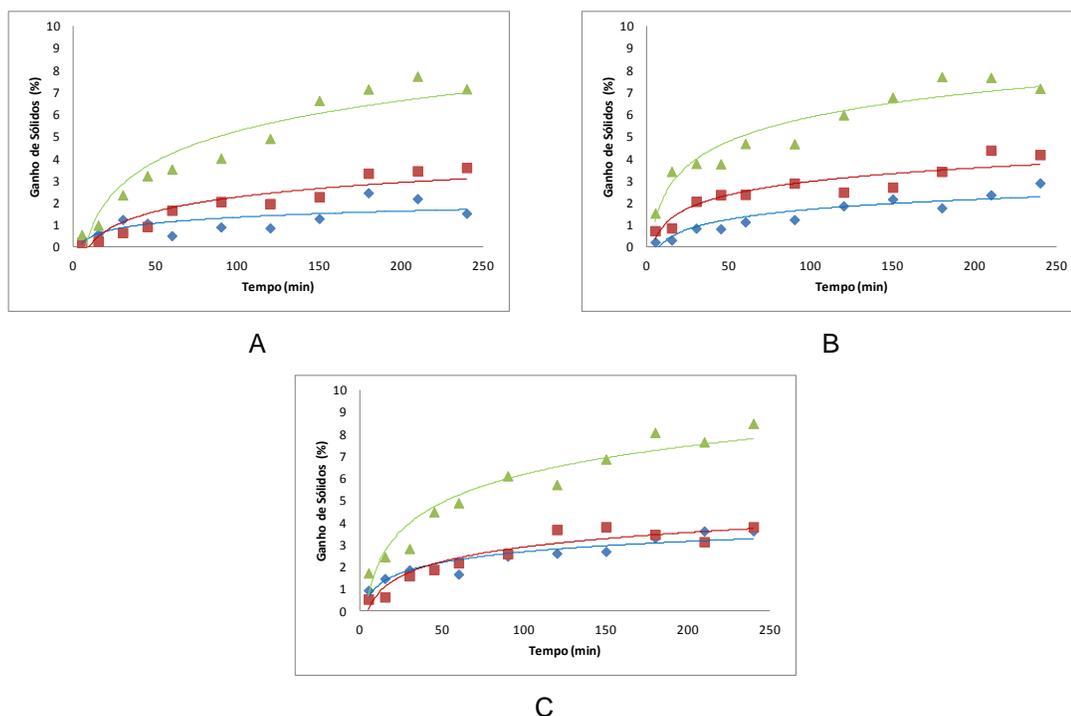


Figura 7 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

A temperatura da solução osmótica foi a variável que mais influenciou o ganho de sólidos na desidratação de melão (Ferrari et al., 2005), tomate (Tonon et al., 2006) e mamão (El-Aour et al., 2006). Por outro lado, Panagiotou et al. (1998), ao estudarem a modelagem de transferência de massa na desidratação osmótica de maçã, banana e kiwi em concentrações de sacarose de 30, 40 e 50% e temperaturas de 20, 40 e 60 °C, verificaram que, ao contrário do efeito significativo sobre a taxa de perda de água, o mesmo não foi observado em relação à temperatura do processo.

Em estudo sobre a desidratação de melão em soluções de sacarose a 40, 50, 60 e 70 °Brix e temperaturas de 20, 30 e 40 °C, Lima (2012) verificou valores similares de  $\delta$  utilizando solução a 40 ou 60 °Brix, a 40 °C. O menor valor de  $\delta$  (~6,2%) foi observado com 50 °Brix, enquanto o maior valor (~11,7%) foi encontrado com solução de 70 °Brix. Sob alguns aspectos, portanto, os dados diferem daqueles obtidos no presente trabalho. Por exemplo, com a maior temperatura empregada (50 °C) verificou-se aumento de duas vezes no valor de  $\delta$  com aumento da concentração da solução de 30 para 40 °Brix. De modo distinto, na desidratação de cilindros de manga a 30 °C, Giraldo et al. (2003) constataram que o ganho de sólidos e a perda de água foram maiores em solução de sacarose a 45 °Brix que naqueles tratados a 65 °Brix.

Sutar e Gupta (2007) estudaram a transferência de massa na desidratação osmótica de fatias de cebola em temperatura de 28, 43 e 58 °C. Tanto a perda de água quanto o ganho de sólidos aumentou com o aumento da temperatura. Temperaturas mais elevadas promoveram mais rápida perda de água em função da aceleração da dilatação das membranas celulares e da difusão de água no interior do produto, bem como pelas melhores características de transferência de água na superfície do produto, devido à menor viscosidade do meio osmótico. Elevados ganhos de sólidos a temperaturas mais elevadas podem ser devidos à destruição de estruturas de membranas celulares.

#### 4.1.2.1.3 – Redução de massa

A Figura 8 mostra a variação dos valores de  $\mu$  durante o processo nas diferentes condições avaliadas. Entre os três níveis empregados de sacarose, a solução a 40 °Brix foi a que proporcionou maior redução de massa. Neste caso, com temperatura de 30 ou 40 °C, os valores de  $\mu$  (14,9 e 15,5%, respectivamente) foram duas vezes maiores que aquele verificado no processo realizado com solução a 20 °Brix e 30 °C (7,0%). Em termos absolutos, o maior valor de redução de massa (16,8%) ocorreu com as amostras desidratadas a 50 °C em solução com concentração de 40 °Brix. O efeito da concentração sobre os valores de  $\mu$  foi mais evidente à temperatura de 30 °C.

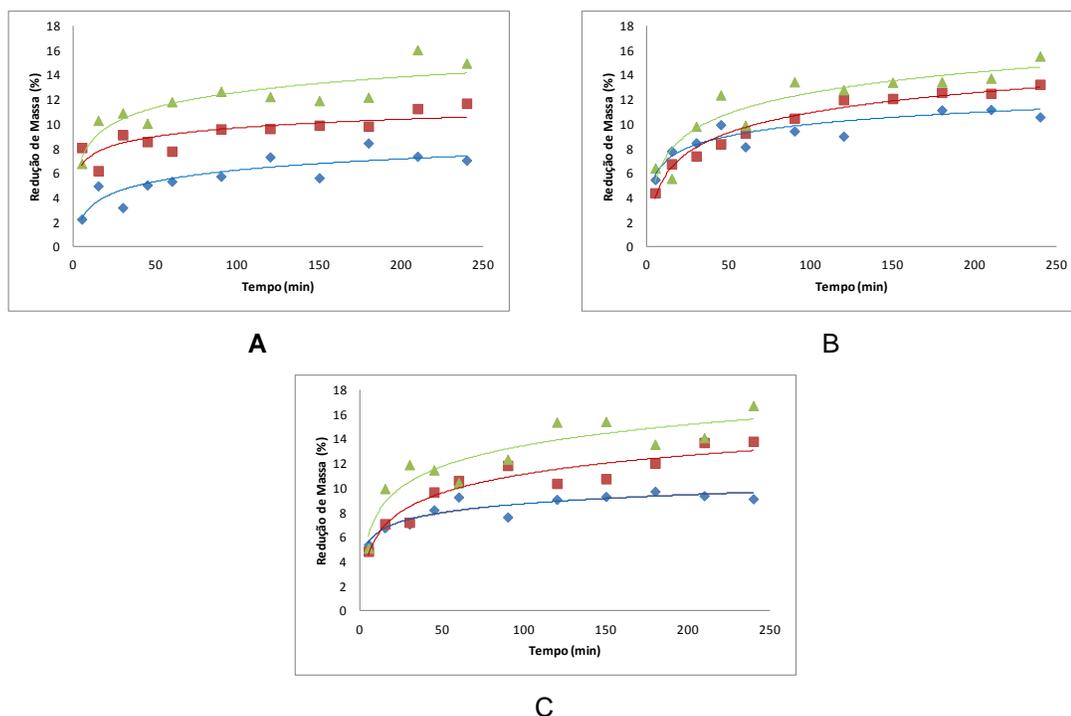


Figura 8 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

Os dados obtidos são condizentes com os observados por Almeida et al. (2005) na desidratação de manga Tommy, em que maiores valores de redução de massa foram observados com o aumento da concentração da solução osmótica. Ao desidratar goiaba em solução de sacarose a 65 °Brix e temperatura de 30 a 50 °C, Panadés et al. (2006) observaram que os valores de redução de massa variaram entre 16 e 37%, em processos realizados por 3 horas. Queiroz et al. (2010), também em trabalho sobre desidratação de goiabas, verificaram que os maiores valores de  $\mu$  foram obtidos nos tratamentos que levaram à maior perda de água. Esse mesmo comportamento foi verificado no presente trabalho.

Dionello et al. (2007) verificaram o aumento na redução de massa de amostras de abacaxi, quando imersos em soluções de sacarose a 40 °C foi significativo apenas nos primeiros 45 minutos do processo realizado por 120 minutos. A 50 °C, as alterações no valor de  $\mu$  continuaram a ocorrer até 75 minutos depois de iniciado o processo, mostrando que o aumento da temperatura da solução de 40 para 50 °C prolongou o intervalo de tempo em que ocorreram reduções na massa das amostras, aumentando, provavelmente, a eficiência do processo de desidratação. De modo geral, os autores verificaram que amostras desidratadas a 50 °C apresentaram redução de massa superior àquelas desidratadas a 40 °C, para todas as concentrações estudadas, mostrando claramente o efeito da temperatura no processo.

Na desidratação de melão amarelo em sacarose, Lima (2012) verificou que, para todos os valores de concentração da solução osmótica (40, 50, 60 e 70 °Brix), os menores valores de  $\mu$  foram obtidos com temperatura de 20 °C. Com aumento da temperatura para 30 ou 40 °C, maiores valores de  $\mu$  só foram observados nas soluções a 50 e 60 °Brix. Os dados obtidos no presente trabalho são similares aos de Lima (2012), uma vez que a menor temperatura empregada levou ao menor valor de  $\mu$ , usando solução de menor concentração.

#### 4.1.2.2 - Maltodextrina

A Tabela 9 apresenta um resumo da análise fatorial referente aos efeitos dos fatores temperatura, tempo e concentração, bem como de suas interações, sobre a perda de água, ganho de sólidos e redução de massa na desidratação osmótica de abacaxi em soluções de maltodextrina. Verificou-se que todos os fatores estudados (concentração, temperatura, tempo), bem como as interações entre eles, mostraram influência significativa, pelo teste F ( $p < 0,01$ ), sobre a perda de água, o ganho de sólidos e a redução de massa. Os valores de coeficiente de variação (CV), entre 22 e 25%, evidenciam que a coleta de dados pode ser classificada como regular (Gomes, 2000).

Tabela 9: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em solução de maltodextrina a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	GL	Quadrado Médio		
		Perda de Água	Ganho de Sólidos	Redução de Massa
<b>CONC</b>	2	707.2944 (*)	0.531245 (*)	664.4611 (*)
<b>TEMP</b>	2	142.9424 (*)	0.531245 (*)	134.2947 (*)
<b>TP</b>	10	185.1413 (*)	0.531245 (*)	131.4912 (*)
<b>CONC*TEMP</b>	4	60.02734 (*)	0.531245 (*)	104.294 (*)
<b>CONC*TP</b>	20	27.01165 (*)	0.531245 (*)	24.06507 (*)
<b>TEMP*TP</b>	20	19.92103 (*)	0.531245 (*)	11.54248 (*)
<b>CONC*TEMP*TP</b>	40	23.16167 (*)	0.531245 (*)	24.50113 (*)
<b>CV (%)</b>		23,5	25,4	22,1
<b>Resíduo TOTAL</b>	<b>396</b>	<b>6.435073</b>	<b>0.5312447</b>	<b>4.982054</b>

CONC – Concentração; TEMP – Temperatura; TP – Tempo. \* Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

A fim de descrever a influência dos fatores analisados sobre a desidratação osmótica com maltodextrina foi realizada a análise de regressão quadrática dos dados. As equações obtidas são apresentadas na Tabela 10. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para perda de água, ganho de sólidos e redução de massa foi de 62,66, 63,43% e 56,46%. Esses valores mostram que as equações não podem ser consideradas totalmente adequadas para descrever a relação entre as variáveis do processo (tempo, temperatura e concentração da solução) nas condições estudadas, sendo necessária a avaliação de outros modelos. Dionello et al. (2007) obtiveram melhor ajuste ( $R^2 > 0,90$ ) dos dados experimentais usando o modelo cúbico (regressão de terceiro grau) na desidratação de abacaxi em soluções de sacarose.

Tabela 10: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de maltodextrina a 20, 30 e 40 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	Equação Quadrática	$R^2$ (%)
Perda de água ( $\omega$ )	$\omega = 68,1059 + 0,0327191\alpha - 1,32908\beta - 2,56332\gamma + 0,00000675785\alpha^2 + 0,0191394\beta^2 + 0,0467475\gamma^2 - 0,00807671\beta\gamma - 0,00129617\alpha\gamma - 0,000437542\alpha\beta + 0,0000441177\alpha\beta\gamma$	62,66
Ganho de sólidos ( $\delta$ )	$\delta = 9,45873 - 0,00876797\alpha - 0,0750451\beta - 0,500817\gamma - 0,00000374118\alpha^2 + 0,000273305\beta^2 + 0,00655696\gamma^2 + 0,00217855\beta\gamma + 0,000139122\alpha\beta + 0,000843316\alpha\gamma - 0,0000130544\alpha\beta\gamma$	63,43
Redução de massa ( $\mu$ )	$\mu = 55,9859 + 0,140063\alpha - 0,774093\beta - 2,52055\gamma - 0,0000755662\alpha^2 + 0,010082\beta^2 + 0,0401107\gamma^2 + 0,00110811\beta\gamma - 0,00378802\alpha\gamma - 0,00208566\alpha\beta + 0,0000816206\alpha\beta\gamma$	56,46

$\alpha$  - tempo;  $\beta$  - Temperatura;  $\gamma$  - Concentração

#### **4.1.2.2.1 – Perda de água**

A variação dos valores de perda de água com o tempo, nas diferentes condições de processo, é apresentada na Figura 9. Observam-se perfis cinéticos similares nos tratamentos a 30 °C e concentração da solução de 20 e 30 °Brix. Em valores absolutos, os maiores valores de  $\omega$  (18,9 e 13,5%, respectivamente) foram observados nestas mesmas soluções, mas à temperatura de 50 °C. O uso de solução a 40 °Brix, em qualquer temperatura, resultou em diminuição expressiva da perda de água. A 50 °C, o valor de  $\omega$  foi mais que a metade (9,1%) daquele obtido no processo realizado a 30 °Brix.

Resultado distinto foi obtido Khan et al. (2011) na desidratação de maçã com maltodextrina nas concentrações de 40, 50 e 60 °Brix, a 40, 50 e 60 °C. A perda de água foi maior na condição em que foi empregada maior concentração e maior temperatura. Os valores absolutos de  $\omega$  não foram citados pelos autores. Outra diferença observada entre os dois trabalhos refere-se à variação dos valores de  $\omega$  com o tempo. Para todas as concentrações do agente osmótico, e para todas as temperaturas, a variação de  $\omega$  com o tempo ocorreu de forma não linear.

Ao desidratar pepinos com oligofrutose e maltodextrina, Dermesonlouoglou et al. (2008) verificaram aumento na taxa de perda de água e ganho de soluto com o aumento da temperatura da solução. O efeito do aumento da temperatura com solução mais concentrada foi atribuído em parte à diminuição da viscosidade da solução osmótica, resultando em taxas de difusão mais elevadas de água e soluto. De fato, o aumento da viscosidade da solução aumenta a resistência à transferência de massa, uma vez que o coeficiente de difusão é inversamente proporcional à viscosidade do sistema (Rastogi et al., 2005).

Córdova (2006) afirma que diferenças das características do tecido vegetal como compactação, massa inicial de substâncias não voláteis, enzimas presentes, tamanho dos espaços intracelulares, presença de gás retido nos capilares e

complexos de pectina e celulose, e grau de geleificação, também determinam a cinética do processo de desidratação.

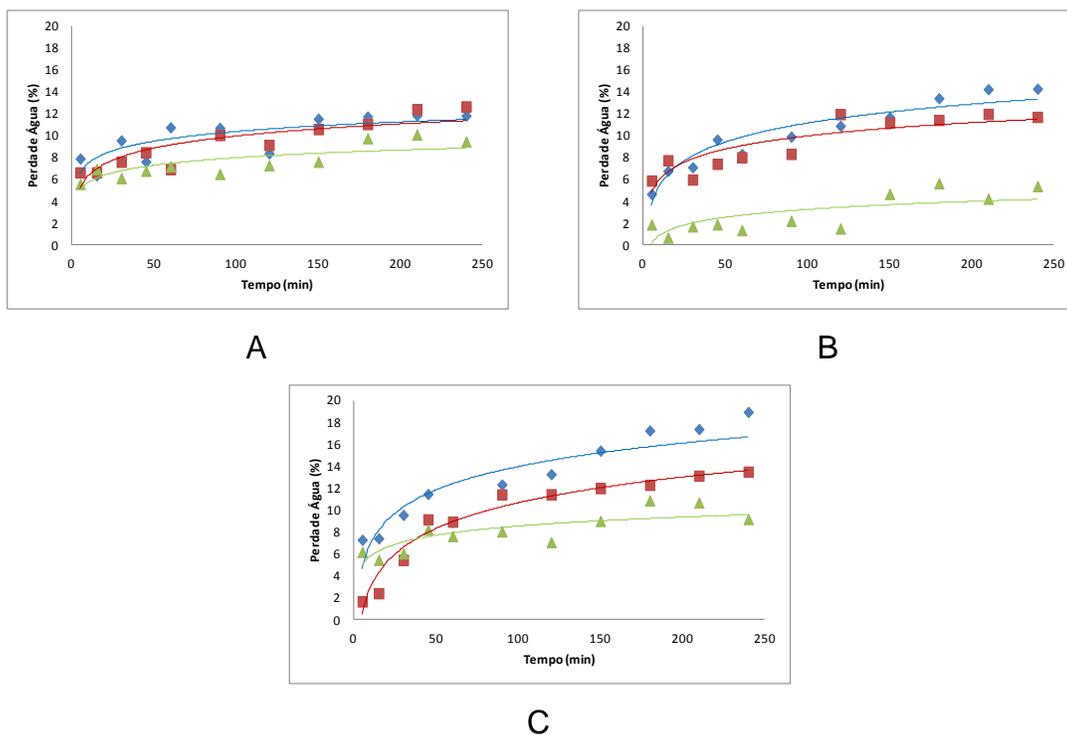


Figura 9 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

#### 4.1.2.2.2 – Ganho de sólidos

Os perfis cinéticos de ganho de sólidos são apresentados na Figura 10. Nota-se que os menores valores de  $\delta$  foram verificados no processo com maior concentração (40 °Brix) da solução osmótica, para todas as temperaturas testadas, atingindo apenas 1,9% a 50 °C. Os maiores valores de  $\delta$  foram obtidos na solução a 30 °Brix, a 30 e 40 °C (3,1 e 3,3, respectivamente).

Os resultados diferem daqueles obtidos por Khan et al. (2011) na desidratação de maçãs com maltodextrina, em que foi observado aumento do ganho de sólidos

com o aumento da temperatura. Os resultados foram também contrários aos observados por Ispir e Togrul (2009) na desidratação de damasco com maltodextrina em concentrações de 40 a 70% e temperaturas de 25 a 45 °C. Neste caso, o aumento da concentração da solução resultou em aumento dos gradientes de pressão osmótica e, por conseguinte, em maior perda de água e maior ganho de sólidos durante a osmose.

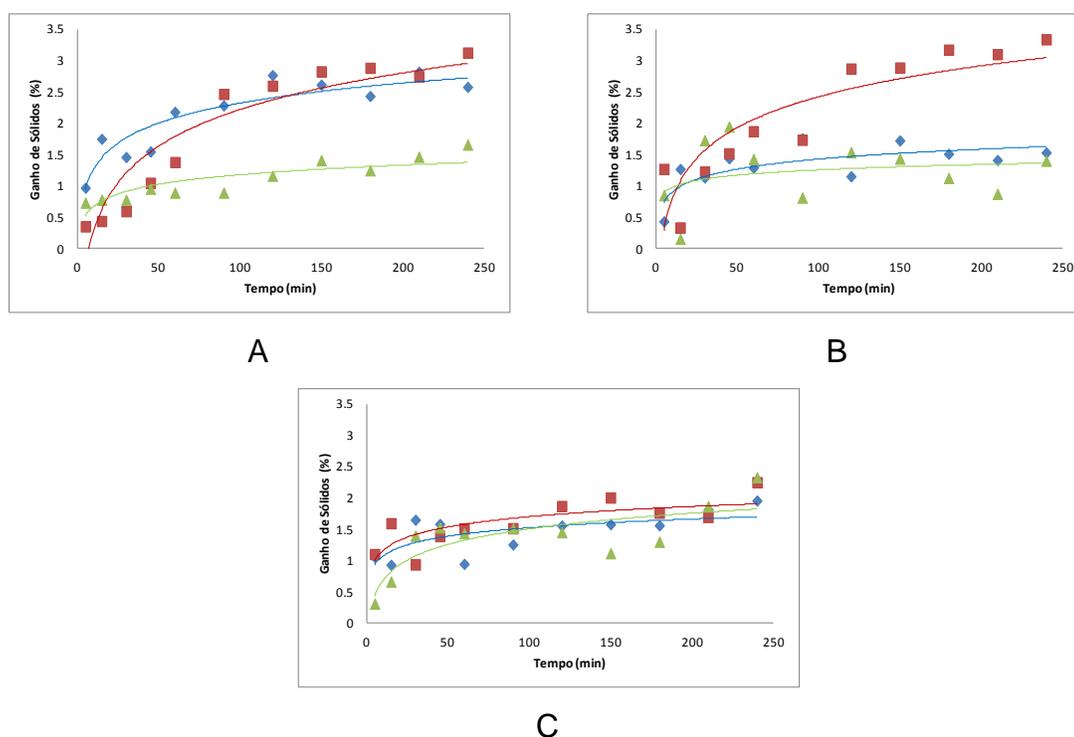


Figura 10 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

Embora os autores citados (Khan et al., 2011; Ispir e Togrul, 2009) tenham relatado o uso de concentrações de maltodextrina de 50, 60 e 70 °Brix, não foi possível, no presente trabalho, preparar soluções com concentração acima de 40 °Brix. É possível que isto seja decorrente de diferenças na composição da maltodextrina empregada, uma vez que sua composição pode variar conforme a

fonte de matéria-prima e o método usado para sua produção (Wang e Wang, 2000). As maltodextrinas são produtos da hidrólise do amido obtidos através da catálise ácida ou de uma ação enzimática específica. São classificadas pelo seu grau de hidrólise, expresso em dextrose equivalente (DE), que é a porcentagem de açúcares redutores calculados como glicose em relação ao peso seco do amido. Para valores de DE muito maiores que 20, o produto é constituído por oligômeros curtos que são solúveis em água, ao passo que DE menor que 20, caso das maltodextrinas, há uma proporção suficiente de cadeias poliméricas longas para diminuir a solubilidade. As maltodextrinas são, portanto, uma mistura de materiais de alta e baixa massa molecular (Loret et. al., 2004).

As taxas de fluxo de massa dependem da concentração da solução e das propriedades físicas associadas a ela, tais como densidade e viscosidade (Chenlo et al., 2002). O aumento da viscosidade da solução osmótica representa uma barreira para a transferência de massa da solução para a fruta. Além disso, soluções mais concentradas limitam a entrada de sólido no produto pela formação de uma camada do soluto na superfície da amostra (Ferrari et al., 2005). Esta pode ser uma razão para explicar o resultado obtido com solução de maltodextrina a 40 °Brix.

Levando em conta o aspecto da qualidade do produto, Lenart (1996) e Tregunno e Goff (1996) descreveram que quanto menor o ganho de sólidos no processo de desidratação osmótica melhor é o resultado em termos de cor, textura e sabor do produto final, o qual se manterá próximo ao sabor da fruta *in natura*. Quanto maior a perda de água, menor será a atividade de água, favorecendo o aumento da vida de prateleira.

#### **4.1.2.2.3 – Redução de massa**

A Figura 11 mostra o perfil cinético de redução de massa nas diferentes condições avaliadas. Os maiores valores de  $\mu$  foram observados nas soluções a 20 e 30 °Brix, o que está coerente com os valores encontrados para  $\delta$  e  $\omega$  nestas

condições, uma vez que são parâmetros intrinsecamente relacionados. Com solução de 20 °Brix a redução de massa foi de 14,3% a 30 °C, enquanto com 30 °Brix esse valor foi de 12,4% a 50 °C. Com a solução a 40°Brix, os valores de  $\mu$  foram de 5,8, 8,7 e 6,8%, a 30, 40 e 50 °C, respectivamente.

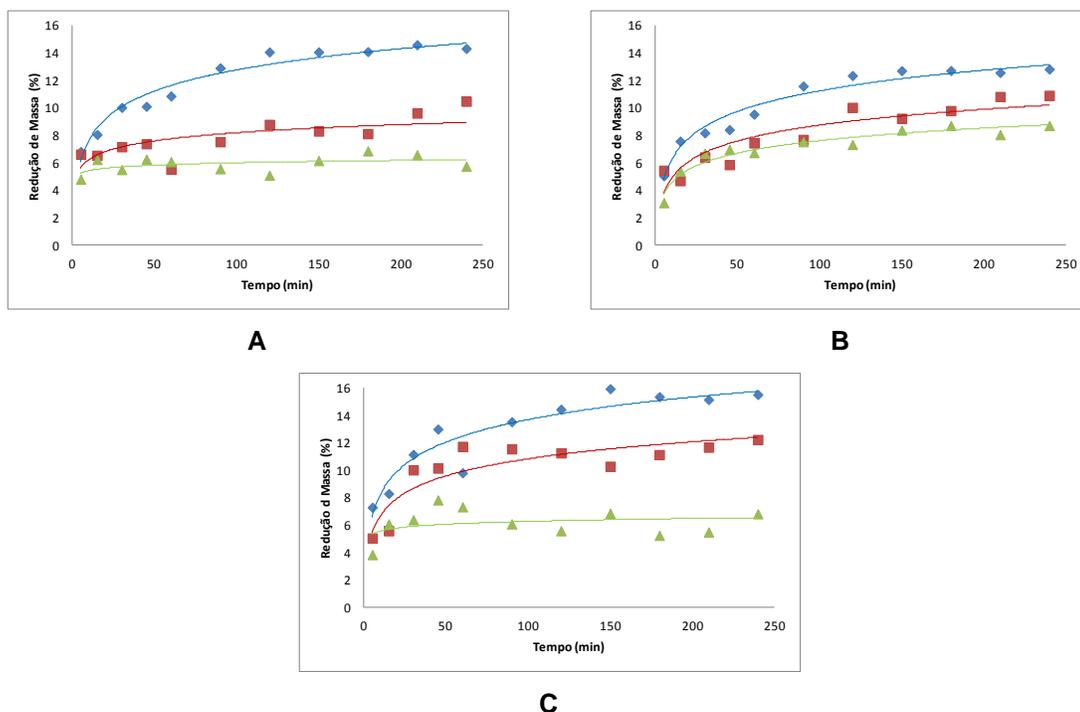


Figura 11 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de maltodextrina a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 20 °Brix (♦), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

#### 4.1.2.3 – Comparação da cinética de desidratação em sacarose e maltodextrina

A comparação dos resultados obtidos com os dois solutos utilizados (sacarose e maltodextrina) mostrou um comportamento distinto em relação ao efeito da concentração da solução osmótica e da temperatura sobre os diferentes parâmetros cinéticos. Fica evidente na Figura 12 que a solução de sacarose, sobretudo a de 40 °Brix foi a que apresentou maiores taxas de perda de água para todas as

temperaturas testadas. Em termos absolutos, nesta condição, a taxa de perda de água com sacarose ficou entre 22 e 25%, enquanto para soluções de maltodextrina, na mesma concentração, os valores de  $\omega$  variaram entre 5 e 9% para as diferentes temperaturas. Estas diferenças se devem possivelmente às diferenças de solubilidade, viscosidade e de massa molecular dos dois solutos. O valor de dextrose equivalente da maltodextrina (<20) indica sua menor solubilidade que sacarose. Maltodextrinas constituem misturas de oligômeros de diferentes massas moleculares (Loret et. al., 2004), o que impede uma comparação direta com a massa molecular da sacarose. Ao comparar o processo osmótico de desidratação de damasco com sacarose e maltodextrina, Ispir e Togrul (2009) observaram que a perda de água foi maior em solução de sacarose, o que está de acordo com o obtido no presente trabalho.

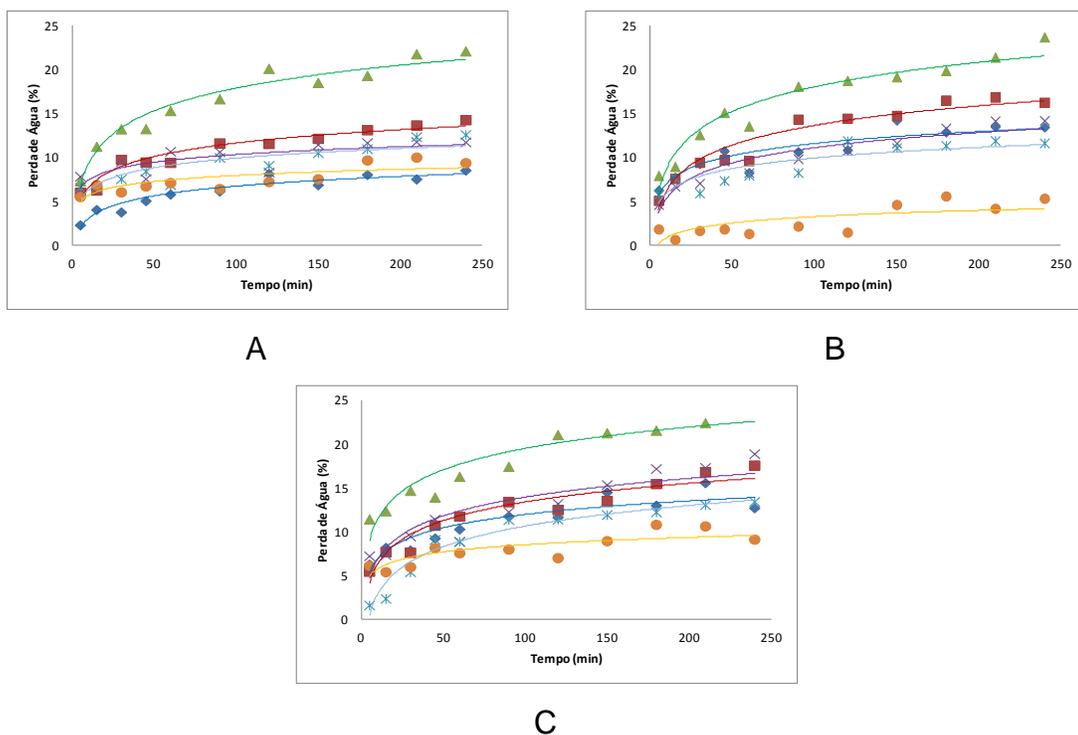


Figura 12 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (♦), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (×), 30 °Brix (×) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C).

A Figura 13 mostra a comparação do desempenho dos dois solutos na cinética de ganho de sólidos. Assim como aconteceu para perda de água, as taxas de ganho de sólido foram maiores com sacarose, para qualquer concentração e qualquer temperatura. Com 40 °Brix, os valores de  $\delta$  variaram de 7,2 a 8,5% para as diferentes temperaturas. Em maltodextrina a 40 °Brix, os valores de  $\delta$  variaram de 1,3 a 2,3%. Os resultados foram contrários aos observados no trabalho de Ispir e Togrul (2009), em que o ganho de sólido foi favorecido na solução de maltodextrina em comparação com sacarose. Os autores verificaram que para algumas temperaturas utilizadas, os valores de  $\delta$  foram quase duas vezes maiores que os alcançados com sacarose.

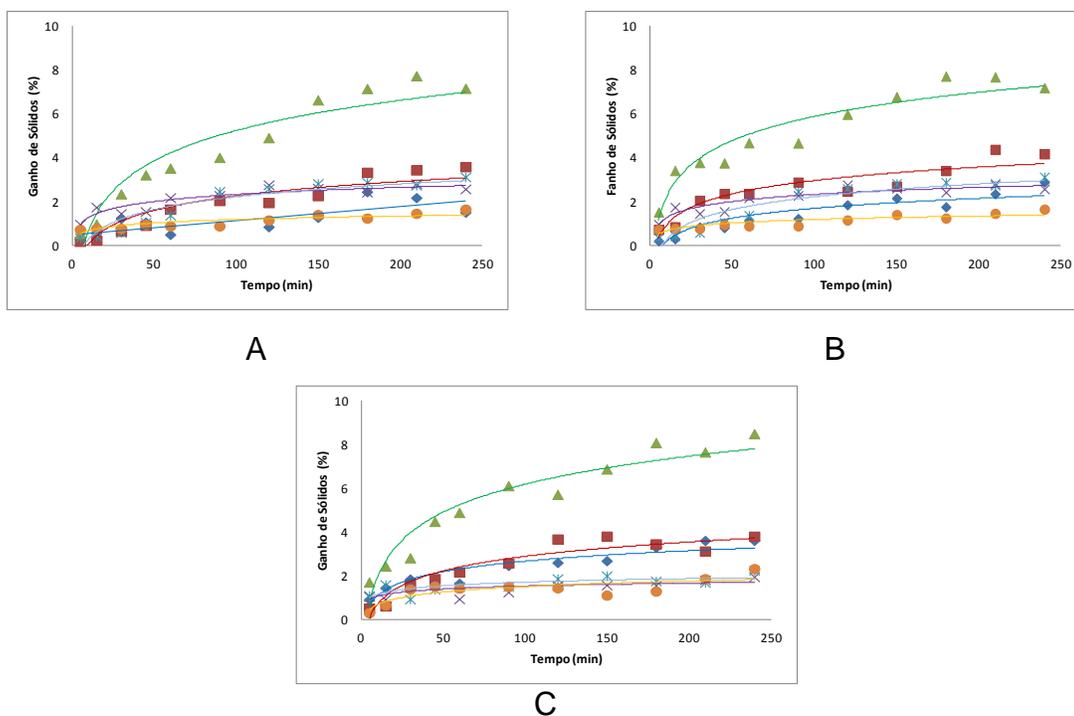


Figura 13 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (×), 30 °Brix (⊗) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C).

Quando sacarose foi utilizada como agente desidratante, observou-se que quanto maior a concentração da solução, maiores os valores de redução de massa (Figura 14), ao contrário do observado com maltodextrina. Com este último soluto, a solução com menor concentração (20 °Brix) foi a que apresentou maiores valores de  $\mu$ . A cinética de redução de massa a 30 e 50 °C foi coincidente para concentrações de sacarose a 40 °Brix e maltodextrina a 20 °Brix.

Não foram encontrados dados na literatura referentes à cinética de redução de massa para o processo de desidratação de abacaxi com maltodextrina e sacarose. No entanto, para outras frutas, como damasco, Ispir e Togrul (2009) verificaram que ao utilizar diferentes solutos na composição da solução osmótica, em concentrações que variavam de 40 a 70 °Brix, as soluções compostas com sacarose influenciaram mais fortemente a redução de massa que maltodextrina.

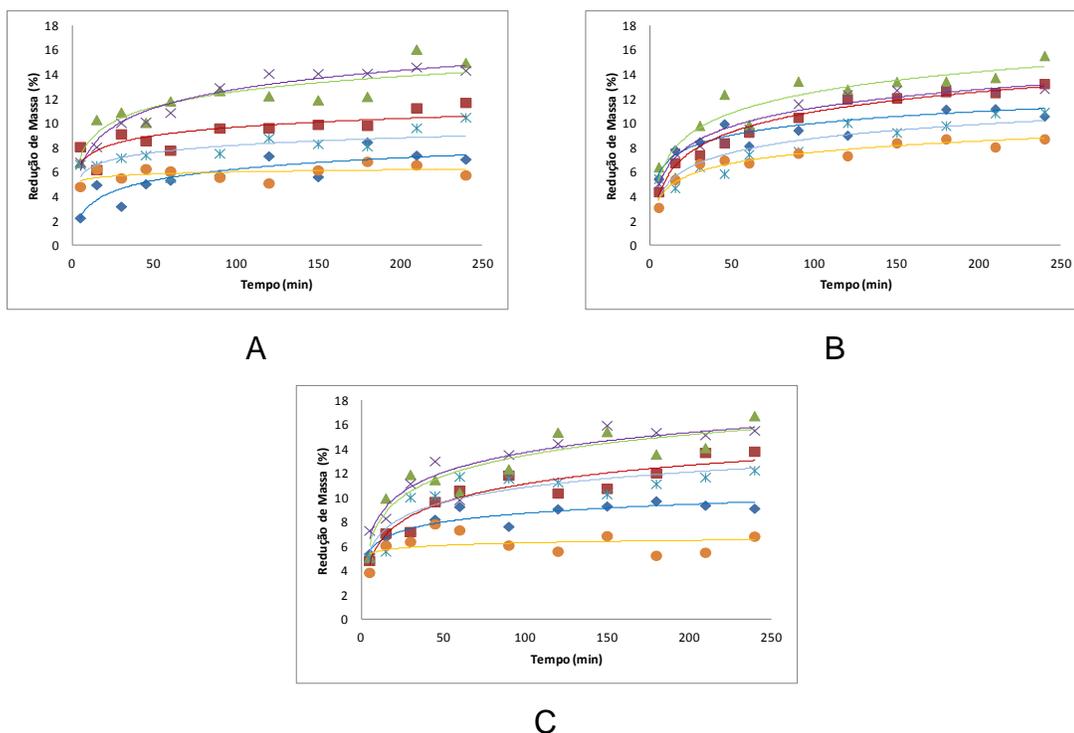


Figura 14 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose (20 °Brix (◆), 30 °Brix (■) e 40 °Brix (▲)) e de maltodextrina (20 °Brix (×), 30 °Brix (✱) e 40 °Brix (●)) a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C).

Aouar et al. (2006) estudaram a influência do agente osmótico na desidratação de mamão papaia, utilizando soluções sacarose e xarope de milho em concentração de 44% a 56%, temperatura entre 34 a 46 °C e tempo de imersão de 120-210 min. Os resultados mostraram que para uma mesma pressão osmótica, os valores obtidos para a perda de água, redução de massa e ganho de sólido para a desidratação em solução de sacarose foram mais elevados do que os obtidos com xarope de milho, devido à alta viscosidade e ao conteúdo de polissacarídeos deste último.

De acordo com Ravindra e Chattopadhyay (2000), a relação entre o ganho de sólidos e a perda de água ( $\delta/\omega$ ) pode ser eficaz para avaliar as melhores condições para um processo de desidratação osmótica. Baixos valores de  $\delta/\omega$  determinam a melhor condição de desidratação osmótica. Quanto menor o valor dessa relação, menor será o ganho de sólidos e maior a perda de água do produto no processo, para um mesmo ensaio. Esse critério foi adotado por Valente (2007) para a escolha das melhores condições de processamento osmótico de abacaxi. Segundo o autor, a maximização da perda de água não é suficiente para alcançar as melhores condições de processamento, uma vez que isso resultaria em produtos com alta incorporação de solutos. Em contrapartida, uma minimização do ganho de sólidos resultaria em um produto com baixa perda de água.

Na Tabela 11 são mostrados os valores de  $\omega$ ,  $\delta$  e  $\mu$ , assim como da relação  $\delta/\omega$ , calculados para os diferentes tratamentos. Segundo o critério sugerido por Ravindra e Chattopadhyay (2000), e considerando-se as condições operacionais empregadas, conclui-se que maltodextrina é mais indicada para o processo de desidratação de abacaxi que sacarose, na faixa de concentração estudada. A menor relação  $\delta/\omega$  (0,06) foi verificada na concentração de 20 °Brix e temperatura de 50 °C. Nesta mesma temperatura, com concentrações de 30 e 40 °Brix, a relação foi de 0,12, bem menor que os valores encontrados com 30 e 40 °C. Os valores da relação  $\delta/\omega$  calculados na desidratação com sacarose foram superiores. Porém, a condição

de escolha para a desidratação da fruta com este soluto seria concentração de 20 °Brix e temperatura de 30 °C, que implicaram em relação  $\delta/\omega$  de 0,17.

Tabela 11: Perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ), redução de massa ( $\mu$ ) e relação  $\delta/\omega$  após 4h de desidratação osmótica de pedaços de abacaxi em solução de sacarose e de maltodextrina.

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
Tratamento	Temperatura (°C)	$\omega$	$\delta$	$\mu$	$\delta/\omega$
Sacarose 20 °Brix	30	8,5	1,5	7,1	0,17
	40	13,5	2,9	10,6	0,21
	50	15,7	3,6	10,2	0,22
Sacarose 30 °Brix	30	17,2	3,6	11,2	0,20
	40	15,3	6,2	12,7	0,40
	50	17,6	4,0	13,9	0,22
Sacarose 40 °Brix	30	22,1	7,2	14,9	0,32
	40	23,7	9,2	14,6	0,39
	50	25,2	8,5	16,7	0,33
Maltodextrina 20 °Brix	30	11,8	2,6	14,3	0,22
	40	11,2	1,5	12,5	0,13
	50	14,9	0,9	11,8	0,06
Maltodextrina 30 °Brix	30	14,6	4,1	10,5	0,28
	40	14,6	3,7	9,1	0,25
	50	17,5	2,2	13,4	0,12
Maltodextrina 40 °Brix	30	6,4	1,6	4,8	0,25
	40	5,3	1,4	9,0	0,26
	50	9,1	1,1	6,8	0,12

No entanto, outros fatores devem ser levados em conta na seleção do agente osmótico. O custo do soluto, sua compatibilidade organoléptica com o produto final e a ação adicional de preservação são fatores a ser considerados na escolha (Torreggiani, 1995). Além de eficaz e barato, deve ser prático, não tóxico, ter sabor agradável, ser prontamente dissolvido para obtenção de soluções com alta concentração e não deve reagir com o alimento (Yadav e Singh, 2012).

O objetivo final do produto a ser obtido na desidratação constitui outro fator a ser levado em conta na avaliação das condições a ser empregadas no processo osmótico. Maltodextrinas são sugeridas para desidratação de frutas e vegetais quando o objetivo é a redução do sabor adocicado, comparado com sacarose (Lenart, 1996). Muitas de suas outras propriedades funcionais são também de interesse na indústria de alimentos, por proporcionarem características desejáveis a alimentos processados. Podem ser utilizadas como agente espessante, para auxiliar a secagem por atomização, como substituto de gorduras, como formador de filmes, no controle do congelamento, para prevenir cristalizações e como complemento nutricional (Wang e Wang, 2000). Outras aplicações possíveis incluem o uso como ingrediente na encapsulação de aromas e corantes, na panificação, na confeitaria, em produtos lácteos, sobremesas e outros (Loret et. al., 2004).

#### **4.1.3 - Cinética da desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo (FOS)**

A segunda etapa no processo de desidratação osmótica de fatias de abacaxi consistiu na utilização de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo na composição da solução desidratante. Para todos os solutos foram empregadas concentrações de 30, 50 e 70 °Brix, em temperaturas de 30, 40 e 50 °C. Para cada um dos tratamentos testados foram construídas curvas de cinética para a perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ). Também foi realizada análise de variância, buscando identificar o nível de significância da influência destas variáveis sobre os parâmetros de desidratação.

##### **4.1.3.1 - Sacarose**

A Tabela 12 apresenta um resumo da análise de variância referente aos efeitos dos fatores concentração, temperatura e tempo, e suas interações, sobre a

perda de água, ganho de sólidos e redução de massa, das amostras de abacaxi na desidratação utilizando sacarose como agente desidratante. Observa-se que todos os fatores independentes e suas interações apresentaram efeito significativo, ao em nível de 1% pelo teste F ( $p < 0,01$ ), sobre a perda de água e o ganho de sólidos. No entanto, em relação à redução de massa, o efeito só não foi significativo para a interação entre os fatores concentração e tempo de imersão.

Para todas as análises fatoriais realizadas, foram encontrados valores de coeficiente de variação, CV (%), entre 13 e 20%, mostrando eficiência na tomada dos dados (Tabela 12). A fim de estimar a relação entre os fatores testados, foi feita análise de regressão múltipla (quadrática) referente aos efeitos significativos. As equações são mostradas na Tabela 13. Valores de  $R^2$  de 94,48, 95,48 e 77,53 %, para perda de água, ganho de sólidos e redução de massa, respectivamente, atestam o grau de adequação dos modelos aos valores experimentais.

Tabela 12: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sacarose a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	GL	Quadrado Médio		
		(Perda de Água)	(Ganho de Sólidos)	(Redução de Massa)
<b>CONC</b>	2	1062.894 (*)	1191.602 (*)	50.42266 (*)
<b>TEMP</b>	2	622.3073 (*)	62.95569 (*)	251.2717 (*)
<b>TP</b>	10	683.6869 (*)	227.3386 (*)	140.4465 (*)
<b>CONC*TEMP</b>	4	78.80929 (*)	12.04781 (*)	45.26182 (*)
<b>CONC*TP</b>	20	31.41334 (*)	20.73218 (*)	4.252199 (ns)
<b>TEMP*TP</b>	20	12.44234 (*)	5.251723 (*)	8.099506 (*)
<b>CONC*TEMP*TP</b>	40	10.68344 (*)	3.970276 (*)	7.601298 (*)
<b>CV (%)</b>		13,4	20,09	17,06
<b>Resíduo TOTAL</b>	<b>396</b>	<b>5.913846</b>	<b>2.584597</b>	<b>3.480233</b>

CONC – Concentração; TEMP – Temperatura; TP – Tempo. \* Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

#### 4.1.3.1.1 – Perda de água

A maior concentração de sacarose (70 °Brix) levou às maiores taxas de perda de água para qualquer temperatura empregada (Figura 15). Este comportamento deve-se ao aumento na pressão osmótica no exterior da fruta (Torregiani, 1993; Mizrahi et al., 2001).

Com relação à influência da temperatura no processo, nota-se que a maior temperatura, 50 °C, implicou em maiores valores de  $\omega$ . O mesmo foi observado por Dionello et al. (2007) na desidratação osmótica de fatias de abacaxi em temperaturas de 40 e 50 °C.

Tabela 13: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	Equação Quadrática	$R^2$ (%)
Perda de água ( $\omega$ )	$\omega = - 16,3601 + 0,0704161 \alpha + 0,439996 \beta + 0,298816 \gamma - 0,0000698888 \alpha^2 - 0,00416735 \beta^2 - 0,00142415 \gamma^2 - 0,00184553 \beta \cdot \gamma - 0,0015523 \alpha \cdot \beta - 0,00085036 \alpha \cdot \gamma + 0,0000429004 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	94,48
Ganho de sólidos ( $\delta$ )	$\delta = - 11,3353 + 0,104145 \alpha + 1,00116 \beta - 0,189252 \gamma - 0,000167766 \alpha^2 - 0,012292 \beta^2 + 0,00152531 \gamma^2 + 0,00228642 \beta \cdot \gamma - 0,000913004 \alpha \cdot \gamma - 0,00139909 \alpha \cdot \beta + 0,0000487992 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	95,48
Redução de massa ( $\mu$ )	$\mu = - 4,53442 + 0,0842259 \alpha + 0,823351 \beta - 0,31111 \gamma - 0,00011292 \alpha^2 - 0,00933793 \beta^2 + 0,00304677 \gamma^2 - 0,00118084 \alpha \cdot \gamma - 0,000774605 \alpha \cdot \beta + 0,0000296333 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	77,53

$\alpha$  - tempo;  $\beta$  - Temperatura;  $\gamma$  - Concentração

Em valores absolutos, o valor de  $\omega$  obtido ao final do processo realizado com solução de 70 °Brix a 50 °C foi de 32,9%. Nas demais concentrações, 30 e 50 °Brix, e na mesma temperatura, as taxas de perda de água foram de 20,8 e 28,1%, respectivamente. Os resultados condizem com aqueles encontrados na literatura. Saputra (2001) e Rastogi e Raghavarao (2004), ao estudarem o processo de desidratação osmótica de abacaxi, concluíram que o aumento da concentração de sacarose de 40 para 70 °Brix favoreceu a perda de água da fruta, devido ao aumento do gradiente de pressão osmótica gerado pela solução.

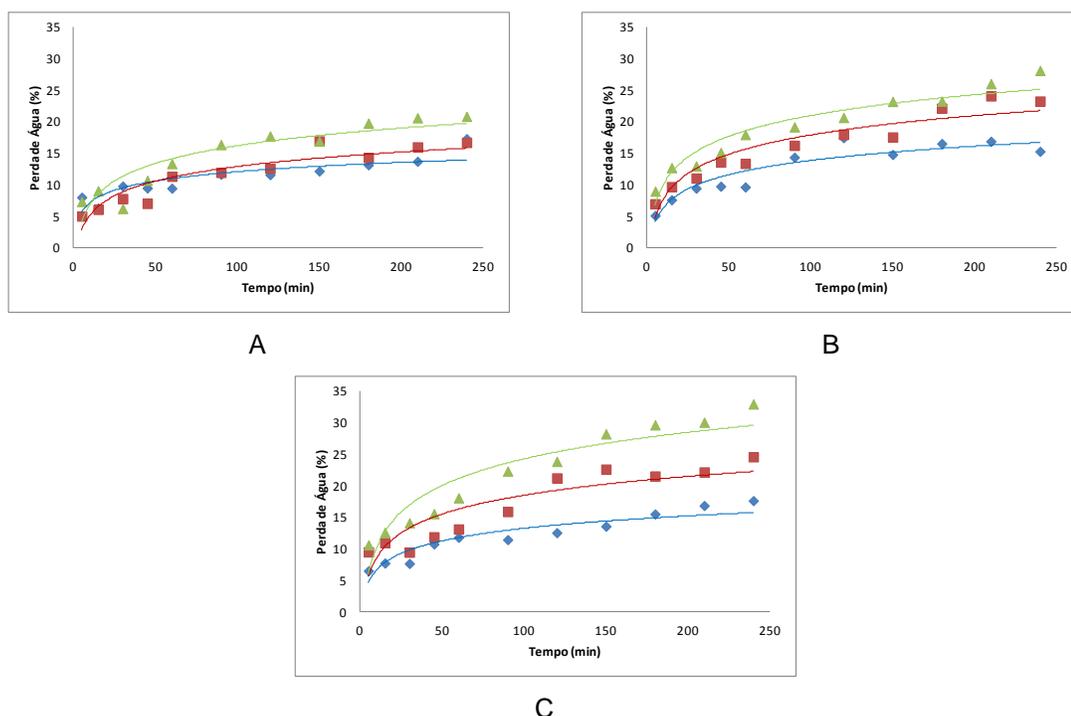


Figura 15 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

Lombard et al. (2008) também estudaram a desidratação de abacaxi em sacarose nas mesmas temperaturas, mas em solução de 45, 55 e 65 °Brix, concluindo que a perda de água foi mais influenciada pela temperatura do que pela

concentração da solução. Por outro lado, Beristain et al. (1990) verificaram que a perda de água aumentou com o aumento da concentração de sacarose (50, 60 e 70 °Brix) e da temperatura da solução (30, 40 e 50 °C) na desidratação de abacaxi. A perda de água foi de 30, 35 e 48% nas soluções de 50, 60 e 70 °Brix, na temperatura de 50 °C. Utilizando estas mesmas concentrações de sacarose e temperaturas mais elevadas (50, 60 e 70 °C), Waliszewski et al. (2002) verificaram que tanto a concentração quanto a temperatura tiveram efeito positivo sobre a perda de água pelas fatias de abacaxi. Em outro estudo com a mesma fruta, à temperatura de 30 °C, Fernandes et al. (2009) mostraram que a perda de água aumentou com o aumento do tempo de processamento e com o aumento do conteúdo de sólidos solúveis da solução osmótica.

A influência da concentração da solução e da temperatura de trabalho sobre a perda de água foi avaliada para diversas outras frutas. Na desidratação osmótica de manga com sacarose, em concentrações que variaram de 40 a 60 °Brix, Almeida et al. (2005) observaram que as taxas de perda de água eram proporcionais ao aumento da concentração da solução. Ao desidratar pêssegos, Germer et al. (2011), observaram o mesmo comportamento, utilizando sacarose como agente desidratante. Segundo os autores, a combinação das variáveis temperatura e concentração da solução contribuiu para o aumento da perda de água, ou seja, quanto maior a temperatura e a concentração, maior a perda de água. Chenlo et al. (2007) verificaram que o aumento da temperatura de valores próximos a 25 para 45 °C, tornou o processo de desidratação osmótica de castanha mais intenso, levando a menores valores de teor de água do produto ao final do processo. Souza-Neto et al. (2004), observaram que o aumento da concentração da solução osmótica promoveu um aumento na taxa de perda de água durante o processo de desidratação de fatias de manga, para todos os tratamentos. Segundo Ferrari (2005), o aumento da concentração da solução osmótica e da temperatura aplicada ao processo, favoreceu a perda de água no produto devido ao maior gradiente de pressão osmótica na interface produto/solução, proporcionando maior taxa de transferência de massa.

Perda de água de cerca de 30% foi observada por Lima (2012) nas duas primeiras horas de desidratação de melão amarelo com sacarose a 70 °Brix. Resultado semelhante foi descrito por Martim et al. (2007) na desidratação de manga em soluções de sacarose a 50 °Brix. Em processo osmótico de desidratação de pera com o mesmo açúcar e a mesma concentração, Park et al. (2002) verificaram perda de água ainda mais elevada (40%) em igual período. Utilizando fatias de maçã e solução de glicose (15, 30 e 45%), Karathanos et al. (1995) também observaram maior perda de água nas amostras nas soluções com maior concentração.

#### **4.1.3.1.2 – Ganho de sólidos**

A Figura 16 mostra o ganho de sólidos em função do tempo nas condições estudadas. Para todas as temperaturas aplicadas, a solução com maior concentração foi a que apresentou maiores taxas de ganho de sólidos. Este resultado foi também observado por Dionello et al. (2007) na desidratação de abacaxi.

De maneira correlata, Beristain et al. (1990) observaram que durante a desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sacarose o ganho de sólidos foi maior na solução com maior concentração. No trabalho de Waliszewski et al. (2002), apenas a concentração da solução exerceu efeito sobre o ganho de sólido pelas fatias de abacaxi, não havendo influência da temperatura. Fernandes et al. (2009) mostraram que, assim como a perda de água, o ganho de sólidos também aumentou com o aumento da concentração da solução osmótica, na desidratação de abacaxi a 30 °C. Comportamento similar ao obtido no presente trabalho foi observado por Sankat et al. (1992) na desidratação osmótica de fatias de banana, por Queiroz et al. (2010), na desidratação osmótica de pedaços de goiaba em concentrações crescentes de sacarose e por Almeida et al. (2005) na desidratação de manga.

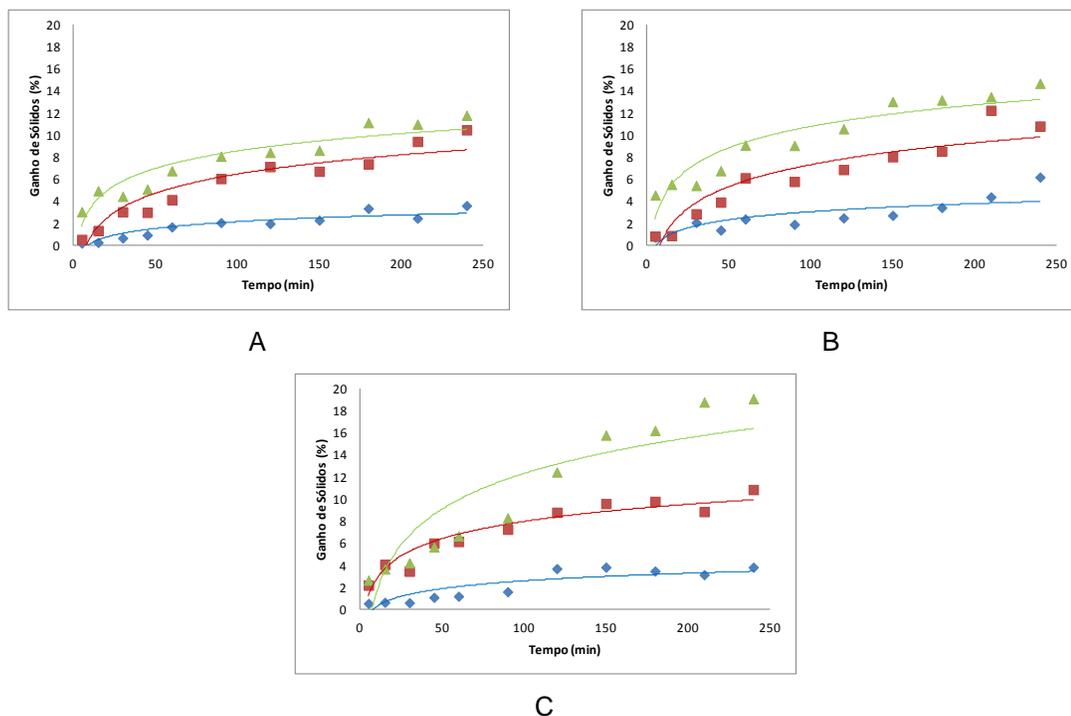


Figura 16 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

De acordo com Raoult-Wack (1991), o aumento da temperatura favorece tanto a perda de água quanto o ganho de sólidos, devido, provavelmente, ao seu efeito positivo sobre a difusividade aparente das moléculas de água e do soluto no interior do produto. No presente trabalho, a maior taxa de ganho de sólidos foi verificada com a maior temperatura e maior concentração. Em valores absolutos, o valor de  $\delta$  com solução a 70 °Brix e temperatura de 50 °C foi de 19,1%. Nesta mesma concentração, mas a 30 °C, foi obtido  $\delta$  de 11,8%, ficando evidente o efeito positivo da temperatura sobre a incorporação de soluto. Tedjo et al. (2002) observaram que quanto maior a temperatura da solução osmótica, maior o grau de permeabilidade das membranas das células do tecido parenquimático de mangas.

Marques et al. (2007) verificaram que quanto maior a concentração do xarope osmótico (50, 60 e 70 °Brix) maior a perda de água e o ganho de soluto de amostras

de caju para um mesmo período de desidratação. Park et al. (2002) observaram que tanto a perda de água quanto o ganho de sólido aumentaram com a temperatura (40, 50, 60 °C) e com a concentração (40, 55 e 70 °Brix) da solução de sacarose na desidratação de pera.

Sankat et al. (1992) observaram, na desidratação osmótica de banana, em soluções de sacarose com diferentes concentrações, que a perda de água e o ganho de sólidos aumentaram de acordo com a concentração inicial de sacarose na solução osmótica. Foi alcançada perda de água de, aproximadamente, 45 e 50%, a 55 e 65 °Brix, respectivamente. Antonio (2002) verificou ganho de sólidos de 11,7% e 9,7% na desidratação de banana e mamão, respectivamente, em solução de sacarose. A variável concentração de sacarose mostrou ter maior influência sobre o ganho de sólidos.

#### **4.1.3.1.3 – Redução de massa**

A Figura 17 ilustra o perfil cinético da redução de massa ( $\mu$ ) nas diferentes concentrações e temperaturas testadas. Observou-se que para todas as temperaturas (30, 40 e 50 °C) a solução com maior concentração (70 °Brix) foi a que apresentou maiores taxas de redução de massa. Analisando-se separadamente cada temperatura testada, foram verificados perfis similares com o aumento da concentração. Em valores absolutos, o valor de  $\mu$  obtido com solução de 70 °Brix foi de 11,7, 13,8 e 15,9%, para 30, 40 e 50 °C, respectivamente. Verificou-se aumento gradativo de  $\mu$  com aumento da temperatura nas diferentes concentrações.

Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por Dionello et al. (2007), que verificaram maiores taxas de redução de massa nos tratamentos com maiores temperaturas e maior concentração da solução desidratante, na desidratação osmótica de fatias de abacaxi. Queiroz et al. (2010) observaram que os maiores valores de  $\mu$  foram obtidos com as maiores concentrações de soluto na desidratação de goiaba em concentrações crescentes de sacarose, condição que também levou

às maiores perdas de água. LIMA (2012) observou que na desidratação osmótica de melão com sacarose em concentrações que variavam de 40 a 70 °Brix, os menores valores de redução de massa (próximos a 10%) foram encontrados nas soluções com menores concentrações.

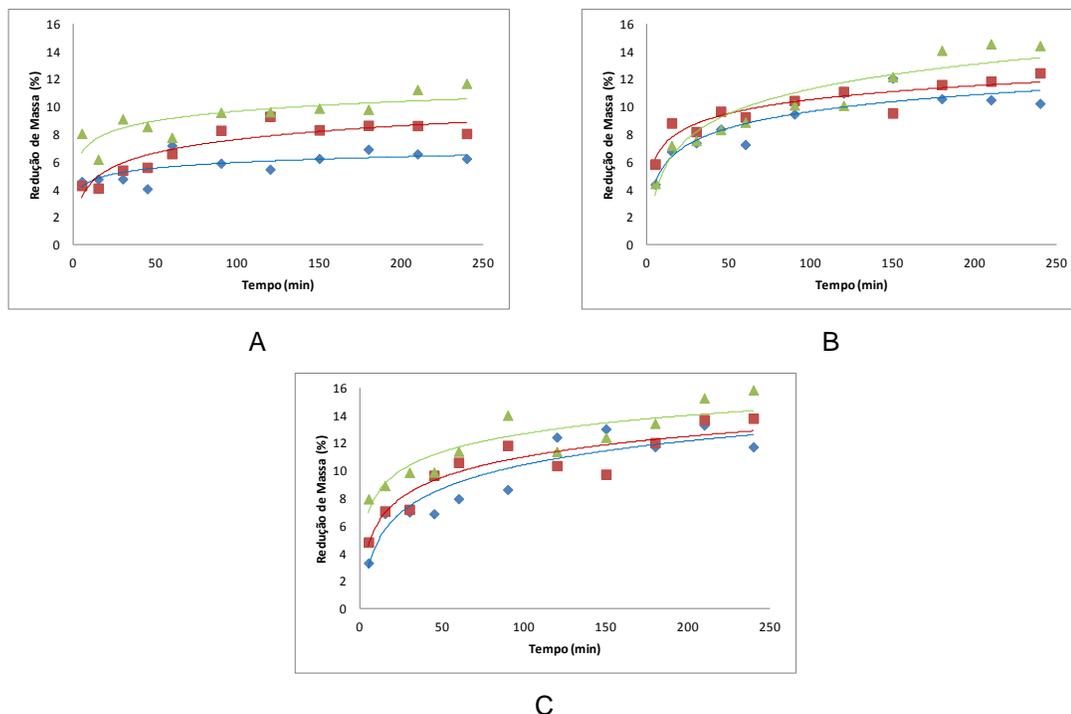


Figura 17 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sacarose a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

Os dados obtidos por Martim et al. (2007) mostraram que a redução de massa foi de 19,65% na desidratação osmótica de manga Tommy com sacarose a 50%, a 50 °C, em duas horas de processo. Este valor encontra-se dentro da faixa (18% a 24%) obtida por Souza Neto et al. (2004) e inferior ao encontrado por Santos (2003) (28,5%) na desidratação da mesma fruta. A diferença, segundo os autores, pode ser explicada pela diferença na geometria das amostras. Na mesma condição citada por Martim et al. (2007), o valor de  $\mu$  obtido no presente trabalho foi de 13,8%.

Como ressaltado anteriormente, diferenças das características do tecido vegetal influenciam a cinética do processo de desidratação (Torreggiani, 1993).

#### 4.1.3.2 - Sorbitol

Os dados referentes à análise de variância do fatorial para os experimentos realizados com sorbitol estão descritos na Tabela 14. Nota-se que para a variável perda de água e ganho de sólidos foram encontradas diferenças significativas, em nível de 1% de probabilidade pelo teste de média F ( $p > 0,01$ ), para os efeitos dos fatores temperatura, tempo e concentração, atuando de forma independente, bem como para as interações entre elas. Dessa forma, existe diferença significativa entre as médias alcançadas em cada um dos tratamentos testados. Para a variável redução de massa apenas a interação entre os fatores concentração e tempo não apresentaram diferença significativa.

Tabela 14: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de sorbitol a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	GL	Quadrado Médio		
		(Perda de Água)	(Ganho de Sólidos)	(Redução de Massa)
<b>CONC</b>	2	1790.217 (*)	860.3763 (*)	110.6973 (*)
<b>TEMP</b>	2	315.9098 (*)	37.58058 (*)	259.3697 (*)
<b>TP</b>	10	937.7658 (*)	356.295 (*)	165.3135 (*)
<b>CONC*TEMP</b>	4	70.62408 (*)	21.89681 (*)	131.2192 (*)
<b>CONC*TP</b>	20	43.10139 (*)	35.06211 (*)	4.65332 (ns)
<b>TEMP*TP</b>	20	23.09135 (*)	7.028135 (*)	11.14903 (*)
<b>CONC*TEMP*TP</b>	40	10.3818 (*)	4.524946 (*)	7.397751 (*)
<b>CV (%)</b>		15,7	19,4	18,3
<b>Resíduo TOTAL</b>	<b>396</b>	<b>5.913846</b>	<b>2.584597</b>	<b>3.480233</b>

CONC – Concentração; TEMP – Temperatura; TP – Tempo. \* Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

A Tabela 14 mostra ainda que os valores de coeficiente de variação (CV%) foram menores que 20%, atestando boa eficiência na tomada dos dados (Gomes, 2000). A fim de estimar a relação entre os fatores testados foram propostos modelos de regressão quadrática referente a cada fator significativo (Tabela 15). Foram encontrados valores de  $R^2$  de 90,39, 91,47 e 69,94 %, para perda de água, ganho de sólidos e redução de massa, respectivamente, indicando que as equações obtidas são adequadas para descrever a relação entre as variáveis do processo (tempo, temperatura e concentração da solução) na desidratação osmótica de abacaxi quando sorbitol é utilizado como soluto nas condições operacionais testadas.

Tabela 15: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de sorbitol a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	Equação Quadrática	
Perda de água ( $\omega$ )	$\omega = - 49,228 + 0,0355185 \alpha + 2,09788 \beta + 0,650465 \gamma - 0,000186875 \alpha^2 - 0,0243136 \beta^2 - 0,00438064 \gamma^2 - 0,002843 \beta \cdot \gamma + 0,000687561 \alpha \cdot \beta + 0,0008187 \alpha \cdot \gamma + 0,0000054319 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	90,39
Ganho de sólidos ( $\delta$ )	$\delta = - 15,5571 - 0,01956 \alpha + 0,736645 \beta + 0,114371 \gamma - 0,0000348629 \alpha^2 - 0,0104747 \beta^2 - 0,001664 \gamma^2 + 0,00210007 \beta \cdot \gamma + 0,000429507 \alpha \cdot \beta + 0,00137812 \alpha \cdot \gamma - 0,00000703242 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	91,47
Redução de massa ( $\mu$ )	$\mu = - 25,1142 + 0,0417476 \alpha + 0,998383 \beta + 0,435251 \gamma - 0,000198274 \alpha^2 - 0,00860732 \beta^2 - 0,00199408 \gamma^2 - 0,00475805 \beta \cdot \gamma + 0,000764305 \alpha \cdot \beta + 0,000000497951 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	69,94

$\alpha$  - tempo;  $\beta$  - Temperatura;  $\gamma$  - Concentração

#### 4.1.3.2.1 – Perda de água

Perfis cinéticos similares foram observados em relação à perda de água (Figura 18). Para uma mesma temperatura, o aumento da concentração implicou em aumento dos valores de  $\omega$ . A 30 °C, os valores de  $\omega$  foram de 16, 23 e 28,9%, nas soluções a 30, 50 e 70 °Brix, respectivamente. A mesma tendência foi verificada no processo com 40 e 50 °C. Por outro lado, considerando-se uma mesma concentração, o aumento da temperatura não implicou em aumento da perda de água. A 70 °Brix, os valores de  $\omega$  foram de 28,9, 28,3 e 28,8, para temperaturas de 30, 40 e 50 °C, respectivamente.

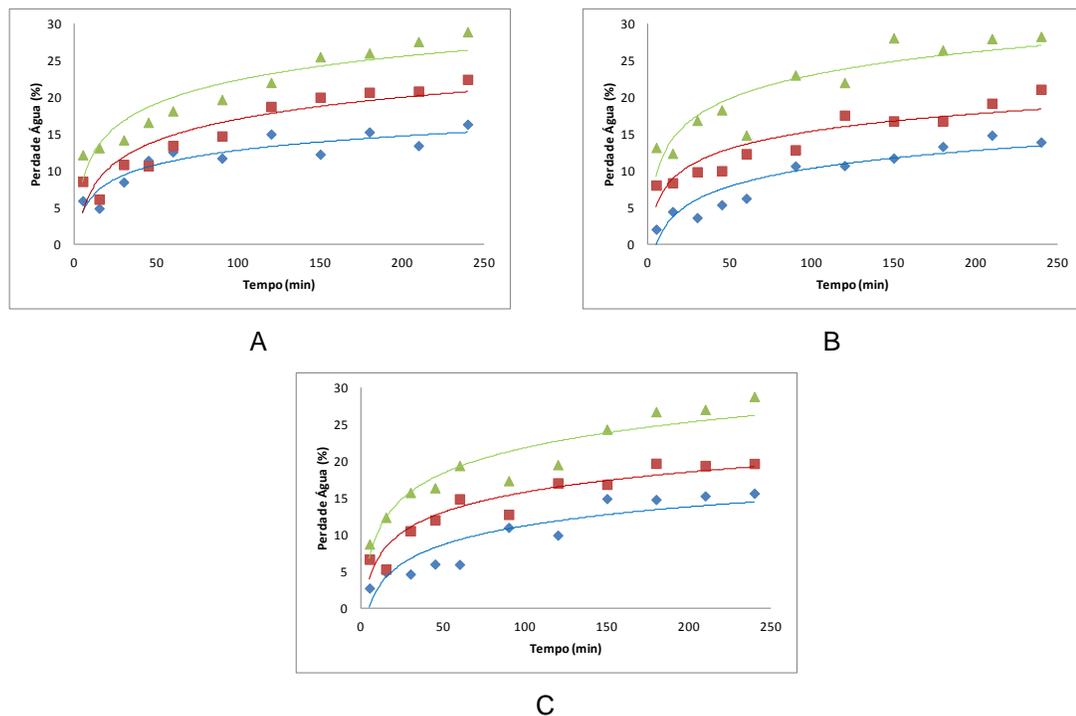


Figura 18 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

Não foi encontrado na literatura dados que reportam a utilização de sorbitol para desidratação de abacaxi. Na desidratação de pedaços de melão amarelo utilizando este soluto em concentrações de 40, 50, 60 e 70 °Brix, a 20, 30 e 40 °C,

Lima (2012) observou que tanto o aumento da concentração da solução osmótica quanto da temperatura levaram a maiores taxas de perda de água, o que difere dos resultados obtidos no presente trabalho. Por outro lado, ao desidratar melão pele de sapo em soluções de sorbitol a 40, 50 e 60 °Brix, nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, Oliveira (2013) verificou que a perda de água aumentou com a concentração e com a temperatura, mas o efeito da concentração foi mais intenso que o da temperatura.

Togrul e Ispir (2008) desidrataram osmoticamente pedaços de damasco, a 25 °C, em soluções de sorbitol a 40, 50, 60 e 70 °Brix, verificando que o aumento da concentração do soluto implicou no aumento da perda de água e no ganho de sólidos pela fruta. Martim et al. (2007) observaram perda de água de 33,46% ao final da desidratação osmótica de cubos de manga com sorbitol a 50 °Brix, em processo realizado a 50 °C por 2 horas. Este valor é superior ao verificado no presente trabalho ao final de 4 horas de desidratação em solução de sorbitol com igual concentração e temperatura, quando foi encontrado valor de  $w$  de 23,7%. Na desidratação de maçã com o mesmo soluto, a 50 °Brix e 30 °C, Córdova (2006) verificou perda de água de 27 e 30% para diferentes variedades do fruto. Ventura (2004) estudou a desidratação de goiaba vermelha e yacon em soluções de sorbitol de 53 a 73 °Brix e temperatura de 30 a 45°C e obteve perda de água de 35 a 43% para goiaba e 53 a 55% para yacon.

As diferenças observadas entre os resultados dos diferentes trabalhos podem ser, portanto, atribuídas às diferenças na estrutura do tecido vegetal das frutas empregadas e mesmo às diferentes variedades dentro de uma mesma espécie (Chiralt et al., 2001).

#### **4.1.3.2.2 – Ganho de sólidos**

A Figura 19 mostra o perfil cinético de ganho de sólidos na desidratação osmótica de fatias de abacaxi realizadas com sorbitol, evidenciando semelhanças com o comportamento apresentado pelo parâmetro perda de água. Maiores valores

de  $\delta$  foram obtidos com o aumento da concentração da solução para a mesma temperatura. Porém, o aumento da temperatura, para uma mesma concentração, não favoreceu a impregnação de soluto. A solução com menor concentração (30 °Brix) foi a que promoveu, em termos absolutos, menor ganho de sólidos para qualquer temperatura testada (4,6, 8,3 e 4,1%, a 30, 40 e 50°C, respectivamente). Comparando com a solução de 70 °Brix, os valores de  $\delta$  para essas mesmas temperaturas foram 15,6, 16,9 e 16,6%, respectivamente.

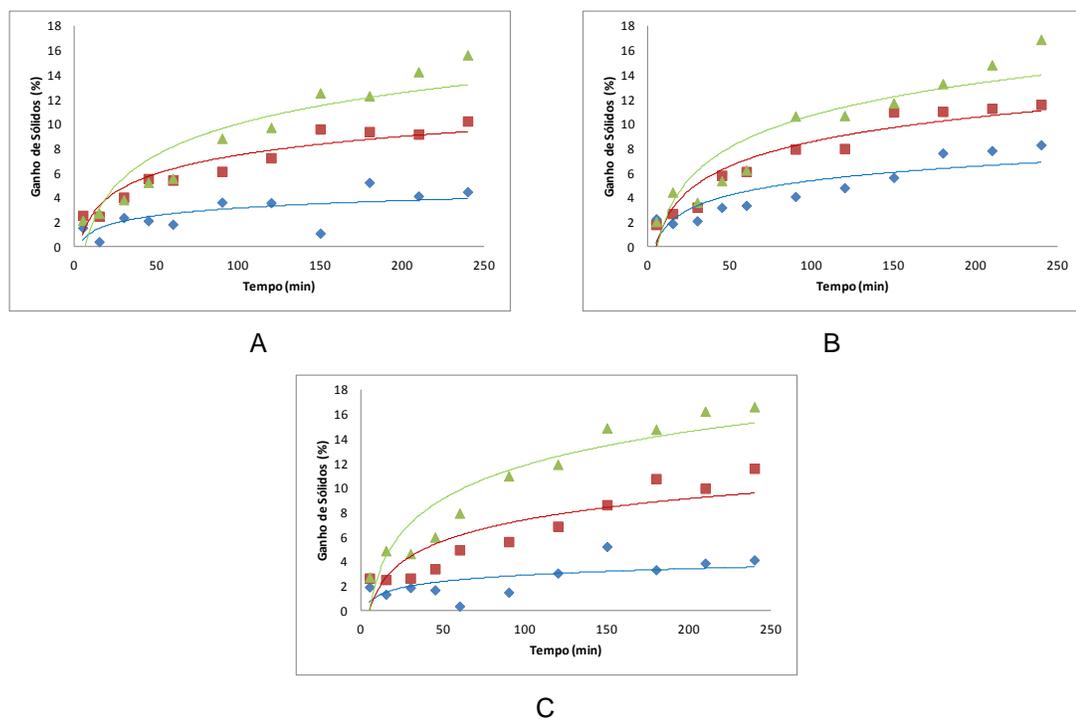


Figura 19 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

Para Lima (2012) e Oliveira (2013) foi observado este mesmo comportamento para desidratação de melão amarelo e melão pele de sapo, respectivamente. Os autores observaram que em soluções com menores concentrações de sorbitol foram obtidos os menores ganhos de sólidos. Na desidratação de goiaba vermelha e yacon

em soluções de sorbitol de 53 a 73 °Brix, entre 30 e 45°C, os valores de  $\delta$  foram de 5,7 a 8,0%, para goiaba, e 6,02 a 6,46%, para yacon (Ventura, 2004).

#### 4.1.3.2.3 – Redução de massa

Os perfis cinéticos para redução de massa são ilustrados na Figura 20. Verificou-se que para temperaturas de 30 e 40°C, a solução com maior concentração (70°Brix) apresentou redução de massa superior às demais concentrações. A 50 °C, para todas as concentrações testadas, a cinética de redução de massa foi coincidente. Valor de  $\mu$  de 13,3% foi obtido a 30 °C, e de 19,6% a 50 °C, no processo realizado com solução a 70 °Brix. Para a concentração de 30 °Brix nestas mesmas temperaturas foram obtidos valores de  $\mu$  de 10,2 e 15,2%, respectivamente. Para uma mesma concentração, o aumento da temperatura implicou em aumento de  $\mu$ .

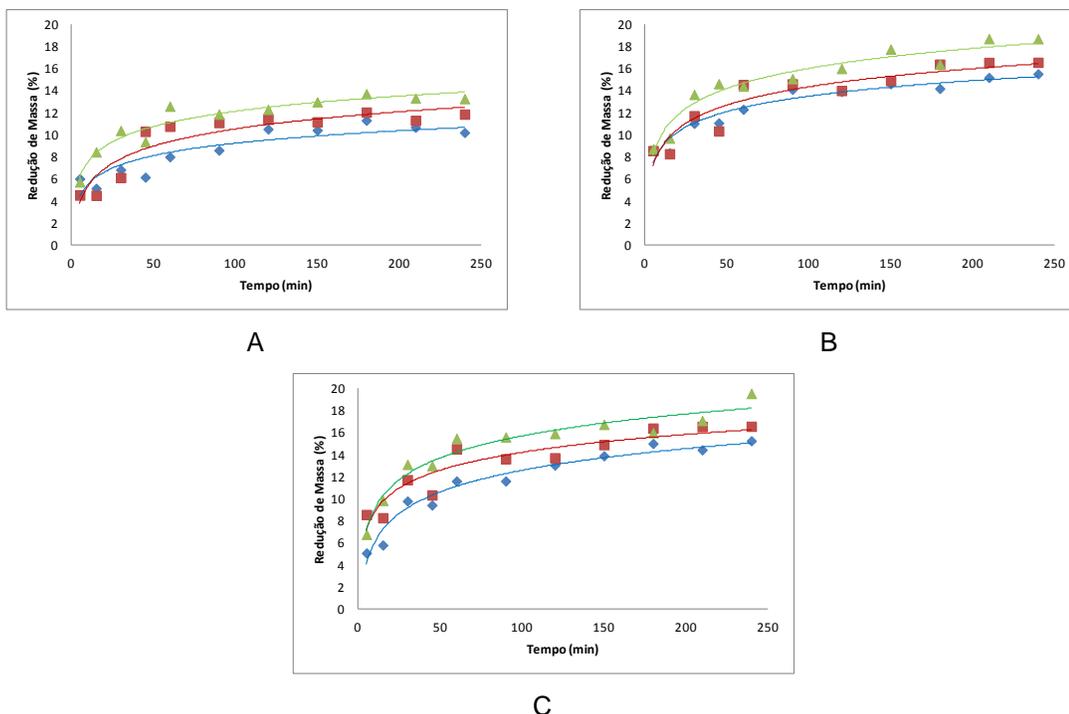


Figura 20 - Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de sorbitol a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

Martim et al. (2007) verificaram perda de peso de 23,91% ao final da desidratação osmótica de manga com solução de sorbitol a 50% e temperatura de 50 °C. Esse valor é maior que o encontrado no presente trabalho (16,9%) para mesma condição operacional. Ao utilizar sorbitol na desidratação de melão amarelo, Lima (2012) observou que quanto maior a temperatura de desidratação maior a redução de massa. Com solução de 50 °Brix os autores obtiveram valores de  $\mu$  de 16,29, 23,13 e 30,31%, em processo realizado a 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

#### **4.1.3.3 - Frutooligossacarídeo**

Na Tabela 16 são mostrados os resultados obtidos da análise fatorial (ANOVA) referente aos efeitos dos fatores temperatura, tempo, concentração e suas interações sobre a perda de água, o ganho de sólidos e a redução de massa quando foi utilizado frutooligossacarídeo como agente osmótico. Verificou-se que todos os fatores de forma independente, bem como suas interações, exerceram efeito significativo, ao em nível de 1% pelo teste F ( $p < 0,01$ ), sobre os parâmetros cinéticos perda de água e redução de massa, apresentaram diferença significativa. Em relação ao ganho de sólidos a única interação não significativa foi observada entre os fatores temperatura e tempo de imersão, mostrando que esses fatores atuam de forma independente. Os valores do coeficiente de variação (CV, %) mostraram eficiência de tomada de dados.

Foi estabelecida uma equação quadrática, a partir da análise de regressão, para cada um dos parâmetros estudados (Tabela 17). Observaram-se valores de  $R^2$  de 89,73, 91,94 e 59,93 %, para perda de água, ganho de sólidos e redução de massa, respectivamente. Assim, são consideradas adequadas as equações relativas à perda de água e ao ganho de sólido, ao passo que o baixo valor do coeficiente de determinação encontrado na equação relativa à redução de massa indica que esta não é totalmente adequada para predição dos valores de  $\mu$  nas condições estudadas para este soluto.

Tabela 16: ANOVA do fatorial para perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ) e redução de massa ( $\mu$ ) das fatias de abacaxi em função do tempo na desidratação osmótica em soluções de frutooligossacarídeos a 30, 50 e 70 °Brix, e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

FV	GL	Quadrado Médio		
		(Perda de Água)	(Ganho de Sólidos)	(Redução de Massa)
<b>CONC</b>	2	2020.466 (*)	1042.286 (*)	120.6003 (*)
<b>TEMP</b>	2	168.6273 (*)	3.536533 (*)	248.2766 (*)
<b>TP</b>	10	369.0462 (*)	195.8521 (*)	30.0254 (*)
<b>CONC*TEMP</b>	4	53.22936 (*)	25.03169 (*)	34.34741 (*)
<b>CONC*TP</b>	20	61.60265 (*)	38.33765 (*)	13.07409 (*)
<b>TEMP*TP</b>	20	18.63684 (*)	2.349026 (ns)	13.51423 (*)
<b>CONC*TEMP*TP</b>	40	9.398608 (*)	4.072794 (*)	9.358737 (*)
<b>CV (%)</b>		17,9	20,6	23,7
<b>Resíduo TOTAL</b>	<b>396</b>	<b>4.204808</b>	<b>1.763746</b>	<b>3.042587</b>

CONC – Concentração; TEMP – Temperatura; TP – Tempo. \* Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Tabela 17: Equações de regressão quadrática e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para modelagem da cinética de desidratação osmótica de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeos a 30, 50 e 70 °Brix e temperatura de 30, 40 e 50 °C.

Variável	Equação Quadrática	
Perda de água ( $\omega$ )	$\omega = 14,4147 - 0,0189606 \alpha - 1,26079 \beta + 0,670161 \gamma - 0,0000958831 \alpha^2 + 0,0154285 \beta^2 - 0,00583054 \gamma^2 - 0,000462047 \beta \cdot \gamma + 0,000384481 \alpha \cdot \beta + 0,000605323 \alpha \cdot \gamma + 0,0000201698 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	89,73
Ganho de sólidos ( $\delta$ )	$\delta = - 15,968 - 0,0205824 \alpha + 0,364475 \beta + 0,393052 \gamma - 0,0000254496 \alpha^2 - 0,00326896 \beta^2 - 0,00281363 \gamma^2 - 0,00188883 \beta \cdot \gamma + 0,00123755 \alpha \cdot \gamma - 0,00000144208 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	91,94
Redução de massa ( $\mu$ )	$\mu = 29,4 + 0,013607 \alpha - 1,57026 \beta + 0,262894 \gamma - 0,0000628157 \alpha^2 + 0,0199926 \beta^2 - 0,00239952 \gamma^2 - 0,000514299 \beta \cdot \gamma - 0,000233867 \alpha \cdot \beta - 0,000558229 \alpha \cdot \gamma + 0,0000248492 \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	59,93

$\alpha$  - tempo;  $\beta$  - Temperatura;  $\gamma$  -Concentração

#### **4.1.3.3.1 - Perda de água**

Os perfis cinéticos de perda de água em função do tempo para a desidratação de fatias de abacaxi utilizando frutooligossacarídeo como agente desidratante são mostrados na Figura 21. Verificou-se que o aumento da concentração da solução, para qualquer temperatura testada, levou ao aumento da perda de água. Para uma mesma concentração, o aumento da temperatura também implicou em aumento de  $\omega$ . A variação dos valores de  $\omega$  no processo realizado com solução mais concentrada (70 °Brix) foi de 23,2, 22,3 e 25,8% para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C, respectivamente. Com temperatura de 50 °C os valores de  $\omega$  foram de 9,1, 20,7 e 25,8% para as concentrações de 30, 50 e 70 °Brix. Destacam-se os pequenos incrementos nos valores de  $\omega$ , ao longo do tempo, na solução a 30 °Brix, nas diferentes temperaturas. Nestas condições, a máxima perda de água (9,1%) foi obtida no processo a 50 °C.

Da mesma forma, não foram encontrados trabalhos sobre o uso de frutooligossacarídeo para desidratação osmótica de abacaxi. Porém, os resultados obtidos são coerentes com os alcançados por outros autores. Matusek et al. (2008) utilizaram frutooligossacarídeo (40, 50 e 60 °Brix) na desidratação osmótica de pedaços de maçã, a 40, 50 e 60 °C, observando que as taxas de perda de água aumentaram com o aumento da concentração da solução. Os autores também verificaram que o efeito da temperatura foi menor que o efeito da concentração. Em contrapartida, na desidratação da mesma fruta com solução de FOS a 50 °Brix e diferentes temperaturas (22, 40 e 60 °C), Klewicki e Uczciwek (2008) observaram taxas de perdas de água iguais a 32,7, 38,9 e 40,3%, respectivamente, mostrando efeito mais acentuado da temperatura. Em outro trabalho, a desidratação de maçã em soluções com concentrações crescentes (50, 55, 60 e 65° Brix) de FOS, a 40 °C, foi observado efeito da concentração da solução sobre as taxas de perda de água, que variaram entre 35 e 45% (Klewicki e Uczciwek, 2010).

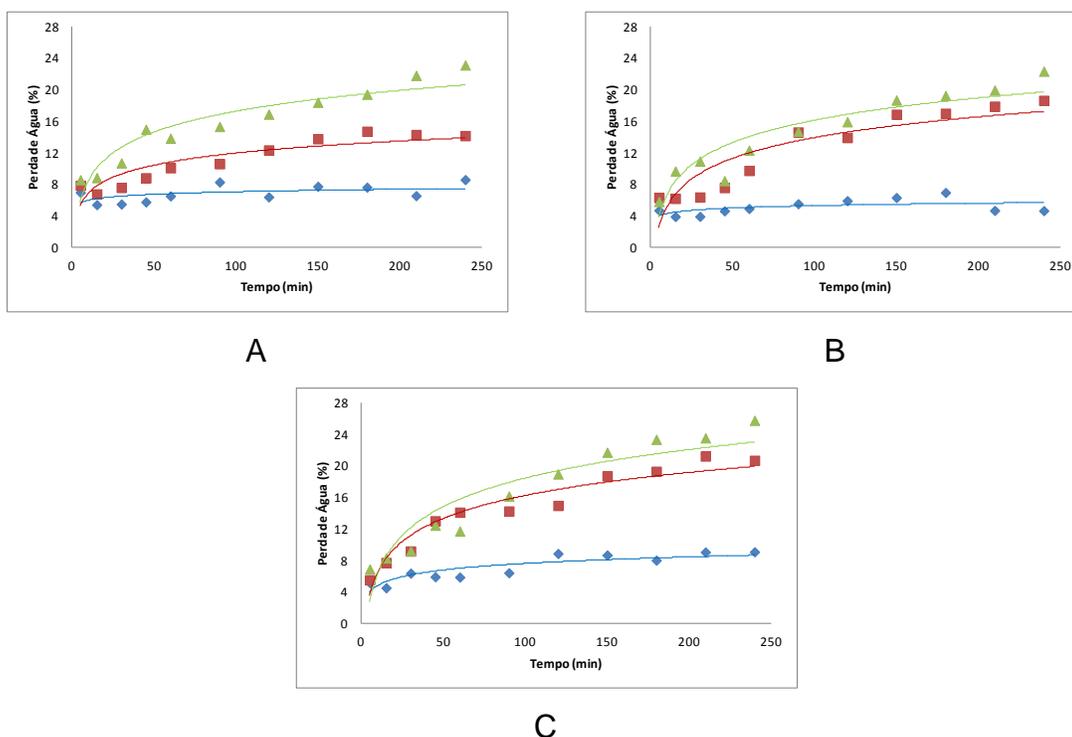


Figura 21 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeos a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (♦), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

#### 4.1.3.3.2 - Ganho de sólidos

Maiores valores de  $\delta$  foram obtidos com o aumento da concentração da solução, mas o mesmo não foi observado em relação ao aumento da temperatura para uma dada concentração (Figura 22). Com aumento da concentração de 30 para 70 °Brix, a 50 °C, os valores de  $\delta$  foram de 2,7, 8,3 e 12,8%, respectivamente. Com solução a 50 °Brix, os valores de  $\delta$  foram de 8,6, 8,7 e 8,4% a 30, 40 e 50 °C, respectivamente.

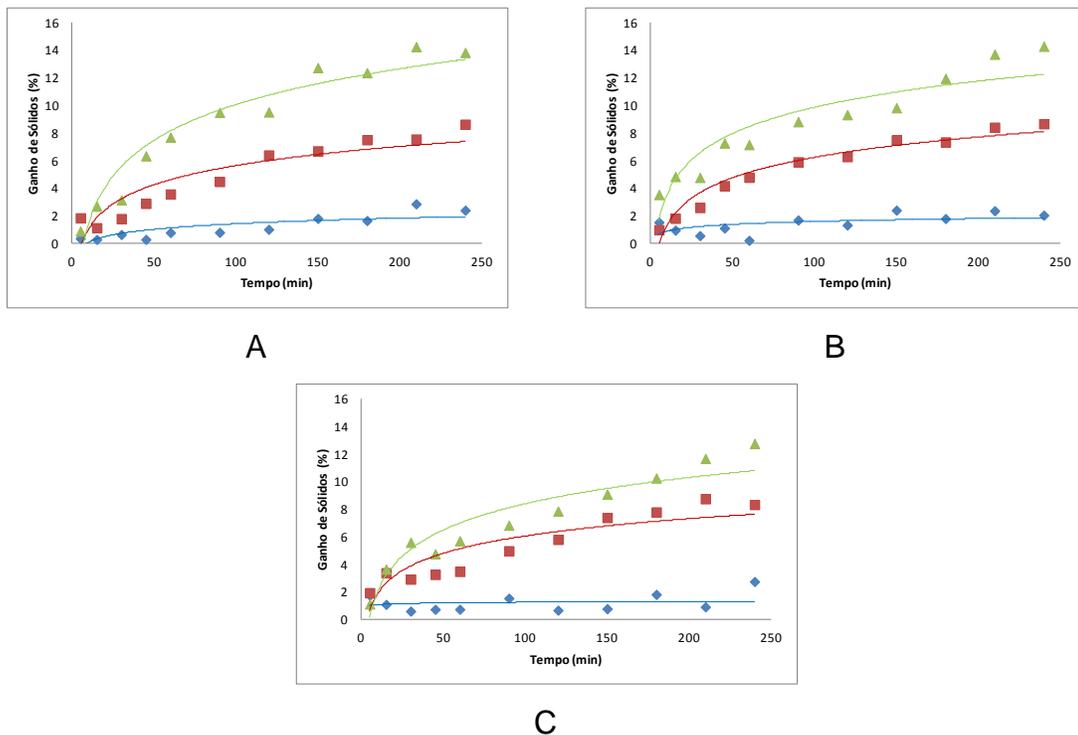


Figura 22 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeos a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (▲).

De maneira distinta, Klewicki e Uczciwek (2010) observaram que as diferentes concentrações testadas na desidratação de maçã (50, 55, 60 e 65 °Brix) não alteraram os níveis de impregnação de frutooligossacarídeo na fruta no final do processo. Por outro lado, a exemplo do observado no presente trabalho, Matusek et al. (2008) observaram efeito mais significativo da concentração da solução do que da temperatura na desidratação de maçãs com este soluto. Os autores encontraram taxas de ganho de sólidos crescentes nos processos realizados com soluções a 40, 50 e 60 °Brix, para todas as temperaturas testadas (40, 50 e 60 °C). Em valores absolutos, foram encontrados, no trabalho, valores de  $\delta$  de 0,52, 0,68 e 0,78% para o tratamento com a menor temperatura. Ressalta-se que estes valores foram medidos com 40 minutos de processo osmótico.

#### 4.1.3.3.3 - Redução de massa

A Figura 23 mostra os perfis de redução de massa das fatias de abacaxi com soluções de frutooligossacarídeos. A 30 °C, os valores de  $\mu$  variaram de maneira muito similar em todas as soluções empregadas (6,2, 5,5 e 8,3%, a 30, 50 e 70 °Brix, respectivamente). O mesmo comportamento não se repetiu para as demais temperaturas. Com 40 °C, o perfil foi mais definido, obtendo-se maiores valores de  $\mu$  (2,6, 7,1 e 11,9%) com aumento da concentração. A 50 °C, a cinética de redução de massa foi idêntica para soluções a 50 e 70 °Brix.

Os dados encontrados por Matusek et al. (2008) são distintos aos obtidos no presente trabalho, os quais encontraram valores de  $\mu$  similares para soluções a 40 e 50 °Brix, a 40 °C, na desidratação de maçã. A 50 °C, os valores de  $\mu$  foram de 0,918, 1,306 e 1,570% para as concentrações de 40, 50 e 60 °Brix. As diferenças entre os dois trabalhos podem ser atribuídas aos diferentes tipos de fruta, ao tempo de processo e à relação fruta:xarope.

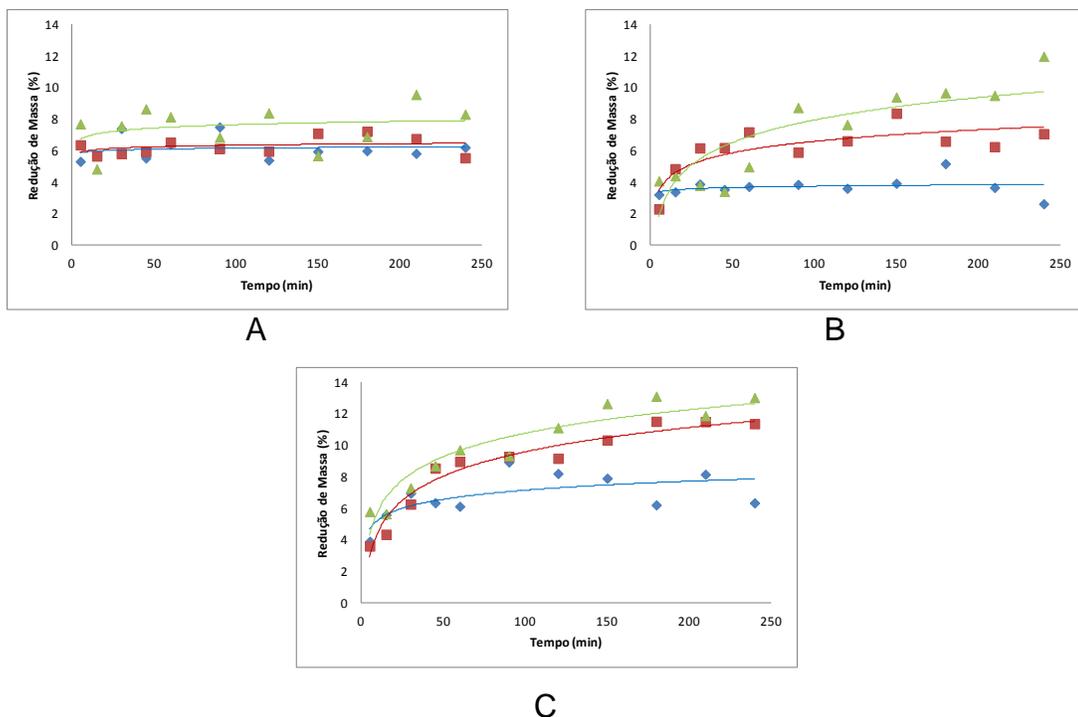


Figura 23: Redução de massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi em soluções de frutooligossacarídeo a 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C), nas concentrações de 30 °Brix (◆), 50 °Brix (■) e 40 °Brix (▲).

#### **4.1.3.4 – Comparação da cinética de desidratação em sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo**

##### ***4.1.3.4.1 - Perda de água***

Os perfis cinéticos de perda de água das amostras de abacaxi na desidratação osmótica com sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeos são mostrados nas Figuras 24, 25 e 26, respectivamente. Na desidratação osmótica, a alta taxa de perda de água no início do processo deve-se à grande força motriz existente entre a água da fruta fresca e o meio hipertônico. Com o avanço do processo, essa força diminui, diminuindo conseqüentemente as taxas de perda de água (Torregiani, 1993; Lenart et al., 1996). Este comportamento foi observado nos processos com sacarose, sorbitol e em quase todos os ensaios com frutooligossacarídeo. Quando este último soluto foi empregado na concentração de 30 °Brix, para qualquer temperatura, a variação de  $\omega$  em função do tempo manteve-se praticamente constante, em valores muito baixos, após os primeiros momentos de desidratação, contrariando o comportamento esperado.

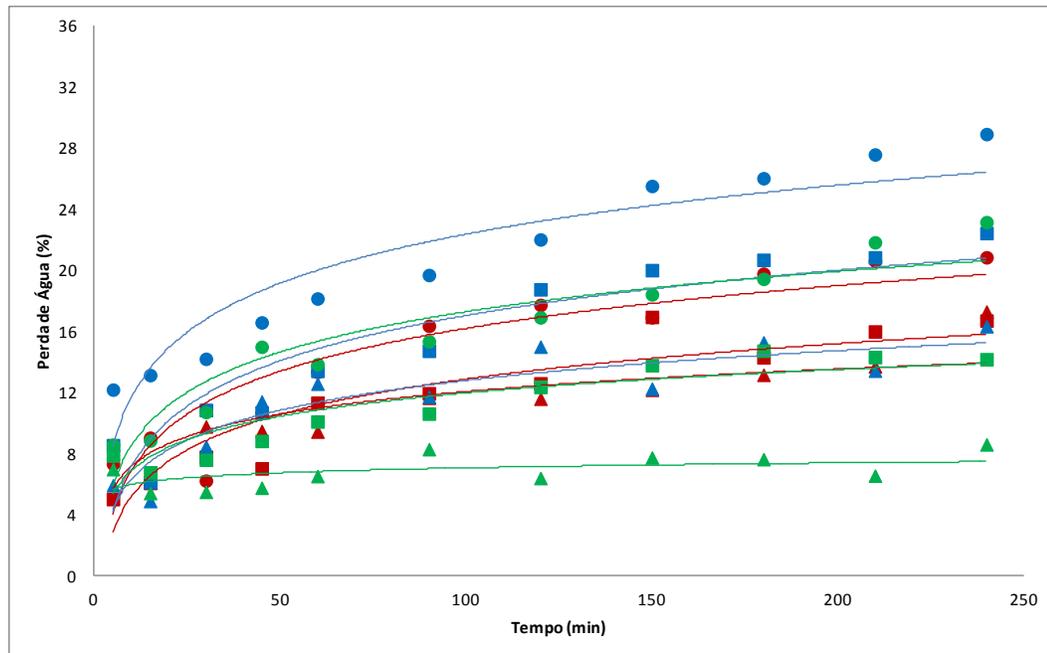


Figura 24 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

Para todas as temperaturas e os agentes osmóticos testados, a solução com maior concentração (70 °Brix) foi a que promoveu maior perda de água ao final do processo. Por outro lado, com soluções a 30 °Brix, a menor utilizada nos ensaios, foram verificados os menores valores de perda de água. Assim, pode-se dizer que para todos os solutos avaliados a concentração da solução osmótica influenciou diretamente o processo de retirada de água das fatias de abacaxi. De acordo com a literatura, a transferência de massa é favorecida pelo aumento da concentração da solução desidratante. Soluções altamente concentradas provocam maior perda de água do produto e minimizam perdas de solutos hidrossolúveis como vitaminas e sais minerais (Rastogi et al., 2002). Quando a concentração da solução osmótica é aumentada, uma densa camada de soluto é formada na superfície do material, o que aumenta o efeito de desidratação e reduz as perdas de nutrientes durante o processo. Uma barreira de soluto semelhante é também formada no caso de solutos com peso molecular mais elevado, mesmo em baixa concentração (Tortoe, 2010).

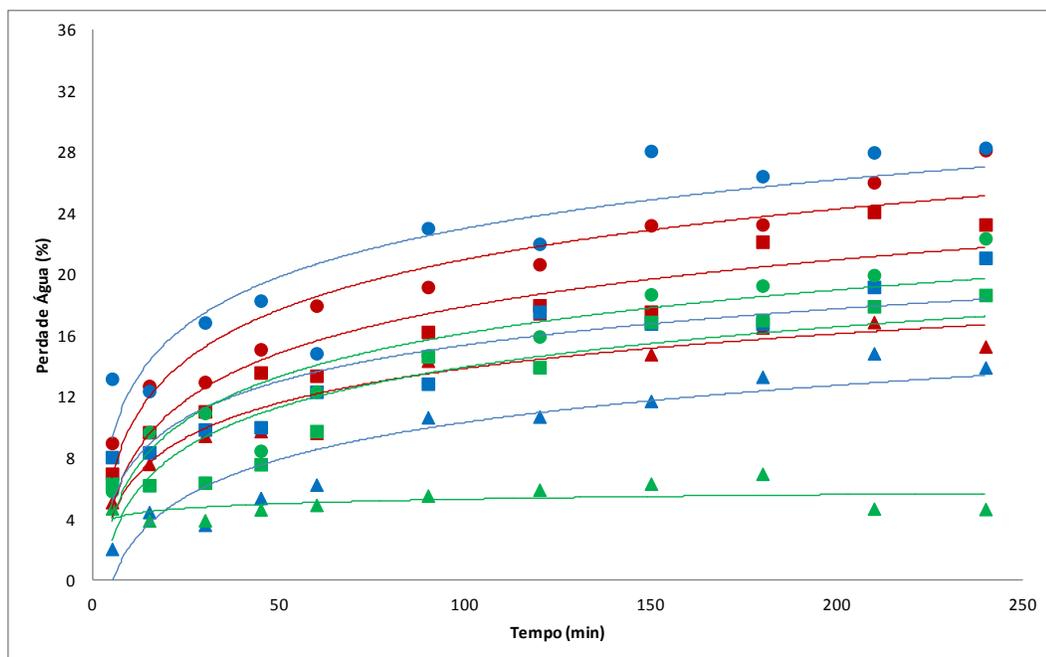


Figura 25 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligosacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

Comparando-se os resultados obtidos com sacarose e sorbitol, verificou-se que em 30 e 40 °C, usando a solução a 70 °Brix, sorbitol exerceu maior efeito desidratante, tendo sido obtidos valores de  $\omega$  de 28,7 e 29,2%, respectivamente. No processo com sacarose, nas mesmas temperaturas e concentração, foram verificados valores de  $\omega$  de 20,8 e 28,1%. No entanto, considerando a maior temperatura, a solução de sacarose a 70 °Brix promoveu maior perda de água (32,9%) que a solução de sorbitol (28,9%), na mesma concentração. Assim, nota-se que o comportamento da cinética com diferentes solutos varia com temperatura do processo, o que foi relatado na literatura.

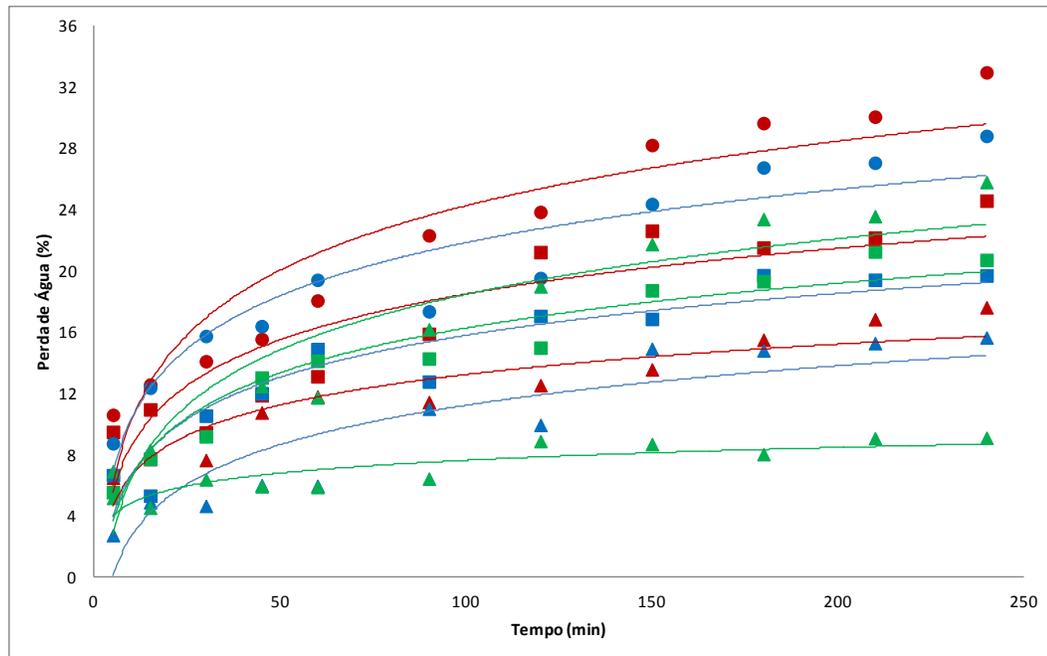


Figura 26 - Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

Dados na literatura mostram que na desidratação osmótica de diferentes frutas, o uso de solução de sorbitol, em comparação com outros solutos, favoreceu a perda de água. Este resultado foi obtido por Rivas et al. (2005) ao desidratar cubos de damasco utilizando sacarose, frutose, glicose e sorbitol, na concentração de 60 °Brix. Valores de  $\omega$  de 24,75 e 19,17% foram obtidos com solução de sorbitol e sacarose, respectivamente. Rizzolo et al. (2007), na desidratação de morango com solução de sacarose e sorbitol a 60 °Brix, também verificaram maior eficiência do último na retirada de água do produto. Forni et al. (1997), compararam o uso de sacarose, maltose e sorbitol na desidratação de damasco e constataram que, na concentração de 65 °Brix, o melhor agente desidratante foi sorbitol. Na desidratação osmótica de abóbora, Zenoozian et al. (2007) verificaram igualmente que sorbitol, em comparação com glicose e sacarose, foi o soluto que causou maiores taxas de perda de água. Este mesmo comportamento foi observado na desidratação de melão por Lima (2012) e Oliveira (2013). Ao desidratar manga a 50 °C e soluções a 50 °Brix,

Martim et al. (2007) obtiveram perda de água, ao final da desidratação osmótica, de 33,46% para o tratamento com sorbitol e de 28,16% para o tratamento com sacarose. Behsnilian e Spiess (2006) estudaram o efeito da solução usada na desidratação osmótica de diferentes alimentos, incluindo maçã, cenoura e batata, constatando que a remoção de água foi afetada pela natureza e pela concentração de agente osmótico usado (sacarose, glicose, sorbitol, sal e glicerol).

Ao comparar os resultados obtidos com sacarose e frutooligossacarídeo, nota-se que sacarose foi mais eficiente na remoção de água das fatias de abacaxi (Figuras 24, 25 e 26). Com a maior concentração (70 °Brix), nas diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C), foram observadas perda de água de 20,8, 28,1 e 32,9%, respectivamente, com sacarose. Nestas mesmas condições, os valores de  $\omega$  em soluções de FOS foram de 23,1, 22,4 e 25,8%, respectivamente. Estes dados estão de acordo com os verificados por Matusek et al. (2008) na desidratação de cubos de maçã, em que sacarose, em duas concentrações distintas (40 e 60%), foi mais eficiente na remoção de água do alimento que FOS.

Sorbitol foi igualmente mais eficiente que FOS na remoção e água das amostras, para qualquer concentração e para todas as temperaturas avaliadas. A diferença mais marcante foi verificada na desidratação em soluções a 30 °Brix. Neste caso, os valores de  $\omega$  foram de 16,3, 13,9 e 15,6%, nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, respectivamente, enquanto com FOS estes valores foram de 8,6, 4,6 e 9,1%.

#### **4.1.3.4.2 - Ganho de Sólidos**

O parâmetro ganho de sólidos apresentou comportamento variado nas diferentes soluções, sendo afetado pela temperatura e concentração (Figuras 27, 28 e 29). De modo geral, sorbitol foi o soluto que mais favoreceu o ganho de sólidos, seguido por sacarose e FOS. À exceção do tratamento com 70 °Brix a 50 °C, maiores valores de  $\delta$  foram encontrados com uso de sorbitol.

Para todos os solutos, a menor concentração levou aos menores valores de  $\delta$ , em todas as temperaturas. Para qualquer concentração, em temperaturas de 30 e 40 °C, foram verificados maiores valores de  $\delta$  em solução de sorbitol que em soluções de sacarose. Dados na literatura mostram este mesmo comportamento para a desidratação de damasco (Forni et al., 1997; Rivas et al., 2005), melão amarelo (Lima, 2012), melão pele de sapo (Oliveira, 2013), abóbora (Zenoozian et al., 2007) e morango (Rizzolo et al., 2007). Martim et al. (2007), ao contrário, verificaram ganho de sólidos de 9,93% para o tratamento com sacarose e 6,31% para o tratamento com sorbitol na desidratação osmótica de manga a 50 °C e soluções a 50 °Brix.

Estudos mostram que as propriedades físico-químicas do soluto afetam a desidratação osmótica. A massa molecular, o estado iônico e a solubilidade do soluto em água provocam diferenças no comportamento do soluto osmótico. Além disso, o tamanho molecular do soluto osmótico tem um efeito significativo sobre a relação entre a perda de água e o ganho de sólidos. Quanto menor for o soluto, maior sua penetração no alimento (Hawkes e Flink, 1978; Bolin et al., 1983; Lerici et al., 1985; Lenart e Lewicki, 1987 e 1989; Lenart, 1992; Torreggiani, 1993). Desta forma, as diferenças observadas entre os resultados obtidos com sacarose e sorbitol podem ser explicadas pela diferença de massa molecular dos dois solutos. Com menor massa molecular (182 g/mol), sorbitol tem maior facilidade de incorporação na fruta que sacarose (342 g/mol). Assim, como consequência no processo, a utilização de sorbitol conduziu a valores de ganho de sólidos mais elevados do que a sacarose.

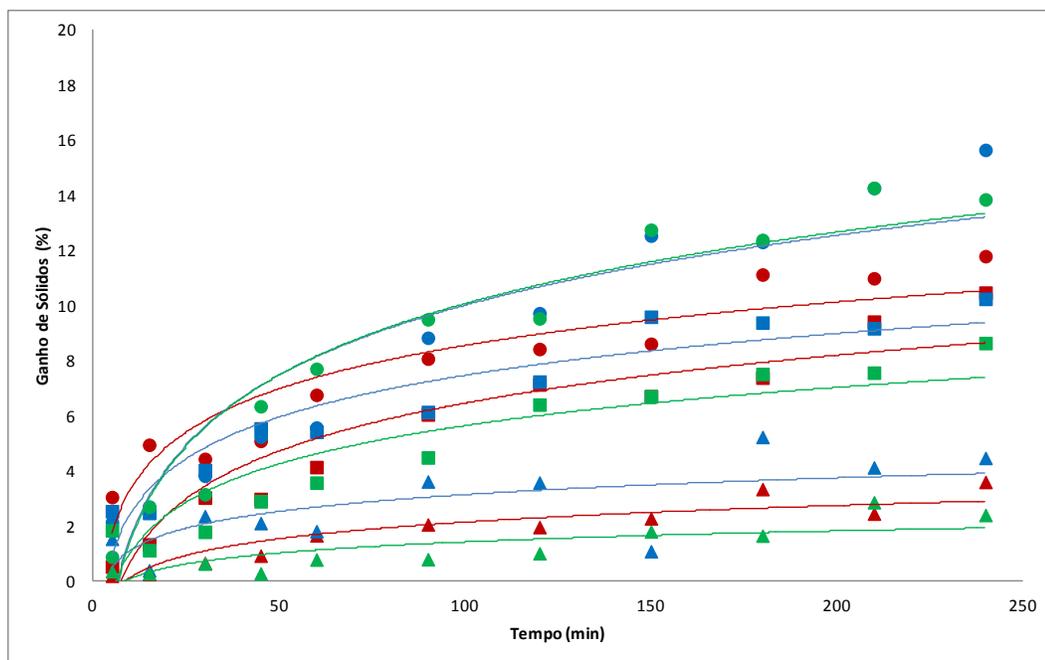


Figura 27 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

Na comparação do ganho de sólidos em solução de FOS e sacarose, (Figura 27), verificou-se que, a 30 °C e solução de 70 °Brix foram encontrados valores de  $\delta$  próximos a 13,8% no final do processo osmótico com FOS, enquanto com sacarose esse valor ficou em torno de 12%. Assim, para esta temperatura, FOS se mostrou ligeiramente mais eficiente que sacarose para a incorporação de soluto à fruta. Por outro lado, levando-se em consideração as demais temperaturas, a solução de sacarose mostrou-se mais efetiva que FOS. Em valores absolutos, a 50 °C, valores de  $\delta$  de 19,1 e 12,8% foram obtidos na desidratação em soluções de sacarose e frutooligossacarídeo a 70 °Brix, respectivamente. Constata-se que, assim como observado para perda de água, o soluto sacarose foi o que mais influenciou o fenômeno de ganho de sólidos. Matusek et al. (2008) desidrataram osmoticamente maçã com soluções de FOS e sacarose em diferentes concentrações (40, 50 e 60%) e temperaturas (40, 50 e 60 °C) observando menor ganho de sólidos quando FOS foi utilizado como agente osmótico. Klewicki e Uzcziwek (2008) observaram um

comportamento distinto na desidratação osmótica de maçã. Ao comparar a aplicação de sacarose e FOS, na concentração de 50% e 40 °C, os autores não verificaram diferença no ganho de sólido. No entanto, ressalta-se que a solução de FOS utilizada no trabalho destes autores era constituída de uma mistura de nistose, kestose, sacarose, frutose e glicose.

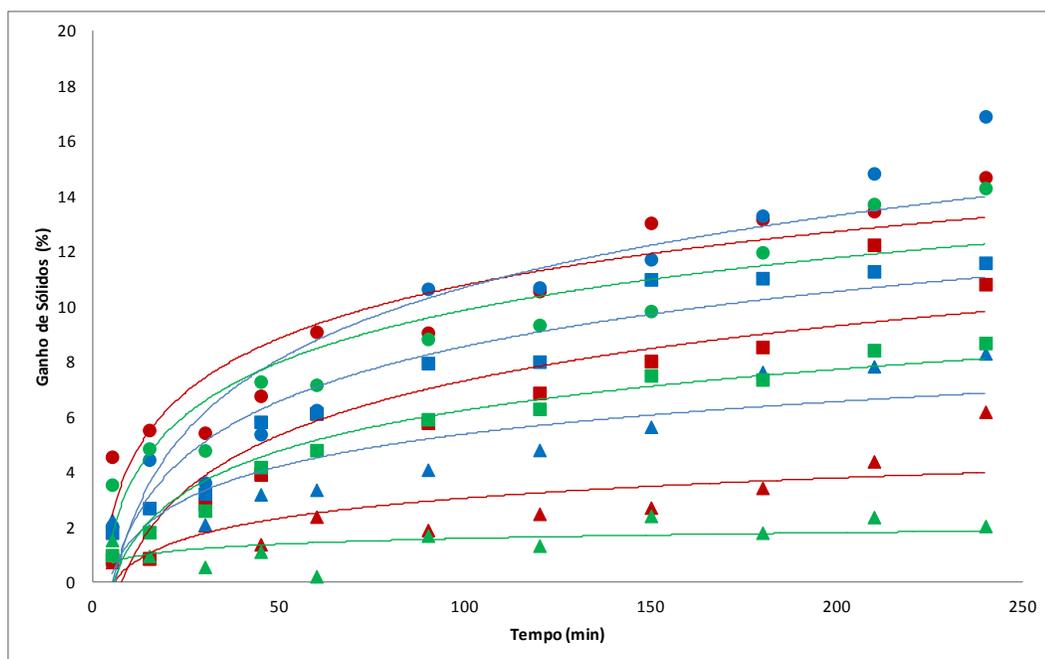


Figura 28 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

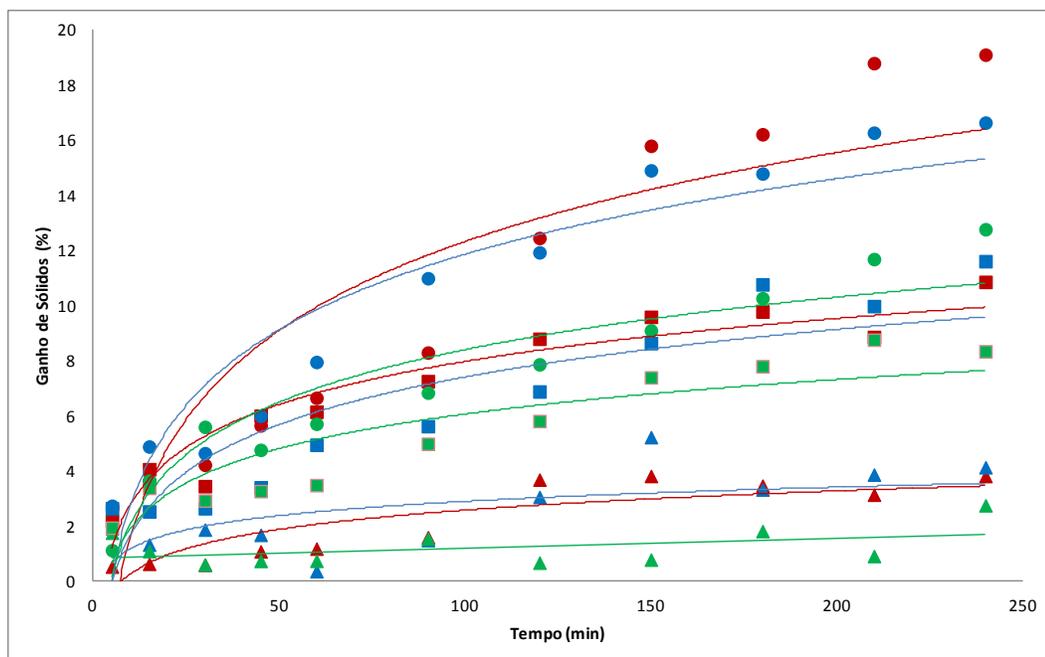


Figura 29 - Ganho de sólidos em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

#### 4.1.3.4.3 - Redução de Massa

Os resultados obtidos com os perfis cinéticos de desidratação osmótica com os solutos sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo são mostrados nas Figuras 30, 31 e 32. Verificou-se que, de maneira geral, a redução de massa foi superior nas soluções formuladas com sorbitol. No entanto, em termos absolutos, o valor de  $\mu$  alcançado ao final do processo osmótico com a solução de sacarose a 70 °Brix, a 30 °C foi de 11,7%, valor próximo ao obtido com a solução de sorbitol (13,1%) nas mesmas condições. Erba et al. (1994) observaram que sorbitol levou a uma maior redução da massa de amostras na desidratação de pêssegos e damascos. Conforme Torreggiani (1993), quanto maior a massa molecular do agente osmótico, maior a redução de massa.

Comparando-se os perfis de redução de massa alcançados com sacarose e FOS, verificaram-se maiores valores de  $\mu$  com a solução de sacarose, para todas as

temperaturas testadas. Em valores absolutos, para a maior concentração deste dissacarídeo, os valores de  $\mu$  foram de 11,7, 14,4 e 15,9%, para temperaturas de 30, 40 e 50 °C, respectivamente. Para a mesma concentração de FOS, estes valores foram de 8,3, 11,9 e 13%, respectivamente. Com sorbitol a 70 ° Brix, os valores de  $\mu$  nestas condições foram de 13,1, 18,7 e 19,5%.

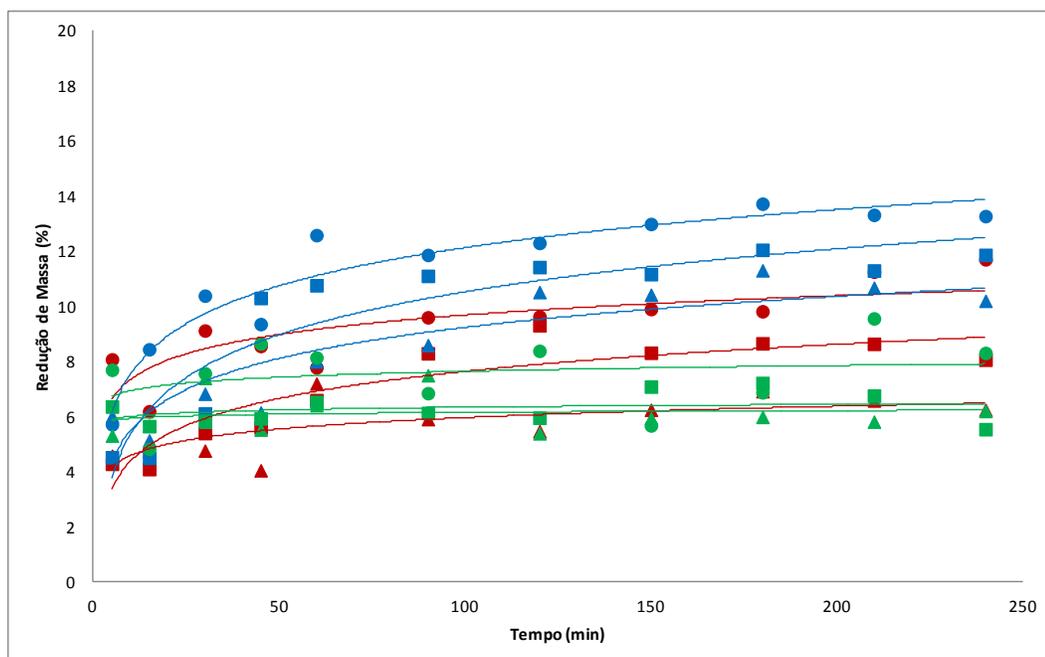


Figura 30 - Redução de Massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 30 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutoligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

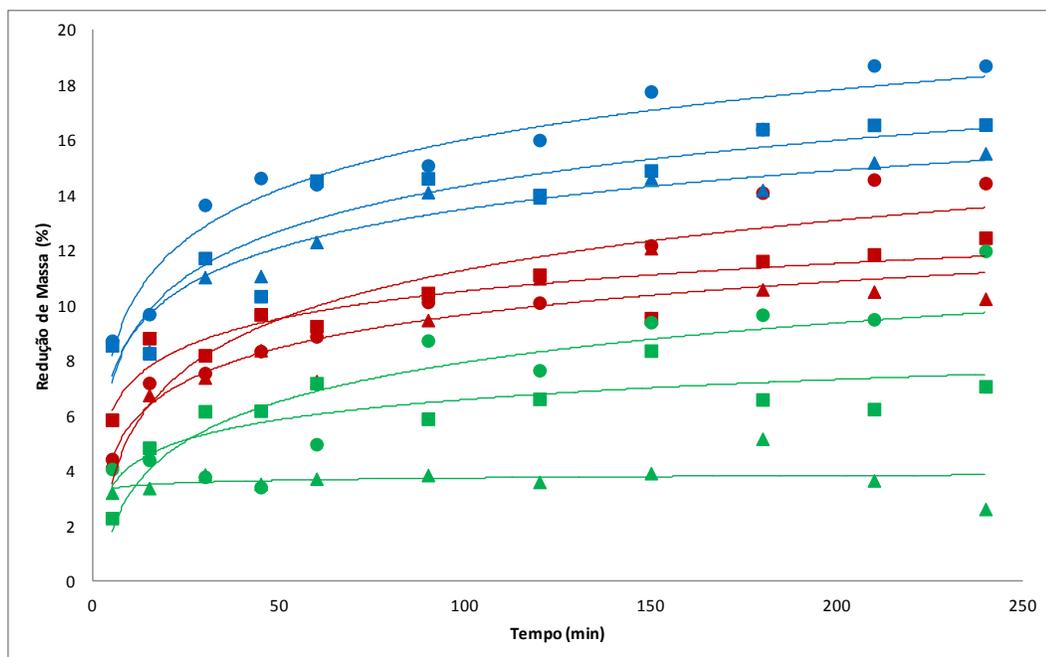


Figura 31 - Redução de Massa, Perda de água em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 40 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

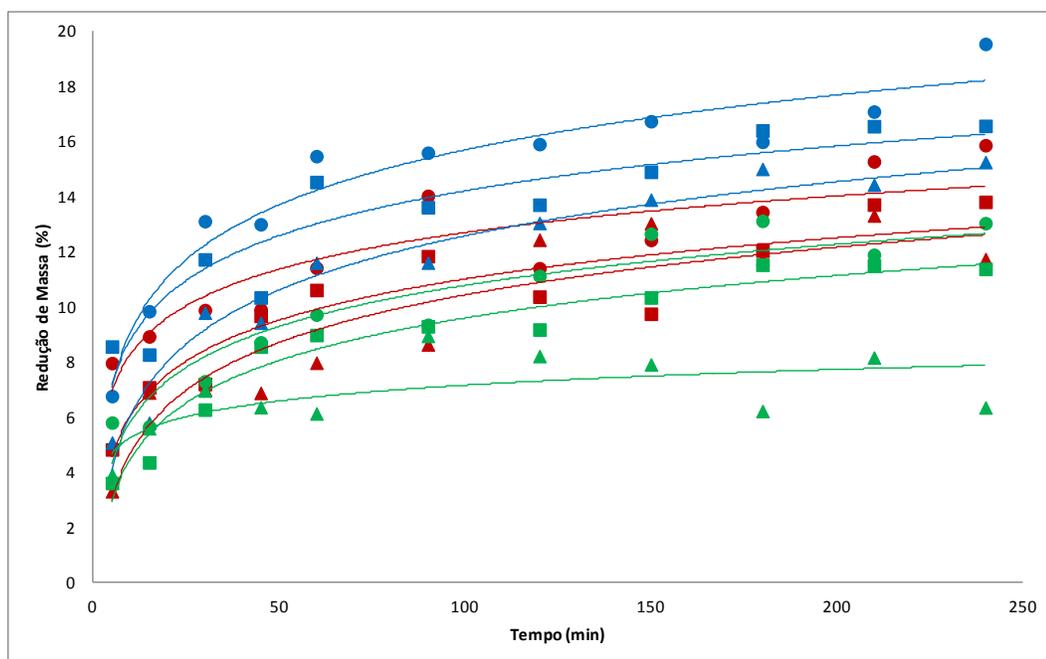


Figura 32 - Redução de Massa em função do tempo na desidratação osmótica de amostras de abacaxi a 50 °C em soluções de sacarose (—), sorbitol (—) e frutooligossacarídeo (—) a 30 °Brix (▲), 50 °Brix (■) e 70 °Brix (●).

Na Tabela 18 são mostrados os valores de  $\omega$ ,  $\delta$  e  $\mu$ , assim como da relação  $\delta/\omega$ , calculados para os diferentes tratamentos. De acordo com Ravindra e Chattopadhyay (2000), baixos valores de  $\delta/\omega$  determinam a melhor condição de desidratação osmótica. Desta forma, de acordo com esse critério, pode-se considerar que, para uma relação fruta:xarope de 1:10, agitação de  $60 \text{ min}^{-1}$  e tempo de processo de 4 horas, as melhores condições para desidratação das fatias de abacaxi são concentração de 30 °Brix, temperatura de 30 ou 50 °C, para qualquer um dos três solutos. Nestas condições, foram encontrados valores de  $\delta/\omega$  de 0,22 e 0,21 (sacarose), 0,28 e 0,28 (sorbitol) e 0,27 e 0,29 (FOS). Considerando estes valores, a condição de escolha, em relação à economia de energia, seria o emprego de temperatura de 30 °C para a realização do processo.

Ressalta-se, porém, que na desidratação com FOS a 30 °Brix, as taxas de remoção de água foram muito baixas (<10%), o que sugere uma análise mais cuidadosa a respeito da possibilidade efetiva de escolha desta condição operacional para a realização do processo. A 50 °Brix e 50 °C, a perda de água foi de 22,7% e o ganho de soluto de 9,6%, o que indica a necessidade de realização de mais ensaios com vistas a melhorar os resultados. A possibilidade de substituição de sacarose por frutooligossacarídeos em soluções osmóticas pode ser benéfica para a saúde humana. Estes compostos não são hidrolisados no intestino delgado e são fermentados por bifidobactérias e lactobacilos (micro-organismos probióticos) quando chegam ao cólon, com produção de ácidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio e outros compostos inibidores do crescimento da microbiota patogênica (Bovee-Oudenhoven et al. 2003). Além disso, o valor calórico de FOS não excede  $10 \text{ kJ.g}^{-1}$ , enquanto o de sacarose chega a  $17 \text{ kJ.g}^{-1}$  (Linden e Lorient, 1999), o que representa a possibilidade de obtenção de alimentos desidratados menos calóricos.

Tabela 18: Perda de água ( $\omega$ ), ganho de sólidos ( $\delta$ ), redução de massa ( $\mu$ ) e relação  $\delta/\omega$  após 4h de desidratação osmótica de pedaços de abacaxi em solução de sacarose, sorbitol e frutooligosacarídeo (FOS).

Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
Tratamento	Temperatura (°C)	$\omega$	$\delta$	$\mu$	$\delta/\omega$
Sacarose 30 °Brix	30	16,2	3,6	6,2	0,22
	40	16,3	6,2	9,2	0,38
	50	17,6	3,8	11,7	0,21
Sacarose 50 °Brix	30	16,7	10,5	8,0	0,62
	40	23,7	10,9	12,4	0,45
	50	26,6	11,9	13,8	0,44
Sacarose 70 °Brix	30	20,9	11,8	11,7	0,56
	40	28,1	14,7	14,4	0,52
	50	36,0	20,1	15,9	0,55
Sorbitol 30 °Brix	30	16,0	4,5	10,2	0,28
	40	14,9	8,3	12,5	0,55
	50	16,6	4,8	15,2	0,28
Sorbitol 50 °Brix	30	23,0	13,2	11,9	0,57
	40	23,8	13,6	16,4	0,57
	50	23,7	13,6	16,9	0,57
Sorbitol 70 °Brix	30	29,7	18,6	11,3	0,63
	40	30,6	19,9	16,7	0,65
	50	30,9	18,6	19,6	0,60
FOS 30 °Brix	30	8,6	2,4	6,2	0,27
	40	4,6	2,0	2,6	0,43
	50	9,1	2,7	6,3	0,29
FOS 50 °Brix	30	14,2	9,6	4,5	0,67
	40	15,6	9,7	7,0	0,62
	50	22,7	9,6	11,3	0,42
FOS 70 °Brix	30	23,1	14,9	8,3	0,64
	40	22,8	15,0	11,9	0,65
	50	27,8	14,8	14,0	0,53

O potencial de aplicação de sorbitol como edulcorante na formulação de produtos destinados a um público alvo diferenciado é promissor, dada a comprovada aceitabilidade sensorial como ingrediente no produto final (Moura, 2004). No entanto, é necessária a avaliação nutricional do produto desidratado, sobretudo com relação à quantidade incorporada do soluto, uma vez que em concentrações maiores que 50 a

80 g ao dia o sorbitol tem poder laxante (Sicard e Leroy, 1983; Carvalho e Zanette, 2006).

## 4.2 – Processo Fermentativo

### **4.2.1 - Meios formulados com resíduos obtidos da desidratação osmótica de abacaxi com diferentes solutos**

A fim de avaliar o desempenho de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio de cultivo formulado com o xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi, foi realizado um primeiro grupo de ensaios (Ensaio F1), em biorreator de bancada, empregando-se soluções oriundas do processo realizado com os três solutos testados, maltodextrina (MAL), frutooligossacarídeo (FOS) e sorbitol (SOB). Em todos os casos, a solução foi diluída de modo a obter-se concentração inicial de açúcar ( $S_0$ ) de, aproximadamente, 30 g/L (meios MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>, respectivamente), e suplementada com os nutrientes do meio GYS<sub>30</sub> (Rogoff e Yousten, 1969), o qual foi usado como referência para comparação dos resultados. A concentração inicial de substrato foi escolhida com base nos resultados obtidos por Berbert-Molina et al. (2008) e Rodrigues (2009), que mostraram a capacidade da bactéria de metabolizar todo o substrato, em meios contendo glicose ou açúcar invertido (solução osmótica residual), respectivamente, em processos fermentativos realizados em condições operacionais semelhantes e com  $S_0$  de 30 g/L.

Os resultados gerais obtidos nestes ensaios são apresentados na Tabela 19. A Figura 33 apresenta os perfis cinéticos de crescimento nos diferentes meios, incluindo aquele observado na fermentação do meio GYS<sub>30</sub>.

Tabela 19: Resultados gerais obtidos no cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios GYS<sub>30</sub>, MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>.

	GYS <sub>30</sub>	MAL <sub>30</sub>	FOS <sub>30</sub>	SOB <sub>30</sub>
t <sub>f</sub> (h)	36	23	23	26
t <sub>gr</sub> (h)	6	5	6	5
t <sub>xm</sub> (h)	11	10	9	7
ΔX (g/L)	23,1	16,4	10,6	5,2
p <sub>x</sub> (g/L.h)	2,08	1,62	1,14	0,74
μ <sub>m</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,83	1,1	0,91	1,0
EL (ufc/mL)	2,20.10 <sup>9</sup>	2,66.10 <sup>9</sup>	1,32.10 <sup>9</sup>	1,22.10 <sup>8</sup>
CV (ufc/mL)	9,57.10 <sup>8</sup>	6,92.10 <sup>8</sup>	6,38.10 <sup>8</sup>	4,31.10 <sup>8</sup>
CE (ufc/mL)	2,39.10 <sup>9</sup>	1,52.10 <sup>9</sup>	1,43.10 <sup>9</sup>	1,50.10 <sup>8</sup>
ET (ufc/mL)	4,59.10 <sup>9</sup>	4,17.10 <sup>9</sup>	2,75.10 <sup>9</sup>	2,71.10 <sup>8</sup>
CT (ufc/mL)	5,55.10 <sup>9</sup>	5,21.10 <sup>9</sup>	3,39.10 <sup>9</sup>	7,02.10 <sup>8</sup>
T <sub>sp</sub> (%)	82,8	85,8	90,9	38,6
LC <sub>50</sub> (mg/L)	2,52 <sup>a</sup>	2,19 <sup>a</sup>	4,66 <sup>b</sup>	171,13 <sup>c</sup>

t<sub>f</sub> - tempo final de fermentação; t<sub>gr</sub> - tempo de formação de grumos; t<sub>xm</sub> - tempo para obtenção da máxima concentração celular; ΔX – máxima concentração celular; p<sub>x</sub> - produtividade em células; μ<sub>m</sub> - máxima velocidade específica de crescimento; EL - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE - número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT - número total de células; T<sub>sp</sub> - taxa de esporulação; LC<sub>50</sub> - concentração necessária para matar 50% das larvas de *Ae. aegypti*.

O tempo para obtenção da máxima concentração celular (t<sub>xm</sub>) foi similar para os meios GYS<sub>30</sub> e MAL<sub>30</sub> e ligeiramente menor (2 h) no meio FOS<sub>30</sub>. Desta forma, mesmo com concentração celular inferior à de GYS, a produtividade em células no

meio MAL<sub>30</sub> (1,62 g/L.h) foi apenas 28,4% menor que a de GYS<sub>30</sub> (2,08 g/L.h). Por outro lado, no meio SOB<sub>30</sub>, embora o valor de  $t_{x_m}$  tenha sido similar aos demais, a baixa concentração celular obtida impactou negativamente o valor de  $p_x$ , que foi de 0,74 g/L.h.

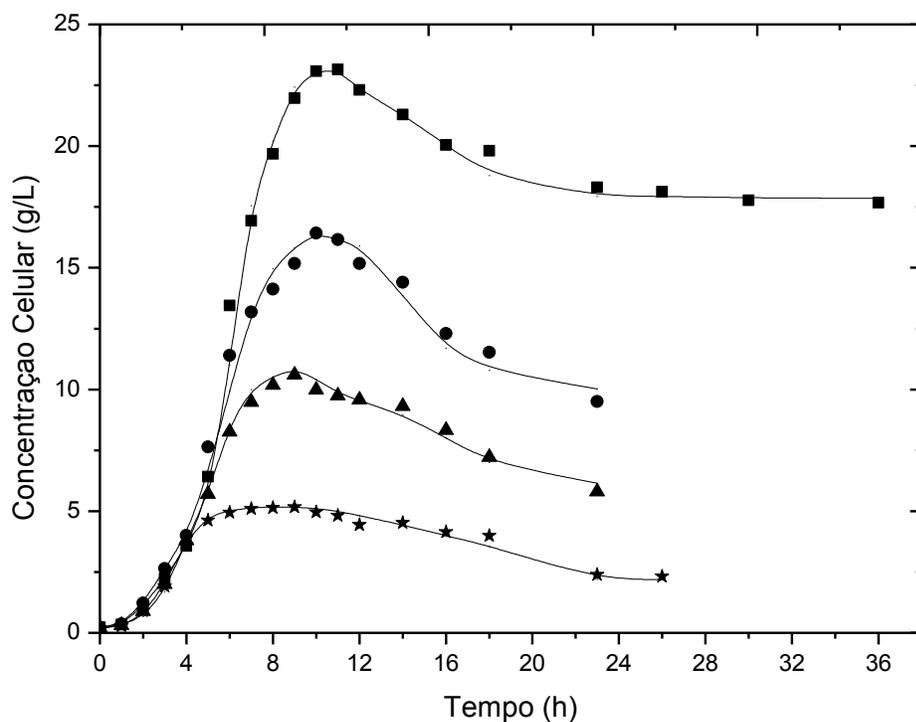


Figura 33 – Concentração celular em função do tempo na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada.

Conforme mostra a Figura 33, a variação da concentração celular com o tempo ocorreu de forma similar em todos os meios, apresentando o perfil característico para o cultivo de Bti, conforme descrito por Berbert-Molina et al. (2008) e Boniolo et al. (2012). Após uma curta fase *lag*, o cultivo apresentou uma fase exponencial de crescimento, durante a qual foram medidas as máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ), seguida de uma fase linear e, finalmente, uma fase

estacionária e de declínio. A duração da fase linear aumentou na medida em que aumentaram os valores de  $\Delta X$ , sendo mais longa na fermentação do meio GYS<sub>30</sub> e muito curta com o meio SOB<sub>30</sub>. Neste último meio, ao contrário, a fase estacionária foi mais prolongada, não se observando também um perfil decrescente acentuado na fase de declínio como nos demais.

A variação das velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nas primeiras 11 horas de processo, ilustrada na Figura 34, mostrou perfis coerentes com a cinética de crescimento celular. As máximas velocidades (cerca de 6 g/L.h) foram exibidas pelo cultivo no meio GYS<sub>30</sub>, por volta de 6 h de processo. Os máximos valores de  $dX/dt$  nos meios MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub> foram muito inferiores.

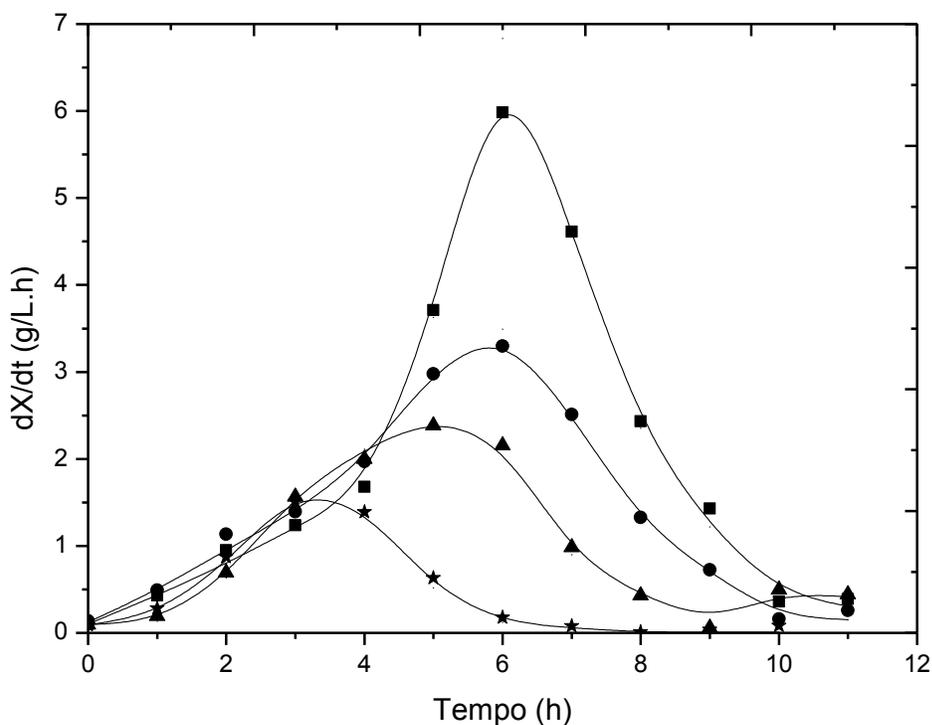


Figura 34 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ), em função do tempo, na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada.

Avaliando-se os valores de  $\mu_m$  nos diferentes meios (Tabela 19), constatou-se que em nenhum dos casos houve inibição do crescimento pela concentração da fonte de carbono. Mesmo o menor valor de  $\mu_m$ , encontrado no meio GYS<sub>30</sub> (0,83 h<sup>-1</sup>), encontra-se na faixa encontrada para a bactéria quando cultivada em glicose, frutose ou sacarose (Pessanha, 2008). Por outro lado, o alto valor de  $\mu_m$  verificado no meio SOB<sub>30</sub> (1,0 h<sup>-1</sup>), praticamente idêntico ao calculado para MAL<sub>30</sub> (1,1 h<sup>-1</sup>), demonstra que a limitação da produção de biomassa neste meio deve-se a outros fatores. É possível que o crescimento microbiano verificado nas primeiras horas de cultivo tenha ocorrido às expensas dos nutrientes aportados pelo extrato de levedura. Como não foi realizada a quantificação de sorbitol nas amostras retiradas ao longo da fermentação, não é possível fazer qualquer afirmação a respeito do consumo de sorbitol, mas os resultados indicam que este substrato não pode ser metabolizado pela bactéria. Padua et al. (1984) afirmam não ter havido produção de ácido pela cepa PG-14 em ensaios de isolamento de *Bt*. Os autores não fazem referência ao crescimento celular nas diferentes fontes de carbono testadas no trabalho. Por outro lado, as eventuais diferenças na composição das soluções osmóticas podem ser decorrentes dos efeitos distintos de cada soluto sobre a retirada de sólidos da fruta durante a desidratação osmótica. Neste processo, minerais e outros nutrientes são extravasados para a solução osmótica, sendo a extensão deste fluxo influenciada pelo tipo de fruta e de agente desidratante, bem como com pelas condições empregadas na desidratação (Peiró et al., 2006; Peiró-Mena et al., 2007; Queiroz et al., 2008).

Em relação às condições de transferência de oxigênio, também fundamental neste processo fermentativo (Abdel-Hameed, 2001; Rowe et al., 2003; Sarrafzadeh e Navarro, 2006; Berbert-Molina et al., 2008), verificou-se, que o cultivo não esteve limitado, em nenhum dos meios, ao longo da fermentação (Figura 35). As menores concentrações de oxigênio dissolvido (OD) foram verificadas justamente no intervalo em que foram calculadas as maiores velocidades de crescimento, período de elevado metabolismo respiratório. No meio SOB<sub>30</sub>, os menores valores de OD foram de aproximadamente 40%, o que reforça o argumento de que o substrato principal

(sorbitol) não foi metabolizado pela bactéria. De acordo com Berbert-Molina et al. (2008), a concentração de oxigênio dissolvido em valores acima da concentração crítica não exerce uma influência direta sobre o crescimento celular de *Bti*. Desde que o cultivo não seja submetido a uma limitação de oxigênio, o desenvolvimento celular independe da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

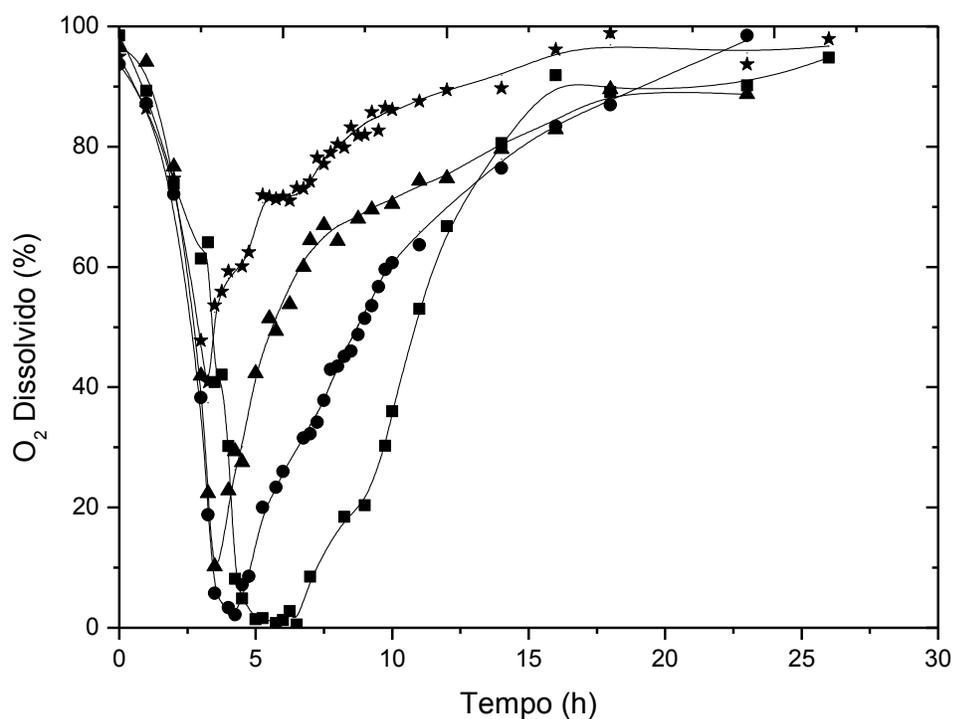


Figura 35 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (●), FOS<sub>30</sub> (▲) e SOB<sub>30</sub> (★) em biorreator de bancada.

O tempo necessário para o início da formação de grumos (floculação), que marca o final da Fase de Crescimento Vegetativo e o início da Fase de Transição para a Esporulação, segundo Berbert-Molina et al. (2008), foi similar (5 a 6h) em todos os casos (Tabela 19). O fenômeno da floculação é coincidente com a paralisação da motilidade celular, característica visível ao microscópio, o que é

seguido por uma diminuição nas velocidades de crescimento e nas velocidades específicas de respiração (Berbert-Molina et al., 2008). Alguns trabalhos mostram que o tempo de formação de grumos está relacionado com as condições nutricionais e operacionais empregadas no cultivo dessa bactéria. Valores de  $t_{gr}$  de 6,5h foram obtidos por Rodrigues (2009) na fermentação de meios formulados com solução osmótica residual de açúcar invertido em diferentes diluições, em processo realizado em condições semelhantes. Kraemer-Schafhalter e Moser (1996), em condição não limitante de transferência de oxigênio, constataram o início da formação de grumos na quarta hora de fermentação com *Bti*, utilizando meios com 10 g/L de glicose. Berbert-Molina et al. (2008) constataram que os tempos para o início da floculação de *Bti* foram idênticos (5 h) em meios com concentrações crescentes de glicose (10 a 120 g/L) e condições não limitantes de oxigênio, mas ocorreu 1 h mais tarde no meio com  $S_0$  de 150 g/L. Pessanha (2008), estudando o cultivo de *Bti*, em frascos agitados e utilizando sacarose, glicose e frutose ( $S_0=10,0$  g/L) como fonte de carbono, além de meio com caldo de cana, verificou valores variáveis de  $t_{gr}$ .

Os parâmetros relativos ao desempenho do processo de esporulação do cultivo nos diferentes meios mostraram diferença de apenas 10% no número de esporos totais (ET) entre os meios GYS<sub>30</sub> e MAL<sub>30</sub> (Tabela 19). Esta diferença foi, no entanto, extremamente mais elevada (17 vezes) quando comparados os meios GYS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>, tendo este último apresentado o pior desempenho (ET=2,71.10<sup>8</sup> ufc/mL). Assim como observado para a produção de células, a esporulação foi superior no meio MAL<sub>30</sub>, em comparação aos demais meios formulados com solução osmótica. Em relação ao meio FOS<sub>30</sub>, esta diferença foi de 53,7%, equivalente àquela observada entre os valores de  $\Delta X$  nestes meios. Desta forma, a taxa de esporulação ( $T_{sp}$ ) foi similar nestes dois meios e comparável à obtida em GYS<sub>30</sub>. No meio SOB<sub>30</sub>, com o baixo desempenho na produção de células e repressão da esporulação, uma taxa de esporulação extremamente baixa (38,6%) foi encontrada.

A Figura 33 evidencia também que as fases de esporulação e de lise celular foram muito mais longas no meio GYS<sub>30</sub> (cerca de 13 horas) que nos meios

formulados com solução osmótica. Os resultados também indicaram que a lise celular foi favorecida no meio MAL<sub>30</sub> em relação ao meio FOS<sub>30</sub>. Por outro lado, o baixo número de esporos livres (EL) verificados no meio SOB<sub>30</sub> pode explicar o perfil da curva de crescimento neste meio, que não mostrou o perfil decrescente característico (Figura 0). A fim de facilitar a visualização, a Figura 36 mostra a variação dos diferentes tipos celulares ao final da fermentação nos diferentes meios.

Com relação à atividade larvicida dos meios fermentados contra larvas de *Aedes aegypti*, parâmetro chave para determinar a eficiência do processo fermentativo, os resultados mostraram (Tabela 19) que não houve diferença significativa, em nível de significância de 5% pelo teste de Tukey, entre os valores de LC<sub>50</sub> no meio controle e no meio MAL<sub>30</sub> (2,52 e 2,19 mg/L, respectivamente). No meio FOS<sub>30</sub>, a atividade tóxica foi cerca de duas vezes menor que no meio MAL<sub>30</sub>. O meio SOB<sub>30</sub>, que apresentou baixa concentração celular e inibição da esporulação, apresentou, da mesma forma, o pior desempenho em relação à síntese de toxinas. Neste meio, o valor de LC<sub>50</sub> foi quase 80 vezes maior que o obtido com MAL<sub>30</sub>. Apesar das taxas de esporulação muito similares em GYS<sub>30</sub>, MAL<sub>30</sub> e FOS<sub>30</sub>, os valores da atividade larvicida não foram semelhantes nestes meios. Este comportamento está de acordo com o observado por diferentes autores, que mostram que, embora a síntese do cristal proteico esteja intrinsecamente ligada ao processo de esporulação da bactéria, elevados valores de ET não implicam necessariamente em alta atividade tóxica do meio fermentado (Avignone-Rossa e Mignone, 1993; Morris et al., 1996; Schnepf et al., 1998; Pessanha, 2005; Rodrigues, 2006 e 2009; Boniolo et al., 2012).

Meios de cultivo empregados no cultivo *Bt* em escala laboratorial, normalmente de composição química semidefinida levam a concentrações de células entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> ufc/mL, com taxas de esporulação variáveis (Bernhard e Utz, 1993; Rodrigues, 2006 e 2009; Boniolo et al., 2012). No entanto, maiores valores de CT e ET têm sido obtidos com o uso de matérias-primas naturais na composição do meio de cultivo. López-y-López e de La Torre (2005) obtiveram uma produção máxima de biomassa de 1,7.10<sup>13</sup> ufc/mL, com taxa de esporulação de 93%, na fermentação de meio contendo farelo de soja e água de maceração de milho. Em meios formulados

com extrato de levedura e peptona de diferentes marcas comerciais, em concentrações variadas, Prabakaran e Hoti (2008) observaram valores de ET entre  $3,7 \cdot 10^{10}$  e  $3,24 \cdot 10^{11}$  ufc/mL em fermentações com *Bti*. Khuzhamshukurov et al. (2001) relataram valores de ET de  $6,4 \cdot 10^9$  ( $T_{SP}=95\%$ ) e  $6,3 \cdot 10^9$  ufc/mL ( $T_{SP}=91\%$ ), no cultivo da variedade *Bt var. thuringiensis* em meios formulados com extrato de levedura e melão ou extrato de batata, respectivamente.

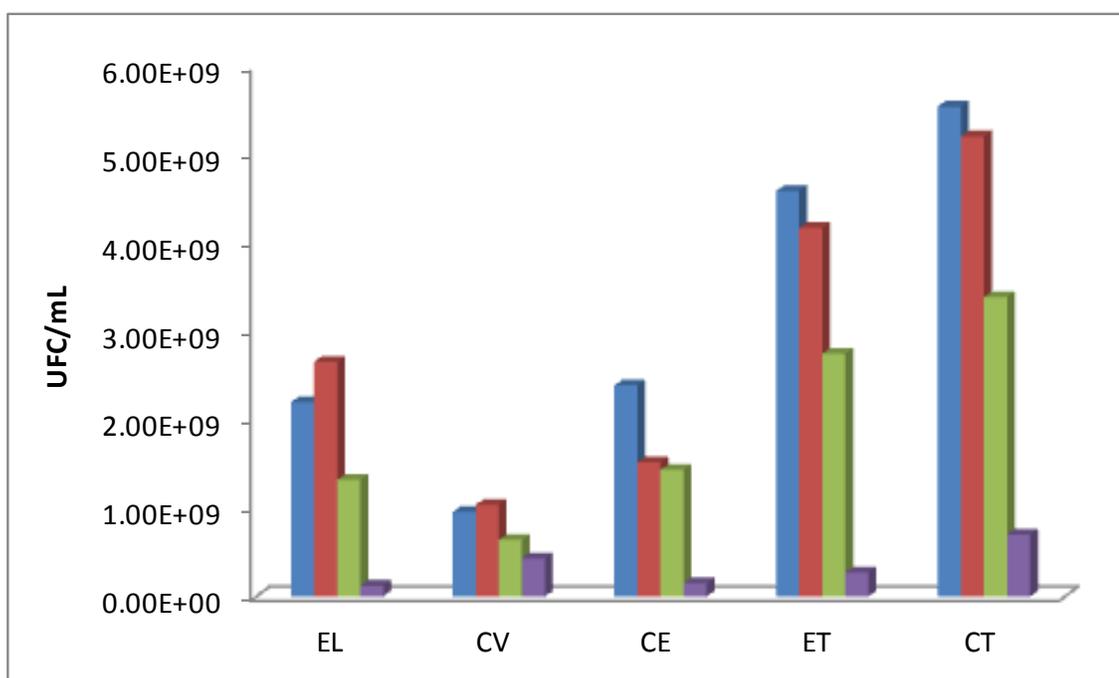


Figura 36 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios GYS<sub>30</sub> (■), MAL<sub>30</sub> (■), FOS<sub>30</sub> (■) e SOB<sub>30</sub> (■). EL - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.

A composição do meio de cultivo também influencia a atividade larvicida pelas diferentes variedades de *Bt* (Bernhard e Utz, 1993). O valor de  $LC_{50}$  encontrado no meio MAL<sub>30</sub> (2,19 mg/L), foi menor que os verificados por Poncet et al. (1995), na fermentação com cepas recombinantes de *Bti* (10,0 e 14,0 mg/L, respectivamente, contra larvas de *Ae. aegypti* e *Culex pipiens*). A atividade tóxica no meio MAL<sub>30</sub> foi

também superior às obtidas por Ramada (2008), no cultivo de *Bti* em meio formulado com melaço e suplementado com sulfato de amônio ( $LC_{50}=7,41$  mg/L), mas similares ao encontrado no mesmo estudo com meio isento deste sal ( $LC_{50}=3,22$  mg/L). No entanto Entretanto, todos os encontrados no presente trabalho foram inferiores aos obtidos por Luna et al. (2004), 0,22 mg/L, na fermentação de *Bti* em meio composto com o sobrenadante da própria fermentação.

Além da composição geral do meio de cultivo, o tipo de açúcar utilizado pode influenciar a produção de endotoxinas (Yang e Wang, 1998; Sachidanandham et al., 1997; Özkan et al., 2003; Panarotto, 2006). İçgen et al. (2002b) verificaram, para uma variedade tóxica para lepidópteros, que as mais altas concentrações de toxina foram obtidas em meios com sacarose, lactose e inulina, enquanto nos meios com glicose, glicerol ou maltose a produção foi muito baixa. Özkan et al. (2003) também verificaram maior produção das frações Cry4Ba e Cry11Aa, por *Bti*, em meios com sacarose, dextrina, lactose, glicerol e inulina. Poopathi e Kumar (2003) obtiveram alta atividade inseticida na fermentação de meios formulados com sacarose, utilizando *Bti* HD 567. Morris et al. (1996) e Panarotto (2006) verificaram que glicose foi o carboidrato mais adequado à produção de endotoxinas por *Bt* var. *aizawa* e *Bti*, respectivamente.

Os resultados globais obtidos na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub>, FOS<sub>30</sub> e SOB<sub>30</sub>, levaram a constatação de que apenas os meios MAL<sub>30</sub> e FOS<sub>30</sub> são adequados para o processo. Apesar da atividade tóxica encontrada no meio FOS<sub>30</sub> ter sido inferior à encontrada no meio MAL<sub>30</sub>, este apresenta potencial para ser utilizado na fermentação, sendo importante novos estudos visando à sua adequação com relação a concentração de minerais e outros parâmetros fermentativos. Em contrapartida, o meio SOB<sub>30</sub> mostrou-se inapropriado ao processo visto seu baixo desempenho com relação a produção em células, esporos e atividade larvicida. O meio MAL<sub>30</sub>, ao contrário, demonstrou desempenho apropriado e comparável ao meio controle, tendo sido por essa razão escolhido para as próximas etapas do trabalho.

#### **4.2.2 – Meios formulados com concentrações crescentes de solução osmótica residual de maltodextrina**

O segundo grupo de ensaios (**Grupo F2**) visou avaliar o processo fermentativo em meios com concentrações crescentes de solução osmótica residual de maltodextrina, buscando aumentar a contribuição nutricional do xarope para o desenvolvimento microbiano. Esta estratégia visava também identificar a diluição mais conveniente do xarope para um adequado balanço C:N, levando-se em conta o emprego de uma concentração inicial de extrato de levedura de 12 g/L. As condições operacionais adotadas na fermentação foram as mesmas da etapa anterior. A solução osmótica foi diluída para valores iniciais de substrato ( $S_0$ ) próximos a 30, 50, 75 e 100 g/L, gerando os meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, respectivamente.

Na Tabela 20 são apresentados os resultados gerais obtidos nos ensaios, enquanto a Figura 37 mostra o perfil cinético de crescimento e de consumo de substrato nos diferentes meios testados.

Nota-se que o tempo de fermentação no meio MAL<sub>50</sub> foi idêntico (23h) ao do meio MAL<sub>30</sub>. Também não houve diferença na duração do processo (34 h) nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, a qual foi, por outro lado, muito superior (11 h) à dos dois primeiros. Este resultado difere do obtido por Rodrigues (2009) no cultivo de *Bti* em meios formulados com solução osmótica residual de açúcar invertido, no qual se observou tempos totais de fermentação de 27 e 28h, respectivamente, para meios com diluições próximas a 75 e 100 g/L.

A produção de biomassa ocorreu de forma similar nos quatro meios, não sendo verificada diferença maior que 10% entre o menor (16,2 g/L) e o maior (17,9 g/L) valor de  $\Delta X$ . O tempo necessário para a obtenção das máximas concentrações celulares ( $t_{Xm}$ ) nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub> foi, no entanto, 8 e 7 h maior, respectivamente, que nos meios MAL<sub>30</sub> e MAL<sub>50</sub>. Desta forma, a produtividade em células ( $p_X$ ) foi negativamente influenciada nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, a qual foi, em média 65% menor que a de MAL<sub>30</sub>. No trabalho de Rodrigues (2009), em que foram avaliadas concentrações crescentes de solução osmótica contendo açúcar invertido,

os valores de  $t_{xm}$  para os meios com  $S_0$  de 30, 50, 75 e 100 g/L foram, respectivamente, 12,7, 12,7, 16 e 21 h.

Tabela 20: Resultados gerais obtidos no cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>.

	MAL <sub>30</sub>	MAL <sub>50</sub>	MAL <sub>75</sub>	MAL <sub>100</sub>
$t_f$ (h)	23	23	34	34
$t_{gr}$ (h)	5	6	7	7
$t_{xm}$ (h)	10	11	18	18
$S_0$ (g/L)	32,3	49,9	69,9	97,5
$\Delta S_{xm}$ (g/L)	15,9	14,2	18,0	23,8
$\Delta S_f$ (g/L)	23,3	26,0	33,1	38,3
$\Delta X$ (g/L)	16,2	16,5	17,5	17,9
$Y_{x/s}$ (g/g)	1,02	1,16	0,97	0,75
$p_x$ (g/L.h)	1,62	1,50	0,97	0,99
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	1,1	0,89	0,71	0,67
EL (ufc/mL)	2,66.10 <sup>9</sup>	2,30.10 <sup>9</sup>	2,90.10 <sup>7</sup>	3,40.10 <sup>7</sup>
CV (ufc/mL)	1,04.10 <sup>9</sup>	4,78.10 <sup>8</sup>	2,80.10 <sup>9</sup>	2,20.10 <sup>9</sup>
CE (ufc/mL)	1,52.10 <sup>9</sup>	2,92.10 <sup>9</sup>	2,50.10 <sup>7</sup>	1,90.10 <sup>7</sup>
ET (ufc/mL)	4,17.10 <sup>9</sup>	5,22.10 <sup>9</sup>	5,40.10 <sup>7</sup>	5,30.10 <sup>7</sup>
CT (ufc/mL)	5,21.10 <sup>9</sup>	5,70.10 <sup>9</sup>	2,86.10 <sup>9</sup>	2,25.10 <sup>9</sup>
$T_{sp}$ (%)	85,8	91,6	1,9	2,4
LC <sub>50</sub> (mg/L)	2,19 <sup>a</sup>	14,6 <sup>b</sup>	85,33 <sup>c</sup>	87,88 <sup>c</sup>

$t_f$  - tempo final de fermentação;  $t_{gr}$  - tempo de formação de grumos;  $t_{xm}$  - tempo para obtenção da máxima concentração celular;  $\Delta S_{xm}$  - substrato consumido até  $t_{xm}$ ;  $\Delta S_f$  - consumo total de substrato;  $\Delta X$  - máxima concentração celular;  $Y_{x/s}$  - fator de conversão de substrato em células, calculado em  $t_{xm}$ ;  $p_x$  - produtividade em células, calculada em  $t_{xm}$ ;  $\mu_m$  - máxima velocidade específica de crescimento; EL - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE

- número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT- número total de células;  $T_{SP}$  - taxa de esporulação;  $LC_{50}$  – concentração necessária para matar 50% das larvas de *Ae. aegypti*.

Verificou-se que em nenhum dos meios houve o esgotamento do substrato até o tempo final de processo (Figura 37), sendo verificadas concentrações residuais crescentes com o aumento da concentração inicial de maltodextrina (Tabela 1). Na fermentação do meio  $MAL_{100}$ , que apresentou o maior consumo de maltodextrina, a concentração residual de açúcar foi de 9 g/L em  $t_f$ , o que corresponde a um consumo de 72,1% do substrato inicialmente presente no meio (Tabela 1). Percentuais de consumo de 52,1, 47,3 e 39,3% foram calculados no caso dos meios  $MAL_{50}$ ,  $MAL_{75}$  e  $MAL_{100}$ , respectivamente, até  $t_f$ . Valores crescentes de consumo de substrato também foram encontrados por Rodrigues (2009) em meios com concentrações crescentes de substrato (95,6, 66,8, 46,6 e 41,1% para meios com 31,0, 54,7, 74,9 e 106,2 g/L de substrato, respectivamente).

Considerando-se o metabolismo de maltodextrina até  $t_{Xm}$ , verificou-se que no meio  $MAL_{30}$  foram consumidas 15,9 g/L do substrato no período, o que corresponde a praticamente a metade do valor de  $S_0$ . Nos demais meios, por outro lado, 26% de maltodextrina, em média, haviam sido consumidas até  $t_{Xm}$ . Assim, mesmo com menor consumo de substrato, o valor de  $Y_{X/S}$  (fator de conversão de substrato em células) no meio  $MAL_{50}$  foi maior que em  $MAL_{30}$ , uma vez que estes meios apresentaram valores equivalentes de  $\Delta X$ . Valores decrescentes de  $Y_{X/S}$  foram observados com o aumento de  $S_0$  de 49,9 ( $MAL_{50}$ ) para 97,5 ( $MAL_{100}$ ). De modo geral, esses valores de  $Y_{X/S}$  são superiores aos descritos por Avignone-Rossa et al. (1993) e Kraemer-Schafhalter e Moser (1996), 0,68 e 0,73 g/g, respectivamente, em ensaios de fermentação com *Bti*, com 10 g/L de glicose e sem limitação de oxigênio. Perfil similar ao do presente trabalho foi observado por Rodrigues (2009), na fermentação de meios formulados com solução osmótica com açúcar invertido em concentrações crescentes, porém com valores inferiores de  $Y_{X/S}$  (0,7 e 0,42 g/g, para meios com  $S_0$  de 30 e 100 g/L, respectivamente). Berbert-Molina et al. (2008), encontraram valores de  $Y_{X/S}$  de 0,58, 0,51, 0,42, 0,41 e 0,36, ao utilizar

concentrações iniciais de glicose de, aproximadamente, 30, 60, 80, 120 e 150 g/L, respectivamente. Em fermentação de glicose com a mesma bactéria, Boniolo et al. (2012) também verificaram valores nesta faixa, em processos com diferentes condições de transferência de oxigênio para o meio. Neste caso, um valor de 0,53 g/g foi obtido no processo em que a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida a 50% da saturação durante toda a fermentação.

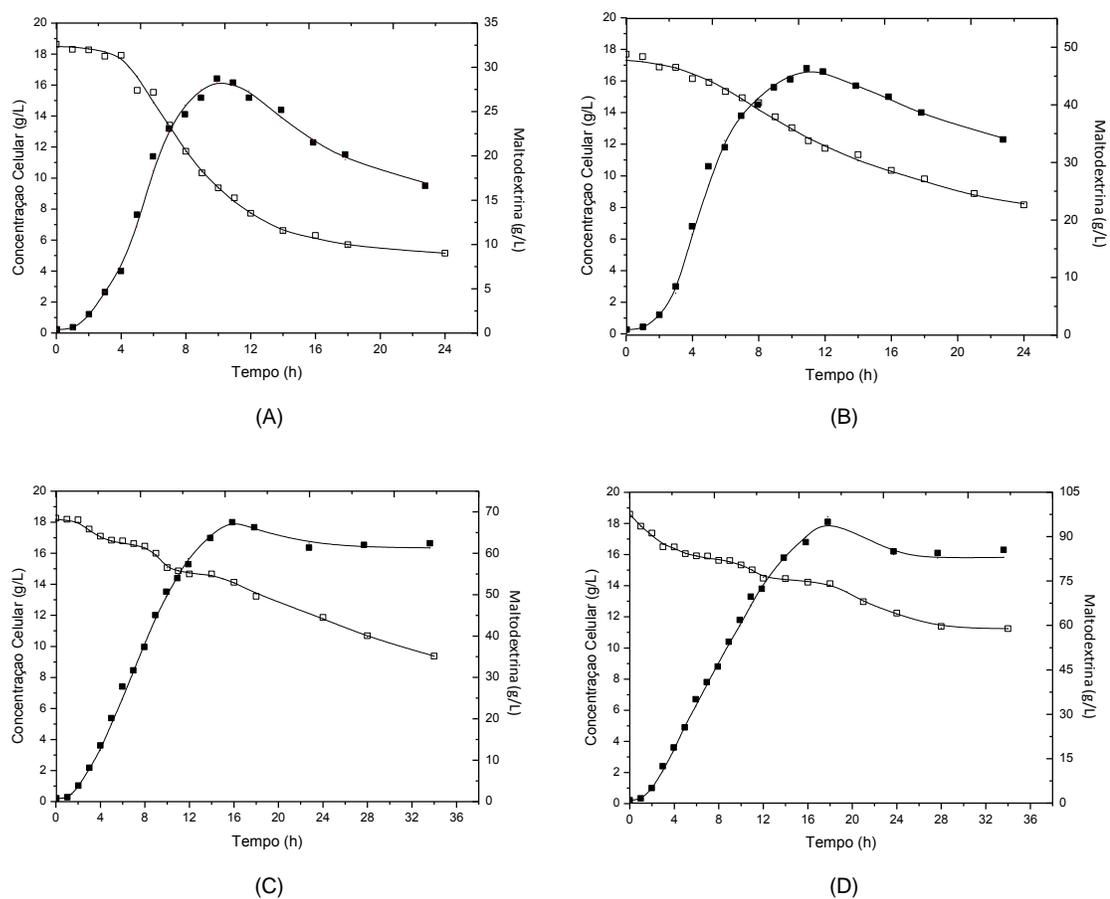


Figura 37 – Concentração de células (■) e de Maltodextrina (□), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (A), MAL<sub>50</sub> (B), MAL<sub>75</sub> (C) e MAL<sub>100</sub> (D) em biorreator de bancada.

Em todos os meios, verificou-se o comportamento característico da bactéria durante a fermentação, conforme descrito por Berbert-Molina et al. (2008). Após curta fase lag, houve ocorrência de uma fase exponencial, seguida de fase linear, estacionária e de declínio. As diferenças nos perfis de variação da concentração celular ( $X$ ) com o tempo podem ser melhor visualizadas na Figura 38, que compara especificamente a evolução da biomassa nos diferentes meios. Os perfis foram coincidentes para todos eles nas três primeiras horas de cultivo. A partir daí, a cinética de crescimento em MAL<sub>30</sub> e MAL<sub>50</sub> continua similar, mas difere daquela observada em MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, tanto em relação às velocidades de crescimento quanto em relação à duração da fase linear.

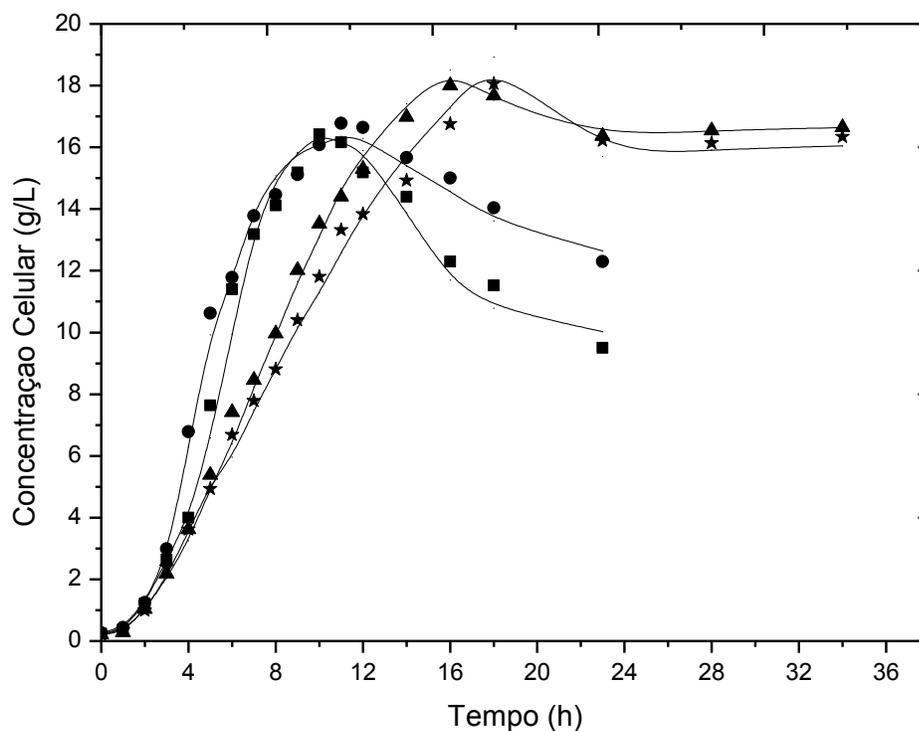


Figura 38 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada.

A Figura 39, que mostra a variação dos valores de  $dX/dt$  em função do tempo em todos os ensaios, evidencia claramente este comportamento. Maiores valores de  $dX/dt$  foram verificados nos meios MAL<sub>30</sub> e MAL<sub>50</sub> (cerca de 3,2 g/L.h), nos tempos de 4 e 6 h, respectivamente, os quais foram duas vezes maior aos obtidos nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>.

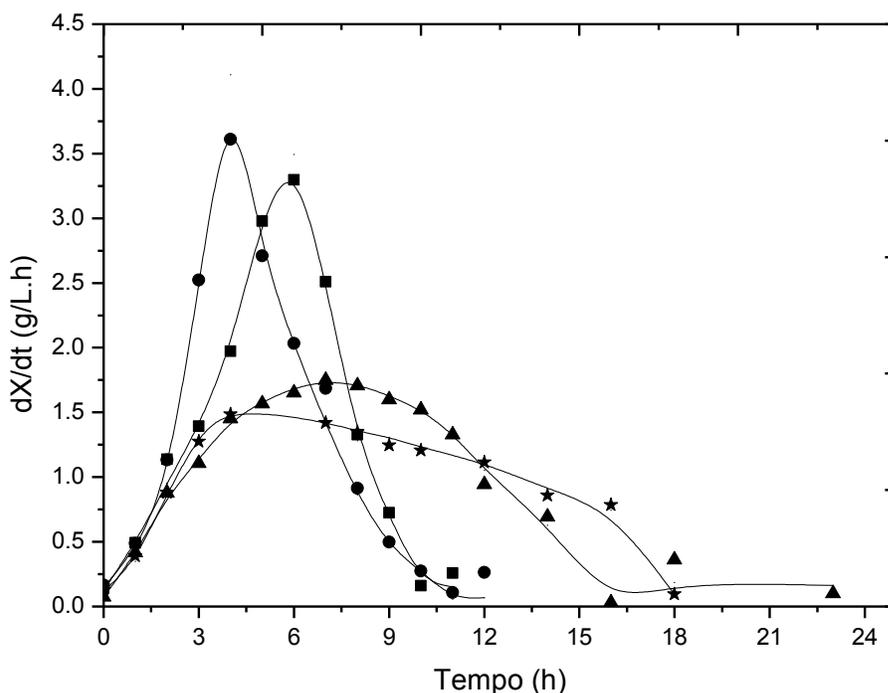


Figura 39 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada.

Os valores decrescentes de  $\mu_m$  com o aumento de  $S_0$  (Tabela 20 e Figura 40) mostraram inibição do crescimento celular com concentrações mais elevadas de maltodextrina, meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, nos quais as máximas velocidades específicas de crescimento foram de 0,71 e 0,67 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados são semelhantes aos descritos por Berbert-Molina et al. (2008) para o cultivo de *Bti* em

meio contendo glicose. Os autores verificaram a ocorrência de inibição do cultivo para valores de  $S_0$  maiores que 75 g/L, evidenciada por uma queda acentuada no valor de  $\mu_m$  (de 1,1 para 0,79  $h^{-1}$ ). Para a variedade *Bt var. galleriae*, ao contrário, Anderson e Jayaraman (2003) verificaram que, independente da concentração de glicose (3,4, 18,7 e 34 g/L), o aumento da concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura: 1, 10,5 e 20 g/L) levou a um aumento dos valores de  $\mu_m$ . Em meio contendo glicose, farelo de soja e amido, foram verificados valores de  $\mu_m$  entre 1 e 1,25  $h^{-1}$  para as variedades *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, *Bt var. aizawai* e *Bt var. tenebrionis* (Yan et al., 2007).

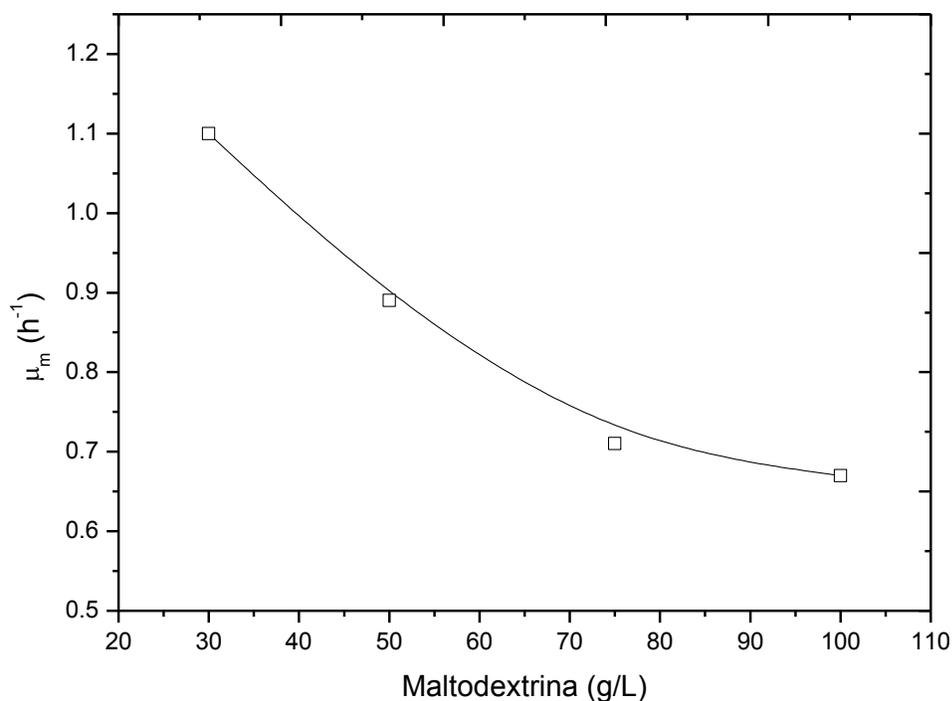


Figura 40 – Máximas velocidades específicas de crescimento, em função da concentração de maltodextrina, Meios MAL<sub>30</sub>, MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub> em biorreator de bancada.

Os perfis das concentrações de oxigênio dissolvido (OD) nos diferentes meios estão evidenciados na Figura 41. No meio MAL<sub>30</sub> o valor de OD chegou a zero por volta de 4h de fermentação, voltando a subir pouco tempo depois e mantendo o perfil crescente até o final. Nos demais meios, apesar do oxigênio dissolvido ter chegado à zero no mesmo período, este permaneceu nesta condição por mais tempo, comportamento mais evidente nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, nos quais os valores de OD só voltaram a subir na décima segunda hora de fermentação. Este maior tempo sob limitação de oxigênio pode ter influenciado os resultados obtidos nestes meios.

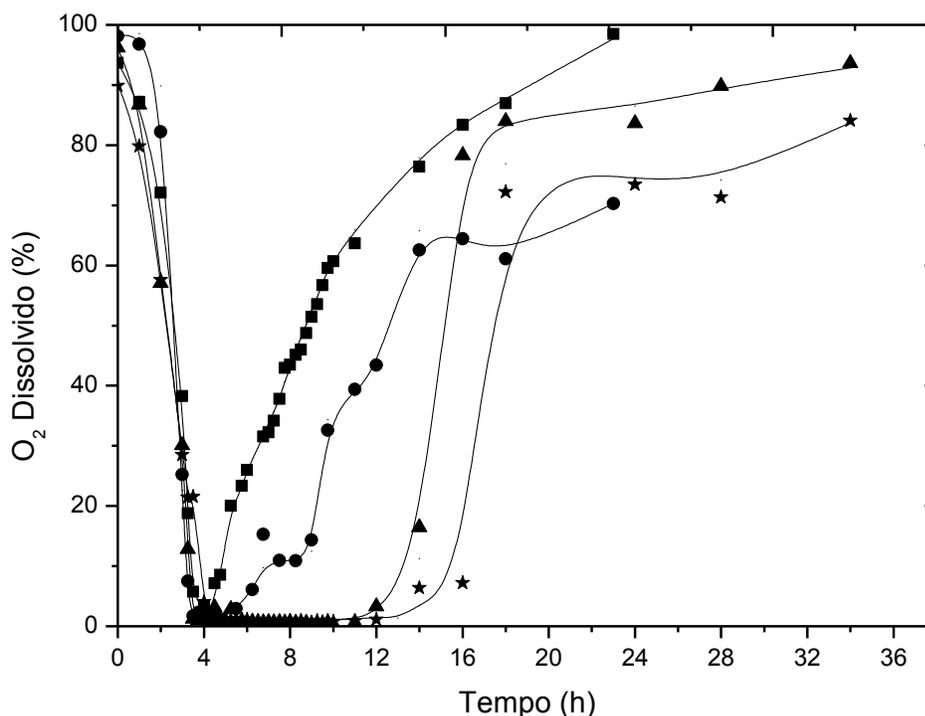


Figura 8 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (●), MAL<sub>75</sub> (▲) e MAL<sub>100</sub> (★) em biorreator de bancada.

Em relação ao tempo para cessar a motilidade celular e iniciar a formação de grumos ( $t_{gr}$ ), fenômenos que caracterizam a transição para a esporulação, observou-se discreto aumento de  $t_{gr}$  com aumento de  $S_0$ . A diferença foi de 2 h entre os meios

MAL<sub>30</sub> e MAL<sub>75</sub> ou MAL<sub>100</sub> (Tabela 20). Porém, o impacto da concentração de maltodextrina sobre a esporulação foi marcante. Verificou-se que a produção de esporos foi fortemente reprimida nos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, nos quais valores de ET foram 80 e 130% menores que os obtidos em MAL<sub>30</sub>. Em relação à MAL<sub>50</sub>, a diferença foi ainda maior. Desse modo, taxas de esporulação muito baixas foram obtidas nestes meios (1,89 e 2,36%, respectivamente). O elevado número de células vegetativas, e o baixo número de esporos livres, ao final do cultivo (Figura 42), também explicam os perfis observados durante as fases finais do cultivo nos meios MAL<sub>75</sub> ou MAL<sub>100</sub> (Figura 38), os quais não apresentaram os perfis decrescentes decorrentes de uma diminuição da concentração celular em função da lise das células.

Os valores de ET encontrados nos meios MAL<sub>30</sub> e MAL<sub>50</sub> são muito superiores ao encontrado por Rodrigues (2009) no cultivo de *Bt* em meio formulado com xarope residual da desidratação de abacaxi com açúcar invertido. Contudo, comparando o desempenho da esporulação nos meios com maior concentração de substrato, observou-se comportamento inverso. Concentrações da ordem de 75 e 100 g/L de maltodextrina levaram a valores de ET muito maiores (50 e 43 vezes, respectivamente) que as observadas pelos autores em meios com concentrações similares de açúcar invertido. Conforme discutido anteriormente, a composição do meio e a natureza da fonte de carbono influenciam significativamente a esporulação de *Bt*. Saksinchai et al. (2001), em estudos com a finalidade de avaliar a substituição de extrato de levedura comercial por autolisado de levedura de cervejaria, na composição do meio de cultivo de *Bt* var. *kurstaki*, observaram valores de ET de  $2,6 \times 10^9$  e de  $1 \times 10^8$  ufc/mL, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Arcas et al. (1987) com a mesma variedade da bactéria. Com *Bt*, Luna et al. (2004) obtiveram um número máximo de esporos de  $2,2 \times 10^9$  ufc/mL utilizando o próprio sobrenadante da fermentação na composição do meio.

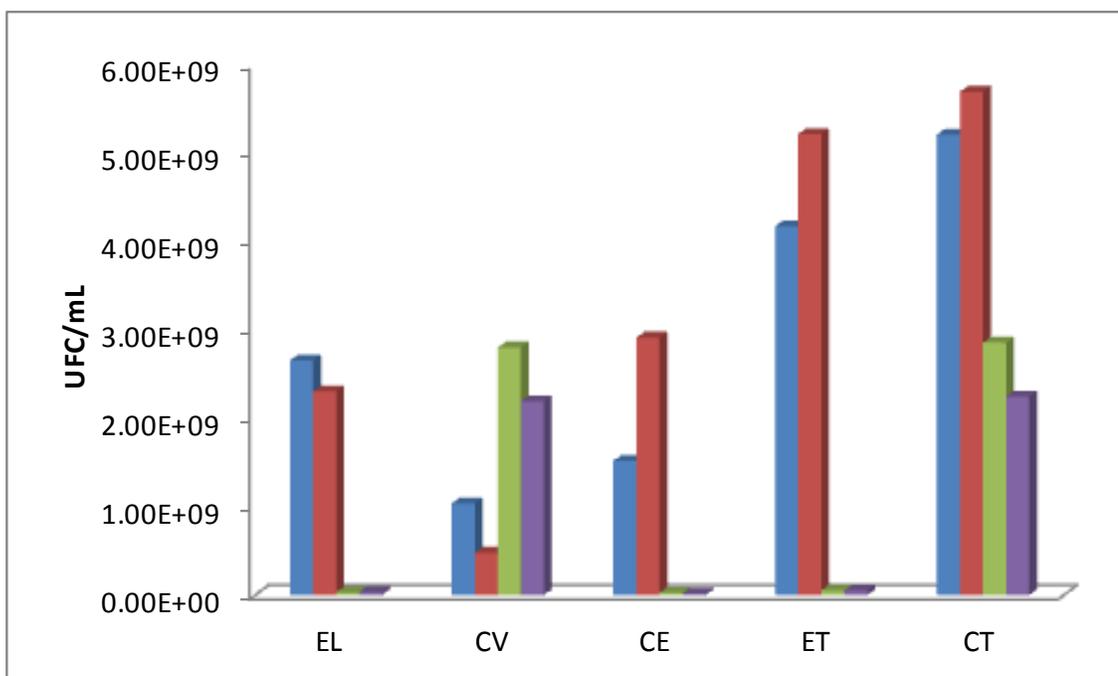


Figura 42 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios MAL<sub>30</sub> (■), MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>75</sub> (■) e MAL<sub>100</sub> (■). EL - Esporos Livres; CV - Células Vegetativas; CE - Células Esporuladas; ET - Esporos Totais; CT - Células Totais.

A atividade biológica é considerada o parâmetro mais adequado para avaliar o desempenho de cultivos de *Bt* para a produção de inseticidas (Maldonado-Blanco et al., 2003). Com relação a este parâmetro, os resultados mostraram que a concentração de maltodextrina, e/ou a relação C:N, também afetaram a produção de toxinas pela bactéria (Tabela 20). Houve diferença significativa, em nível de significância de 5% pelo teste de Tukey, entre o valor de LC<sub>50</sub> encontrado no meio MAL<sub>30</sub> (2,19 mg/L) e os demais. Isto representa uma atividade tóxica 6 vezes maior que a encontrada no meio MAL<sub>50</sub> (LC<sub>50</sub> = 14,6 mg/L). Os meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub>, por outro lado, apresentaram valores muito maiores de LC<sub>50</sub> (85,33 e 87,33, respectivamente), sem diferença significativa entre eles, demonstrando grande repressão da síntese de toxinas. Ghribi et al. (2007) mostraram que concentrações crescentes de carboidratos levam à repressão catabólica da síntese de toxinas por *Btk*, evento que também é regulado pela natureza da fonte de carbono.

Os resultados dos bioensaios foram também distintos dos obtidos por Rodrigues (2009), que observou valores similares de  $LC_{50}$  (8,0 mg/L, aproximadamente) com concentrações iniciais crescentes de ART. Os menores valores de  $LC_{50}$  encontrados no presente trabalho foram também inferiores àqueles reportados por outros autores com emprego de diferentes meios: 0,02 mg/L, em meio composto com sobrenadante da própria fermentação (Luna et al., 2004); 0,22 mg/L, com extrato de batata (Poopathi e Kumar, 2003); 0,18 mg/L, em meio suplementado com esterco de galinha (Poopathi e Abidha, 2007); 0,27 mg/L, com farelo de soja e água de maceração de milho (Maldonado-Blanco et al., 2003); 0,27 mg/L, em meio com extrato de levedura e peptona (Prabakaran e Hoti, 2008). Diversos estudos mostram a influência da relação C:N sobre os resultados deste processo fermentativo. Farrera et al. (1998) verificaram maior produção de uma das frações proteicas do cristal de *B.t.* var. *kurstaki* com relação C:N de 7:1. Para *B.ti*, Tockaer et al. (2006) observaram maiores rendimentos das frações Cry4 e Cry11 usando meio com relação C:N de 20:1.

Os resultados gerais obtidos neste grupo de ensaios levaram a constatação de que diluições da solução osmótica de maltodextrina para obtenção de concentrações de substrato acima de 50 g/L não são adequadas para o processo. Apesar do desempenho satisfatório dos meios MAL<sub>75</sub> e MAL<sub>100</sub> com relação à produção de biomassa, constatou-se inibição do crescimento pelo substrato e também grande repressão dos processos de esporulação e síntese de endotoxinas. Por outro lado, no meio com menor diluição (MAL<sub>30</sub>) obtiveram-se altas concentrações celulares e de esporos, além do menor valor de  $LC_{50}$ . No entanto, apesar do meio MAL<sub>50</sub> ter apresentado menor atividade tóxica, os demais parâmetros fermentativos, como  $Y_{X/S}$ ,  $p_X$  e taxa de esporulação, foram elevados, tornando sua formulação interessante para o processo fermentativo. Devido ao baixo consumo de substrato (52,1%), porém, acreditava-se ser necessário suplementar o meio de cultivo com nitrogênio, a fim de obter uma relação C:N mais conveniente. Este ajuste poderia, eventualmente, influenciar também a atividade larvicida. Outra variável importante, o suprimento de oxigênio no meio de cultivo, considerado decisivo no processo fermentativo com *Bt*, independente da subespécie empregada (Avignone-

Rossa et al. 1992; Flores et al., 1997; Abdel-Hameed, 2001; Maldonado-Blanco et al., 2003, Rowe et al., 2003; Sarrafzadeh e Navarro, 2006; Ghribi et al., 2007a), indicava a necessidade de avaliar o novo meio em condições mais adequadas de aeração, o que será apresentado no próximo item.

#### ***4.2.3 - Influência da suplementação de nitrogênio orgânico sobre o crescimento celular e a atividade tóxica***

Neste grupo de ensaios (**Grupo F3**) buscou-se avaliar de que forma a suplementação do meio com nitrogênio orgânico, feita desde o início do cultivo, e o aumento da transferência de oxigênio, neste meio, afetariam os principais parâmetros cinéticos, a esporulação e a síntese de toxinas pela bactéria. Conforme as razões relatadas anteriormente, optou-se por diluir a solução osmótica para obter  $S_0$  em torno de 50 g/L. A formulação testada foi denominada MAL<sub>50</sub>2N, a qual tem o dobro da concentração de extrato de levedura que a do meio MAL<sub>50</sub>. A fermentação deste meio em condições não limitadas em oxigênio (acima de 50%) foi analisada na sequência e, apesar da mesma composição, este meio foi denominado MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) para facilitar a análise.

Os principais parâmetros cinéticos e os dados relativos à esporulação e síntese de toxinas nestes dois meios estão apresentados na Tabela 21. A Figura 43 apresenta a cinética de crescimento celular e de consumo de maltodextrina em função do tempo. Em ambos os casos, os resultados obtidos com o meio MAL<sub>50</sub> são também apresentados a fim de facilitar a comparação.

Tabela 21: Resultados gerais obtidos no cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis* nos meios MAL<sub>50</sub>, MAL<sub>50</sub>2N e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>).

	MAL <sub>50</sub>	MAL <sub>50</sub> 2N	MAL <sub>50</sub> 2N(O <sub>2</sub> )
t <sub>f</sub> (h)	23	29	24
t <sub>gr</sub> (h)	6	8	7
t <sub>xm</sub> (h)	11	18	12
S <sub>0</sub> (g/L)	49,9	54,0	52,9
ΔS <sub>x,m</sub> (g/L)	14,2	45,4	34,3
ΔS <sub>f</sub> (g/L)	26,0	49,0	48,6
ΔX (g/L)	16,5	31,9	30,7
Y <sub>x/s</sub> (g/g)	1,16	0,70	0,90
p <sub>x</sub> (g/L.h)	1,50	1,77	2,55
μ <sub>m</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,89	0,98	0,97
EL (ufc/mL)	2,30.10 <sup>9</sup>	4,66.10 <sup>9</sup>	3,15.10 <sup>9</sup>
CV (ufc/mL)	4,78.10 <sup>8</sup>	1,58.10 <sup>9</sup>	7,50.10 <sup>8</sup>
CE (ufc/mL)	2,92.10 <sup>9</sup>	2,36.10 <sup>9</sup>	4,37.10 <sup>9</sup>
ET (ufc/mL)	5,22.10 <sup>9</sup>	7,03.10 <sup>9</sup>	7,52.10 <sup>9</sup>
CT (ufc/mL)	5,70.10 <sup>9</sup>	8,61.10 <sup>9</sup>	8,27.10 <sup>9</sup>
T <sub>sp</sub> (%)	91,61	81,60	90,93
LC <sub>50</sub> (mg/L)	14,6 <sup>a</sup>	69,62 <sup>b</sup>	33,98 <sup>a</sup>

t<sub>f</sub> - tempo final de fermentação; t<sub>gr</sub> - tempo de formação de grumos; t<sub>xm</sub> - tempo para obtenção da máxima concentração celular; ΔS<sub>x,m</sub> - substrato consumido até t<sub>xm</sub>; ΔS<sub>f</sub> - consumo total de substrato; ΔX - máxima concentração celular; Y<sub>x/s</sub> - fator de conversão de substrato em células, calculado em t<sub>xm</sub>; p<sub>x</sub> - produtividade em células, calculada em t<sub>xm</sub>; μ<sub>m</sub> - máxima velocidade específica de crescimento; EL - número de esporos livres; CV - número de células vegetativas; CE - número de células esporuladas; ET - número total de esporos; CT - número total de células; T<sub>sp</sub> - taxa de esporulação; LC<sub>50</sub> - concentração necessária para matar 50% das larvas de *Ae. aegypti*.

Verificou-se que, em comparação com o meio MAL<sub>50</sub>, o tempo total de fermentação foi aumentado em 6 h no meio MAL<sub>50</sub>2N. Entretanto, a concentração celular foi amplamente favorecida neste último meio em função da maior concentração de nitrogênio, obtendo-se valor de  $\Delta X$  muito superior (93%) que o alcançado em MAL<sub>50</sub>. Todavia, como o tempo necessário para a obtenção desta concentração ( $t_{Xm}$ ) foi maior (18 h), a produtividade em células não foi favorecida, encontrado-se um valor de  $p_x$  ligeiramente superior (17%) ao de MAL<sub>50</sub>. Além disso, mesmo com aumento significativo da produção de biomassa neste meio, houve ainda um residual de cerca de 9 g/L de maltodextrina no final do processo. Esse consumo (91%) foi, no entanto, superior ao verificado no meio MAL<sub>50</sub> (52,1%), comprovando a inadequação da relação carbono nitrogênio neste meio. Considerando-se que em MAL<sub>50</sub>2N a maior parte (84%) do substrato havia sido consumida até  $t_{Xm}$ , o valor de  $Y_{X/S}$  encontrado neste ensaio foi 65% menor que o obtido em MAL<sub>50</sub>.

A análise das Figuras 43 e 44 evidencia que, em relação à MAL<sub>50</sub>, a maior concentração de nitrogênio afetou o perfil cinético de crescimento em MAL<sub>50</sub>2N, no qual foram verificadas menores velocidades de crescimento nas primeiras 4 horas de processo (Figura 45). A partir daí, houve um aumento das velocidades, que atingiram valores máximos de, aproximadamente, 4,2 g/L.h em 8 horas, valores muito similares aos verificados em MAL<sub>50</sub>. As velocidades voltam a cair a partir deste ponto, fato evidenciado também na curva de crescimento. As elevadas concentrações de nitrogênio no meio MAL<sub>50</sub>2N no início do cultivo não chegaram a afetar o valor de  $\mu_m$ , que foi, ao contrário, ligeiramente maior (0,98 h<sup>-1</sup>) que em MAL<sub>50</sub> (0,89 h<sup>-1</sup>).

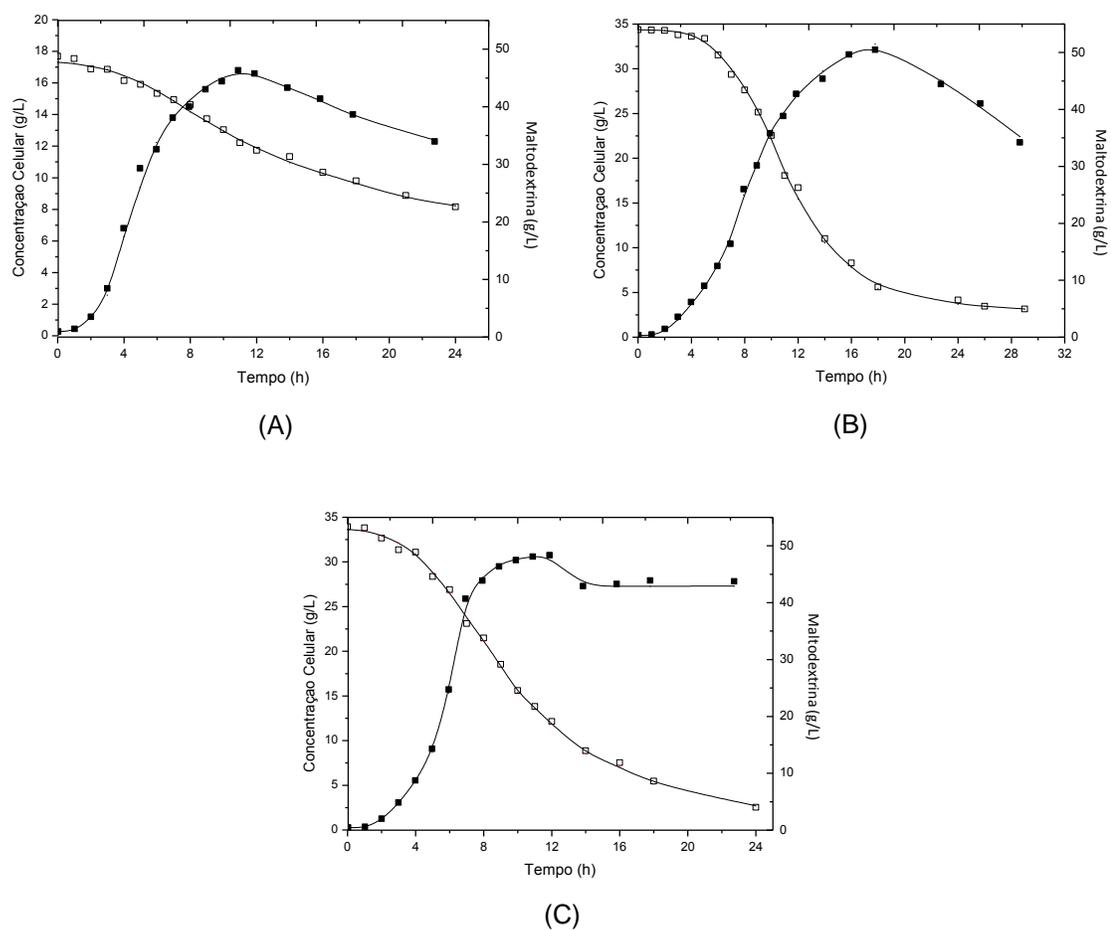


Figura 43 – Concentração de células (■) e de Maltodextrina (□), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (A), MAL<sub>50</sub>2N(B) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (C) em biorreator de bancada.

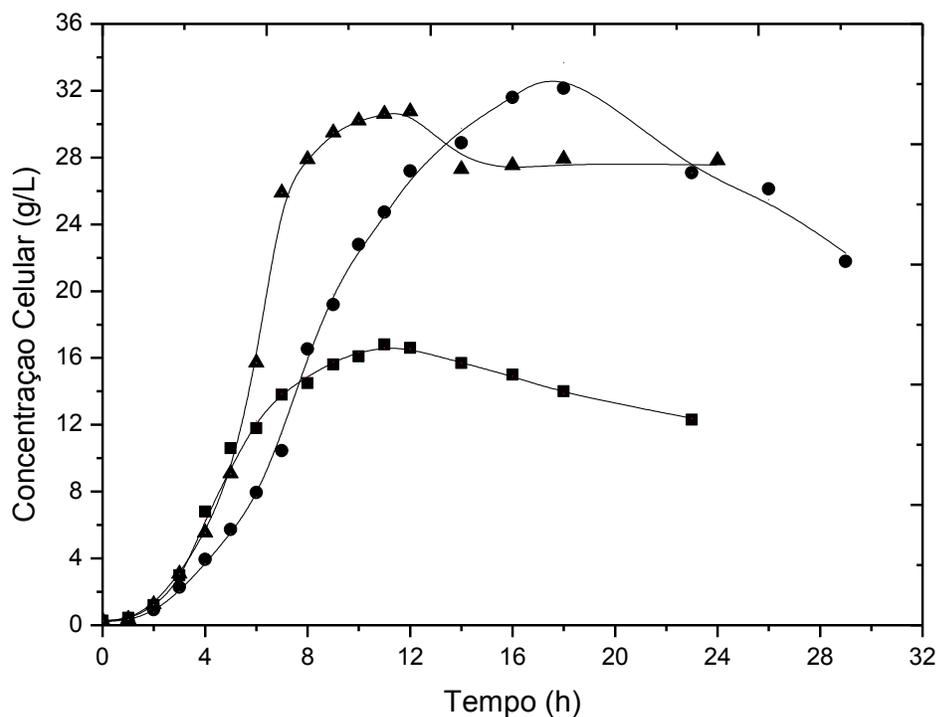


Figura 44 – Concentração de células, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (▲) em biorreator de bancada.

O perfil do consumo de oxigênio durante a fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> e MAL<sub>50</sub>2N está ilustrado na Figura 46. Fica evidente que durante a fase exponencial de crescimento as concentrações de oxigênio dissolvido estavam, em ambos os casos, acima da concentração crítica para o microrganismo (Moraes et al., 1980; Boniolo et al., 2012). No meio MAL<sub>50</sub>2N, no entanto, os valores de OD chegaram a zero logo após a quarta hora, permanecendo neste patamar por mais 14 h, o que possivelmente influenciou as velocidades de crescimento neste período.

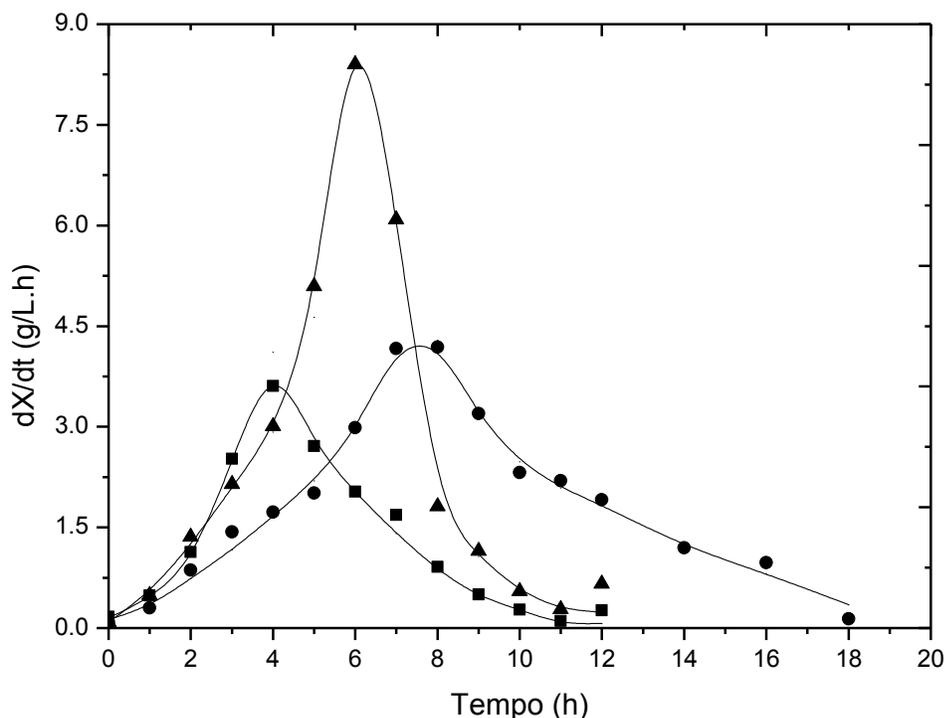


Figura 45 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ), em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (▲) em biorreator de bancada.

A fase de crescimento vegetativo, que corresponde ao intervalo entre o início do cultivo e o início da floculação da cultura ( $t_{gr}$ ), teve 2 horas a menos que no meio MAL<sub>50</sub>. Por outro lado, a duração da fase de transição para a esporulação, que consiste no intervalo entre  $t_{gr}$  e  $t_{xm}$  (Berbert-Molina et al., 2008) foi visivelmente mais longa (10 h) em MAL<sub>50</sub>2N. Com relação à esporulação, o número total de esporos no meio MAL<sub>50</sub>2N foi 34% maior que em MAL<sub>50</sub>. Mas, como o número total de células (CT) também foi muito superior (51%), a taxa de esporulação foi 12% menor neste meio ( $T_{SP}=81,6\%$ ). A composição de MAL<sub>50</sub>2N parece ter afetado também o processo de lise celular, uma vez que as mais altas concentrações de esporos livres, ao final do processo, foram observadas neste meio (Figura 47).

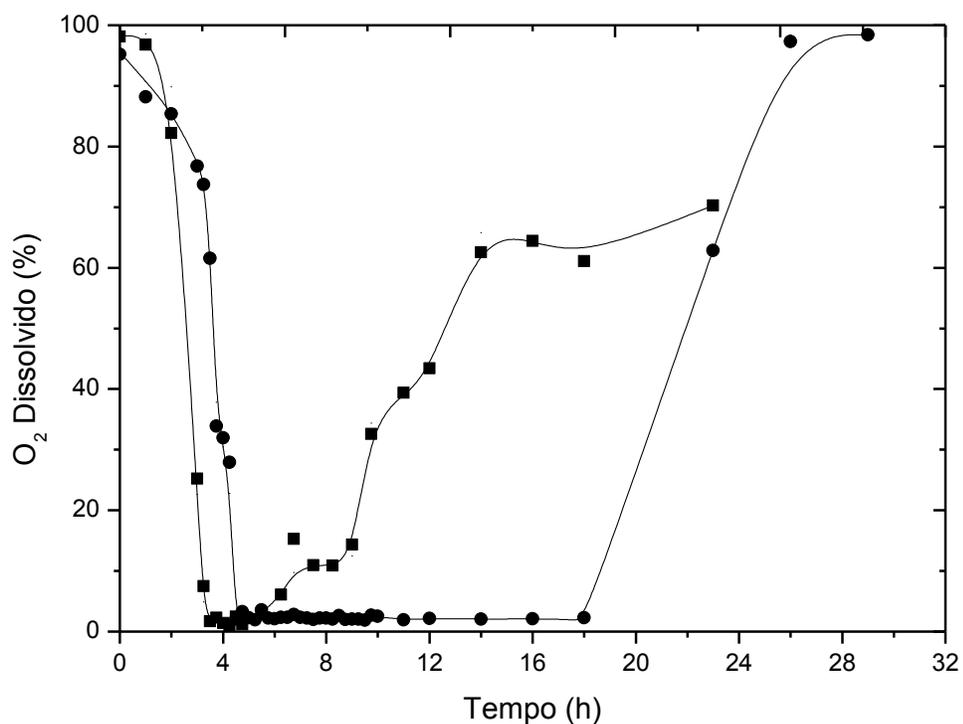


Figura 46 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (●) em biorreator de bancada.

Em relação ao principal parâmetro do processo, verificou-se que apesar da significativa diferença na produção de células e esporos, a atividade larvívora obtida com o meio MAL<sub>50</sub>2N ( $LC_{50}=69,62$  mg/L) foi significativamente inferior àquela obtida com o meio MAL<sub>50</sub> ( $LC_{50}=14,6$  mg/L).

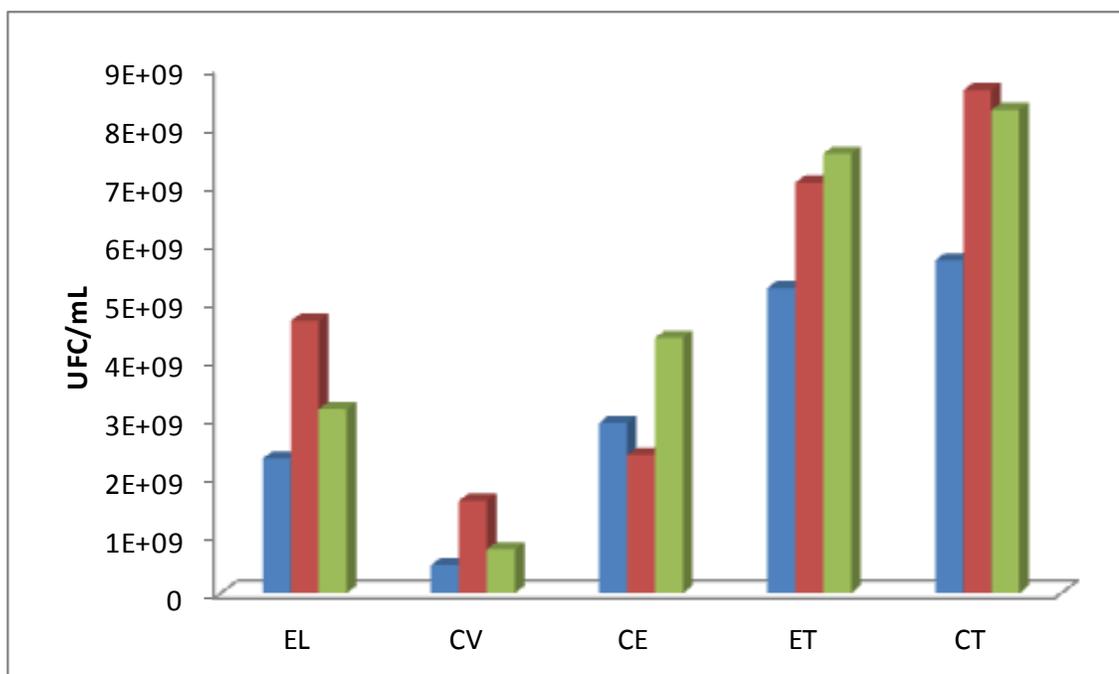


Figura 47 – Crescimento celular e esporulação obtidos na fermentação dos meios MAL<sub>50</sub> (■), MAL<sub>50</sub>2N (■) e MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (■). EL - Esporos livres; CV - Células vegetativas; CE - Células esporuladas; ET - Esporos totais; CT - Células totais.

Além da relação C:N, a influência da fonte de nitrogênio empregada na composição do meio, e sua concentração, sobre os diferentes aspectos do cultivo de *Bt*, foi explorada em diversos trabalhos (Zouari e Joua, 1999; Sakisinchai et al., 2001; Anderson e Jayaraman, 2003; Prabakaram e Balaraman, 2006; Ghribi et al., 2007; Rodrigues, 2009; Tabuchi, 2103). O aumento da concentração celular, com maiores concentrações de nitrogênio, em cultivos de *Bti* foi demonstrado por Rodrigues (2009) na fermentação de meios formulados com solução de açúcar invertido em concentrações próximas a 50 e 75 g/L. A adição de extrato de levedura no curso da fermentação levou a um aumento de 29 e 42%, respectivamente, no valor de  $\Delta X$ , mas a atividade tóxica foi seriamente comprometida. Por outro lado, Prakabaran e Hoti (2008) verificaram que altas concentrações iniciais de nitrogênio, na forma de aminoácidos individuais e pequenos peptídeos, favoreceram a produção de biomassa, a esporulação e a atividade tóxica do meio fermentado com *Bti*. Anderson

e Jayaraman (2003) testaram a influência de diferentes concentrações da fonte de carbono (glicose: 3,4, 18,7 e 34 g/L) e de nitrogênio (extrato de levedura: 1, 10,5 e 20 g/L) sobre o cultivo de *Bt* var. *galleriae* e concluíram que o efeito do aumento da fonte de nitrogênio sobre a síntese de toxinas é mais acentuado que o da fonte de carbono. Tabuchi (2013) verificou que *Bti* é capaz de crescer em meio contendo extrato de levedo de cerveja na faixa de concentração de 20 g/L a 100 g/L, em meio com glicerol, porém só produz toxinas quando as concentrações estão na faixa de 10 g/L a 30 g/L. Para a variedade *B. t.* var. *kurstaki*, Ghribi et al. (2007) relataram aumento de 7% na produção de toxinas em meio contendo farinha de soja, amido e diversos minerais. Prabakaran e Balaraman (2006) também verificaram, em fermentação com *Bti*, que o uso de farinha de soja possibilitou a produção intensa de esporos e toxinas.

A análise dos efeitos dá uma maior transferência de oxigênio (Figura 48) na fermentação do meio enriquecido com nitrogênio (meio MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>)) e evidenciou uma melhora de vários parâmetros cinéticos e de outros aspectos importantes para a viabilidade do processo. Comparando-se com os resultados obtidos com o meio MAL<sub>50</sub>2N, o tempo total de fermentação foi reduzido em 5 h (Tabela 21). Não houve diferença na concentração máxima de biomassa, mas esta foi obtida em um tempo significativamente menor (6 horas), o que levou a uma produtividade em células quase 45% maior. O consumo total de maltodextrina (92%) também foi maior, restando cerca de 4 g/L no final do processo. Por outro lado, mesmo com menor concentração de açúcar consumida até  $t_{x_m}$  (70,6%), a maior concentração celular neste período, em função das mais altas velocidades de crescimento (Figura 45), favorece o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), que foi 28% maior.

Valores análogos de  $\mu_m$  (0,97 e 0,98 h<sup>-1</sup>, respectivamente) foram medidos nos dois ensaios, confirmando que no meio MAL<sub>50</sub>2N não havia limitação de oxigênio no início do cultivo.

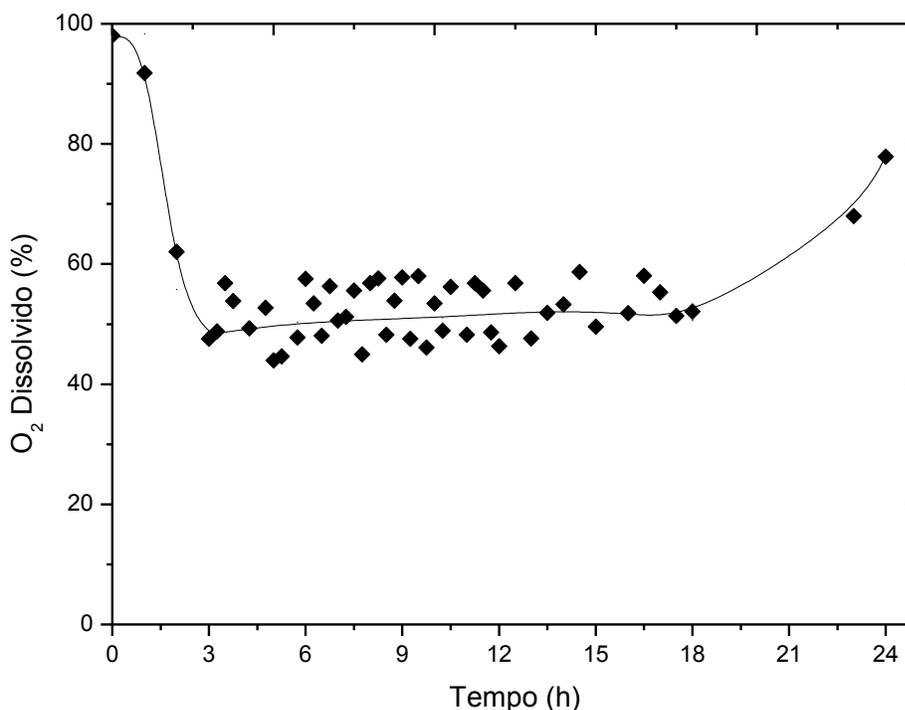


Figura 48 – Concentração de oxigênio dissolvido, em função do tempo, na fermentação do meio MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) em biorreator de bancada.

Avignone-Rossa et al. (1992) não verificaram diferenças na máxima concentração celular em cultivos de *Bti* sob condições variáveis, mas não limitadas de oxigênio. Por outro lado, Kraemer-Schfhalter e Moser (1996) observaram diferenças na produção de biomassa com concentrações de oxigênio dissolvido mantidas em 5, 26, 50 ou 70%. Da mesma forma, Boniolo et al., (2012) mostraram que o aumento da oferta de oxigênio para o meio, de 5 para 50%, levou a um ligeiro aumento da concentração celular no cultivo de *Bti*.

A fase de transição para a esporulação durou cerca de 5 h menos MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>) (Tabela 21), indicando a importância de maiores concentrações de oxigênio na aceleração do ciclo celular, conforme relatado por outros autores (Boniolo et al., 2012). Apesar disso, a produção de esporos não foi aumentada neste meio, resultando em taxa de esporulação apenas ligeiramente superior. A maior

concentração de oxigênio no meio afetou, por outro lado, a lise celular, sendo observado duas vezes mais esporos livres ao final do processo (Figura 47), comportamento igualmente destacado por Boniolo et al. (2012).

A literatura destaca a alta dependência do processo de esporulação de *Bt* em relação ao oxigênio. Flores et al. (1997) verificaram aumento linear da concentração final de esporos com o aumento de  $k_L a$  (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) na faixa de 180-570  $h^{-1}$  no cultivo de *Btk* HD73, tanto em escala laboratorial quanto em grande escala. Para outra cepa (*Btk* BNS3), Ghribi et al. (2007b) verificaram que quanto maior a concentração de OD, maior a concentração de esporos, independente do meio de cultura ou da concentração inicial da fonte de carbono. A manutenção de oxigênio em 50% da saturação durante todo o cultivo também impactou positivamente a produção de esporos em cultivo de *Bti* em meio com glicose, em comparação com concentrações de OD de 5 ou 20% (Boniolo et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido por Kraemer-Schfhalter e Moser (1996) e Avignone-Rossa et al. (1992) para *Bti*.

A maior transferência de oxigênio impactou significativamente a produção de toxinas em  $MAL_{50}2N(O_2)$ , observando-se valor de  $LC_{50}$  duas vezes menor (33,98 mg/L) que o verificado em  $MAL_{50}2N$ . Por outro lado, não houve melhora da atividade tóxica em relação ao meio  $MAL_{50}$  ( $LC_{50}=14,6$  mg/L). Este resultado sugere que os efeitos positivos da maior disponibilidade de oxigênio não foram ainda suficientes para contornar os efeitos aparentemente negativos ocasionados pela maior oferta de nitrogênio orgânico para o cultivo.

Boniolo et al. (2012) verificaram  $LC_{50}$  de 39,2 mg/L na fermentação de meio de composição semidefinida, com 30 g/L de glicose, na qual a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 50%. Este resultado é equivalente ao obtido no presente trabalho, apesar da diferença na composição do meio. Os autores verificaram, no entanto, que atividades tóxicas ainda maiores ( $LC_{50}=8,2$  mg/L) podem ser obtidas realizando-se o processo com 50% de OD até  $t_{x_m}$  e aumentando-a para 100% a partir daí até o final. Os efeitos advindos de um maior suprimento de oxigênio sobre a síntese de toxinas por *Bt* foram também abordados em outros

trabalhos, mostrando resultados contraditórios. Maldonado-Blanco et al. (2003) obtiveram maior atividade tóxica de *Bti* em processo em que os valores de OD eram mantidos em 26% da saturação. Rossi (2012) concluiu que a melhor condição de fornecimento de oxigênio para a produção de toxinas por *Bti* em meio contendo glicerol como substrato é aquela em que os valores de OD são mantidos em 45% da saturação durante toda a fermentação. Ghribi et al. (2007) observaram níveis de toxinas até 45% maior no cultivo de *Btk* em meios mantidos com OD de 40 ou 60%, em comparação com OD de 80%. Por outro lado, Yezza et al. (2004) relataram que valores de OD mais baixos (20-24%) implicaram em redução significativa da toxicidade do meio fermentado com *Btk*.

Os resultados obtidos neste grupo de ensaios mostraram que, apesar da maior concentração celular e de esporos, a diminuição da relação C:N no meio (MAL<sub>50</sub>2N) não possibilitou uma melhora da atividade tóxica em relação ao meio original (MAL<sub>50</sub>). Por outro lado, quando o meio mais rico em nitrogênio é fermentado em condições não limitadas em oxigênio durante todo o processo (MAL<sub>50</sub>2N(O<sub>2</sub>)), é possível aumentar em duas vezes a atividade tóxica, mesmo com concentrações de células e esporos similares, demonstrando maior eficiência na síntese de proteínas tóxicas. Os dados confirmam a potencialidade de emprego de soluções osmóticas de maltodextrina para o processo, mas sugerem a necessidade de novos estudos no sentido de maximizar a atividade tóxica.

## 5 - CONCLUSÕES

- Na faixa de concentração avaliada (20, 30 e 40 °Brix), soluções de sacarose proporcionaram maior perda de água, maior ganho de sólidos e maior redução de massa nas amostras de abacaxi que soluções de maltodextrina, em todas as temperaturas testadas (30, 40 e 50 °C) . Mas, a menor relação  $\delta/\omega$  (0,6) foi obtida com solução de maltodextrina na concentração de 20 °Brix e temperatura de 50 °C, sendo esta condição indicada como a melhor para o processo de desidratação;
- Em soluções de sacarose, sorbitol e frutooligossacarídeo (30, 50 e 70 °Brix), a desidratação realizada com soluções a 30 °Brix e temperatura de 30 ou 50 °C levou aos menores valores de  $\delta/\omega$ . Como estes valores foram similares, a escolha da solução dependerá da aplicação esperada do produto final;
- Dentre as soluções osmóticas avaliadas no processo fermentativo, a solução de maltodextrina mostrou grande potencial para o cultivo de *Bti*, ao contrário da

solução de sorbitol, na qual o desenvolvimento do cultivo ficou muito comprometido e a síntese de toxinas reprimida;

- O meio com concentração de maltodextrina de 30 g/L possibilitou a obtenção da mais alta atividade tóxica ( $LC_{50}=2,19$  mg/L) dentre todas as formulações testadas. Ajustando-se a relação C:N através da suplementação de nitrogênio desde o início do cultivo, é possível aumentar a concentração celular e de esporos em meio com 50 g/L de maltodextrina. Porém, a atividade tóxica é significativamente diminuída nestas condições. Todavia, o aumento do suprimento de oxigênio para o meio, possibilita um aumento de duas vezes na atividade tóxica contra larvas de *Ae aegypti*.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELL-HAMEED, A. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.857-861, 2001.
- ABDELL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt – III. Selection of media for delta-endotoxin production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.313-317, 1990.
- ADAMS, T.T.; EITCMAN, M.A.; ADANG, M.J. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. **Bioresource Technology**, v.67, p.83-87, 1999.
- AGNELLI, M.E.; MARANI, C.M.; MASCHERONI, R.H. Modelling of heat and mass transfer during (osmo) dehydrofreezing of fruits. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.415-424, 2005.
- ALVES, S.M.; SILVEIRA, A.M. Estudo da secagem de tomates desidratados e não desidratados osmoticamente. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v.21, n.1, p.21-30, 2002.
- ALZAMORA, S. Preservación I- Alimentos conservados por factores combinados In: CITED-Instituto Politécnico Nacional. **Temas en Tecnología de alimentos**, v.1, p337, 1997.

- AMINA, G.; ALOTAIBIA, S.; NARMENB, Y.A.; SALEHC W. D. Bioinsecticide production by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. 1. Pattern of cell growth, toxin production and by-product synthesis. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.54, n.4, p.387-394, 2008.
- ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.17, n.3, p.225-231, 2003.
- ANDRADE, S. A. C. et al. Evaluation of water and sucrose diffusion coefficients during osmotic dehydration of jenipapo (*Genipa Americana* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 2, p. 551-555, 2007.
- ANDRADE, S.A.; METRI, J.C.; BARROS NETO, B. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.276-281, 2003.
- ANDREWS Jr., R.E.; KANDA, K.; BULLA Jr., L.A. *In vitro* translation of the entomocidal toxin of *B. thuringiensis*. In: Ganesan, A.T.; Chang, S.; Hoch, J.A. (Ed.). **Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli**. New York: Academic Press, 1982. p.121-130.
- ANGELINI, R. Desidratação osmótica de kiwi (*Actinidia deliciosa* L.) estudo da reutilização da solução osmótica. 2002. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p.945-958, 2010.
- ANTONIALI, S.; SANCHES, J. (2008) **Abacaxi: Importância Econômica e Nutricional**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acessado dia 12 de janeiro de 2009.
- ANTONIO, G. C. Influência da estrutura celular e da geometria da amostra na taxa de transferência de massa do processo de desidratação osmótica de banana nanica (*Musa cavendishi*) e de mamão formosa (*Carica papaya* L.). 2002. 104 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- ANTONIO, G.C.; KUROZAWA, L.E.; XIDIEH-MURR, F.E.; PARK, K.J. Otimização da Desidratação Osmótica de Batata Doce (*Ipomoea batatas*) Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p.135-141, 2006.

- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Method 920.152  
Method 940.26: **Ash of fruits and fruit products**: Final action. Arlington, 1990
- AOKI, M.S.; PONTES, F.L.; NAVARRO, F.; UCHIDA, M.C; BACURAU, R.F.P.  
Suplementação de carboidrato não reverte o efeito deletério do exercício de  
endurance sobre o subseqüente desempenho de força. . **Revista Brasileira de  
Medicina do Esporte**, v.9, n.5, p.282-287, 2003.
- ARCAS, J.; YANTORNO, G.; ERTOLA, R. Effect of high concentration of nutrients on  
*Bacillus thuringiensis* cultures. **Biotechnology Letters**, v.9, n.2, p.105-110, 1987.
- ARONSON, A.I. The two face of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-  
exponential survival. **Molecular Microbiology**, v.7, p.489-496, 1993.
- AVIGNONE-ROSSA, C.; MIGNONE, C. Delta-endotoxin activity and spore production  
in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**,  
v.15, n.3, p.295-300, 1993.
- AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza:  
Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p
- AZEREDO, H.M.C.; JARDINE, J.G. Desidratação osmótica de abacaxi aplicada à  
tecnologia de métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20,  
n.1, p.74-82, 2004.
- AZUARA, E.; CORTÉS, R.; GARCIA, H. S.; SILYSTROM, M. Kinetic model for  
osmotic dehydration and its relationship with Fick's second law. **International  
Journal of Food Science and Technology**, v. 27, p. 409-418, 1992.
- BARONI, A. F., HUBINGER, M. D. Kinetics of the dehydration of onion by immersion.  
**Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, p. 81-86, 1999.
- BE MILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohidratos. In: FENNEMA, O.R. **Química de  
los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, p. 187-268, 2000.
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F.;  
Delécluse, A.; LeRoux, C.N. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to  
Field Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-398.
- BEHSNILIAN, D.; SPIESS Walter, E.L. Osmotic Dehydration of Fruits and Vegetable.  
In Proceedings of the 13th World Congress of Food Science & Technology,  
Nantes, France, September 17–21, Ed: Colonna, P.; INRA, Paris, 1857–1869,  
2006.

- BELTRÃO, H.B.M.; SILVA-FILHA, M.H.N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, v.266, p163-169, 2007.
- BENOIT, T.G.; WILSON, G.R.; BAUGH, C.L. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p.15-18, 1990.
- BERBERT-MOLINA, M.A.; PRATA, A.M.R.; PESSANHA, L.G.; SILVEIRA, M.M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.1397–1404, 2008.
- BERNHARD, K.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. John Wiley and Sons Ltd., p.255-267, 1993.
- BERRY, C.; O'NEIL, S.; BENDOV, E. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin coding plasmid of *B. thuringiensis* sub spp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5082–5095, 2002.
- BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; SANKOH, O.; MYERS, M.F.; GEORGE, D.B.; JAENISCH, T.; Wint, G.R.W.; SIMMONS, C.P.; SCOTT, T.W.; FARRAR, J.J.; HAY, S.I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, n.7446, p. 504-507, 2013.
- BIZZARRI, M.F.; BISHOP, A.H. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. **Microbial Ecology**, v.56, p.133-139, 2008.
- BOLIN, H.R.; HUKSOLL, C.C.; JACKSON, R.; NG, K.C. Effect of osmotic agents and concentration on fruit quality. **Journal of Food Science**, v.48, p.202-205, 1983.
- BONIOLO, F.S., RODRIGUES, R.C., PRATA, A.M.R., LÓPEZ, M.L., JACINTO, T., SILVEIRA, M.M., BERBERT-MOLINA, M. A. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and delta-endotoxin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v.94, n.3, p.625-36, 2012.
- BORNET, F.R. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n.3, p.763-769, 1994.
- BRANDÃO, M.C.C.; MAIA, G.A.; LIMA, D.P.; PARENTE, E.J.S.; CAMPELLO, C.C.; NASSU, R.T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P.H.M. Análise físico-química,

microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratção osmótico-solar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p.38-41, 2003.

BRAVO, A.; GILL, S.S; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Comprehensive **Molecular Insect Science**. Elsevier BV; 2005: pp. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S.S; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, p.423-435, 2007.

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

BULLA JR., L.A.; FAUST, R.M.; ANDREWS, R.; GOODMAN, N. Insecticidal *Bacilli*. In: D. A. Dubnau (ed.). **The Molecular Biology of the Bacilli**. New York: Academic Press, Inc., v.2, p.185-209, 1985.

BULLA, L.A; BECHTEL, D.B, KRAMER, K.J, SHETHNA, Y.I, ARONSON, A.I, FITZ-JAMES, P.C. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **Critical Review in Microbiology**, v.8, p.147-204, 1980.

CAB International. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. London: **CPL Business Consultant**, 2010. 40p.

CAMPBELL, J.M.; BAUER, L.L.; FAHEY, G.C.Jr.; HOGARTH, A.J.C.L.; WOLF, B.W.; HUNTER, D.E. Selected fructooligosaccharides (1-kestose, nystose and 1F- $\beta$ -fructofuranosylntose) composition of foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3076-3082, 1997.

CARVALHO, R.I.N.; ZANETTE, F. Variações do conteúdo de glucose, frutose e sorbitol em gemas e ramos de macieira durante a dormência. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.

CHANG, C.; YONG-MAN, Y.; SHU-MEI, D.; LAW, S.K.; GILL, S.G. High level of *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitos. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.815-821, 1993.

CHEN, S.; HONG, J.Y.; WU, W.T. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.677-681, 2003.

- CHENLO, F., MOREIRA, R., PEREIRA, G., AMPUDIA, A. Viscosities of aqueous solutions of sucrose and sodium chloride of interest in osmotic dehydration processes. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 347-352, 2002.
- CHILCOTT, C.N.; ELLAR, D.J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Genetics and Microbiology**, v.134, p.2551-2558, 1988.
- COELHO, G. (2010). **Notificações de dengue são recorde**. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/?p=835>. Acesso dia 9 de julho de 2010.
- COHEN, J.S.; YANG, T.C.S. Progress in food dehydration. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n.1, p.20–25, 1995.
- COLLIGNAN, A.; RAOULT-WACK, A. L. Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated sugar/salt solutions. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 27, n. 3, p. 259-264, 1994.
- CONTRERAS, J.E.; SMYRL, T.G. An Evaluation of osmotic concentration of apple rings using corn syrup solids solutions. **Canadian Institute of Food Science Technology**, v.14, n.4, p.310-314, 1981.
- COOPER D. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.49, p.21-26, 1994.
- CORRÊA, J.F.G.; SILVA-FILHO, E.D.; BATISTA, M.B.; AROLA, F.; FIOREZE, R. Desidratação Osmótica de Tomate Seguida de Secagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.10, n.1, p.35-42, 2008.
- COUCH, T.L.; ROSS, D.A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, n.7, p.1297-1304, 2004.
- CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* research. 2007. Disponível em: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acessado em: 12 junho 2009.
- CRICKMORE, N.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A.; ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.131, p.249-254, 1995.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Biology Reviews**, v.62, p.807-813, 1998.

- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, DR.; Schnepf, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; Dean, DH. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2010. Disponível em: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). Acessado em: 02/3/2011.
- CRICKMORE, N; BONE, E.J; WILLIAMS, J.A; ELLAR, D. Contribution of individual components of the endotoxins crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.131, p.249-254, 1995.
- CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: Cunha, G.A.P. da; Cabral, J.R.S.; Souza, L.F. da S. (Org.) **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.17-51, 1999.
- DALLA ROSA, M.; GIROUX, F. Osmotic treatments (OT) and problems related to the solution management. **Journal of Food Engineering**, v.49, p.223-236, 2001.
- DEL BIANCHI, V. L. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo. Botucatu, 1998. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP. 118 p., 1998.
- DESPRÉS, L.; LAGNEAU, C., FRUTOS, R. (2011). Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israeliensis* in mosquito control. In: Stoytcheva, M. (Ed.). *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech, CAP.6, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pests-control-and-pesticides-exposure-and-toxicity-assessment/using-the-bio-insecticide-bacillus-thuringiensis-israeliensis-in-mosquito-control>. Acessado em: 12/07/2013
- DHINGRA, D.; SINGH, J., PATIL, R.T., UPPAL, D.S. Osmotic dehydration of fruits and vegetables: A review. **Journal of Food Science Technology**, v.45, n.3, p.209–217, 2008.
- DIAS, M.C. **Comida jogada fora**. Correio Braziliense, 31 de Agosto de 2003. Disponível em: <http://www.consciencia.net/2003/09/06/comida.html>. Acessado em: 19 de janeiro de 2007.
- DIONELLO, R.G.; BERBERT, P.A.; BERBERT-MOLINA, M.A.; VIANA, A.P.; CARLESSO, V.O.; QUEIROZ, V.A.V. Desidratação por imersão-impregnação de abacaxi em soluções de sacarose e em xarope de açúcar invertido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.701-709, 2007.

- DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD-I, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebral Pathology**, v.15, p.232-239, 1970.
- DULMAGE, H.T. Production of S-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in three fermentation media **Journal of Invertebral Pathology**, v.18, p.353-358, 1971.
- DULMAGE, H.T.; CORREA, J.A.; MARTINEZ, A.J. Coprecipitation with lactose as a means of recovering spore-crystal complex of *Bacillus-thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, n.1, p.15-20, 1970.
- EL-AOUAR, A.A.; AZOUBEL, P.M.; BARBOSA JR, J.L.; MURR, F.E.X. Influence of the osmotic agent on the osmotic dehydration of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Food Engineering**. v. 75, n 2, p. 267- 274, 2006.
- EL-BENDARY, M.A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. **Journal of Basic Microbiology**, v.46, n.2, p.158-170, 2006.
- ERBA, M.L.; FORNI, E.; COLONELLO, A.; GIANGIACOMO, R. Influence of sugar composition and air dehydration levels on the chemical-physical characteristics of osmodehydrofrozen fruit. **Food Chemistry**, v.50, p.69-73, 1994.
- ERNANDES, S. Estudos da utilização de sangue de abatedouros como substrato fermentativo para produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa. **Dissertação (Mestrado)**, IQ/UNESP, Araraquara, 81 p., 1998.
- FALADE, K. O., IGBEKA, J. C., AYANWUYI, F. A. Kinetics of mass transfer, and colour changes during osmotic dehydration of watermelon. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 979-985, 2007.
- FARKAS, J. Physical methods of food preservation. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, p.685-712, 2007
- FARRERA, R.R.; PÉREZ-GUEVARA, F.; DE LA TORRE, M. Carbon-nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, n.6, p.758-765, 1998.
- FEDERICI, B.A. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.30-38, 2005.
- FEDERICI, B.A.; PARK, H.W.; BIDESHI, D.K.; WIRTH, M.C.; JOHNSON, J.J. Recombinant bacteria for mosquito control. **The Journal of Experimental Biology**, v.206, p.3877-3885, 2003.

- FERNÁNDEZ, L.E.; AIMANOVA, K.G.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.A. GPI-anchored alkaline phosphatases is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemistry Journal**, v.394, p.77-84, 2006.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, p.333, 1971.
- FITO, P.; CHIRALT, A.; BARAT, J.; SALVATORI, J.D.; ANDRÉS, A. Equilibrium in cellular food-osmotic systems: The role of the structure **Food Science and Technology International**; v.4; p.329-338, 1998.
- FORNI, E.; SORMANI, A.; SCALISE, S.; TORREGGIANI, D. The influence of sugar composition on the colour stability of osmodehydrofrozen intermediate moisture apricots. **Food Research International**, v.30, p.87-94, 1997.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, E.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; CAMACHO, M.M.; Martínez-Navarrete, N. Characterisation of reused osmotic solution as ingredient in new product formulation. **Food Research International**, 35, 307-313. (2002).
- GHRIBI, D., ZOUARI, N., TRABELSI, H., JAOUA, S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. **Enzyme Microbiol Technology**, v.40, p.614-622, 2007.
- GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria: implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, n. 1150, p. 381- 387, 1994.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIENFRANTONIO, P.V. The mode of action of endotoxins. **Annual Review of Entomology**. v.37, p.615-636, 1992.
- GIRALDO, G., TALENS, P., FITO, P., CHIRALT, A. Influence of sucrose solution concentration on kinetics and yield during osmotic dehydration of mango. **Journal of Food Engineering**, v. 58, p. 33-43, 2003.
- GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERTNER, W., JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KÖHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v.30, n.5, 2012.
- GLARE, T.R.; O' CALLAGHAN, N.M. **Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety**. Chichester: Wiley and Sons, 350p, 2000.
- GOMES, A.T.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. Desidratação osmótica: uma tecnologia de baixo custo para o desenvolvimento da agricultura familiar. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v.3, n.3, p.212-226, 2007.

- HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Effects of heavy metals on *Pseudomonas auruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresearch Technology**, v.65, p.73-82, 1998.
- HENDRIKSEN, N.B.; HANSEN, B.M. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.256-261, 2002.
- HENG, K.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Osmotic dehydration of papaya: influence on the product quality. **Science des Aliments**, v. 10, p. 831-848, 1990.
- HÖFTE, H.K.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v.53, p.242-245, 1989.
- HOGARTH, A.J.C.L.; HUNTER, D.E.; JACOBS, W.A.; GARLEB K.A.; WOLF, B.W. Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 5326–5330, 2000.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sidra: **Dados de safra de abacaxi no Brasil**, 2009. em: <[www.sidra.ibge.gov.br/](http://www.sidra.ibge.gov.br/)> Acesso:15 de junho de 2010.
- IBRAHIM, M.A.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L.A. *Bacillus thuringiensis* - A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v.1, n.1, p.31-50, 2010.
- IBURG, J.P.; GRAY, E.W.; WYATT, R.D.; NOBLET, R. , Influence of selected antibiotics on the response of black fly (*Simulium vittatum*) larvae to insecticidal proteins produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, p.1849-1853, 2010.
- IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCEENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I: Effects of mineral elements and pH. **Research in Microbiology**, v.153, p.599-604, 2002a.
- IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCEENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, v.153, p.605-609, 2002b.
- IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. **Pesquisa do IDEC constata: adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor**. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/emacao.asp?id= 1153>>. Acessado em: 29 de outubro de 2010.

- ISPIR, A., TOGRUL, I. T. Osmotic dehydration of apricot: Kinetic and the effect of process parameters. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 166-180, 2009.
- JOKIC, A.; GYURA, J.; LEVIC, L.; ZAVARGO, Z. Osmotic dehydration of sugar beet in combined aqueous solution of sucrose and sodium chloride. **Journal of Food Engineering**. v.78, p.47-51, 2007.
- KANG, B.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. **Biotechnology Letters**, v.14, n.8, p.721-726, 1992.
- KHAN, M.A.; SHUKLAA R.N.; ZAIDI, S. Mass Transfer during Osmotic dehydration of Apple using Sucrose, Fructose and Maltodextrin Solution. **11th International Congress on Engineering and Food (ICEF)**, Athenas – Grecia, 2011.
- KHOYI, M. R., HESARI, J. Osmotic dehydration kinetics of apricot using sucrose solution. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1355-1360, 2007.
- KHUZHAMSHUKUROV, N.A.; YUSUPOV, T.Y.; KHALILOV I.M.; GUZALOVA A.G.; MURADOV, M.M.; DAVRANOV, K.D. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, n.6, p.596-598, 2001.
- KLEWICKI, R.; UCZCIWEK, M. Effect of osmotic dehydration in fructose, sucrose and fructooligosaccharide solutions on the content of saccharides in plums and apples and their energy value. **Agricultural and Food Science**, v.17, p.367–375, 2008.
- KLEWICKI, R.; UCZCIWEK, M. Effect of osmotic dehydration in the carbohydrate mixtures containing fructooligosaccharides on the oligosaccharide content of apples. **Acta Alimentaria**, v.39, n.3, p.357–367, 2010.
- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v.24, n.27, p.308, 1994.
- KOZIEL, M.G.; CAROZZI, N.B.; CURRIER, T.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.V. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, v.11, p. 171-228, 1993.
- KRAEMER-SHAFHALTER, A.; MOSER, A. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. **Bioprocess Engineering**, v.14, p.139-144, 1996.
- KURT, A. ÖZCENGİZ, G. Increased production of coleoptera-specific delta-endotoxin by homologous expression of cry3Aa11 in *Bacillus thuringiensis* Mm2. **Turk Journal of Biology**, v.35, p.585-592, 2011.

- LACEY, L. A.. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of American Mosquito Control Association**, v.23, n.2, p.133-163, 2007.
- LACEY, L.A.; KAYA, R.H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control. agents: Do they have a future? **Biological Control**, v.21, p.230–248, 2001.
- LAZARIDES, H.N. Osmotic Preconcentration: Developments and Prospects. In: SINGH, R.P.; OLIVEIRA, F.A.R. (Eds.). **Minimal processing of foods and process optimization. An Interface**. Boca Raton: CRC Press, p. 73-85, 1994.
- LAZARIDES, H.N.; GEKAS, V. e MAVROUDIS, N. Apparent mass diffusivities in fruit and vegetable tissues undergoing osmotic processing. **Journal of Food Engineering**, v.31, p.315-324, 1997.
- LENART, A. Osmo-convective drying of fruits and vegetables: technology and application. **Drying Technology**, v.14, n.2, p.391-413, 1996.
- LENART, A., PIOTROWSKI, D. Drying characteristics of osmotically dehydrated fruits coated with semipermeable edible films. In: KUDRA, T.; MUJUMDAR, A.S. **Drying Technology**. New York: MARCEL DEKKER, vol.19, n.5, p. 849-877, 2001.
- LERICI, C. R.; PINNAVAIA, G.; DALLA ROSA, M.; BARTOLUCCI, L. Osmotic dehydration of fruit: influence of osmotic agents on drying behavior and product quality. **Journal of Food Science**, v.50, p. 1217-1226, 1985.
- LIMA, A.S.; FIGUEIREDO, R.W.; LIMA, J.R.; SOUZA NETO, M.A.; SOUZA, A.C.R. Estudos das variáveis de processo sobre a cinética de desidratação osmótica de melão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.2, p. 282-286, 2004.
- LIMA, R.M.P. Desidratação osmótica de melão (*Cucumis melo* L.) em soluções de sacarose e sorbitol, 2012. **Tese (Doutorado em Produção Vegetal)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.
- LIU, W.; BAJPAI, R.; BIHARI, V. High-density cultivation of sporeformers. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.721, p.310–325, 1994.
- LIU, W.M.; BAJPAI, R.K. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Program**, v.11, p.589-591, 1995.
- LORET, C.; MEUNIER, V.; FRITH, W.J.; FRYER, P.J. Rheological characterization of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v.57, n.2, p.153-163, 2004.

- LUNA, C.L., SILVA, G.R., RIOS, E.M.M.M. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. **Biotechnology Letters**, v.26, p.143-145, 2004.
- LÜTHY, P.; CORIER, J.; FISCHER, H. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. In: Kurstak, E. (Ed.). **Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p.35-74.
- MALDONADO-BLANCO, M.G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALAN-WONG, L.J. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.7, p.671-674, 2003.
- MARGALITH, Y.; Ben-DOV, E. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. In: Rechcigl, JE.; Rechcigl, NA., editors. **Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection**. CRC Press; 2000. p. 243
- MARQUES, L.F.; DUARTE, E.M.; COSTA, T.L.; SOUSA, J.S. Efeito da concentração do xarope na desidratação osmótica e na caracterização físico-química do caju. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.2, 2007.
- MARTINS, L. P.; SILVA, S. M.; SILVA, E. de O. Qualidade de abacaxi Perola tratado com choque-frio e 1-metilciclopropeno. In: **SIMPOSIO INTERNACIONAL DO ABACAXI**, 6, 2007, João Pessoa. Resumos... João Pessoa, PB, 2007, p. 272.
- MASTRANGELO, M.M.; ROJAS, A.M.; CASTRO, M.A.; GERSCHENSON, L.N.; ALZAMORA, S.M. Texture and structure of glucose-infused melon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 769-776, 2000.
- MATSUURA, F.C.A.U.; ROLIM, R.B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando a produção de um “blend” com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.138-141, 2002.
- MATUSEK A., CZUKOR B., MERESZ P. Comparison of sucrose and fructo-oligosaccharides as osmotic agents in apple. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, n.3, p. 365-373, 2008.
- MAURO, M.A.; TAVARES, D.Q. e MENEGALLI, F.C. Behavior of plant tissue in osmotic solutions. **Journal of Food Engineering**. v.56, p.1-15, 2003.
- MAVROUDIS, N., GEKAS, V., SJÖHOLN,I. Osmotic dehydration of apples – Effects of agitation and raw material characteristic. **Journal of Food Engineering**, v. 35, p. 191-209, 1998.

- MIGNONE, C.F., AVIGNONE-ROSSA, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.46, p.78-84, 1996.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426, 1959.
- MILNER, R.J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.49, p.9-13, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acessado em: 23/11/2012.
- MISCH, D.W., BURNSIDE, F.D., CECIL, L.T. A novel bioassay system for evaluating the toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.59, p.286-289, 1992.
- MITSOUKA, T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health. **Journal Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.
- MIZRAHI, S.; EICHLER, S.; RAMON, O. Osmotic dehydration phenomena in gel systems. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 87-96, 2001.
- MORAES, I.O., Santana, M.H.A., Hokka, C.O. The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. In: **Adv Biotechnol, Proceedings of 6<sup>th</sup> International Fermentation Symposium**, London, Canada, v.1, p.75-79, 1980.
- MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biociologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v.3, p.245-265; 2001.
- MORANGA, M.J; MORAGA, G.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Effect of the re-use of the osmotic solution on the stability of osmodehydro-refrigerated grapefruit **Food Science and Technology** xxx (2010) 1e7
- MOREIRA, R., SERENO, A. M. Evaluation of mass transfer coefficients and volumetric shrinkage during osmotic dehydration of apple using sucrose solutions in static and non-static conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 57, p. 25-31, 2003.
- MORRIS, O.N.; CONVERSE, V.; KANAGARATNAM, P.; DAVIES, J.S. Effect of cultural conditions on spore crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawa* (HD 133). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.129-136, 1996.

- MOTA, R.V. Avaliação da qualidade físico-química e aceitabilidade de passas de pêssego submetidas à desidratação osmótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.789-794, 2005.
- MOURA, C. P. Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Pilymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico. 2004. 98p. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR, 2004.
- MUJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; WELTI-CHANES, J. Impregnation properties of some fruits at vacuum pressure. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.307-314, 2003.
- MURRELL, W.G. The biochemistry of the bacterial endospore. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.1, n.133-251, 1967.
- NAHIMANAA, H.; ZHANGA, M.; MUJUMDARB, A.S.; DINGA, Z. Mass Transfer Modeling and Shrinkage Consideration during Osmotic Dehydration of Fruits and Vegetables. **Food Reviews International**, v.27, n.4, p. 331-356, 2011.
- NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2007. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**, Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/>. Acessado em: 12 junho 2010.
- NICKERSON, K.W.; St. JULIAN, G.; BULLA Jr., L.A. Physiology of spore-forming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology**, v.28, n.1, p.129-132, 1974.
- OBETA, J.A.; OKAFOR, N. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied Environment and Microbiology**, v.47, n.4, p.863-867, 1984.
- OLIVEIRA, M.M. Desidratação osmótica de melão ‘pele de sapo’ em soluções de sacarose e de sorbitol, 2013. **Monografia (Engenharia Agrônomo)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.
- ÖZKAN, M.; DILEK, F.B; YETIS, U.; ÖZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**, v.154, p.49-53, 2003.
- PANAROTTO, C. Influência de parâmetros operacionais, fontes proteicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

2006. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS. Brasil. 2006.
- PARIS, M., BOYER, S., BONIN, A., COLLADO, A., DAVID, J-P.; DESPRES, L. Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. **Molecular Ecology**, v.19, n.2, 325-337, 2010.
- PARK, K.J.; BIN, A.; BROD, F.P.R. Drying of pear d'Anjou with and without osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.97-103, 2002.
- PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n.2, p.385-390, 2003.
- PEIRÓ, R., DIAS, V. M. C., CAMACHO, M. M., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. micro nutrient flow to the osmotic solution during grapefruit osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 299-307, 2006.
- PEIRÓ-MENA, R., CAMACHO, M. M., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Compositional and physicochemical changes associated to successive osmodehydration cycles of pineapple (*Ananas comosus*). **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 842-849, 2007.
- PESSANHA, L. G. Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para a produção de biomassa e a esporulação de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. 2005. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)** – UENF, Campos dos Goytacazes, 2005.
- PESSANHA, L.G. Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. 2008. **Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. Brasil. 2008.
- PETRY, F.; LOZOVEI, A. L.; FERRAZ, M.E.; NETO, L.G.S. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48 n.1, p.127-132, 2004.
- POINTING, J. D., WATERS, G. G., FORREY, R. R., JACKSON, R., STANLEY, W. L. Osmotic dehydration of fruits. **Food Technology**, v. 20, p. 125- 128, oct. 1966.
- POLANCZYK, R.A. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas – do uso convencional em pulverização à Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.31, jul/dez, 2003.

- PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, p. 131-135, 1995.
- POOPATHI, S.; ABIDHA, S. A medium for the production of biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) in mosquito control. **Journal of Economic Entomology**, v.102, n.4, p.1423-1430, 2009.
- POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Coffee husk waste for fermentation production of mosquitocidal bacteria. **Journal of Economic Entomology**, v.104, n.6, p.1816-1823, 2011.
- POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Use of feather-based culture media for the production of mosquitocidal bacteria. **Biological Control**, v.43, p.49-55, 2007.
- POOPATHI, S.; KUMAR, A.; KABILAN, L., SEKAR V. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.219-216, 2002.
- PRABAKARAN, G.; HOTI, S.L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of delta-endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquitocidal control agent. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.961-965, 2008.
- QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A. BERBERT-MOLINA, M.A.; GRAVINA, G.A.; QUEIROZ, L.R.; Deliza, R. Desidratação por imersão-impregnação e secagem por convecção de goiaba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1479-1486, 2007.
- QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A.; BERBERT-MOLINA, M.A. Mecanismos de Transferência de massa na desidratação penetrante de goiaba los Soluções de sacarose, sucralose e Açúcar invertido. **Engenharia Agrícola**, v.30, n.4, p.715-725, 2010.
- QUEIROZ, V.A.V.; BERBERT, P.A.; BERBERT-MOLINA, M.A., GRAVINA, G.A.; QUEIROZ, L.R.; Accácio da SILVA, J.A. Qualidade nutricional de goiabas submetidas aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.329-340, 2008.
- RAMADA, J.S. Formulação de meios a base de melaço de cana-de-açúcar para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 2008. **Monografia (Bacharelado)**

- em Ciências Biológicas)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.
- RAMALLO, L.A.; MASCHERONI, R.H. Quality evaluation of pineapple fruit during drying process. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, p.275-283, 2012.
- RAOULT-WACK, A. L. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 8, p. 255-260, 1994.
- RAOULT-WACK, A.L. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, n. 8, p. 255-260, 1994.
- RAOULT-WACK, A.L.; LAFONT, F. e GUILBERT, S. **Osmotic Dehydration: Study of Mass Transfer in Terms of Engineering Properties**. In Drying'89, ed. A.S. Mujumdar. International Science Publishers, New York, p.487-495, 1992.
- RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; NIRANJAN, K.; KNORR. D. Recent Developments in Osmotic Dehydration: Methods to Enhance Mass Transfer. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 48-59, 2002.
- REGIS, L., SILVA-FILHA, M.H., NIELSEN-LEROUX, C; CHARLES J.-F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v.17, p.377-380, 2001.
- REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v.17, p.377-80, 2001.
- RIVA, M.; CAMPOLONGO, S.; LEVA, A.A.; MAESTRELLI, A.; TORREGGIANI, D. Structure–property relationships in osmo-air-dehydrated apricot cubes. **Food Research International**, v.38, p.533–542, 2005.
- RIZZOLO, A.; GERLI, F.; PRINZIVALLI, C.; BURATTI, S.; TORREGGIANI, D. Headspace volatile compounds during osmotic dehydration of strawberries (cv Camarosa): Influence of osmotic solution composition and processing time. **LWT - Food Science Technology**, v.40, p.529-535, 2007.
- ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**. v.51, n.5, p.137-146, 1993.
- RODRIGUES, R. C. Aproveitamento de xarope residual da desidratção osmótica de abacaxi para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 2009. **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2009.

- RODRIGUES, R. C. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico sobre a produção de biomassa e a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 2006. **Monografia (Licenciatura em Biologia)** UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
- RODRIGUES, R.C.; BERBERT, P.A.; BONIOLO, F.S.; NUNES, M.C.O.; SALVINI, J.R.; BERBERT-MOLINA, M.A. Avaliação de Xarope Residual da Desidratação Osmótica de Abacaxi como Meio Alternativo para o Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM**, Anais eletrônicos, Natal – RN, 2009a.
- RODRIGUES, R.C.; BERBERT, P.A.; BONIOLO, F.S.; NUNES, M.C.O.; SALVINI, J.R.; BERBERT-MOLINA, M.A. Produção de  $\delta$ -endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios com altas concentrações de xarope residual da desidratação osmótica de abacaxi. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM**, Anais eletrônicos, Natal – RN, 2009b.
- RODRIGUES, W.C. (2008). **Apostila Estatística Aplicada**. 6 ed. Rio de Janeiro: Creative Commons Licence, 49p.
- ROGOFF, M.; YOUSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: Microbiological considerations. **Annual Review of Microbiology**, v.23, p.257-386, 1969.
- ROSSI, A.A. Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel. 2012. 163 p. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Escola de Engenharia de Lorena - USP, Lorena, 2012.
- ROWE, G.E.: Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.6, p.87-127, 1987
- RUUD, A.; de MAAGD, I.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.37, p.409-433, 2003.
- RYDZANICZ, K.; DECHANT, P.; BECKER, N. Field Efficacy of Granular Formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* - Strain Am65-52 Against Floodwater Mosquitoes in Poland and Germany. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.26, n.3, p.295-301, 2010
- SACCHETTI, G.; GIANOTTI, A.; DALLA ROSA, M. Sucrose-salt combined effects on mass transfer kinetics and product acceptability. Study on apple osmotic treatments. **Journal of Food Engineering**, n. 49, p.163-173, 2001.
- SACHIDANANDHAM, R.; JENNY, K.; FIECHTER, A. Stabilization and increased production of insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae* in

- stead- and transient-state continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.12-17, 1997.
- SAGAR, V.R.; KUMAR, P.S. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.47, n.1, p.15-26, 2010
- SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.307-316, 2001.
- SALAMA, H.S; FODA, M.S.; SELIM, M.H.; EL-SHARABY, A. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Zbl Microbiology**, v.138, p.553-563, 1983.
- SAPATA, K.B.; FAYH, A.P.T.; OLIVEIRA, A.R. Efeitos do consumo prévio de carboidratos sobre a resposta glicêmica e desempenho. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.4, p.189-194, 2006.
- SAPUTRA, D. Osmotic dehydration of pineapple. **Drying Technology**, v.19, p.415-425, 2001.
- SCHNEPF, H.E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, n.3, p.775–806, 1998.
- SERENO, A. M., HUBINGER, M. D., COMESANÃ, J. F., CORREA, A. Prediction of water activity of osmotic solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 103-114, 2001.
- SICARD, P.J., LEROY, P. Mannitol, Sorbitol and Lycasin: Properties and Food Applications. In: Developments in Sweeteners--2, T.H. Grenby, K.J. Parker and M.G. Lindley eds., **Applied Science Publishers LTD**, London and New York, 1983.
- SIKDAR, D.P.; MAJUMBAR, M.K.; MAJUMDAR, S.K. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Biotechnology Letters**, v.13, n.7, p.511-517, 1991.
- SILVEIRA, E. T. F.; RAHMAN, M. S.; BUCKLE, K. A. Osmotic dehydration of pineapple: kinetics and product quality. **Food Research International**, v. 29, n. 2-3, p. 227-233, 1996.

- SINGH, B.; KUMAR, A.; GUPTA, A.K. Study of mass transfer kinetics and effective diffusivity during osmotic dehydration of carrot cubes. **Journal of Food Engineering** v.79, p.471-480, 2007.
- SOMMER, R. (1996) Yeast Extracts: Production, Properties and Components. In: **International Symposium on Yeasts**, 9<sup>th</sup>, 1996, Sydney, Austrália. Disponível em: <[http://ohly.de/publications/download/Yeast%20extracts %20Production .doc](http://ohly.de/publications/download/Yeast%20extracts%20Production.doc)>. Acessado em: 15 de janeiro de 2009.
- SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A.; SOUZA FILHO, M.S.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUZA, A.C.R. Goiabas desidratadas osmoticamente seguidas de secagem em estufa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p.414-416, 2003a.
- SOUSA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.A.; MAIA, G.A.; SOUZA FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, R.W. Desidratação osmótica de frutos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA**, v. 37, p. 94-100, 2003b.
- SOUZA-NETO, M.A.; MAIA, G.A.; LIMA, J.R.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUZA-FILHO, M.S.M.; LIMA, A.S. Cinética de desidratação osmótica de manga. **Ciências Exatas e da Terra**, v.10, n.2, p.37-44, 2004.
- SPIESS, W. E. L.; BEHSNILIAN, D. Osmotic treatments in food processing: current state and future needs. In: DRYING.98 . **PROCEEDINGS OF 11<sup>TH</sup> INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM** (p.47-56), Halkidiki, Greece, 1998.
- SPIESS, W. E. L.; BEHSNILIAN, D. Osmotic treatments in food processing: current state and future needs. In: **DRYING'98 - PROCEEDINGS OF 11<sup>TH</sup>INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM**, p.47-56, Halkidiki, Greece, 1998.
- STAHLY, P.; ANDREWS, R.E.; YOUSTEN, A.A. The genus *Bacillus* – Insect Pathogens. In: Balows, A.H.G.; Truper, M.; Dworkin, W.; Harder, K.H.; Schliefer (Ed.). **The Prokaryotes**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1990.
- SUTAR, P.P.; GUPTA, D.K. Mathematical modeling of mass transfer in osmotic dehydration of onion slices. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.90-97, 2007.
- SZYMCZAK, J.A.; PLOCHARSKY, W.J. & KONOPACKA, The Influence of Repeated use of Sucrose Syrup on the Quality of Osmo-convectively Dried Sour Cherries. D. Drying 98. **DRYING'98 - PROCEEDINGS OF 11<sup>TH</sup>INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM**, p.895-902, Halkidiki, Greece, 1998.
- TABUCHI, S.C.T. Utilização do extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*. 2013. 80 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Escola de Engenharia de Lorena - USP, Lorena, 2012.

- TÁMBARA, Y.; HORMAZA, J.V.; PÉREZ, C.; LEÓN, A.; ARRIETA, J.; HERNÁNDEZ, L. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 2, p. 117-121, 1999.
- TEDJO, W. et al. Comparison of pretreatment methods on water and solid diffusion kinetics of osmotically dehydrated mangos. **Journal of Food Engineering**, v. 53, n. 2, p. 133-142, 2002.
- TELIS, V. R. N.; MURARI, R. C. B. D. L.; YAMASHITA, F. Diffusion coefficients during osmotic dehydration of tomatoes in ternary solutions. **Journal of Food Engineering**, v.61, p. 253-259, 2004.
- THEMELIN, A.; RAOULT-WACK, A.L.; LEBERT, A.; DANZART, M. Multicriteria optimization of food processing combining soaking prior to air drying. **Drying Technology**, v.15, p.2263–2279, 1997.
- TOGRUL, I. T.; ISPIR, A. Equilibrium distribution coefficients during osmotic dehydration of apricot. **Food and Bioproducts Processing**, v.86, p.254–267, 2008.
- TOMA, L.; SEVERINI, F.; BELLA, A.; ROMI, R. A semifield evaluation of Vectobac DT (ABG-6499), a new formulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for control of *Aedes albopictus*. **Journal of American Mosquito Control**, v.19, p.424-429, 2003.
- TONON, R.V.; BARONI, A.F.; HUBINGER, M.D. Estudo da desidratação osmótica de tomate em soluções ternárias pela metodologia de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, v. 26, n. 3, Sept. 2006 .
- TOOREGGIANI, D. BERTOLO, G. Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structural effects. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 247-253, 2001.
- TORREGGIANI, D. Osmotic dehydration in fruit and vegetable processing. **Food Research International**, v. 26, p. 59-68, 1993.
- TORREGGIANI, D.; FORNI, E.; ERBA, M.L.; LONGONI F. Functional properties of pepper osmodehydrated in hydrolysed cheese whey permeate with or without sorbitol. **Food Research International**, v.28, n.2, p. 161–166, 1995.
- TREGUNNO, N. B; GOFF, H. D. Osmodehydrofreezing of apples: structural and textural effects. **Food Research International**, v.29, p. 471-479, 1996.

- VALDEZ-FRAGOSO, A. e MUJICA-PAZ, H. Reuse of sucrose syrup in pilot-scale osmotic Dehydration of Apple cubes **Journal of Food Process Engineering** v.25, n.3, p.125-139, 2002.
- VALDEZ-FRAGOSO, A.; WELTI, J.C. e GIROUX, F. Properties of a sucrose solution reused in osmotic dehydration of Apples. **Drying Technology**, v.16, p.1429-1445, 1998.
- VALLEJO, F.; GONZÁLEZ, A.; POSADA, A.; RESTREPO, A.; ORDUZ, S. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.279-281, 1999.
- VAN FRANKENHUYZEN, K.; GRINGORTEN, J.L.; GAUTHIER, D.; MILNE, R.E.; MASSON, L.; PEFEROEN, M. Toxicity of activated CryI proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest Lepidoptera and *Bombyx mori*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.295–301, 1993.
- VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L.D.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 35, n. 6, p. 525-552, 1995.
- VIAL, C.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Osmotic dehydration of Kiwi fruits: influence of process variables on the color and ascorbic acid content. **Science des Aliments**, v. 11(1), p. 63-84, 1991.
- VIANA, E.S.; REIS, R.C.; JESUS, J.L.; JUNGHANS, D.T.; SOUZA, F. Caracterização físico-química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1155-116, 12013.
- VIBERG, U.; Freuler, S.; VASSILIS, G.; SJÖHOL, M. Osmotic Pretreatment of Strawberries and Shrinkage Effects. **Journal of Food Engineering**, v.35, p.135-145, 1998.
- VIDYARTHI, A.S.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. **Water Research**, v.36, n.19, p.4850-4860, 2002.
- VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ - Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz, 1998. p.447-480.
- VIMALA-DEVI, P.S.; RAVINDER, T.; JAIDEV, C. Barley based medium for the cost-effective production on *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.173-178, 2005.

- VORA, D., SHETNA, Y.I. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in seed meal extract media containing cystine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.747-749, 1999.
- VU, K.D.; TYAGI, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.32, n.4, p.511-519, 2009.
- WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environment Microbiology**, v.43, n.6, p.1473-1480, 1982.
- WANG, Y.J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. **Starch/Starke**, v.52, p.296-304, 2000.
- WHO, (1999) *Bacillus thuringiensis: Microbial Pest Control Agent*, World Health Organization: Geneva.
- WINKLER, M. Limitations of fermentation process for utilization of food wastes. In: Wiseman, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. New York: Ellis Horwood, Chapter 9, p.271-307, 1983.
- WU, D.; CHANG, F.N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Letters**, v.190, n.2, p.232-236, 1985.
- WU, W.-T.; CHEN, S. An index for determining the culture time of inoculum in cultivation of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1201-1204, 2001.
- XIAOYAN, L.; YI, L.; PENG, L.; JUNCHENG, Z.; Li, L.; SONGSHENG Q.; ZINIU, Y. Microcalorimetric study of *Bacillus thuringiensis* growth with different plasmid numbers and various promoters. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.79, p.649–652, 2005
- YADAV, A.K.; SINGH, S.V. Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.49, n.1, 2012
- YAN, S.; MOHAMMEDI, S.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÉRO, J.R. Growth of four serovar of *Bacillus thuringiensis* (var. *kurstaki*, *israelensis*, *tenebrionis*, and *aizawa*) in wastewater sludge. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, v.11, n.2, 2007.

- YANG, X.M.; WANG, S.S. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.28, p.95-98, 1998.
- YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; QU, S.S.; YU, Z.N. A Microcalorimetric study on the biological effects of  $Zn^{+2}$  on *Bacillus thuringiensis* growth. **Chinese Journal of Chemistry**, Pequim, v.2, p.746-752, 2002a.
- YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; QU, S.S.; YU, Z.N. A microcalorimetric study of the biologic effect of Mn(II) on *Bacillus thuringiensis* growth. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.70, p.415-421, 2002b.
- YAO, J.; LIU, Y.; TUO, Y.; LIU, J.B.; CHEN, X.; ZHOU, Q.; DONG, J.X.; QU, S.S.; YU, Z.N. Action of  $Cu^{2+}$  on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.39, n.6, p.576-580, 2003.
- YEZZA, A.; TYAGI, R.D; VALERO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, p.502–510, 2005.
- YUN, J.W. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, v.19, n.2, p.107-117,1996.
- ZENOOZIAN M.S.; DEVAHASTIN, S.; RAZAVI, M.A.; SHAHIDI, F.; POREZA, H.R. Use of Artificial Neural Network and Image Analysis to Predict Physical Properties of Osmotically Dehydrated Pumpkin. **Drying Technology: An International Journal**, v.26, n.1, p. 132-144, 2007.