UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico Farmacêutica

**Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC
9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja**

Elizandra Hertel Lenhardt

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico Farmacêutica

**Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC
9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja**

Elizandra Hertel Lenhardt

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lenhardt, Elizandra Hertel

L566a Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja / Elizandra Hertel Lenhardt. -- São Paulo, 2016.
95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Ishii, Marina

1. Microbiologia aplicada 2. Resíduos agrícolas I. T. II. Ishii, Marina, orientador.

660.7 CDD

Elizandra Hertel Lenhardt

**Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC
9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja**

Comissão julgadora
da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Marina Ishii
Orientadora/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

Aos meus pais Nélío e Marilene

*Que não tiveram a oportunidade de frequentar a escola, mas
que não mediram esforços para os filhos estudarem.
Orgulhosamente dedico esta conquista a vocês.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à professora Dr^a Marina Ishii pela oportunidade, confiança, compreensão, orientação, paciência e ensinamentos, fundamentais para o meu crescimento científico e pessoal.

À minha família, que somente Deus sabe o quanto sinto falta e como foi difícil ficar longe todo esse tempo, meus pais por todo o amor carinho e suporte, aos meus irmãos Nélio e Elizabeth pela amizade e por saber que posso contar com vocês para sempre. Ao meu sobrinho Arthur que é o presente mais bonito que Deus nos deu e que a madrinha ama mais do que tudo no mundo.

Ao meu amor Ronaldo Pinho que desde o início acreditou mais do que eu na realização desta etapa, por todos os abraços, carinho, paciência, palavras de incentivo e cuidados comigo, por estar sempre me fazendo feliz.

À professora Thereza Christina Vessoni Penna, pelos ensinamentos. À professora Rita (UNIFESP) e ao professor João Carlos Monteiro de Carvalho pelo apoio.

Aos colegas da pós-graduação, em especial Douglas Xavier pela amizade e companheirismo no estágio PAE. Aos técnicos pela prontidão, e aos colegas de laboratório pela convivência, principalmente Evellin e Duda pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade.

***Follow your bliss and don't be afraid, and doors will open
where you didn't know they were going to be.***

Joseph Campbell

RESUMO

LENHARDT, E. H. **Avaliação da produção e viabilidade de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 utilizando resíduos do processamento de suco de laranja.** 2016. 95 p. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de suco de laranja, da mesma forma que a produção é elevada, a geração de resíduos também é significativa. Sabe-se que estes resíduos, os quais incluem sementes, cascas e restos de polpa são ricos em nutrientes que poderiam ser utilizados como substrato por micro-organismos, seja para o crescimento ou para a obtenção de subprodutos. Esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 são utilizados como indicadores biológicos, IBs, em processos térmicos por formarem esporos termorresistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de resíduos do processamento de suco de laranja como um meio de cultura alternativo para obtenção de esporos de *B. atrophaeus*, para serem aplicados em processos industriais. Ao bagaço de laranja (de 1,0 g a 20,0 g), obtido por processamento em centrífuga de frutas, foram adicionados 100 mL de água, e incubados a 150 rpm / 37 °C por até 6 dias. Evidenciada a viabilidade de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}} = 0,0238 \text{ h}^{-1}$ e $P_x = 0,0787 \text{ g/L.h}$, para 5,0 g de bagaço) procedeu-se ao estudo de planejamento experimental fatorial 2^2 em formato estrela com 6 pontos centrais, considerando a concentração de bagaço e o volume de meio. Foram determinados os valores de pH, de biomassa, de esporos viáveis e a resistência térmica dos mesmos a 102 °C. Observou-se que houve aumento nos valores de pH após o cultivo e que as maiores concentrações de esporos foram de $1,73 \times 10^9$ esporos /mL e $5,75 \times 10^9$ esporos /mL após 3 e 6 dias de cultivo e os tempos de redução decimal determinados variaram de $D_{102\text{C}} = 0,92 \text{ min}$ a $D_{102\text{C}} = 2,71 \text{ min}$ e de $D_{102\text{C}} = 1,34 \text{ min}$ a $D_{102\text{C}} = 3,98 \text{ min}$ após 3 e 6 dias de cultivo, respectivamente. Com base no planejamento proposto e a análise de regressão, o desenvolvimento de esporos em bagaço segue a relação: $\text{Esporos} = \{-1,15 + 0,0303 \cdot [\text{bagaço (g)}] - 0,00611 \cdot [\text{volume (mL)}] + 0,611 \cdot [\text{tempo (dias)}]\}$, $p=0,000$, $R^2=0,452$, sendo o tempo ($p=0,000$) o fator de maior influência na formação de esporos. Os meios preparados com bagaço de laranja apresentaram-se viáveis para a produção de esporos de *B. atrophaeus* termorresistentes, produto de interesse farmacêutico e industrial, agregando valor ao resíduo que seria descartado.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, processamento de laranja, esporos de *Bacillus atrophaeus*, indicador biológico, resistência térmica, valor D.

ABSTRACT

LENHARDT, E. H. **Evaluation of production and viability of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 spores using orange juice processing waste.** 2016. 95 p. (Master Dissertation) – Faculty of Pharmaceuticals Sciences, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

Brazil is one of the world's largest producers of oranges juice, in the same way that the production is high the amount of generated waste is also significant. It is well known that these residues, which include seeds, peel and pulp, are rich in nutrients that could be used as substrate by microorganisms whether for growth or for obtaining by-products. *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 spores are used as biological indicators, Bls, in thermal processes due to their ability to form heat-resistant spores. This study aimed to evaluate the use of orange juice processing waste as an alternative culture media to obtain *B. atrophaeus* spores, to be applied in industrial processes. To orange's bagasse (from 1.0 g to 20.0 g), obtained by processing in a fruit's centrifuge, 100 mL of water was added, and sterilized at 121 °C. An aliquot of 0.1g/L of *Bacillus atrophaeus* spores was inoculated to bagasses's media and incubated at 150 rpm / 37 °C up to 6 days. As cells ($\mu_{\max} = 0.0238 \text{ h}^{-1}$ and $P_x = 0.0787 \text{ g/L.h}$, for 5.0 g of bagasse) were obtained, a factorial experimental design 2^2 , with star-shaped model and 6 central points, was performed considering the bagasse concentration and the media volume used. Values of pH, biomass, viable spores and their thermal resistance at 102 °C were determined. It was observed that pH increased after cultivation and major values of spore concentration achieved were 1.73×10^9 spores /mL and 5.75×10^9 spores /mL after 3 and 6 days, respectively. Decimal reduction times determined ranged from $D_{102\text{C}} = 0.92 \text{ min}$ to $D_{102\text{C}} = 2.71 \text{ min}$ and from $D_{102\text{C}} = 1.34 \text{ min}$ to $D_{102\text{C}} = 3.98 \text{ min}$ after 3 and 6 days of incubation, correspondingly. The regression analysis showed that the development of spores in bagasse can be defined by the equation: $\text{Spores} = \{-1.15 + 0.0303 \cdot [\text{bagasse (g)}] - 0.00611 \cdot [\text{volume (mL)}] + 0.611 \cdot [\text{time (days)}]\}$, $p=0.000$, $R^2 = 0.452$ and time has a positive influence in the spore formation. Results demonstrated media prepared with oranges' bagasse were capable to grow and to develop *B. atrophaeus* heat-resistant spores, being an alternative to add value to a waste that would be discarded, generating a product of great importance in the pharmaceutical field.

Key-words: agricultural residues, processing of orange, *Bacillus atrophaeus* spores, biological indicator, thermal resistance, D value.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Corte horizontal demonstrando as partes da laranja. Adaptado de (CITRUSBR, 2014)	19
Figura 2 -	A: <i>B. subtilis</i> utilizando coloração de Wirtz, demonstrando a formação do endósporo. B: <i>B. subtilis</i> corados pelo método de Gram (ASM, 2002)	29
Figura 3 -	Esquematisação do processo de esporulação de <i>B. subtilis</i> . Adaptado de: (EIJLANDER <i>et al.</i> , 2014)	33
Figura 4 -	<i>Direita:</i> Micrografia eletrônica de varredura <i>B. atrophaeus</i> : esporos (A) e células vegetativas (B), sobre uma superfície de ágar. <i>Esquerda:</i> Secção transversal de um <i>B. atrophaeus</i> esporos. Adaptado de: (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b)	35
Figura 5 -	Fluxograma de trabalho para a produção de esporos de <i>B. atrophaeus</i> a partir de resíduos do processamento do suco de laranja	39
Figura 6 -	Cultivo de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 em garrafa de Roux (A) e esporos viáveis obtidos em placa de Petri (B)	47
Figura 7 -	Bagaço de laranja obtido após o processamento dos frutos em centrífuga	48
Figura 8 -	Aspecto dos meios de cultivo preparados com bagaço de laranja e água após a esterilização (1,0 g, 2,5 g, 5,0 g e 20,0 g de bagaço / 100 mL de água destilada, da esquerda para a direita)	48
Figura 9 -	Quantidade de açúcares redutores totais (ART, g/L) disponível nos meios de cultivo utilizando diferentes concentrações bagaço de laranja e em TSB	49
Figura 10 -	Valores de pH dos meios, após adição do inóculo, cultivado por 3 dias e por 6 dias, utilizando diferentes concentrações bagaço de laranja e TSB como padrão	50
Figura 11 -	Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) disponível (-♦-), concentração de células totais (-♦-) e concentração de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 (-♦-) em função do tempo de cultivo em 5,0 g de bagaço de laranja	54
Figura 12 -	Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) disponível (-♦-), concentração de células totais (-♦-) e concentração de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 (-♦-) em função do tempo de cultivo em TSB	55

Figura 13 -	Produtividade em células (g/L.h) de <i>B. atrophaeus</i> em meio padrão (-♦-) e em meio contendo bagaço de laranja (5,0 g / 100 mL) (-♦-) por até 6 dias de cultivo	57
Figura 14 -	Coloração de Gram, células de <i>B. atrophaeus</i> cultivadas por 24 horas, (Esquerda) em meio de 5,0 g de bagaço de laranja, (Direita) meio padrão, (100x)	58
Figura 15 -	Células de <i>B. atrophaeus</i> cultivadas em meio de 5,0 g de bagaço de laranja por 3 dias, (Esquerda) coloração de Wirtz: células vegetativas coradas de vermelho e esporos em verde (100X), (Direita) imagem editada (Microsoft Word)	58
Figura 16 -	Células de <i>B. atrophaeus</i> cultivadas em TSB por 3 dias (100x), (Esquerda) coloração de Wirtz: células vegetativas coradas de vermelho e esporos em verde, (Direita) imagem editada (Microsoft Word)	59
Figura 17 -	Eletromicrografias de esporos de <i>B. atrophaeus</i> cultivadas em meio contendo 5,0 g de bagaço de laranja por 24 horas. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão (JEOL EXII, Japão), equipado com uma câmera (GATAN multiscan 791, Estados Unidos)	60
Figura 18 -	Representação gráfica do pH do meio em função da quantidade de bagaço de laranja (g) e do volume de meio (mL) nos ensaios realizados em dias distintos	64
Figura 19 -	Representação gráfica dos valores de pH inoculado em função do pH do meio de cultura	65
Figura 20 -	Tempos de redução decimal (valor D (min)) determinados a 102 °C, de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 obtidos em 3 e 6 dias de cultivo de acordo com os ensaios propostos no planejamento experimental utilizando bagaço de laranja (E ₁ a E ₁₄) e TSB	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Utilização de diferentes resíduos agrícolas para obtenção de produtos com interesse industrial e farmacêutico	24
Tabela 2 -	Variáveis e valores usados nos diferentes níveis do planejamento	45
Tabela 3 -	Planejamento experimental de modelo fatorial 2^2 , em formato estrela, com 6 pontos centrais	46
Tabela 4 -	Valores de pH e biomassa (g/L) de <i>B. atrophaeus</i> após 3 e 6 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de bagaço de laranja em água	51
Tabela 5 -	Valores de pH, biomassa (g/L), açúcares redutores totais, ART (g/L), células totais (UFC/mL) e esporos/mL de <i>B. atrophaeus</i> cultivados em meios contendo 5,0 g de bagaço de laranja e em TSB	53
Tabela 6 -	Parâmetros dos ensaios, valores de pH dos meios, após a adição do inóculo e após 3 dias de cultivo, concentração de ART disponíveis (g/L) nos meios e após o cultivo, biomassa (g/L) e contagem de esporos viáveis (esporos/mL) obtidos após 3 dias de cultivo	62
Tabela 7 -	Parâmetros dos ensaios, valores de pH dos meios, após a adição do inóculo e após 3 dias de cultivo, concentração de ART disponíveis (g/L) nos meios e após o cultivo, biomassa (g/L) e contagem de esporos viáveis (esporos/mL) obtidos após 6 dias de cultivo	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DO	Densidade Ótica
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i>
g/L	grama por litro
IB	Indicador Biológico
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	unidade formadora de colônia
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μm	micrômetro
λ	comprimento de onda
μ_x	velocidade específica de crescimento
P_x	produtividade em células

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Composição da laranja	19
3.2 Produção de laranja e suco	20
3.3 Resíduos agroindustriais	23
3.4 Esterilização e indicadores biológicos	26
3.5 <i>Bacillus subtilis</i>	28
3.6 Formação do endósporo bacteriano	31
3.7 Fatores que influenciam o crescimento microbiano	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Micro-organismo	38
4.2 Meios de cultivo	38
4.3 Fluxograma de trabalho	39
4.4 Preparo da suspensão matriz de esporos de <i>B. atrophaeus</i>	40
4.5 Viabilidade de esporos de <i>B. atrophaeus</i>	40
4.6 Preparo do inóculo	41
4.7 Obtenção do bagaço de laranja	41
4.8 Preparação dos meios de cultivo	41
4.9 Determinação da curva de crescimento de <i>B. atrophaeus</i> em meio TSB e bagaço de laranja	42
4.10 Coloração de Gram e Wirtz	42
4.11 Determinação de pH	43
4.12 Determinação de biomassa	43
4.13 Determinação de açúcares redutores totais (ART)	43
4.14 Avaliação da resistência térmica de esporos de <i>Bacillus</i>	44
4.15 Velocidade específica de crescimento e Produtividade em células	45
4.16 Planejamento experimental	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Suspensão matriz de esporos e bagaço de laranja	47
5.2 Ensaios com bagaço de laranja em diferentes concentrações	49
5.3 Curva de crescimento de <i>B. atrophaeus</i>	52
5.5 Esporos obtidos	58

5.6	Planejamento experimental	61
6.	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	APÊNDICES	81
	ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo (IBGE, 2014), sendo que entre os anos de 1995 e 2008, o setor representou uma média de 26,5% do PIB do país. Em 2011, a receita bruta relacionada à produção agrícola foi de 195,37 bilhões de reais. Além da alta produção, o país contribui com a distribuição de alimentos pelo mundo, visto que lidera a exportação de açúcar (42%), de café (32%) e de suco de laranja (80%), além de outros produtos que contribuem com uma boa parcela do abastecimento, como milho e produtos derivados da soja (grãos e farelo) (FAVA NEVES et al., 2009).

Considerando o mercado citrícola, o Brasil contribui com aproximadamente 56% da produção mundial de suco de laranja, exportando cerca de 98% do que produz. A produção do suco de laranja apresenta importância econômica e social, contribuindo com o PIB brasileiro (US\$ 6,5 bilhões em 2009), movimentando estabelecimentos, recolhendo impostos e gerando empregos diretos e indiretos (CONAB, 2013).

Em virtude da alta produção agrícola, a quantidade de resíduos provenientes das fases de colheita e processamento é elevada (SOUSA; CORREIA, 2010). No caso do processamento do suco de laranja, aproximadamente metade do peso de um fruto é dado em resíduo após a obtenção do suco (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012). Atualmente, a preocupação sobre os impactos que os resíduos podem provocar vem desencadeando a busca por alternativas para reutilização e diminuição da geração dos mesmos.

Uma opção para a utilização de resíduos agrícolas, precisamente aqueles advindos do processamento de frutas é o cultivo de micro-organismos, visto que estes resíduos são compostos por nutrientes que podem permitir o crescimento e obtenção de subprodutos de interesse industrial (KUROSUMI et al., 2009; MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011).

Bacillus atrophaeus ATCC 9372 são bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos ou endósporos e que são conhecidas como produtoras de substâncias com atividades antimicrobianas (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a). A característica de formação de endósporo bacteriano permite o emprego de *B. atrophaeus* como indicadores biológicos (IBs) para avaliação da eficiência de processos térmicos, como por exemplo, a esterilização de artigos médico-

hospitalares e insumos farmacêuticos e avaliação de agentes desinfetantes, constituindo uma ferramenta de importância industrial e na área da Saúde, garantindo a segurança do produto para o consumidor final (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

Mediante o exposto, é importante a avaliação do uso de resíduos como meio de cultivo relativamente barato e disponível para a produção de esporos de *B. atrophaeus*, aproveitando e agregando valor aos resíduos que seriam descartados, para obtenção de produtos de interesse farmacêutico e industrial.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

A presente dissertação teve como objetivo avaliar a utilização de resíduos do processamento de suco de laranja na produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, para serem empregados como bioindicadores de processos térmicos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação do comportamento do crescimento de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio padrão TSB e em meio contendo bagaço de laranja;
- Cultivo de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio contendo resíduos do processamento de suco de laranja por até seis dias;
- Avaliação da viabilidade e resistência térmica dos esporos obtidos, em solução parenteral de cloreto de sódio 0,9%.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Composição da laranja

A laranja (*Citrus sinensis*) é um fruto da árvore laranjeira, pertencente à família *Rutaceae*. Dentre todas as espécies de citros, a laranja é a mais importante devido o sabor doce e aroma fino, sendo apreciada no mundo inteiro. A laranja é composta basicamente por casca, endocarpo ou polpa e sementes (Figura 1). A casca pode ser dividida em duas partes: externa ou flavedo, rica em óleos e carotenóides; e parte interna ou albedo, que é de coloração branca, contendo pectina, limoneno e hesperidina. A parte comestível ou endocarpo aloja as vesículas de suco, divididas em segmentos (CITRUSBR, 2014).

Figura 1 - Corte horizontal demonstrando as partes da laranja. Adaptado de (CITRUSBR, 2014)

No sumo de laranja existem diversos carboidratos como glicose, frutose e sacarose, vitaminas do complexo B (ácido fólico, biotina, tiamina, riboflavina e piridoxina), ácido ascórbico e retinol. Os minerais expressos em cinzas são: potássio e nitrogênio, representando 40%, cálcio, magnésio e fósforo, aproximadamente 5% cada e em menores quantidades sódio, ferro, enxofre, cloro e cobre (ROUSSOS, 2011).

A maturidade dos frutos promove mudanças na cor, sabor, aroma e textura, havendo variações na quantidade de carboidratos, principalmente a sacarose, outros açúcares como galactose, heptilose, xilose, raminose, manose e trealose são encontrados apenas em traços, independente do estado de maturação. Os aminoácidos (arginina, prolina, asparagina e glutamina) representam cerca de 70% do nitrogênio disponível. A presença de ácido cítrico e ácido málico contribui para a acidez característica do suco de laranja (VENTURINI FILHO, 2010).

Os mesmos componentes do suco de laranja são encontrados no bagaço, porém em diferentes quantidades. O valor de pH do suco de laranja e do bagaço (casca, sementes e polpa) é de aproximadamente 4,30. Considerando o peso seco, no bagaço de laranja há aproximadamente 15% de açúcares totais, 9% de açúcares redutores, 21% de pectina, 11% de celulose e 6,5% de proteínas (MAHMOOD; GREENMAN; SCRAGG, 1998).

A composição do bagaço de laranja sofre modificações após o processo de esterilização em autoclave, com eliminação de limoneno e diminuição de polissacarídeos com aumento na quantidade de carboidratos álcool solúveis (glicose, frutose e sacarose), sugerindo a hidrólise de pectina e celulose em açúcares redutores, aumentando assim a fonte de carbono pronta para ser utilizada (MANTZOURIDOU; PARASKEVOPOULOU; LALOU, 2015).

3.2 Produção de laranja e suco

A laranja (*Citrus sinensis*) é nativa do leste da Ásia e foi disseminada para o norte da África pelos povos nômades, chegando à Europa na Idade Média, sendo que o comércio, as guerras e os domínios de novas terras favoreceram a disseminação de citros. A citricultura com ênfase na produção de laranjas iniciou-se na América no período da colonização, século XVI, através das expedições de Cristóvão Colombo, com o intuito de prevenir o escorbuto, mal que acometia viajantes devido à falta de vitamina C (LOHBAUER, 2011).

Os pés de laranja trazidos nas expedições portuguesas para o Brasil adaptaram-se muito bem ao clima, sendo a primeira laranjeira do país plantada no ano de 1501 no Estado da Bahia disseminando-se para outras regiões. Em 1920, criou-se o primeiro núcleo citrícola na cidade de Nova Iguaçu-RJ, o qual atendia a

demanda dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro além de algumas exportações para Argentina e Inglaterra. No ano de 1950, a produção de laranja migrou para a região de Araraquara-SP, onde muitos fazendeiros adotaram o cultivo. A partir da década de 60, o Brasil passou a liderar o comércio externo de suco de laranja, devido a uma forte geada no Estado da Flórida (EUA), que era até então líder na produção e exportação de suco de laranja. A diminuição da produção na Flórida favoreceu o desenvolvimento da indústria de suco de laranja no Brasil, com melhorias na tecnologia e aumento da área plantada (FAVA NEVES et al., 2009).

Desde então o Brasil lidera mundialmente em produtividade de suco de laranja, tendo ainda projeções de aumento de 6%, devido à adoção de novas tecnologias e manejo empregados no campo e no processo industrial, permitindo a disponibilidade de frutos em maior quantidade e qualidade (ESTADÃO CONTEÚDO, 2014).

O Brasil produz em média de 19 milhões de toneladas por ano e boa parte da produção é destinada à obtenção de suco. Por sua vez o país exporta cerca de 98% do total de suco de laranja produzido e lidera o mercado externo com 56% de participação (CITRUSBR, 2011). Em segundo lugar no *ranking* de produção de suco de laranja, estão os Estados Unidos com 8 milhões de toneladas/ano seguido da China que produz 7 milhões de toneladas/ano. Os estados da Flórida (EUA) (28%) e São Paulo (BR) (53%) contribuem com (81%) da produção mundial de suco de laranja (FAVA NEVES et al., 2009).

A variação no tipo de laranja plantada sejam elas de características tardias como Natal e Valência (55% do total plantado), precoces como Hamlin, Westin, Rubi e Pineapple (23%) ou meia estação como Pera Rio (22%), são estratégias para dissolver a colheita e auxiliar no controle de pragas (FAVA NEVES et al., 2009).

A legislação brasileira classifica o suco de laranja como bebida não alcóolica obtida de forma tecnológica dos frutos de *Citrus sinensis*. De acordo com o grau de diluição, as bebidas a base de laranja podem ser classificadas como: suco, néctar e refresco. O suco possui (100%) da polpa e não é adicionado de adoçante, corante e conservante, o néctar por sua vez contém entre (99%) e (25%) de polpa, podendo ser adicionado de adoçantes, conservantes e corantes, estes são mais acessíveis à populações com menor poder aquisitivo, por último o refresco possui menos de (25%) de polpa e pode conter aditivos, o que diminui muito o custo deste produto, bem como os valores nutricionais (VENTURINI FILHO, 2010).

A cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são de

origem brasileira. A Europa é o principal importador de suco de laranja brasileiro (UNITED STATES, 2013), e o consumo de suco está associado a elevada renda per capita. Os Estados Unidos e a Europa geralmente consomem mais sucos e países como o Brasil, a Rússia, a Índia e o México com menor renda per capita tendem a consumir mais néctar e refresco. O Brasil, apesar de ser líder mundial na exportação de suco de laranja, apresenta perfil de consumo interno dominado pela fruta *in-natura*, através de extratores de suco seja nas residências, padarias e restaurantes (FAVA NEVES et al., 2009).

A importância das exportações do suco de laranja estimulou a Associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos (CITRUSBR) a desenvolver um plano de *marketing* para a defesa e a promoção do suco de laranja na Europa, estimado em US\$ 7 milhões visando utilizar suporte científico e de profissionais da área da Saúde para demonstrar os benefícios da bebida, garantindo o consumo no maior mercado importador do suco brasileiro (ESTADÃO CONTEÚDO, 2015).

O suco de laranja é muito bem aceito dentre os consumidores, além do seu consumo sugerir associação com a diminuição do risco de carcinomas relacionados ao sistema digestório e efeitos antioxidantes devido à presença de flavononas como hesperidina e vitamina C, além do efeito hipoglicemiante, hipocolesterolêmico e anti-inflamatório. Tais benefícios estimulam a adesão ao consumo de suco de laranja (PEREIRA-CARO et al., 2015).

O procedimento de extração industrial do suco de laranja é padronizado, variando minimamente de acordo com o grau de concentração, consistindo basicamente por: recepção dos frutos, pré-seleção, higienização, seleção por tamanho, extração do suco, filtração, centrifugação, concentração e pasteurização e embalagem. No processo de obtenção do suco, há geração de subprodutos como terpenos, óleos essenciais e bagaço (LOHBAUER, 2011).

Na produção de suco de laranja, utiliza-se apenas metade do peso do fruto para obtenção do suco, o restante é considerado resíduo ou também definido como bagaço (casca, sementes e polpa). O bagaço possui elevado teor de umidade, cerca de (82%), este resíduo tem como principal destino a fabricação de ração animal, porém existem algumas dificuldades devido à facilidade de contaminação microbiana e o custo empregado na secagem e logística inviabilizando economicamente a comercialização (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012).

3.3 Resíduos agroindustriais

Por definição, segundo a Resolução 5/1993 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), resíduos sólidos, semissólidos e líquidos são provenientes de atividades doméstica, industrial ou hospitalar, que são descartados por não terem finalidade dentro de processos. O resíduo necessita de destino apropriado, visto que o acúmulo no local onde foi gerado acarreta problemas sociais, ambientais e econômicos, com perda de matéria-prima e energia. O destino dos resíduos gerados em atividades industriais é de responsabilidade do órgão gerador, o qual deve seguir os pilares de sustentabilidade: reduzindo, reciclando e reutilizando (BRASIL, 2010).

Desde a Revolução Industrial o problema da geração de resíduos tem aumentado, seja pela emissão de gases poluentes, descarga de rejeitos em rios e solo, descarte inadequado de embalagens ou uso de defensivos e fertilizantes tem contribuído para o esgotamento dos recursos naturais e mudanças climáticas (BURGERS, 2011).

A agricultura moderna deve oferecer produtos de qualidade e adotar medidas de preservação ao meio ambiente, através do cuidado com os resíduos gerados durante a cadeia agroindustrial. Os problemas ambientais gerados pela descarga de resíduos na natureza parecem inofensivos. Porém o descarte de matéria orgânica proveniente do processamento da laranja, considerado natural, no oceano pode acarretar danos à vida marinha, em razão ao aumento na demanda bioquímica de oxigênio, desencadeando desequilíbrio do habitat e por sequente geração de zonas mortas (YOO et al., 2011).

O desperdício mundial de alimentos é de aproximadamente 1,3 bilhões de toneladas por ano, originando impactos ambientais, sociais e econômicos (por volta de US\$ 750 mil milhões/ ano). Dentre os alimentos perdidos ou descartados, 54% das perdas ocorrem na produção, pós-colheita e armazenamento e é característica de países em desenvolvimento, relacionado com a escassez de tecnologias adequadas, já 46% do desperdício é decorrente do processamento, transporte e consumo, refletindo o maior poder de compra da população e muitas vezes o desperdício ocorre nas residências (FAO, 2013).

A tendência de crescimento econômico de alguns países, principalmente asiáticos, associado ao maior poder de compra dos consumidores e o desenvolvimento de novas tecnologias empregadas no campo, contribuem com o

aumento na produção agrícola. Projeções indicam que até o ano 2030, um terço do total de alimentos comercializados no mundo será de origem brasileira refletindo também no aumento da geração de resíduos, evidenciando a necessidade do emprego imediato de técnicas adequadas de aproveitamento destes (BEVILAQUA et al., 2013; FORSTER-CARNEIRO et al., 2013).

Diversos estudos vêm sendo realizados no desenvolvimento de técnicas de aproveitamento de resíduos agrícolas com o objetivo de obter produtos com valor comercial (Tabela 1).

Tabela 1 – Utilização de diferentes resíduos agrícolas para obtenção de produtos com interesse industrial e farmacêutico

Resíduo	Micro-organismo	Produto	Referência
Melancia, Maça e Batata	<i>Lactobacillus sp</i>	Ácido Lático	(WU et al., 2015)
Mandioca	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululano	(SUGUMARAN; JOTHI; PONNUSAMI, 2014)
Laranja, Mamão e Beterraba	<i>Acetobacter xylinum</i>	Celulase Bacteriana	(MORETTI et al., 2013)
Caju	<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	(OLIVEIRA et al., 2013)

A utilização de uma mistura de resíduos contendo melancia (57%), maçã (29%) e batata (14%) demonstrou eficiência na produção de ácido lático, que é amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica e têxtil e na produção de detergentes (WU et al., 2015).

Através da fermentação de resíduos de mandioca, obteve-se pululano, polissacarídeo biodegradável que possui diversas aplicações, como a produção de embalagens farmacêuticas e películas. (SUGUMARAN; JOTHI; PONNUSAMI, 2014). Resíduos de laranja, mamão e beterraba foram promissores na produção de celulase bacteriana, utilizada para no tratamento de queimaduras ou perda de pele, além de outras utilidades na área cirúrgica devido à baixa toxicidade e estabilidade (MORETTI et al., 2013).

Resíduos de laranja, abacaxi, maçã, pera e uva também permitiram a obtenção de celulase bacteriana pelo mesmo micro-organismo, o meio contendo laranja demonstrou melhor produtividade, possivelmente devido a presença de fontes de nitrogênio neste, fato que beneficia o crescimento bacteriano (KUROSUMI et al.,

2009).

O crescimento de *B. subtilis* utilizando resíduos de caju favoreceu a produção de surfactina, composto anfifílico de consideráveis aplicações, como biorremediação e retirada de poluentes da água (OLIVEIRA et al., 2013), *B. subtilis* também foi capaz de desenvolver-se em resíduos de malte, produzindo na fase de esporulação o antibiótico iturina A, que é utilizada no controle de doenças em plantas, fornecendo uma alternativa para a redução do uso de pesticidas químicos (KHAN; RAHMAN; ANO, 2009).

A utilização de cascas de arroz possibilitou a produção de ácido levulínico, produto de importância em diversos setores industriais que serve como plataforma para outros produtos químicos, como polímeros plásticos, o processo foi viável por apresentar bom rendimento (59,4%) e utilizar fonte renovável de baixo custo (BEVILAQUA et al., 2013).

Utilizando farinha de casca de laranja como substrato nutritivo para o cultivo de *Klebsiella sp* obteve-se produção de fitase, enzima útil como aditivo na alimentação animal aumentando o valor nutricional de rações devido a liberação de fósforo para absorção intestinal (MITTAL et al., 2012).

A utilização de resíduos de maçã, uva, tamarindo e limão para crescimento de *Aspergillus sp* permitiu a obtenção de pectinase, enzima extremamente utilizada na indústria alimentícia e produção de bebidas (MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011). A obtenção de probióticos *Lactobacillus sp* em suco de maçã demonstrou-se satisfatória e estável frente ao tempo de estocagem de 4 semanas, com a produção de folato (vitamina do complexo B), apresentando boa aceitação no teste de aceitabilidade com voluntários (ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015).

DLUGOKENSKI et al., 2011, avaliaram o uso de resíduos de soja para obtenção de *G. stearothermophilus* para ser empregado como bioindicador de esterilização por calor úmido, obtendo esporos com resistência térmica, $D_{121}= 3,2$ min.

Resíduos do processamento de laranja podem ser promissores no cultivo de micro-organismos, devido à presença de nutrientes, como açúcares solúveis, polissacarídeos insolúveis e óleos essenciais (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012). O bagaço de laranja é o maior resíduo sólido produzido pela indústria processadora de frutas (MANTZOURIDOU; PARASKEVOPOULOU; LALOU, 2015).

O uso de bagaço de laranja como meio de cultivo para crescimento de

Aspergillus niger permitiu a obtenção de biomassa e produção de alfa amilase. Através de *design* estatístico para a otimização do meio observou-se que quando o meio foi suplementado com amido houve aumento na produção de amilase, porém a biomassa não sofreu alterações, sugerindo que o resíduo de laranja apresentou adequadas fontes de carbono para o crescimento deste micro-organismo (DJEKRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006).

O emprego de resíduos agrícolas, principalmente advindos de frutas, como meio de cultivo, mostram-se promissores para o desenvolvimento de micro-organismos e obtenção de produtos, permitindo a valorização do resíduo e contribuindo ambientalmente por diminuir a descarga de matéria orgânica no meio ambiente (SELLA et al., 2013). A tendência é de transição industrial e global para o reuso de fontes naturais, com benefícios econômicos, ambientais e sociais.

3.4 Esterilização e indicadores biológicos

Esterilização é um processo que visa destruir ou inativar todas as formas de vida que possam se desenvolver durante a conservação e a utilização de produtos, sejam estes farmacêuticos ou médico-hospitalares. A esterilidade pode ser obtida através do emprego de agentes físicos: calor seco e calor úmido; agentes químicos: como sanitizantes e óxido de etileno; radiação: ionizante (alfa, beta, gama e delta) e não ionizante (ultravioleta); e filtração (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

A ausência do controle da eficácia do processo de esterilização pode resultar em infecções severas adquiridas através de materiais hospitalares contaminados (WILSON; NAYAK, 2013).

A escolha no método de esterilização deve levar em consideração as características do produto e a carga microbiana, por exemplo, a filtração é o método de escolha para esterilização de produtos termo sensíveis. E o calor seco é o método de escolha quando o produto apresenta forma farmacêutica pó. Além das características do produto, o custo do processo também deve ser considerado (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

O método de esterilização utilizando óxido de etileno é utilizado desde 1950, para esterilizar equipamentos que não podem ser autoclavados. Trata-se de uma mistura explosiva de gases, combinado com temperatura, umidade e tempo,

necessitando de aeração após o processamento. Este método possui efeito carcinogênico e teratogênico (WILSON; NAYAKI, 2013).

O calor é o agente esterilizante mais utilizado, devido ao baixo custo quando comparado aos outros métodos e pela facilidade de controle do processo. O calor úmido sob pressão é realizado em autoclave 121 °C / 15 min, é o método mais utilizado para materiais médico-hospitalares do tipo crítico, sendo este mais eficiente que o calor seco 160 °C / 2 horas, por necessitar de tempo e temperatura menores para atingir o nível de esterilidade proposto, tal facilidade está relacionada à presença de água quando se utiliza o calor úmido. O mecanismo de morte na esterilização por calor úmido é dado pela desnaturação de proteínas e dissolução de lipídeos, já no calor seco ocorre à oxidação dos componentes do protoplasma (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Para certificar a eficiência de um processo térmico, utilizam-se indicadores, os quais podem ser físicos, químicos e biológicos. Os indicadores físicos compreendem ferramentas como manômetros e termopares, estes são distribuídos estrategicamente em diversos pontos da câmara, registrando a homogeneidade da distribuição do calor. Indicadores químicos por sua vez demonstram a exposição ao agente esterilizante, através da mudança de cor entre materiais processados e não expostos. Existem também indicadores químicos integrados, classificados em seis níveis, que relacionam as condições de temperatura, vapor e tempo. Por fim os indicadores biológicos são os mais confiáveis e recomendados pelos métodos farmacopeicos (WILSON; NAYAKI, 2013).

Indicadores biológicos são proteínas ou micro-organismos com resistência definida e estáveis frente a um processo de esterilização. O IB selecionado deve apresentar resistência maior quando comparado a biocarga presente no material a ser processado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os indicadores biológicos são introduzidos no ciclo de esterilização e a morte destes certifica que outros micro-organismos de menor resistência ao agente esterilizante também tenham sido eliminados. Suspensões de esporos, autocontidos e impregnados em fitas de celulose são as apresentações disponíveis de bioindicadores. Quando se utiliza IBs autocontidos verifica-se mudança de coloração no rótulo de amostras que foram processadas e alteração na coloração do meio, que é dada pela presença de metabólitos ácidos resultantes do crescimento microbiano e mudança no pH do meio (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Algumas bactérias formadoras de esporos, altamente resistentes são utilizadas como indicadores biológicos, de acordo com o processo utilizado, esporos de *G. stearothermophilus* é referência na esterilização por calor úmido, *B. atrophaeus* qualificam processos por calor seco e óxido de etileno e *B. pumilus* são referência quando se utiliza radiação ionizante. O IB geralmente apresenta população de 10^5 e 10^6 esporos por unidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Teoricamente, a esterilidade absoluta com 100% de morte não existe, devido à natureza logarítmica da cinética de destruição microbiana (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006). A esterilidade é mensurada conforme o nível de letalidade, o qual assegura o nível de esterilidade (*sterility assurance level*, SAL) que é o nível de certeza da ausência de multiplicação, sendo um SAL de 10^6 representa uma chance em um milhão de um micro-organismo sobreviver ao processo de esterilização (WILSON; NAYAKI, 2013). Para que o processo de esterilização seja seguro, define-se a necessidade do decaimento de 10^{-6} ou 12 ciclos logarítmicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A manutenção do nível de esterilidade de um produto depende de operações pré-esterilização como as boas práticas de laboratório, de esterilização que envolve a validação da metodologia e equipamentos, e pós-esterilização que é a parte de armazenamento adequado e transporte. A eficiência dos processos de esterilização deve ser qualificada e documentada (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

3.5 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é um micro-organismo Gram-positivo (Figura 2), não patogênico, aeróbio facultativo, saprofítico, mesófilo, geralmente encontrado no solo, pertencente à família *Bacillaceae* e ao filo *Firmicutes*, os quais apresentam como principal característica a capacidade de formar endósporos, também denominados esporos (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

Figura 2 - **A:** *B. subtilis* utilizando coloração de Wirtz, demonstrando a formação do endósporo. **B:** *B. subtilis* corados pelo método de Gram (ASM, 2002)

A maioria dos *Bacillus spp* possui importância industrial devido à produção de enzimas hidrolíticas, como a alfa amilase e a bacitracina, permitindo a utilização de matéria orgânica de mistura complexa, por exemplo, os resíduos como fonte de energia para o crescimento e geração de subprodutos (MAHMOOD; GREENMAN; SCRAGG, 1998).

Bacillus atrophaeus, também conhecido como *Bacillus globigii* ou *Bacillus niger* são uma reclassificação de *B. subtilis*. A diferença entre eles está na produção de pigmento escuro que o *B. atrophaeus* promove em alguns meios de cultivo contendo fontes de nitrogênio, onde “atro” faz referência à cor negra e “phaeus” à marrom, devido à formação de pigmento marrom escuro (BURKE et al., 2004; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a). Segundo o órgão ATCC (American Type Culture Collection) a pigmentação das colônias de *B. atrophaeus* pode variar de acordo com a composição do meio, apresentando coloração laranja em caldo carne e ágar glicose e colônias negras em ágar tirosina. A morfologia das colônias pode variar, podendo ser mucoides, grandes e não delimitadas ou serem menores e bem delimitadas, estas características estão relacionadas com a produção de biofilmes (SELLA et al., 2009a).

Na literatura, os registros sobre *B. atrophaeus* e suas moléculas estão disponíveis desde 1989, quando foi descrito como nova espécie por Nakamura, por esta razão considera-se *B. subtilis* como micro-organismo similar em características e produção de biomoléculas (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b; ATCC, 1995).

A engenharia de modulação de caminho metabólico através do estudo genético permite o direcionamento do metabolismo de *B. subtilis*, com seleção dos produtos desejáveis e assim otimização energética do substrato e aumento da produtividade (LIU et al., 2014).

Bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas umas das maiores fontes de moléculas com reconhecida ação antibacteriana e fungicida com ampla aplicação na área da saúde e industrial (NALISHA, MUSKHAZLI, FARIZAN, 2006). Atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus* e *E. faecalis* foi detectada no cultivo de *B. atrophaeus*, contribuindo com a segurança de alimentos (GUO et al., 2016).

B. subtilis são uma ferramenta importante na biorremediação, que é um processo de retirada de contaminantes do meio ambiente através do uso de micro-organismos ou de seus produtos, como exemplo os biosurfactantes, que são moléculas anfifílicas, com vantagens sobre os surfactantes químicos. Dentre as vantagens estão baixa toxicidade, biodegradabilidade e efetividade em condições adversas de pH e temperatura (PEREIRA et al., 2013).

Esporos de *B. subtilis* também são utilizados como indicadores biológicos IBs para avaliação da eficiência de processos térmicos, como a esterilização e desempenho de agentes desinfetantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; VESSONI PENNA, 2006). *B. atrophaeus* também são citados na validação da descontaminação de cabines de fluxo laminar utilizando desinfetantes químicos como ácido peracético e dióxido de cloro (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

Devido à classificação GRAS (*Generally Regarded As Safe*), que garante a segurança de uso, por não produzirem toxinas, *B. subtilis* podem ser empregados como probióticos na alimentação animal. A suplementação alimentar de frangos com *B. subtilis* LS 1-2 demonstrou efeito de proteção intestinal contra bactérias patogênicas, como *Clostridium* e *Coliforms*, sendo uma alternativa segura e econômica, visto que os micro-organismos foram obtidos pela fermentação de resíduos cítricos (SEN et al., 2011).

O gênero *Bacillus* apresenta capacidade de modificar seu processo fisiológico, e o ciclo de vida pode consistir em: crescimento vegetativo, caracterizado por divisão binária simétrica que ocorre na presença de nutrientes; esporulação, que é a forma dormente na qual pode permanecer durante anos; e germinação que é a retomada

das atividades metabólicas frente a condições ambientais favoráveis como a presença de nutrientes (LOPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2009; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

3.6 Formação do endósporo bacteriano

Os primeiros registros sobre o estudo de esporos bacterianos são datados de 1872, quando Cohn e Kock demonstraram a resistência a temperaturas elevadas que estas estruturas possuíam (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a). A descoberta da esporulação bacteriana foi muito importante para a área da saúde e na conservação e segurança de alimentos, visto que um processo comum de destruição de células vegetativas não é eficiente na eliminação de esporos (EIJLANDER et al., 2014).

Os esporos bacterianos são considerados o principal obstáculo na preservação de alimentos. O processamento inadequado pode permitir a sobrevivência de esporos nos alimentos, que podem germinar, levando à deterioração e perda econômica, bem como causar doenças e até morte, por exemplo, a ingestão da neurotoxina botulínica proveniente de *C. botulinum* (AQUARONE; BORZANI; LIMA, 1975). Outros esporos patogênicos são: *B anthracis*, *C. tetani* e *C. perfringens*.

A esporulação origina uma estrutura dormente, cada célula vegetativa dá origem a um esporo, estrutura que apresenta maior resistência às condições físicas e químicas adversas, aumentando também a longevidade da célula no ambiente (VESSONI PENNA; MACHOSHVILI; ISHII, 2003). O esporo bacteriano é capaz de sobreviver em condições ambientais extremas de pH, temperatura, radiação e substâncias químicas por centenas ou até milhares de anos com níveis de metabolismo quase indetectáveis (GOULD, 2006).

A esporulação pode ser desencadeada por fatores ambientais ou condições de estresse, como a baixa disponibilidade de nutrientes, variação de temperatura, pH, quantidade de minerais, população celular e outros. Trata-se de um mecanismo de sobrevivência, o processo de esporulação é composto por sete estágios e tem duração média de 8 horas (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008):

- Estágio I: no primeiro estágio de formação do esporo ocorre duplicação do material nuclear e disposição em filamento axial.
- Estágio II: ocorre à separação da cromatina e formação de um septo com duas membranas, dado pela invaginação da membrana plasmática em um polo.
- Estágio III: o esporo imaturo é envolvido por uma dupla membrana da célula mãe, em um processo semelhante à fagocitose. A posição do endósporo em relação à célula mãe pode ser terminal, central ou subterminal. O endósporo de *B. subtilis* ocupa a posição subterminal.
- Estágio IV: formação do córtex, que compreende em uma camada de peptidoglicano entre duas membranas e acúmulo de ácido dipicolínico e cálcio no núcleo do esporo, bem como saída de água. Esta é a fase mais crítica e que contribui para a resistência adequada do esporo, é também chamada de fase de mineralização.
- Estágio V: ocorre a síntese das membranas internas e externas, da capa e do *exosporium*, que são camadas de proteínas, as quais possuem importância na proteção do esporo. O *exosporium* é muito pequeno em *B. subtilis*, sendo a capa mais importante (SETLOW, 2006).
- Estágio VI: maturação do esporo, apresentando refratibilidade, devido à desidratação do núcleo, elevada mineralização. A aquisição da resistência total é observada após a liberação do esporo.
- Estágio VII: liberação do esporo e autólise da célula vegetativa. Neste período o esporo está maduro e apresenta resistência a agentes químicos e elevadas temperaturas (SANCHEZ-SALAS et al., 2011).

Figura 3 - Esquematização do processo de esporulação de *B. subtilis*. Adaptado de: (EIJLANDER et al., 2014)

A estrutura do esporo e sua composição química são essenciais na resistência deste. O esporo bacteriano geralmente compreende bactérias Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium* e *Sporasarcina*), que podem sobreviver períodos longos, em condições extremas. São formados por uma complexa estrutura de camadas protetoras, a saber: capa, membrana externa, córtex, membrana interna e núcleo (Figura 3) (SETLOW, 2006; ROSE et al., 2007).

A capa é um complexo de diversas camadas de proteínas em *B. subtilis* representam entre (50% e 80%) do conteúdo de proteína da célula. A presença de proteínas insolúveis forma uma barreira seletiva, exercendo o papel de transporte de moléculas, seja pela exclusão de compostos tóxicos, especialmente oxidantes e enzimas hidrolíticas ou pela entrada de moléculas importantes. A capa também serve como veículo de antígenos (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

A membrana externa envolve o córtex, e está localizada abaixo da capa. O córtex é considerado primordial na resistência do esporo, formado por uma espessa camada de peptidoglicanos (ácido acetilmurânico) que envolve o núcleo e possui como principal função a redução do conteúdo de água na célula. O baixo conteúdo de água no núcleo é o maior contribuinte da dormência enzimática e assim proteção ao núcleo (ROSE et al., 2007; SETLOW, 2006).

A membrana interna é uma barreira composta de moléculas lipídicas e canais que permitem a passagem de cálcio e ácido dipicolínico. O núcleo é a parte central

que contém enzimas, DNA, RNA, ácido dipicolínico (15% do peso seco do esporo), íons divalentes e pequenas proteínas ácido solúveis, as quais saturam o DNA do esporo e previnem danos ao mesmo, essas proteínas são sintetizadas no final da esporulação (SETLOW, 2006).

Figura 4 - *Direita*: Micrografia eletrônica de varredura *B. atrophaeus*: esporos (A) e células vegetativas (B), sobre uma superfície de ágar. *Esquerda*: Secção transversal de um *B. atrophaeus* esporos. Adaptado de: (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b)

A resistência do esporo é influenciada por fatores intrínsecos, como as características genéticas de cada micro-organismo, bem como parâmetros de esporulação, composição do meio de cultivo, temperatura de cultivo e atividade de água (NGUYEN; PERRIER-CORNET; GERVAIS, 2008). A presença de vitaminas no meio parece contribuir com a esporulação, bem como a quantidade de cálcio, sendo este íon o maior constituinte da capa do esporo. Os esporos formados na presença de cálcio tendem a apresentar maior resistência térmica (MONTEIRO et al., 2014), possivelmente por diminuir o conteúdo de água no esporo e assim prevenir atividade enzimática nas células dormentes (VRIES, 2004).

Se o esporo bacteriano receber estímulo para retomar suas atividades metabólicas, inicia-se germinação, que é dada por etapas, sendo: ativação, que é desencadeada devido à ligação de nutrientes a receptores localizados na membrana interna do esporo; síntese de proteínas de reparo ao DNA; liberação do complexo ácido dipicolínico e cálcio com a reidratação parcial do núcleo; hidrólise do córtex que é essencial para a expansão do núcleo e início da divisão celular e quebra das pequenas proteínas ácido solúveis que protegem o núcleo, permitindo o início do metabolismo celular, resultando na germinação de uma célula vegetativa normal. A saída do complexo dipicolinato de cálcio permite a entrada de água na célula pela fluidez da membrana (VRIES, 2004; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

A germinação também pode ser iniciada frente à presença de muopeptídeos, que são produzidos pela degradação de peptidoglicanos presentes no esporo, esta característica explica a germinação estimulada pela germinação de outras células. A capacidade de utilização de material celular de células semelhantes atribui à denominação de canibais (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

3.7 Fatores que influenciam o crescimento microbiano

O crescimento microbiano é dado por um perfil característico, dividido em fases. Na fase inicial de adaptação ou *lag*, a população bacteriana sofre pequenas alterações no crescimento, passando então para a fase *log* ou exponencial, onde ocorre o crescimento celular e intensa atividade metabólica, quando o crescimento é constante e o número de células novas é igual ao número de células mortas denomina-se fase estacionária, que ocorre devido à diminuição de nutrientes e o acúmulo de metabólitos no meio, consequentemente existe a fase de declínio ou morte, com diminuição do número de células (AQUARONE; BORZANI; LIMA, 1975).

Diversos fatores podem influenciar o crescimento bacteriano, como por exemplo, o tipo de ambiente, presença de outros micro-organismos, disponibilidade de nutrientes, temperatura, oxigênio, pH, agitação e osmolaridade. As bactérias necessitam de elementos importantes para a renovação celular, sendo capazes de adaptarem-se a diferentes condições (DAS NEVES et al., 2009).

As condições de cultivo são essenciais para uma boa produtividade de células, a temperatura influencia na velocidade das reações enzimáticas, e cada micro-organismo apresenta uma temperatura ótima para o crescimento. A agitação é importante para homogeneizar o meio de cultivo e as células, bem como facilitar trocas gasosas, influenciando também a formação de produtos secundários. Quanto ao pH, cada micro-organismo possui uma faixa ideal que facilita a absorção de nutrientes, bem como a osmolaridade (VITOLLO et al., 2015).

O meio de cultura deve oferecer fontes de energia para o crescimento microbiano, que são fontes de carbono, sendo mais comuns glicídios (glicose, frutose, lactose, sacarose), aminoácidos, lipídeos, aldeídos e substâncias poliméricas como o amido e celulose. As fontes de nitrogênio também apresentam

importância no crescimento microbiano, o nitrogênio pode ser obtido por sais de amônia, aminoácidos, vitaminas e proteínas (VITOLO et al., 2015).

Alguns íons são essenciais para o metabolismo energético e síntese da maquinaria celular, como fósforo, enxofre, manganês, zinco, ferro, cobre, sódio, potássio, magnésio e cálcio. No caso de bactérias formadoras de esporos a presença de cálcio é essencial para atingir a fase de esporulação (MONTEIRO et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

Esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 foram mantidos em suspensão, sob refrigeração a 4 °C até o momento de uso.

4.2 Meios de cultivo

Foram utilizados dois meios de cultivo: *Plate Count Agar* (PCA), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) utilizado para obtenção dos esporos e *Trypic Soy Broth* (TSB), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) como padrão para os experimentos, preparados de acordo com as especificações dos fabricantes, e autoclavados a 121 °C por 20 minutos (modelo Av 75, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil).

PCA: agar triptona, glicose e extrato de levedura (pH 7,0 ± 0,2)

- Triptona 5,0 g;
- Extrato de levedura 2,5 g;
- Glicose 1,0 g;
- Ágar 9,0 g;
- Água q.s.p 1000 mL;

TSB: caldo de caseína de soja (pH 7,3 ± 0,2)

- Caseína de digestão pancreática 17,0 g;
- Farinha de soja de digestão papaínica 3,0 g;
- Cloreto de sódio 5,0 g;
- Fosfato de potássio dibásico 2,5 g;
- Dextrose 2,5 g;
- Água q.s.p 1000 mL;

4.3 Fluxograma de trabalho

Figura 5 - Fluxograma de trabalho para a produção de esporos de *B. atrophaeus* a partir de resíduos do processamento do suco de laranja

A obtenção de esporos de *B. atrophaeus* em meio de cultivo utilizando resíduos do processamento do suco de laranja foi desenvolvida em etapas (Figura 5), as quais serão detalhadas nos próximos itens.

4.4 Preparo da suspensão matriz de esporos de *B. atrophaeus*

O preparo da suspensão matriz de esporos foi realizado conforme descrito por VESSONI PENNA et al., 2002. Esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 foram cultivados a partir de uma suspensão de estoque, a qual foi homogeneizada por 20 minutos em agitador magnético (752, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil). Alíquota de 5,0 mL foi transferida para um tubo de ensaio estéril, e aquecida em banho de água a 80 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo. O conteúdo do tubo foi inoculado na superfície de uma garrafa de Roux contendo 200,0 mL de PCA solidificado, a qual foi incubada a 37 °C por 6 dias (347, Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

Após seis dias a cultura da garrafa foi removida com auxílio de pérolas de vidro e 80,0 mL de solução de acetato de cálcio 0,02 M, filtrada através de gaze e acondicionada em frasco estéril com pérola de vidro e barra magnética. O pH desta suspensão foi ajustado para 9,7 com solução de hidróxido de cálcio saturada 0,14% (p/v). As soluções de hidróxido de cálcio e acetato de cálcio foram preparadas conforme APÊNDICE - A.

4.5 Viabilidade de esporos de *B. atrophaeus*

A viabilidade dos esporos obtidos foi avaliada através de contagem de esporos após choque térmico. Alíquota de 5,0 mL foi submetida a tratamento térmico a 80 °C por 10 minutos, e banho de gelo 0 °C a 4 °C por. Procedendo com diluições seriadas em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri, adicionando 20,0 mL de PCA e incubadas a 37 °C / 48 horas em posição invertida, quantificando o número de células através do fator de diluição adequado expressando esporos/mL.

4.6 Preparo do inóculo

A suspensão de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 foi homogeneizada por 20 minutos em agitador magnético (752, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil). Uma alíquota de 1,0 mL desta suspensão foi transferida para Erlenmeyer de 250,0 mL contendo 100,0 mL de TSB, fechando-o com tampa de espuma. O inóculo foi incubado a 150 rpm / 37 °C em *shaker* orbital (TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 horas.

Após o cultivo alíquotas de 1,0 mL em triplicata foram centrifugadas (5810R, Eppendorf, Germany) 4000 rpm / 4 °C / 25 minutos, separando o sobrenadante do *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspenso com água destilada e a concentração da biomassa foi ajustada em 0,1 g/L através da leitura da densidade ótica em $\lambda = 600$ nm (UV-1650PC, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), utilizando a equação da curva padrão previamente definida ($\text{Absorbância}_{600\text{ nm}} = 2,441 \cdot \text{biomassa (g/L)} + 0,2584$), $R^2 = 0,98$ (APÊNDICE B - 2.1).

4.7 Obtenção do bagaço de laranja

As laranjas (*Citrus sinensis* L.), da variedade nacional laranja pêra, foram adquiridas em um comércio local (São Paulo, SP, Brasil), na quantidade necessária para todos os experimentos, para evitar variações sazonais. Os frutos foram escovados em água corrente e submersos em solução de ácido peracético 0,1% (v/v) por 60 minutos, enxaguados e processados em centrífuga de frutas (Modelo BRCT Big Apple, Britânia, China), separando-se o suco do bagaço (casca, sementes e polpa). O bagaço foi acondicionado em sacos plásticos e congelado a -18 °C, até o momento do preparo dos meios.

4.8 Preparação dos meios de cultivo

Para preparo dos meios de cultivo, o bagaço de laranja foi descongelado e pesado nas concentrações desejadas, variando de 1,0 g a 20,0 g de bagaço em 100,0 mL de água destilada e esterilizados (121 °C por 20 minutos). Cada

concentração foi filtrada com auxílio de gaze e tecido não tecido (TNT), transferindo o volume de cultivo desejado para Erlenmeyers de 250,0 mL. Os meios foram inoculados com 0,1 g/L de *B. atrophaeus*, fechados com tampa de espuma e incubados em *shaker* a 150 rpm / 37 °C por até 6 dias, utilizando TSB como padrão. Após o cultivo alíquotas de 10,0 mL foram retiradas e centrifugadas 4000 rpm / 4 °C / 25 minutos.

4.9 Determinação da curva de crescimento de *B. atrophaeus* em meio TSB e bagaço de laranja

O comportamento de *B. atrophaeus* em meio contendo bagaço de laranja, foi determinado utilizando a concentração de 5,0 g / 100 mL preparados conforme item 4.8. Para determinação do crescimento de *B. atrophaeus* em meio TSB, foram preparados 1,6 L de TSB que foram inoculados com 16,0 mL da suspensão de esporos matriz e incubados conforme descrito no item 4.8.

Como o intuito deste ensaio foi verificar o comportamento de crescimento de *B. atrophaeus* em bagaço de laranja e no meio padrão durante o período de seis dias. Definiram-se tempos de retirada dos cultivos, e para cada tempo realizaram-se análises de pH item 4.11, biomassa (g/L) item 4.12, açúcares item 4.13 e contagem de células totais e esporos viáveis. A contagem de células totais foi realizada através de diluição seriada e semeadura em profundidade e a quantificação de esporos viáveis conforme descrito no item 4.5.

4.10 Colorações de Gram e Wirtz

A técnica de coloração de Gram permite a diferenciação entre bactérias pelo conteúdo da parede celular. Bactérias Gram-positivas coram-se de azul devido à espessa camada de peptidoglicanos que absorve o corante violeta, já bactérias Gram-negativas, possuem estreita camada de peptidoglicanos corando-se de vermelho (ANEXO A). A coloração de Wirtz é um teste diferencial entre células vegetativas e esporos bacterianos. Os esporos são corados de verde devido ao conteúdo do córtex e células vegetativas de vermelho (ANEXO B).

4.11 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada nos meios de cultivos padrão e nos meios preparados com bagaço de laranja, utilizando pHmetro (pH 210, Coleman, Santo André, SP, Brasil) calibrado com soluções padrão pH 4 e 7.

4.12 Determinação de biomassa

A biomassa produzida após o cultivo foi determinada por turbidimetria, em $\lambda = 600$ nm. Amostras dos cultivos foram centrifugadas e o *pellet* ressuspensionado em água destilada e a densidade ótica obtida convertida em termos de biomassa através da equação: (Absorbância_{600 nm} = 2,441*biomassa (g/L) + 0,2584), $R^2 = 0,98$, obtendo-se os valores de biomassa dados em g/L. Quando necessário as amostras foram diluídas de acordo com a curva de calibração (APÊNDICE B – 2.1).

4.13 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A determinação de açúcares redutores totais foi realizada pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson, com prévia hidrólise da amostra. Para hidrólise alíquota de 2,0 mL da amostra foi adicionada de 2,0 mL de HCl 2N levando em banho de água a 100 °C durante 10 minutos, seguido de banho de gelo e adição de 2,0 mL de NaOH 2N. Esta hidrólise permite a detecção de açúcares redutores, e também outros açúcares como a sacarose (MALDONADE et al., 2013).

As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito no APÊNDICE C. Utilizando tubos Folin-Wu adicionou-se 1,0 mL da amostra previamente hidrolisada e 1,0 mL da mistura reativa, agitou-se levemente e os tubos foram levados a banho de água fervente por exatos 10 minutos, seguidos de banho de gelo, adicionou-se 2,0 mL de solução arseno-molíbdica, seguida de agitação manual com o propósito de eliminar os gases formados, completou-se o volume do tubo (25,0 mL) com água destilada e homogeneizou-se novamente, deixando em repouso por 20 minutos.

Após o repouso, efetuou-se a leitura das absorbâncias. Uma prova em branco foi preparada simultaneamente utilizando-se água destilada. Com o branco, acerta-

se o 100% na escala de transmitância do espectrofotômetro ($\lambda = 540 \text{ nm}$) e a concentração de açúcares redutores totais foi determinada através da curva de calibração ($\text{Absorbância}_{540 \text{ nm}} = 1,3371 \cdot \text{glicose (g/L)} + 0,0537$), $R^2 = 0,996$ (APÊNDICE B – 2.2).

4.14 Avaliação da resistência térmica de esporos de *Bacillus*

A avaliação da resistência térmica foi realizada conforme descrito por VESSONI PENNA et al., 2002. Para cada suspensão de esporos de *Bacillus* obtida, foi determinada a resistência térmica dos esporos em solução parenteral de cloreto de sódio 0,9% (concentração final entre 10^5 - 10^6 esporos/mL). Alíquotas de 5,0 mL foram distribuídas em frascos tipo ampola e submetidos a tratamento térmico por imersão em banho de óleo de silicone a 102°C , retirados em tempos pré-determinados, resfriados em banho de água e gelo para posterior contagem dos esporos sobreviventes, por diluição seriada e plaqueamento por semeadura em profundidade.

A resistência térmica definida através do cálculo do tempo de redução decimal, valor D, que é o tempo em minutos necessário para decaimento de 90% da população inicial de esporos presentes na amostra, à temperatura constante, ou seja, é o intervalo de tempo exigido para o decaimento de um ciclo logarítmico da população inicial de esporos, conforme equação abaixo:

$$\lg \alpha = \frac{\text{Log}_{10} N_F - \text{Log}_{10} N_0}{T_2 - T_1} = \frac{-1}{\text{valor } D} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

N_0 = população inicial de micro-organismos

N_F = população final de micro-organismos

T = tempo de exposição à temperatura constante de tratamento (minutos)

O valor D é o inverso do negativo do coeficiente angular da equação da reta utilizando a região linear da curva de sobreviventes, este parâmetro é a principal ferramenta de avaliação de termo resistência (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006).

4.15 Velocidade específica de crescimento e Produtividade em células

Para determinação das características de cultivo de *B. atrophaeus* no meio padrão e em bagaço de laranja, foi calculada a velocidade específica de crescimento (μ_x), calculada pelo método proposto por Le Duy e Zajic (1973). A produtividade em células (P_x), expressa em gramas por litro por hora de cultivo (g/ L. h), conforme a equação 2.

$$P_x = \frac{X_m - X_i}{T_c} \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

P_x = produtividade em células (g/ L. h)

X_m = concentração celular máxima obtida (g/ L)

X_i = concentração celular inicial (g/ L)

T_c = tempo de cultivo (horas)

4.16 Planejamento experimental

Os parâmetros avaliados para cultivo dos esporos de *B. atrophaeus* foram a concentração de bagaço de laranja e o volume de meio utilizado, seguindo planejamento experimental de modelo fatorial 2^2 , com 4 ensaios nos níveis clássicos ($\pm 1,000$), mais 4 ensaios com rotação de 45° ($\pm 1,414$) que quando dispostos, tem o formato de estrela (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007), com 6 pontos centrais conforme Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Variáveis e valores usados nos diferentes níveis do planejamento

Variáveis		-1,41	-1	0	+1	+1,41
X₁	Bagaço de laranja (g)	1,5	4,0	10,0	16,0	18,5
X₂	Volume de meio (mL)	57,5	70,0	100,0	130,0	142,4

Cada experimento (Tabela 2) foi incubado por período de 3 e 6 dias, para avaliação do desenvolvimento de esporos. Cultivos em TSB foram realizados como padrão.

Tabela 3 – Planejamento experimental de modelo fatorial 2^2 , em formato estrela, com 6 pontos centrais

Ensaio	X₁	X₂	Bagaço (g)	Volume de meio (mL)
E ₁	-	+	4,0	130,0
E ₂	+	+	16,0	130,0
E ₃	-	-	4,0	70,0
E ₄	+	-	16,0	70,0
E ₅	0	-1,41	10,0	57,5
E ₆	0	+1,41	10,0	142,4
E ₇	-1,41	0	1,5	100,0
E ₈	+1,41	0	18,5	100,0
E ₉	0	0	10,0	100,0
E ₁₀	0	0	10,0	100,0
E ₁₁	0	0	10,0	100,0
E ₁₂	0	0	10,0	100,0
E ₁₃	0	0	10,0	100,0
E ₁₄	0	0	10,0	100,0

A partir do planejamento experimental proposto analisou-se estatisticamente a influência dos parâmetros avaliados por meio de regressão, adotando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando-se do aplicativo Minitab 14[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Suspensão matriz de esporos e bagaço de laranja

Através do cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372, em garrafa de Roux contendo PCA, foi obtida uma suspensão de esporos matriz homogênea, com população de $6,6 \times 10^8$ esporos / mL, a qual foi utilizada nos experimentos (Figura 6, A).

Figura 6 - Cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em garrafa de Roux (A) e esporos viáveis obtidos em placa de Petri (B)

A partir da suspensão de esporos, determinou-se a curva padrão de concentração celular, relacionando-se a densidade ótica a 600nm com a biomassa seca (g/L), resultando na equação: (Absorbância_{600 nm}) = 2,441*biomassa (g/L) + 0,2584, $R^2 = 0,98$ (Apêndice A, 2.1). As colônias obtidas apresentaram-se com formato circular e coloração alaranjada, característica de esporos de *B. atrophaeus* (Figura 6, B).

O resíduo do processamento de suco de laranja, também denominado bagaço de laranja, foi preparado conforme descrito em Material e Métodos, item 4.7, onde cerca de 58% do peso das laranjas foi extraído na forma de suco, resultando em 42% do peso em bagaço, composto por cascas, sementes e polpa, valores semelhantes aos encontrados por MAHMOOD; GREENMAN; SCRAGG, 1998, onde estes valores foram de 54% de suco e 46% de bagaço, respectivamente. O bagaço de laranja obtido apresentou coloração amarela, com granulometria variável e aroma cítrico característico (Figura 7).

Figura 7 - Bagaço de laranja obtido após o processamento dos frutos em centrífuga

Após a esterilização observou-se que com o aumento da concentração de bagaço de laranja no meio, a coloração variou de clara e límpida (1,0 g de bagaço) a escura e turva (20,0 g de bagaço), (Figura 8). A maior concentração utilizada foi de 20,0 g / 100 mL, pois acima desta os meios gelificaram, não sendo considerados neste estudo.

O aumento da viscosidade dos meios pode ser atribuído à maior quantidade de substâncias pécticas em maiores concentrações de bagaço; já a mudança na coloração provavelmente foi resultado das reações de escurecimento não enzimático, como a caramelização de açúcares e reação de *Maillard*, ocasionadas durante a esterilização (MAHMOOD; GREENMAN; SCRAGG, 1998).

Figura 8 - Aspecto dos meios de cultivo preparados com bagaço de laranja e água após a esterilização (1,0 g, 2,5 g, 5,0 g e 20,0 g de bagaço / 100 mL de água destilada, da esquerda para a direita)

5.2 Ensaio com bagaço de laranja em diferentes concentrações

O bagaço de laranja apresenta-se como uma rica fonte de carbono, contendo diversos carboidratos fermentáveis que dependendo da concentração no meio de cultivo podem ser adequados para o crescimento microbiano (DJEKRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006).

As quantidades de bagaço de laranja selecionadas para preparar os meios foram de 1,0 g, 2,5 g, 5,0 g, 10,0 g e 20,0 g de bagaço em 100 mL de água destilada. Verificou-se a disponibilidade de açúcares nos meios através da quantidade de açúcares redutores totais (ART, g/L) (Figura 9), os quais compreendem monossacarídeos e polissacarídeos após hidrólise (MALDONADE et al., 2013).

Figura 9 - Quantidade de açúcares redutores totais (ART, g/L) disponível nos meios de cultivo utilizando diferentes concentrações bagaço de laranja e em TSB

Observou-se que o total de açúcares disponíveis nos meios foi proporcional à concentração de bagaço utilizada, sendo de 1,357 ($\pm 0,019$) g/L e 2,504 ($\pm 0,012$) g/L para 1,0 g e 20,0 g de bagaço, respectivamente, enquanto que em TSB este valor foi de 1,748 ($\pm 0,099$) g/L.

A esterilização em autoclave, dos meios contendo bagaço de laranja além de eliminar a microbiota presente na laranja promoveu o aumento de açúcares redutores totais pela hidrólise de parte dos componentes como pectina e celulose (MANTZOURIDOU; PARASKEVOPOULOU; LALOU, 2015).

A partir da disponibilidade de açúcares nos meios de bagaço, os esporos de *B. atrophaeus* foram cultivados por períodos de 3 e 6 dias, avaliando-se o valor de pH, biomassa e esporos obtidos em cada condição.

Figura 10 -Valores de pH dos meios, após adição do inóculo, cultivado por 3 dias e por 6 dias, utilizando diferentes concentrações bagaço de laranja e TSB como padrão

O pH dos meios contendo bagaço de laranja em água, apresentaram valor médio de pH 4,47 ($\pm 0,22$), aumentando para 5,70 ($\pm 0,63$) após a adição do inóculo, para as concentrações avaliadas. Após incubação, observou-se aumento no pH acima de 8,0 com exceção dos meios utilizando 10 g de bagaço por 3 dias (pH 7,46 ($\pm 0,04$)) e 20,0 g de bagaço, onde o pH final foi de 5,91 ($\pm 0,11$) e de 5,48 ($\pm 0,074$) após 3 e 6 dias de cultivo, respectivamente (Figura 10). O aumento do pH pode ter relação com a amonificação dos meios devido a geração de metabólitos do crescimento microbiano (KHAN; RAHMAN; ANO, 2009; CHOI et al., 2014) assim como pela maior quantidade de ácido cítrico (VENTURINI FILHO, 2010) na concentração de 20,0g, que não permitiu o aumento do pH após o cultivo.

O pH ácido nas condições utilizando-se 20,0 g não afetou o crescimento microbiano, visto que foi a condição que proporcionou maior produção de biomassa em 3 dias de cultivo (0,973 ($\pm 0,025$) g/L), e a esporulação alcançou $3,75 \times 10^8$ esporos / mL após 6 dias de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de pH, biomassa (g/L) e de esporos de *B. atrophaeus* após 3 e 6 dias de cultivo em meio de diferentes concentrações de bagaço de laranja em água

Bagaço (g)	pH meio	3 dias de cultivo			6 dias de cultivo		
		Biomassa (g/L)	pH	esporos/mL	Biomassa (g/L)	pH	esporos/mL
1,0	4,10	0,487 ($\pm 0,015$)	8,19 ($\pm 0,31$)	$1,30 \times 10^8$	0,291 ($\pm 0,007$)	8,81 ($\pm 0,03$)	$1,48 \times 10^8$
2,5	4,67	0,293 ($\pm 0,017$)	8,35 ($\pm 0,03$)	$2,13 \times 10^8$	0,252 ($\pm 0,008$)	8,85 ($\pm 0,01$)	$2,85 \times 10^8$
5,0	4,60	0,710 ($\pm 0,007$)	8,22 ($\pm 0,13$)	$4,70 \times 10^8$	0,925 ($\pm 0,017$)	8,88 ($\pm 0,02$)	$3,85 \times 10^8$
10,0	4,54	0,507 ($\pm 0,005$)	7,46 ($\pm 0,04$)	$2,63 \times 10^7$	1,700 ($\pm 0,014$)	8,13 ($\pm 0,02$)	$2,12 \times 10^8$
20,0	4,45	0,973 ($\pm 0,025$)	5,91 ($\pm 0,11$)	$3,00 \times 10^6$	0,985 ($\pm 0,061$)	5,48 ($\pm 0,07$)	$3,75 \times 10^8$
TSB	7,13	0,786 ($\pm 0,009$)	8,61 ($\pm 0,01$)	$6,95 \times 10^6$	0,306 ($\pm 0,009$)	9,04 ($\pm 0,02$)	$3,05 \times 10^6$

Após 3 dias de cultivo, a maior biomassa alcançada foi de 0,973 ($\pm 0,025$) g/L em 20,0 g de bagaço, valor 20% maior em relação ao crescimento em TSB de 0,786 ($\pm 0,009$) g/L (Tabela 4). A maior produção de biomassa após 6 dias de cultivo foi de 1,700 ($\pm 0,014$) g/L, obtida com 10,0 g de bagaço, valor 5,5 vezes maior se comparado ao meio padrão de 0,306 ($\pm 0,009$) g/L. Utilizando-se 10,0 g e 20,0 g de bagaço, obtiveram-se $2,63 \times 10^7$ e $3,00 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente, reforçando que ainda existam nutrientes para a manutenção celular, não ocorrendo a esporulação de todas as células (KHAN; RAHMAN; ANO, 2009).

Houve máxima esporulação na concentração de 5,0 g de bagaço, após 3 dias de cultivo ($4,70 \times 10^8$ esporos/mL, pH 8,22 ($\pm 0,13$)), mesma condição de melhor esporulação após 6 dias de incubação ($3,85 \times 10^8$ esporos/mL, pH 8,13 ($\pm 0,02$)).

Estudo realizado por (SELLA et al., 2012), utilizando bagaço de cana como meio de cultivo para *B. atrophaeus* proporcionou uma boa produção de esporos, entre (10^7 e 10^9) esporos, indicando a capacidade do micro-organismo em consumir o substrato e se desenvolver até a esporulação.

A esporulação pode ter sido favorecida pelo esgotamento de nutrientes no meio com 6 dias de incubação, onde em todas as condições avaliadas alcançou-se a concentração de 10^8 esporos/mL enquanto que em meio padrão, TSB, a concentração de esporos foi de 10^6 esporos/mL, e 10^2 células permaneceram no estado vegetativo.

O *Bacillus subtilis* apresenta facilidade de adaptação a várias fontes energéticas complexas, devido à capacidade de síntese de diversas enzimas. A expressão de cada enzima é estimulada pela composição nutricional do meio (KONSOULA; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, 2007). Assim, o crescimento microbiano depende da disponibilidade de nutrientes no meio em que é inserido.

5.3 Curva de crescimento de *B. atrophaeus*

Avaliou-se o perfil de crescimento de *B. atrophaeus* em 5,0 g /100 mL de bagaço de laranja em água destilada por 6 dias de cultivo (Tabela 5 e Figuras 11-12). A escolha de 5,0 g de bagaço para verificar o perfil de crescimento foi devido a ser o ponto mediano das concentrações onde houve viabilidade de crescimento em bagaço (de 1,0 g a 20,0 g de bagaço), utilizando-se TSB como meio padrão.

Em meio de cultivo contendo 5,0 g de bagaço de laranja / 100 mL de água destilada, o pH médio de 24 horas de cultivo foi de 5,63 ($\pm 0,31$), e no meio padrão foi de 6,81 ($\pm 0,29$) (Tabela 5). Houve aumento de pH após 72 horas e 144 horas, o que corresponde a 3 e 6 dias, sendo de 7,79 ($\pm 0,11$) e de 9,13 ($\pm 0,01$) em meio de bagaço de laranja e de 8,29 ($\pm 0,01$) e de 8,97 ($\pm 0,01$) em TSB, respectivamente.

A relação entre o aumento do valor de pH e a esporulação das células pode ser devido à liberação de metabólitos durante a maturação dos esporos (DJEKRIF-DAKHMOUCHE, 2006).

O perfil de formação de esporos por até 144 horas de cultivo, ou 6 dias, acompanhou o crescimento celular, representado nas Figuras 11 e 12, tanto para o cultivo em bagaço quanto no meio padrão TSB.

Tabela 5 - Valores de pH, biomassa (g/L), açúcares redutores totais, ART (g/L), células totais (UFC/mL) e esporos/mL de *B. atrophaeus* cultivados em meios contendo 5,0 g de bagaço de laranja e em TSB

Tempo (h)	Bagaço de laranja					TSB				
	pH	Biomassa (g/L)	ART (g/L)	Células totais (UFC/mL)	Esporos/mL	pH	Biomassa (g/L)	ART (g/L)	Células totais (UFC/mL)	Esporos/mL
0	5,80 (±0,04)	0,000	2,100 (±0,003)	1,26 x 10 ⁶	3,57 x 10 ⁴	7,07 (±0,02)	0,000	1,729 (±0,012)	6,20 x 10 ⁶	4,10 x 10 ⁴
2	5,81 (±0,01)	0,000	1,854 (±0,032)	2,26 x 10 ⁴	5,65 x 10 ³	7,07 (±0,02)	0,000	1,602 (±0,026)	3,25 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁴
4	5,70 (±0,01)	0,156 (±0,003)	1,714 (±0,015)	2,00 x 10 ⁵	4,73 x 10 ⁴	6,67 (±0,02)	0,249 (±0,018)	0,880 (±0,010)	4,21 x 10 ⁷	1,04 x 10 ⁴
6	-	-	-	-	-	6,21 (±0,02)	0,422 (±0,039)	0,959 (±0,008)	1,05 x 10 ⁸	2,77 x 10 ⁴
8	6,04 (±0,21)	0,629 (±0,008)	1,550 (±0,010)	1,63 x 10 ⁷	6,65 x 10 ⁴	6,52 (±0,01)	0,817 (±0,099)	-	-	-
10	-	-	-	-	-	6,86 (±0,01)	0,868 (±0,035)	0,827 (±0,005)	1,87 x 10 ⁸	1,90 x 10 ⁵
12	-	-	-	-	-	6,96 (±0,01)	0,906 (±0,020)	0,577 (±0,185)	1,84 x 10 ⁶	3,80 x 10 ⁴
14	5,09 (±0,06)	0,768 (±0,012)	1,489 (±0,006)	2,50 x 10 ⁷	2,17 x 10 ⁴	-	-	-	-	-
20	5,56 (±0,04)	0,874 (±0,028)	1,476 (±0,114)	7,30 x 10 ⁶	6,45 x 10 ⁴	6,96 (±0,02)	0,931 (±0,006)	0,663 (±0,019)	2,00 x 10 ⁶	5,75 x 10 ⁴
24	5,42 (±0,03)	0,920 (±0,005)	1,286 (±0,008)	1,93 x 10 ⁷	8,52 x 10 ⁵	6,95 (±0,01)	1,001 (±0,099)	-	-	-
48	-	-	-	-	-	7,69 (±0,01)	1,000 (±0,006)	0,640 (±0,008)	1,25 x 10 ⁷	1,95 x 10 ⁶
72	7,79 (±0,11)	0,708 (±0,053)	0,713 (±0,009)	5,90 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁷	8,29 (±0,01)	1,047 (±0,031)	0,665 (±0,389)	1,53 x 10 ⁷	9,00 x 10 ⁶
144	9,13 (±0,01)	1,223 (±0,041)	0,357 (±0,008)	6,30 x 10 ⁸	6,40 x 10 ⁸	8,97 (±0,01)	0,917 (±0,102)	0,412 (±0,006)	5,95 x 10 ⁸	1,82 x 10 ⁷

Comparando-se o crescimento de *B. atrophaeus* em bagaço e no meio padrão, observou-se que em ambos, o crescimento celular máximo foi de 10⁸ UFC / mL, porém a quantidade de esporos viáveis foi de 6,40 x 10⁸ esporos / mL e de 1,82 x 10⁷ esporos/mL, respectivamente. A diferença entre a quantidade de esporos formados nos meios pode ser devido à maior concentração de nutrientes principalmente carbono, nitrogênio e fósforo (PIGGOT; HILBERT, 2004) em TSB, o que não favoreceu a esporulação de todas as células, ao contrário do cultivo em bagaço de laranja onde a esporulação de toda a população de células pode ter sido influenciada pelo consumo de nutrientes disponíveis e, devido à presença em sua

composição, de íons considerados ativadores do sistema enzimático promotor da esporulação, como cálcio, magnésio, zinco e manganês (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

Figura 11 - Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) disponível (-♦-), concentração de células totais (-♦-) e concentração de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 (-♦-) em função do tempo de cultivo em 5,0 g de bagaço de laranja

No intervalo de tempo entre 8 e 14 horas de cultivo em bagaço de laranja, houve queda no valor de pH de 6,04 ($\pm 0,21$) para 5,09 ($\pm 0,06$), o que pode estar relacionado com a metabolização de enzima necessária para o consumo de outras fontes de carbono, com aumento do consumo de açúcares redutores totais, visto que o micro-organismo pode modificar o metabolismo e utilizar outras fontes energéticas presentes no meio (TANG et al., 2015).

Figura 12 - Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) disponível (-♦-), concentração de células totais (-♦-) e concentração de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 (-♦-) em função do tempo de cultivo em TSB

Observou-se após 8 horas de incubação, que o cultivo foi direcionado à maior formação de esporos, o que pode ser justificado pelo término das fases de esporulação que tem a duração de cerca de 7 horas (PIGGOT; HILBERT, 2004). Neste momento, a quantidade de células totais elevou-se para $1,63 \times 10^7$ UFC / mL, sendo três ciclos logarítmicos maior do que a população de $6,65 \times 10^4$ esporos / mL em bagaço de laranja. Em meio padrão, após 10 horas de cultivo, pH $6,86 (\pm 0,01)$, a diferença entre células totais e esporos também foi de três ciclos logarítmicos, sendo as populações de $1,87 \times 10^8$ UFC / mL e $1,90 \times 10^5$ esporos / mL.

Em alguns intervalos de tempo do cultivo pode-se observar a redução do número de células totais, o que pode estar relacionada com a população de *Bacillus atrophaeus* em diferentes estágios de desenvolvimento, à tendência autolítica frente à diminuição da fonte de carbono (MONTEIRO et al., 2014) ou como característica do comportamento de canibalismo, onde são secretados fatores extracelulares no meio, os quais promovem a morte das células que ainda não iniciaram o processo de esporulação (PIGGOT; HILBERT, 2004). Além disso, podem-se considerar as alterações nas características do mosto com a formação de compostos citotóxicos (SANCHEZ-SALAS et al., 2011).

A quantidade inicial de açúcares foi de 2,100 ($\pm 0,003$) g/L em bagaço de laranja, considerando açúcares redutores totais (ART) e de 1,729 ($\pm 0,012$) g/L em TSB, considerando apenas a glicose presente no meio.

De acordo com as figuras 11 e 12, observou-se que a concentração de açúcares após 4 horas de cultivo, foi duas vezes maior em bagaço de laranja do que em TSB, sendo 1,714 ($\pm 0,015$) g/L e 0,880 ($\pm 0,010$) g/L, respectivamente. Esta diferença foi mantida até aproximadamente 20 horas de cultivo 1,476 ($\pm 0,114$) g/L e 0,663 ($\pm 0,019$) g/L, aproximando-se após 3 dias de cultivo, com 0,713 ($\pm 0,009$) g/L e 0,665 ($\pm 0,389$) g/L. Este perfis mostram que o consumo de glicose pelo micro-organismo em bagaço é mais lento, que no meio padrão, pois o mesmo deve direcionar energia para a clivar os açúcares redutores totais como a frutose e a sacarose, adaptando-se ao meio com a síntese de enzimas necessárias para iniciar o processo de multiplicação (DAS NEVES et al., 2007).

Até as primeiras 20 horas de cultivo, o dobro de consumo de glicose em TSB do que em bagaço, produziu 60% a mais de biomassa após 4 horas, 30% a mais após 8 horas e alcançando valores máximos de 1,223 g/L em bagaço e 0,917 g/L em TSB.

Em meios de cultivo de composição complexa, como o bagaço de laranja é difícil afirmar precisamente qual nutriente é limitante para o crescimento, visto que o micro-organismo pode se utilizar de diversas fontes de carbono sendo os monossacarídeos preferenciais por apresentarem estrutura simples para assimilação (MAHMOOD; GREENMAN; SCRAGG, 1998); mas, sabe-se também que nitrogênio e fósforo são necessários para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos (VITOLLO et al., 2015).

A produtividade máxima em células (Px) foi alcançada com 8 horas de cultivo em ambos os meios, padrão e em bagaço de laranja, sendo 0,1022 (g/L.h) e 0,0787 (g/L.h), respectivamente. A maior produtividade no meio padrão pode estar associada à composição rica deste, favorecendo o metabolismo microbiano.

Figura 13 - Produtividade em células (g/L.h) de *B. atrophaeus* em meio padrão (---♦---) e em meio contendo bagaço de laranja (5,0 g / 100 mL) (---♦---) por até 6 dias de cultivo

A produtividade em células pode ser influenciada pela concentração de ART (g/L) no meio. OLIVEIRA et al., 2013, utilizando resíduos da produção de suco de caju obtiveram aumento de duas vezes na produtividade em células de *B. subtilis* $P_x = 0,09$ (g/L.h) para $P_x = 0,20$ (g/L.h), quando a concentração de ART aumentou de 12,71 g/L para 65,04 g/L.

YEH; WEI; CHANG, 2006, avaliaram o crescimento de *B. subtilis*, observando que a aeração e agitação favoreciam a produtividade em células, sendo a agitação importante para a homogeneização do cultivo e suprimento de oxigênio.

Em se tratando de cinética de crescimento celular, calculou-se a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$), obtendo-se $\mu_{x\text{máx}} = 0,0238 \text{ h}^{-1}$ em bagaço de laranja e $\mu_{x\text{máx}} = 0,2205 \text{ h}^{-1}$ em TSB. Apesar do meio padrão apresentar maior $\mu_{x\text{máx}}$, a produtividade em células em bagaço ocorreu no mesmo período (Figura 13). A velocidade de crescimento aproximadamente 9 vezes maior no meio padrão em relação ao bagaço pode ser devido a composição mais complexa do meio contendo resíduos, havendo necessidade de adaptação do micro-organismo para o consumo de ART. A presença de glicose favorece o aumento na velocidade específica de crescimento de *B. atrophaeus* (DAS NEVES et al., 2007).

5.4 Esporos obtidos

As culturas obtidas neste trabalho foram analisadas quanto ao aspecto celular. Através da coloração de Gram (Figura 14) observaram-se células na forma de bastão coradas de azul, presença de material celular rompido e células menores e ovaladas, sugestivo de esporos. A coloração de Wirtz permitiu a diferenciação entre células vegetativas e esporos (Figuras 15 e 16), devido à incorporação do corante verde malaquita ao córtex do esporo, confirmando a capacidade de esporulação de *B. atrophaeus*, em ambos os meios, bagaço e TSB.

Figura 14 - Coloração de Gram, células de *B. atrophaeus* cultivadas por 24 horas, (Esquerda) em meio de 5,0 g de bagaço de laranja, (Direita) meio padrão, (100x)

Figura 15 - Células de *B. atrophaeus* cultivadas em meio de 5,0 g de bagaço de laranja por 3 dias, (Esquerda) coloração de Wirtz: células vegetativas coradas de vermelho e esporos em verde (100X), (Direita) imagem editada (Microsoft Word)

Figura 16 - Células de *B. atrophaeus* cultivadas em TSB por 3 dias (100x), (Esquerda) coloração de Wirtz: células vegetativas coradas de vermelho e esporos em verde, (Direita) imagem editada (Microsoft Word)

Observou-se que as células obtidas apresentavam duas formas morfológicas, sendo células isoladas ou em cadeias longas. Em meios de cultivo repletos de nutrientes, *Bacillus sp* podem ser encontrados de duas formas, isolados e móveis ou agrupados formando cadeias, consequência da não separação das células durante a divisão celular (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a). A formação de longas cadeias de células também pode ser explicada pela concepção de biofilmes, produzidos antes do início da esporulação, os quais fornecem proteção extra aos esporos contra biocidas e antibióticos, mantendo as células unidas (LOPES; VLAMAKIS; KOLTER, 2009).

O tamanho dos esporos é influenciado por características presentes no meio, tais como a osmolaridade e consequentemente a atividade de água, que quanto mais baixa, resulta em menor mineralização tornando o esporo formado menor e menos resistente (NGUYEN; PERRIER-CORNET; GERVAIS, 2008).

Figura 17 - Eletromicrografias de esporos de *B. atrophaeus* cultivadas em meio contendo 5,0 g de bagaço de laranja por 24 horas. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão (JEOL EXII, Japão), equipado com uma câmera (GATAN multiscan 791, Estados Unidos)

Através da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 17), observou-se a morfologia dos esporos obtidos. As células apresentaram características comuns das formas esporuladas, com presença de diversas camadas envolvendo o material nuclear.

Apesar dos esporos obtidos apresentarem características morfológicas indicativas de completa esporulação, existe a necessidade de avaliação da resistência térmica da população que pode ser influenciada por diversos fatores. (NGUYEN; PERRIER-CORNET; GERVAIS, 2008).

5.5 Planejamento experimental

Para avaliar a influência da concentração de bagaço e do volume de meio utilizado na produção de esporos de *B. atrophaeus*, realizou-se planejamento experimental de modelo fatorial 2^2 , em formato de estrela, com 6 pontos centrais em períodos de 3 e 6 dias, sendo os cultivos realizados separadamente (Tabelas 6 e 7).

Após 3 dias de cultivo, não foi detectada perda de volume dos meios. Já nos meios cultivados por 6 dias houve perda de volume por evaporação, sendo a menor perda de 5% com a concentração de 1,5 g de bagaço / 100 mL de meio (E_7) e a maior perda de 28,6% no ensaio E_3 , com 4,0 g de bagaço / 70 mL de meio. Nos pontos centrais e em TSB, a perda de volume foi de 10,0% após 6 dias de cultivo.

Os valores de pH dos meios em bagaço de laranja apresentaram-se entre 4,40 ($\pm 0,01$) e 5,33 ($\pm 0,06$), tendo todos caráter ácido. Após a adição do inóculo, houve aumento de uma a duas unidades de pH, devido ao caráter básico ($\sim$ pH 7,4) do inóculo preparado em TSB.

Tabela 6 - Parâmetros dos ensaios, valores de pH dos meios, após a adição do inóculo e após 3 dias de cultivo, concentração de ART disponíveis (g/L) nos meios e após o cultivo, biomassa (g/L) e contagem de esporos viáveis (esporos/mL) obtidos após 3 dias de cultivo

Ensaio	Bagaço (g)	Volume (mL)	pH			ART (g/L)		Biomassa (g/L)	Esporos /mL
			meio	inoculado	3 dias	Meio	3 dias		
E ₁	4,0	130,0	5,33 (±0,06)	6,51 (±0,08)	8,56 (±0,18)	2,544 (±0,037)	0,148 (±0,008)	0,594 (±0,011)	8,70 x 10 ⁸
E ₂	16,0	130,0	4,68 (±0,00)	5,42 (±0,01)	6,55 (±0,15)	1,932 (±0,011)	1,087 (±0,043)	1,032 (±0,019)	6,40 x 10 ⁶
E ₃	4,0	70,0	4,65 (±0,06)	6,13 (±0,02)	8,37 (±0,04)	1,794 (±0,016)	0,143 (±0,012)	0,781 (±0,044)	1,73 x 10 ⁹
E ₄	16,0	70,0	4,40 (±0,01)	5,20 (±0,02)	6,47 (±0,08)	1,992 (±0,027)	0,681 (±0,006)	1,445 (±0,194)	3,85 x 10 ⁸
E ₅	10,0	57,5	4,57 (±0,02)	5,65 (±0,01)	8,11 (±0,15)	1,948 (±0,044)	0,366 (±0,013)	2,402 (±0,034)	1,12 x 10 ⁹
E ₆	10,0	142,4	4,47 (±0,03)	5,53 (±0,04)	6,60 (±0,10)	1,942 (±0,002)	0,917 (±0,013)	0,579 (±0,026)	9,50 x 10 ⁷
E ₇	1,5	100,0	4,75 (±0,06)	6,21 (±0,04)	8,87 (±0,03)	1,894 (±0,072)	0,096 (±0,009)	0,341 (±0,258)	2,45 x 10 ⁸
E ₈	18,5	100,0	4,49 (±0,03)	5,44 (±0,02)	6,38 (±0,17)	2,077 (±0,040)	1,594 (±0,025)	1,167 (±0,098)	1,57 x 10 ⁸
E ₉	10,0	100,0	4,70 (±0,03)	5,83 (±0,03)	6,85 (±0,17)	1,841 (±0,017)	0,566 (±0,018)	0,671 (±0,037)	1,42 x 10 ⁸
E ₁₀	10,0	100,0	4,56 (±0,05)	5,66 (±0,05)	7,71 (±0,13)	1,850 (±0,067)	0,442 (±0,019)	0,604 (±0,181)	1,63 x 10 ⁷
E ₁₁	10,0	100,0	4,63 (±0,02)	5,89 (±0,02)	7,48 (±0,03)	1,785 (±0,007)	0,490 (±0,008)	0,712 (±0,156)	1,35 x 10 ⁶
E ₁₂	10,0	100,0	4,64 (±0,00)	5,94 (±0,01)	7,64 (±0,37)	1,94 (±0,017)	0,454 (±0,031)	0,691 (±0,195)	8,40 x 10 ⁷
E ₁₃	10,0	100,0	4,56 (±0,01)	5,88 (±0,01)	7,59 (±0,09)	1,883 (±0,011)	0,401 (±0,017)	0,715 (±0,151)	2,01 x 10 ⁸
E ₁₄	10,0	100,0	4,69 (±0,00)	5,94 (±0,01)	7,63 (±0,25)	1,969 (±0,034)	0,520 (±0,031)	0,550 (±0,046)	2,66 x 10 ⁷
TSB	TSB	TSB	6,99 (±0,02)	7,02 (±0,02)	8,54 (±0,18)	2,051 (±0,025)	0,373 (±0,007)	0,362 (±0,020)	8,40 x 10 ⁵

Tabela 7 - Parâmetros dos ensaios, valores de pH dos meios, após a adição do inóculo e após 3 dias de cultivo, concentração de ART disponíveis (g/L) nos meios e após o cultivo, biomassa (g/L) e contagem de esporos viáveis (esporos/mL) obtidos após 6 dias de cultivo

Ensaio	Bagaço (g)	Volume (mL)	pH			ART (g/L)		Biomassa (g/L)	Esporos/mL
			meio	inoculado	6 dias	Meio	6 dias		
E ₁	4,0	130,0	5,17 (±0,04)	6,36 (±0,06)	9,09 (±0,15)	2,654 (±0,060)	0,064 (±0,002)	0,715 (±0,056)	1,40 x 10 ⁹
E ₂	16,0	130,0	4,48 (±0,03)	5,32 (±0,04)	8,16 (±0,09)	1,955 (±0,040)	0,283 (±0,007)	1,389 (±0,049)	8,50 x 10 ⁸
E ₃	4,0	70,0	4,59 (±0,08)	5,93 (±0,02)	9,05 (±0,11)	2,576 (±0,025)	0,095 (±0,002)	0,577 (±0,043)	1,79 x 10 ⁹
E ₄	16,0	70,0	4,42 (±0,09)	5,21 (±0,05)	8,34 (±0,06)	1,777 (±0,006)	0,483 (±0,115)	2,191 (±0,053)	1,24 x 10 ⁹
E ₅	10,0	57,5	4,48 (±0,07)	5,57 (±0,09)	9,02 (±0,05)	1,809 (±0,028)	0,185 (±0,003)	2,393 (±0,101)	2,24 x 10 ⁹
E ₆	10,0	142,4	4,63 (±0,05)	5,70 (±0,05)	8,50 (±0,04)	1,821 (±0,011)	0,173 (±0,002)	1,029 (±0,043)	2,62 x 10 ⁹
E ₇	1,5	100,0	4,72 (±0,06)	6,23 (±0,05)	9,04 (±0,12)	2,309 (±0,007)	0,063 (±0,003)	0,358 (±0,008)	4,19 x 10 ⁸
E ₈	18,5	100,0	4,54 (±0,02)	5,37 (±0,04)	7,96 (±0,01)	2,036 (±0,007)	0,601 (±0,008)	1,586 (±0,210)	4,90 x 10 ⁹
E ₉	10,0	100,0	4,52 (±0,09)	5,63 (±0,07)	8,91 (±0,05)	1,968 (±0,006)	0,217 (±0,003)	1,708 (±0,266)	5,75 x 10 ⁹
E ₁₀	10,0	100,0	4,52 (±0,08)	5,66 (±0,11)	8,84 (±0,09)	1,953 (±0,013)	0,158 (±0,011)	1,736 (±0,133)	2,17 x 10 ⁹
E ₁₁	10,0	100,0	4,42 (±0,15)	5,61 (±0,11)	8,79 (±0,03)	1,897 (±0,010)	0,170 (±0,008)	1,795 (±0,033)	2,36 x 10 ⁹
E ₁₂	10,0	100,0	4,50 (±0,04)	5,76 (±0,05)	8,94 (±0,03)	1,974 (±0,021)	0,181 (±0,003)	1,407 (±0,090)	1,77 x 10 ⁹
E ₁₃	10,0	100,0	4,53 (±0,04)	5,70 (±0,04)	8,84 (±0,03)	1,955 (±0,016)	0,164 (±0,006)	1,251 (±0,055)	1,75 x 10 ⁹
E ₁₄	10,0	100,0	4,47 (±0,06)	5,58 (±0,05)	8,78 (±0,01)	1,896 (±0,028)	0,176 (±0,003)	1,443 (±0,085)	1,65 x 10 ⁹
TSB	TSB	TSB	7,00 (±0,03)	6,96 (±0,09)	9,04 (±0,20)	2,362 (±0,009)	0,309 (±0,001)	0,715 (±0,022)	4,55 x 10 ⁶

Realizou-se a análise por teste *2-sample t*, o qual avalia a diferença estatística entre as médias de duas populações, e observou-se que os valores de pH de meio ($p = 0,075$) e do pH inoculado ($p = 0,117$), realizados em dias distintos, não diferem estatisticamente, com intervalo de confiança de 95%.

Figura 18 - Representação gráfica do pH do meio em função da quantidade de bagaço de laranja (g) e do volume de meio (mL) nos ensaios realizados em dias distintos

A Figura 18 mostra a representação gráfica da variação de pH em função da concentração de bagaço e do volume do meio utilizado.

Dada as igualdades de pH, os parâmetros avaliados nos ensaios relacionam-se de acordo com a equação por regressão:

$$\text{pH}_{\text{meio}} = \{4,51 - 0,0247 * [\text{bagaço (g)}] + 0,00346 * [\text{volume (mL)}]\}, R^2 = 0,44$$

($p = 0,000$), onde, o coeficiente de determinação, $R^2 = 0,44$ indica correlação moderada dos valores de pH do meio com a concentração de bagaço e do volume de meio.

A análise de regressão do valor de pH após a adição de inóculo em função do pH do meio pode ser descrita pela equação:

$$\text{pH}_{\text{inoculado}} = \{-0,148 + 1,28 * [\text{pH meio}]\}, R^2 = 0,639, (p = 0,000),$$

sendo também um modelo de correlação moderada, cuja representação gráfica é mostrada na Figura 19.

Figura 19 - Representação gráfica dos valores de pH inoculado em função do pH do meio de cultura

Após os períodos de cultivo de 3 e 6 dias, os valores de pH elevaram-se em todos os ensaios. Por exemplo, no ensaio 1 (4,0 g de bagaço/ 130 mL de meio) o pH aumentou de 5,33 ($\pm 0,02$) para 8,56 ($\pm 0,18$) enquanto que no ensaio 2 (16,0 g de bagaço/ 130 mL de meio) o pH aumentou de 4,68 ($\pm 0,01$) para 6,55 ($\pm 0,15$), indicando que quanto maior a concentração de bagaço utilizada, menor a variação de pH do meio após o cultivo. Estudo realizado por (SELLA et al., 2009) avaliou que o aumento do pH durante a esporulação em ágar é consequência do consumo de ácidos pelas células que ainda não esporularam, tornando a variação de pH uma característica típica no cultivo de *Bacillus spp.* em meios complexos.

A análise pelo teste *2-sample t* das séries de pH dos meios após cultivo evidenciaram que estas são estatisticamente diferentes ($p = 0,000$). A diferença entre as médias de valores de pH, dado que $p < 0,05$ não é apenas devido à variação natural dos experimentos, mas é porque há realmente uma diferença estatisticamente significativa entre as médias.

Por análise de regressão, observou-se que tanto o pH do meio inoculado quanto o tempo de cultivo têm influência positiva sobre o pH final dos cultivos, relação dada pela equação:

$$\text{pH}_{\text{cultivado}} = \{-2,20 + 0,469 \cdot [\text{tempo (dias)}] + 1,43 \cdot [\text{pH}_{\text{inoculado}}]\}, \\ R^2 = 0,787 \text{ (p= 0,000)}.$$

A relação entre o $\text{pH}_{\text{cultivado}}$ e o número de esporos obtidos, pode ser representada pela equação de reta:

$$\text{pH}_{\text{cultivado}} = \{7,70 + 3,18 \times 10^{-10} \cdot [\text{esporos}]\}, R^2 = 0,257, \text{ (p= 0,000)}.$$

Nos ensaios de 3 dias de cultivo, observou-se que o número de esporos viáveis variou de $6,40 \times 10^6$ esporos / mL, pH 6,55 (E_2) a $1,73 \times 10^9$ esporos / mL, pH 8,37 (E_3), sem suplementação. Estes valores estão acima do crescimento em meio padrão, TSB, de $8,40 \times 10^5$ esporos / mL (pH 8,59). Para o cultivo de 3 dias, a quantidade de 16,0 g bagaço utilizada pode ter liberado elevada quantidade de substâncias ao meio, concentrando-o e dificultando o crescimento bacteriano.

(KONSOULA; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, 2007), avaliaram que quanto maior a concentração de substrato menor a formação de enzimas que pudessem degradar a farinha de milho para o crescimento de *B. subtilis*. (MONTEIRO et al., 2014), conseguiram máxima esporulação de $6,3 \times 10^9$ esporos / mL em meio quimicamente definido, com suplementação de vitaminas, nitrogênio, carbono e cálcio, após 2 dias de cultivo.

Considerando os ensaios cultivados por 6 dias, observou-se que o número de esporos viáveis variou de $4,19 \times 10^8$ esporos / mL, pH 9,04 (E_7) a $5,75 \times 10^9$ esporos / mL, pH 8,91 (E_9), valores acima do crescimento em meio padrão, TSB, de $4,55 \times 10^6$ esporos / mL (pH 9,04). (SELLA et al., 2013), avaliaram o crescimento de *B. atrophaeus* em meio contendo vinhaça de soja, alcançando uma população de $2,3 \times 10^9$ esporos / mL.

Mediante os valores de concentração de esporos obtidos, observou-se que o fator tempo de incubação tem influência positiva na formação e maturação dos esporos e por regressão, segue a equação:

$$[\text{Esporos}] = \{-1,15 + 0,0303 \cdot [\text{bagaço (g)}] - 0,00611 \cdot [\text{volume (mL)}] + \\ + 0,611 \cdot [\text{tempo (dias)}] \cdot F\}, R^2 = 0,452,$$

onde $F = 10^9$, ($p = 0,000$), e que de acordo com o coeficiente de determinação, apresenta correlação moderada entre a quantidade de esporos e a concentração de bagaço, o volume de meio e o tempo de incubação.

Determinou-se a quantidade de açúcares redutores totais presente no meio preparado e após o cultivo. A maior concentração de ART presente no meio foi de 2,654 ($\pm 0,060$) g/L, valor semelhante à quantidade presente em TSB de 2,362 ($\pm 0,009$) g/L, com menor valor de 1,777 ($\pm 0,006$) g/L.

Em termos de biomassa, o maior valor obtido foi em bagaço de laranja foi de 2,402 ($\pm 0,034$) g/L após 3 dias de cultivo e de 2,393 ($\pm 0,101$) após 6 dias de cultivo, ambos no ensaio E_5 (57,5g de bagaço / 70 mL), que correspondem à $1,12 \times 10^9$ esporos / mL e $2,24 \times 10^9$ esporos / mL, respectivamente. Em comparação com o cultivo em TSB, observou-se valores de 0,362 ($\pm 0,020$) g/L e de 0,715 ($\pm 0,022$) g/L após 3 e 6 dias de cultivo, com população de $8,40 \times 10^5$ esporos / mL e $4,55 \times 10^6$ esporos / mL.

A resistência térmica dos esporos foi definida através da determinação do tempo de redução decimal a 102 °C utilizando-se solução de cloreto de sódio como meio (APÊNDICE D), e os valores obtidos (valor D) estão representados na Figura 20.

A resistência térmica, expressa em termos de tempo de redução decimais, é a principal característica do indicador biológico e é definida por fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como crescimento celular, meio de formação dos esporos, temperatura, tempo de cultivo, conteúdo de água do esporo, grau de mineralização, estrutura do córtex e da capa do esporo (VESSONI PENNA et al., 2000).

Figura 20 - Tempos de redução decimal (valor D (min)) determinados a 102 °C, de esporos de *Bacillus atropheus* ATCC 9372 obtidos em 3 e 6 dias de cultivo de acordo com os ensaios propostos no planejamento experimental utilizando bagaço de laranja (E₁ a E₁₄) e TSB

Os tempos de redução decimal determinados variaram de $D_{E8} = 0,92$ min a $D_{E6} = 2,71$ min para 3 dias de cultivo e de $D_{E12} = 1,34$ min a $D_{E4} = 3,98$ min para 6 dias de cultivo, valores similares ou superiores aos valores D determinados para os esporos desenvolvidos em TSB, de $D_{3\text{dias}} = 1,10$ min e $D_{6\text{dias}} = 1,03$ min. A maior termorresistência apresentada pelos esporos cultivados por 6 dias corroboram com os estudos realizados por (VESSONI PENNA et al., 2000), onde tanto em suspensão ou impregnados em fita, esporos cultivados por 6 dias mostraram ser mais resistentes.

VESSONI PENNA et al., 2002, avaliaram o efeito da composição de soluções parenterais na resistência térmica de *B. atrophaeus* ($T_r = 104,5$ °C), alcançando valor médio ($D_{104,5C} = 0,66$ min), sendo $D_{104,5C} = 0,53$ min em água purificada por osmose reversa e $D_{104,5C} = 0,83$ min em água destilada.

SELLA et al., 2009, avaliaram a produção de *B. atrophaeus* através de fermentação em estado sólido, utilizando resíduos de soja e bagaço de cana-de-açúcar, por 9 dias, onde obtiveram produção máxima de $1,90 \times 10^{10}$ esporos / mL, com resistência térmica, em calor seco de $D_{160C} = 5,2$ minutos.

Ao realizar a análise de regressão da resistência térmica (RT) de esporos de 3 e 6 dias, em função da concentração de bagaço utilizada, do volume de meio e do tempo de incubação, obteve-se a equação:

$$[RT] = \{0,904 + 0,0169 * [\text{bagaço (g)}] + 0,00212 * [\text{volume (mL)}] + 0,128 * [\text{tempo (dias)}]\}, R^2 = 0,111, p = 0,024$$

Ao se analisar o comportamento da resistência térmica de esporos somente no grupo de ensaios com o tempo de incubação fixo, por regressão obteve-se as seguintes equações:

$$[RT \text{ 3d}] = \{1,59 - 0,0372 * [\text{bagaço (g)}] + 0,00456 * [\text{volume (mL)}]\}, \\ R^2 = 0,149, p = 0,043$$

$$[RT \text{ 6d}] = \{1,38 + 0,0710 * [\text{bagaço (g)}] - 0,00031 * [\text{volume (mL)}]\}, \\ R^2 = 0,218, p = 0,008$$

Apesar da resistência térmica de esporos apresentar relação linear com os fatores de concentração de bagaço utilizada, do volume de meio e do tempo de incubação, estes modelos apresentaram baixo coeficiente de determinação, o que denota um modelo de fraca correlação. Este fato pode ser explicado pela necessidade de maior amostragem ou que o modelo de planejamento experimental proposto não seja o ideal para correlacionar os parâmetros estudados com a termorresistência.

Os valores D obtidos à temperatura de 102 °C, em todas as condições do planejamento experimental atestam a resistência térmica de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 cultivados em resíduos do processamento de suco de laranja para serem utilizados como bioindicadores de processos térmicos.

6. CONCLUSÕES

Os meios de cultura preparados a partir do resíduo do processamento de suco de laranja demonstraram-se promissores para o cultivo de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

A máxima produção de esporos foi de $1,73 \times 10^9$ esporos / mL e $5,75 \times 10^9$ esporos / mL após 3 e 6 dias de cultivo.

Os esporos obtidos em bagaço de laranja, em todas as condições avaliadas, apresentaram resistência térmica apropriada para serem utilizados como bioindicadores de processos térmicos, tendo os valores de redução decimal variado de: $D_{E8} = 0,92$ min a $D_{E6} = 2,71$ min e de $D_{E12} = 1,34$ min a $D_{E4} = 3,98$ min após 3 e 6 dias de cultivo, à temperatura de 102°C , valores similares ou superiores em meio TSB ($D_{3d} = 1,10$ min e $D_{6d} = 1,03$ min), e aos dados encontrados na literatura.

O estudo estatístico baseado no modelo planejamento experimental fatorial 2^2 em formato estrela com 6 pontos centrais, apresentou a correlação linear: Esporos = $\{-1,15 + 0,0303 \cdot [\text{bagaço (g)}] - 0,00611 \cdot [\text{volume (mL)}] + 0,611 \cdot [\text{tempo (dias)}]\}$, $p=0,000$, $R^2 = 0,452$, sendo o tempo ($p=0,000$) o fator de maior influência no crescimento e na maturação dos esporos.

Os resultados apresentados sugerem a viabilidade de produção de esporos de *B. atrophaeus* por cultivo em bagaço de laranja, agregando valor a este resíduo para a obtenção de produtos de interesse farmacêutico e industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AQUARONE, E.; BORZANI, V.; LIMA, U. A., (coord.). **Tópicos em microbiologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. cap.3. (Biotecnologia, v.2).

ASM. ***Bacillus atrophaeus***. 2002. Disponível em: http://www.microbelibrary.org/library/search/1-microbe-library-Objects?filter_search=Bacillus+subtilis&filter_category%5B%5D=15&limitstart=0&limit=20&filter_order=r.ctime&filter_order_Dir=desc. Acesso em: 6 dez. 2015.

ATCC. Product Sheet. ***Bacillus atrophaeus* ATCC 9372**. Manassas: ATCC, American Type Culture Collection, 1995. p.1–2.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. E.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. 3. ed.

BEVILAQUA, D. B.; RAMBO, M. K. D.; RIZZETTI, T. M.; CARDOSO, A. L.; MARTINS, A. F. Cleaner production: levulinic acid from rice husks. **Journal of Cleaner Production**, v.47, p.96-101, 2013.

BRASIL. Presidência da República. **Lei n.12.305, de 02 de agosto de 2010**. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei n.9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm. Acesso em: 12 nov. 2014.

BURGERS, E. I. **Gestão socioambiental em empresas brasileiras do setor de suco de laranja**. São Paulo, 2011. 139p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo.

BURKE, S. A.; WRIGHT, J. D.; ROBINSON, M. K.; BRONK, B.V.; WARREN, R. L. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2786-2790, 2004.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CHOI, K. Y.; WERNICK, D. G.; TAT, C. A.; LIAO, J. C. Consolidated conversion of protein waste into biofuels and ammonia using *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 53–61, 2014.

CITRUSBR. **História da laranja**. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/historia-da-laranja-150989-1.asp>. Acesso em: 06 jun. 2014.

CITRUSBR. **Produção de laranja e suco**. 2011. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>. Acesso em: 06 dez. 2014.

CONAB. **Receita bruta dos produtores rurais brasileiros**: extrato do caderno estatístico para a safra de 2010-11. Brasília: CONAB, 2013. 64p. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_29_09_16_40_receita_bruta_volume_resumo-versao_final.pdf. Acesso em: 07 nov. 2015.

DAS NEVES, L. C. M.; DE OLIVEIRA, K. S.; KOBAYASHI, M. J.; PENNA, T. C. V.; CONVERTI, A. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 539–54, 2007.

DAS NEVES, L. C. M.; KOBAYASHI, M. J.; RODRIGUES, T. M.; CONVERTI, A.; VESSONI PENNA, T. C. Biomonitoring of biosurfactant production by green fluorescent protein-marked *Bacillus subtilis* W1012. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v.84, n.1, p.112-118, 2009.

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v.73, n.2, p.190–197, 2006.

DLUGOKENSKI, R. E. F.; SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R.; MINOZZO, J. C. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.2, p.713-719, 2011.

EIJLANDER, R. T.; DE JONG, A.; KRAWCZYK, A. O.; HOLSAPPEL, S.; KUIPERS, O. P. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v.42, n.1, p.D685–D691, 2014.

ESPIRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. Apple, grape or orange juice: which one offers the best substrate for *Lactobacilli* growth — a screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. **Food Research International**, n.78, p.352-360, 2015.

ESTADÃO CONTEÚDO. Associação do Brasil assina acordo para promoção de suco na Europa. **Globo Rural**. 07 out. 2015. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015/10/associacao-do-brasil-assina-acordo-para-promocao-de-suco-na-europa.html>. Acesso em: 07 jan. 2016.

ESTADÃO CONTEÚDO. Produção brasileira de laranjas deve crescer 6% em 2014/2015. **Globo Rural**. 02 jul. 2014. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/Laranja/noticia/2014/07/producao-brasileira-de-laranjas-deve-crescer-6-em-20142015.html>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FAO. **Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade**. Brasília, 2013. Disponível em: <https://www.fao.org/daccatb.asp>. Acesso em: 07 jun. 2015.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010. v.1, cap.7, p.321-337.

FAVA NEVES, M. (coord.). **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CITRUSBR, v. 62, n. 4, p. 127–129, 2009.

FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M. D.; DORILEO, I. L.; ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v.77, p.78-88, 2013.

GOULD, G. W. History of science – spores. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.3, p.507–513, 2006.

GUO, Y.; HUANG, E.; YANG, X.; ZHANG, L.; YOUSEF, A.E.; ZHONG, J. Isolation and characterization of a *Bacillus atrophaeus* strain and its potential use in food preservation. **Food Control**, v.60, p.511–518, 2016.

IBGE. Indicadores. Agropecuária. Produção Agrícola. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Abr, 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201404_5.shtm. Acesso em: 04 jun. 2014.

KHAN, A. W.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Application of malte residue in submerged fermentation of *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v.21, suppl.1, p.S33-S35, 2009.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v.98, n.1, p.150–157, 2007.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v.76, n.2, p.333-335, 2009.

LIU, Y.; ZHU, Y.; LI, J.; SHIN, H.; CHEN, R.R.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production. **Metabolic Engineering**, v.23, p.42–52, 2014.

LOHBAUER, C. **A indústria brasileira de suco de laranja**. CitrusBR, 2011.

LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol Rev**, v.33, p.152-163, 2009.

MAHMOOD, A. U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, n.2, p.130-137, 1998.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A.; MOULIN, B. S. F. **Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método Somogyi-Nelson**. Brasília: Embrapa, 2013. p.1–4. (Comunicado, 86). Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalias/busca-de-publicacoes/-/publicacao/956360/protocolo-para-determinacao-de-acucares-redutores-pelo-metodo-de-somogyi-nelson>. Acesso em: 24 jan 2015.

MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. **Biochemical Engineering Journal**, v.101, p.1–8, 2015.

MARTINEZ-TRUJILLO, A.; ARREGUÍN-RANGEL, L.; GARCÍA-RIVERO, M.; AGUILAR-OSORIO, G. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, n.2, p.202-209, 2011.

MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella* sp. DB-3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.10, p.18-27, 2012.

MONTEIRO, S. M. S.; CLEMENTE, J. J.; CARRONDO, M. J. T.; CUNHA, A. E. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. **Advances in Microbiology**, v.4, n.8, p.444-454, 2014.

MORETTI, D. C. V.; SENNA, B. T. G.; ISHII, M.; VESSONI PENNA, T. C. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and *Saccharomyces cerevisiae* in green tea leaves and fruit juice medium. **Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, v.3, n.2, p.690–698, 2013.

NALISHA, I.; MUSKHAZLI, M.; NOR FARIZAN, T. Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.2, n.2, p.19-23, 2006.

NGUYEN, H.; PERRIER-CORNET, J. M.; GERVAIS, P. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p.107–114, 2008.

NOGAROTO, S. L.; VESSONI PENNA, T. C. **Desinfecção e esterilização**. São Paulo: Atheneu, 2006. 338p.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.101, p.34-43, 2013.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v.111, p.259-268, 2013.

PEREIRA-CARO, G.; OLIVER, C. M.; WEERAKKODY, R.; SINGH, T.; CONLON, M.; BORGES, G.; SANGUANSRI, L.; LOCKETT, T.; ROBERTS, S. A.; CROZIER, A.; AUGUSTIN, M. A. Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v.84, p.206–214, 2015.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, n. 7, p.579-586, 2004.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, n.4, p.606-614, 2012.

ROSE, R.; MONROE, A.; MALLOZZI, D.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or agar plates. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.691-699, 2007.

ROUSSOS, P. A. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. **Scientia Horticulturae**, v.129, n.2, p.253-258, 2011.

SANCHEZ-SALAS, J. L.; SETLOW, B.; ZHANG, P.; LI, Y. Q.; SETLOW, P. Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.19, p.6746-6754, 2011.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.1, p.1–17, 2004.

SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Lab-scale production of *Bacillus atrophaeus*' spores by solid state fermentation in different types of bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 159–170, 2009.

SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; ZANELLO, P. H.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RIBEIRO, C. a O.; MINOZZO, J. C.; SOCCOL, C. R. Development of a low-cost sterilization biological indicator using *Bacillus atrophaeus* by solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 151–158, 2012.

SELLA, S. R. B. R.; MASETTI, C.; FIGUEIREDO, L. F. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MINOZZO, J. C.; SOCCOL, C. R. Soybean molasses-based bioindicator system for monitoring sterilization process: Designing and performance evaluation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 1, p. 75–87, 2013.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 1–13, 2014a.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbiological Research**, v.169, n.12, p.931-939, 2014b.

SEN, S.; INGALE, S. L.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; KIM, Y. W.; KHONG, C.; LOHAKARE, J. D.; KIM, E. K.; KIM, H. S.; KWON, I. K.; CHAE, B. J. Effect of Supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 Grown on Citrus-juice Waste and Corn-soybean Meal Substrate on Growth Performance, Nutrient Retention, Caecal Microbiology and Small Intestinal Morphology of Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 8, p. 1120–1127, 2011.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.3, p.514-525, 2006.

SOUSA, B. A. A.; CORREIA, R. T. P. Biotechnological reuse of fruit residues as a rational strategy for Agro-Industrial resources. **Journal of Technology Management & Innovation**, v.5, n.2, p.104-112, 2010.

SUGUMARAN, K. R.; JOTHI, P.; PONNUSAMI, V. Bioconversion of industrial solid waste—Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p.22–30, 2014.

TANG, B.; XU, H.; XU, Z.; XU, C.; XU, Z.; LEI, P.; QIU, Y.; LIANG, J.; FENG, X. Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.181, p.351–354, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F., eds. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 2, p.103-476.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP35. Rockville: United States pharmacopeial convention, 2013. v.2.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Citrus**: world markets and trade. January 2013. 10p. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/citruswm//2010s/2013/citruswm-01-24-2013.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

VENTURINI FILHO, W. G., (coord.). **Bebidas não alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010. 385p. (Bebidas, v.2).

VESSONI PENNA, T. C.; MACHOSHVILI, I. A.; ISHII, M. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105/108, p.287-294, 2003.

VESSONI PENNA, T. C.; MARQUES, M.; MACHOSSHVILI, I. A.; ISHII, M. The effect of composition of parenteral solution on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* spores. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98/100, n.1/9, p.539-551, 2002.

VESSONI PENNA, T. C.; MACHOSSHVILI, I. A.; TAQUEDA, M. E. S.; ISHII, M. The effect of composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* sporulation. **PD Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v.54, n.5, p.398-412, 2000.

VITOLO, M. (Coord.). **Tecnologia de Fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 2015. cap.3, p.111-114. (Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial).

VRIES, Y. P. The role of calcium in bacterial spore germination. **Microbes and Environments**, v.19, n.3, 199-202, 2004.

WILSON, J. A.; NAYAK, S. Disinfection, sterilization and disposables. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.14, n.10, p.423-427, 2013.

WU, Y.; MA, H.; ZHENG, M.; WANG, K. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. **Bioresource technology**, v.191, p.53–58, 2015.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v.41, n.8, p.1799–1805, 2006.

YOO, J.; LEE, H.; CHOI S.; KIM, Y.; SUMATHY, B.; KIM, E. Production of an antimicrobial compound by *Bacillus subtilis* LS 1-2 using a citrus-processing by product. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.6, p.1400-1405, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Soluções para a manutenção dos esporos

Soluções de acetato de cálcio 0,02 M; soluções de hidróxido de cálcio 0,14% (p/v); foram preparadas para serem utilizadas nos experimentos de obtenção e manutenção dos esporos obtidos.

1.1 Preparo da solução de acetato de cálcio 0,02 M

Dissolveu-se 3,51 g de acetato de cálcio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e em 1000,0 mL de água destilada, e então autoclavada a 121 °C por 30 minutos. A solução foi armazenada sob refrigeração a 8 °C até o momento do uso.

1.2 Preparo da solução de hidróxido de cálcio 0,14 % (p/v)

Dissolveu-se 1,4 g de hidróxido de cálcio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) em 1000,0 mL de água destilada estéril. Determinou-se o pH em pHmetro digital e a solução foi armazenada sob refrigeração a 8 °C até o momento do uso.

APÊNDICE B - Curvas de calibração

2.1 Curva de calibração da Biomassa

Para determinação da curva de calibração da biomassa de *B. atrophaeus* preparou-se um inóculo utilizando 1,0 mL da suspensão de esporos de estoque e 99,0 mL de TSB em Erlenmeyer de 250,0 mL fechado com gaze. Este inóculo foi incubado 37 °C / 150 rpm / 24 horas (modelo TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), todo o conteúdo foi fracionado e centrifugados a 4000 rpm / 4 °C / 25 minutos (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Alemanha) desprezou-se o sobrenadante e o pellet de células foi ressuspenso em água, agitando-se em vórtex (modelo AP56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e realizadas diluições pré-determinadas.

De cada diluição filtrou-se 10,0 mL em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm (Millipore, São Paulo, SP, Brasil) previamente tarada, as membranas foram secas em estufa (NT 514, Novatécnica, Piracicaba, SP, Brasil) 90 °C por 3 horas, colocadas em dessecador com sílica gel por 2 horas e pesadas. A massa seca foi determinada através da diferença de peso das membranas após a filtração. A absorbância das diluições foi determinada em comprimento de onda de 600 nm (UV-1650 PC, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão).

Figura B 2.1- Curva padrão da biomassa (g/L) de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em função da densidade ótica em $\lambda = 600\text{nm}$.

A.2.2 Curva de calibração de açúcares redutores totais (ART)

Para a determinação da curva de calibração padrão utilizou-se glicose PA Sigma®, na concentração 0,2 g/L, obtida através da diluição em balão volumétrico de 0,02 g de glicose em 100,0 mL de água destilada. Em seguida retirou-se 20,0 mL para outro balão, completando o volume para 100,0 mL. Para obtenção da curva leram-se absorbâncias variando as concentrações de glicose de 0,02 g/L à 0,2 g/L, através de diluições. A absorbância relacionada utilizou comprimento de onda de 540 nm.

Figura B 2.2- Curva de calibração de açúcares redutores totais (ART).

APÊNDICE C - Preparo de reagentes utilizados na determinação de açúcares redutores totais

3.1 Preparo das soluções da mistura reativa

A mistura reativa é uma solução que contém 4 partes de solução alcalina para 1 parte de solução alcalino-cúprica.

3.1.1 Preparo da solução alcalina

A solução alcalina é obtida pela adição dos reagentes:

NaHCO ₃	20,0 g
Na KC ₂ H ₄ O ₆	15,0 g
Na ₂ CO ₃	30,0 g
Na ₂ SO ₄	180,0 g
Água destilada q.s.p	1000,0 mL

Dissolveu-se cada sal separadamente, o sulfato de sódio foi dissolvido em aproximadamente 800,0 mL de água destilada, com auxílio do aquecimento em bico de Bunsen, os outros sais foram diluídos utilizando cerca de 50,0 mL de água, então as soluções foram misturadas e o volume completo para 1000,0 mL.

3.1.2 Preparo da solução alcalino cúprica

O preparo da solução alcalino cúprica utilizou os seguintes reagentes:

Na ₂ SO ₄	46,0 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O (40 g/L)	100,0 mL
Água destilada q.s.p	200,0 mL

Para preparar a solução acima, dissolveu-se 46,0 g de Na₂SO₄ em 100,0 mL de uma solução CuSO₄ . 5 H₂O, de concentração igual à 40 g/L, após a dissolução o volume foi completo para 200,0 mL com água destilada.

3.2 Preparo da solução arseno-molíbdica

$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	26,32 g
$\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,16 g
H_2SO_4 (d= 1,84)	22,10 g
Água destilada q.s.p	500,0 mL

Dissolveu-se o moblidato de amônio em 400,0 mL de água destilada, e adicionou-se o ácido sulfúrico. Separadamente dissolveu-se o arseniato de sódio em 25,0 mL de água destilada. Verteu-se a solução de moblidato à solução de arseniato + ácido sulfúrico e o volume completo para 500,0 mL com água destilada.

APÊNDICE D – Curva de esporos sobreviventes planejamento experimental.

Determinou-se a resistência térmica dos esporos obtidos em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v), tendo o decaimento os comportamentos conforme figuras abaixo:

Figura D 1 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 1. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 2 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 2. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 3 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 3. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 4 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 4. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 5 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 5. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 6 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 6. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 7 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 7. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 8 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 8. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 9 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 9. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 10 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 10. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 11 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 11. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 12 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 12. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 13 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 13. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 14 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 102 °C, amostra 14. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

Figura D 15 - Curva de esporos sobreviventes ao tratamento térmico 100 °C, Padrão TSB. Esquerda: 3 dias. Direita 6 dias de cultivo.

ANEXOS

ANEXO A - Técnica de coloração de Gram

Com auxílio de alça de platina realizou-se o esfregaço, fixando-o junto ao bico de Bunsen. Difundiu-se cuidadosamente o corante violeta de genciana sobre a lâmina e aguardando por 1 minuto, o esfregaço foi lavado com água destilada, seguido da aplicação de lugol por 1 minuto, lavando novamente com água destilada, a lâmina então foi descorada com álcool acetona (1:1) por 15 segundos e lavada com água destilada, aplicou-se o corante Fucsina de Ziehl diluída (1:10) por 30 segundos e lavou-se com água destilada. Após a secagem as lâminas foram observadas com objetiva de imersão.

ANEXO B - Técnica de coloração de Wirtz

O esfregaço foi produzido com uma gota de água destilada e a amostra, a fim de obter um esfregaço fino, fixando-o com calor utilizando bico de Bunsen. A lâmina foi corada com solução verde malaquita (5%) e mantida sobre água fervente durante 3 minutos, sem deixar que o corante secasse, lavou-se em água corrente e cobriu-se com solução de safranina (1%), deixando por 30 segundos, em seguida lavou-se novamente. As lâminas foram observadas com objetiva de imersão.

ANEXO C - Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO D - Ficha do aluno**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9135 - 8863630/1 - E[izandra Hertel] Lenhardt

Email:	elizandrahertel@usp.br
Data de Nascimento:	16/10/1990
Cédula de Identidade:	RG - 1848572-3 - MT
Local de Nascimento:	Estado de Mato Grosso
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmácia - Universidade de Cuiabá - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia Químico-Farmacêutica
Data de Matrícula:	03/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2014
Data Limite para o Depósito:	03/08/2016
Orientador:	Prof(a), Dr(a), Marina Ishii - 03/02/2014 até o presente, Email: marishii@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 23/03/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 18/02/2016 12:05:37

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9135 - 8863630/1 - Elizandra Hertel Lenhardt

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5768-4/3	Princípios de Fermentação Contínua	07/02/2014	13/03/2014	75	5	90	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBT5723-6/2	Conservação de Alimentos por Processos Térmicos	07/05/2014	08/07/2014	90	6	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0530 - Física Industrial, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, (1)	01/07/2014	30/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	90	A	N	Concluída
FBF5805-1/3	Deixeamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 18/12/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 18/02/2016 12:05:37