UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

STEPHANIE CAROLINE TAVARES TABUCHI

Estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae*
em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento

Lorena
2017

STEPHANIE CAROLINE TAVARES TABUCHI

Estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae*
em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho
Prata

Versão Corrigida

Lorena
Janeiro, 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tabuchi, Stephanie Caroline Tavares

Estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento / Stephanie Caroline Tavares Tabuchi; orientador Arnaldo Márcio Ramalho Prata - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
103 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018
Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata

1. Exopolissacarídeo. 2. *Lasiodiplodia theobromae*.
3. Glicerol. 4. Biorreator. I. Título. II. Prata,
Arnaldo Márcio Ramalho, orient.

AGRADECIMENTOS

À Escola de Engenharia de Lorena - USP, em especial ao Departamento de Biotecnologia, por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela orientação, ajuda, paciência e, principalmente, pela amizade ao longo de todos esses anos de parceria, que começou lá atrás, ainda na iniciação científica.

À minha mãe, Isabel, que sempre me apoiou e me aconselhou nos momentos em que mais precisei.

Ao meu pai, Yutaka, por todo suporte e confiança.

Ao Kahl, pelo auxílio nas análises, por me acompanhar nos finais de semana e feriados no laboratório, por sempre estar disposto a me ajudar, mas sobretudo, por todo amor, compreensão e companheirismo.

À Sabrina, por todos bons momentos, por toda ajuda dentro e fora do laboratório, e, principalmente, pela inestimável amizade.

Ao Prof. Dr. Mario A. A. Cunha, que forneceu o microrganismo utilizado neste trabalho.

Aos técnicos Nicamor e Bárbara, que me ajudaram com análises fundamentais para realização desse trabalho.

Aos professores e vários colegas do Debiq e demais Departamentos da EEL-USP pelo empréstimo de material e de equipamentos.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e torceram por mim.

(Charles M. Schulz)

RESUMO

TABUCHI, S. C. T. **Estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento.** 2017. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2017.

Os polissacarídeos possuem diversas aplicações industriais devido a sua ampla variedade de propriedades físico-químicas. Além desses empregos tradicionais, pesquisas mais recentes estão impulsionando o uso de polissacarídeos para novas aplicações, principalmente na área de terapia farmacêutica. Com o objetivo de ampliar a produção industrial de polissacarídeos microbianos, pesquisas têm se concentrado nos exopolissacarídeos (EPS), que apresentam produtividade elevada e processos de extração e purificação mais simples quando comparados aos polímeros tradicionais. A lasiodiplodana, uma β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, é um EPS produzido por *Lasiodiplodia theobromae*, um fungo filamentoso característico de regiões tropicais e patógeno de mais de 500 espécies vegetais. Na produção de EPS observa-se que, como resultado do crescimento e da produção do biopolímero, o meio de cultivo torna-se mais viscoso, tornando difícil a manutenção da homogeneidade no biorreator e, consequentemente, prejudicando a transferência de massa e oxigênio no meio. Nos cultivos em que ocorrem mudanças na reologia do meio e nos quais são utilizados fungos filamentosos, sensíveis ao cisalhamento, o uso de biorreatores convencionais, como o *Stirred Tank Reactor* (STR) e o *Airlift*, não é adequado. Nesse contexto, no presente estudo tem-se como objetivo estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de EPS pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*, a partir de glicose e de glicerol, no Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC) e compará-lo com o STR. No estudo inicial, realizado em frascos agitados, a maior produção de EPS ($6,49 \pm 0,03$ g/L) foi alcançada pelo ensaio G, que continha a maior concentração glicose testada (50 g/L) e a menor concentração de extrato de levedura (3 g/L). Quando se utilizou glicerol como fonte de carbono, a maior produção de EPS ($3,39 \pm 0,06$ g/L) foi observada no Ensaio O, que continha 30 g/L de glicerol e a maior concentração de fonte de nitrogênio testada (12 g/L de extrato de levedura). Nos ensaios em biorreatores, quando utilizou-se glicose como fonte de carbono observou-se que o BAABC com controle de temperatura proporcionou uma produção de $3,17 \pm 0,16$ g/L de EPS, concentração inferior à obtida em frascos, porém bastante superior à obtida no biorreator STR ($0,70 \pm 0,12$ g/L). Para os meios contendo glicerol, o biorreator STR proporcionou uma produção de EPS de $3,02 \pm 0,19$ g/L, enquanto no BAABC a concentração de EPS obtida foi muito menor ($1,45 \pm 0,25$ g/L). Analisando-se, porém, a concentração máxima de biomassa obtida ($28,86 \pm 1,46$ g/L) bem como os parâmetros cinéticos relacionados ($Y_{X/S}$ e Q_X), nota-se que a produção de biomassa foi muito superior e mais eficiente no BAABC. Apesar das diferenças morfológicas visualmente observadas e confirmadas por meio de microscopia óptica nos EPS obtidos a partir de glicose e de glicerol, as análises de Difração de raios-X e Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier permitiram evidenciar a similaridade estrutural entre ambos os EPS.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo. *Lasiodiplodia theobromae*. Glicerol. Biorreator.

ABSTRACT

TABUCHI, S. C. T. **Kinetic study of the production of exopolysaccharide by *Lasiodiplodia theobromae* in agitated and aerated low shear bioreactor.** 2017. 103 p. Thesis (Doctoral of Science) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2017.

Polysaccharides have several industrial applications because of their wide variety of physicochemical properties. In addition to these traditional applications, recent research is driving the use of polysaccharides towards new applications, especially in the field of pharmaceutical therapy. With the aim of increasing the industrial production of microbial polysaccharides, research has focused on exopolysaccharides (EPS), which have high productivity and simpler extraction and purification processes when compared to traditional polymers. Lasiodiplodana, a β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan, is an EPS produced by *Lasiodiplodia theobromae*, a filamentous fungus characteristic of tropical areas and pathogenic of more than 500 plant species. In EPS production, as a result of the growth and biopolymer production, the culture medium becomes more viscous, making it difficult to maintain homogeneity inside the bioreactor and, consequently, harming the transfer of mass and oxygen in the medium. In cultures where changes in media rheology occur and in which shear-sensitive filamentous fungi are used, the use of conventional bioreactors, such as Stirred Tank Reactor (STR) and Airlift, is not appropriate. In this context, the objective of the present study was to study the growth kinetics, substrate consumption and EPS production by the *Lasiodiplodia theobromae* filamentous fungus, from glucose and glycerol, in the Low-Shear Aerated-Agitated Bioreactor (LSAAB) and compare it with the STR. In the initial study, conducted in shaken flasks, the highest EPS production (6.49 ± 0.03 g/L) was achieved by the G test, which contained the highest glucose concentration tested (50 g/L) and the lowest concentration of yeast extract (3 g/L). When glycerol was used as the carbon source, the highest EPS yield (3.39 ± 0.06 g/L) was observed in Test O, which contained 30 g/L glycerol and the highest concentration of nitrogen source tested (12 g/L of yeast extract). In the bioreactor trials, when glucose was used as the carbon source, it was observed that the LSAAB with temperature control provided a production of 3.17 ± 0.16 g/L of EPS, a concentration lower than that obtained in flasks, but rather higher than that obtained in the STR bioreactor (0.70 ± 0.12 g/L). For the glycerol-containing media, the STR bioreactor produced 3.02 ± 0.19 g/L of EPS, while in LSAAB the EPS concentration obtained was much lower (1.45 ± 0.25 g/L). However, analyzing the maximum concentration of biomass obtained (28.86 ± 1.46 g/L) as well as the related kinetic parameters ($Y_{X/S}$ and Q_X), biomass production was much higher and more efficient in LSAAB. In spite of the visually observed morphological differences confirmed by optical microscopy in EPS obtained from glucose and glycerol, X-ray diffraction and absorption spectroscopy analyzes in the infrared region with Fourier transform showed the structural similarity between both EPS.

Keywords: Exopolysaccharide. *Lasiodiplodia theobromae*. Glycerol. Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Distribuição do EPS firmemente preso à parede celular (EPS-FP) e do EPS ligeiramente preso à parede celular (EPS-LP) ao redor da célula. 24
- Figura 2.2** – Visão esquemática da composição da parede celular fúngica. A β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana é sintetizada pela β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana sintase (amarela) que utiliza UDPG (hexágono verde) como doador para transferir glicose para a fibra de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana extrudada..... 25
- Figura 2.3** – Estrutura da β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana. 26
- Figura 2.4** – Cultivo do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em meio BDA em: (A) 4 dias e (B) 14 dias..... 29
- Figura 2.5** – Curvas de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento de diferentes tipos de fluidos. 36
- Figura 2.6** – Exemplos de biorreatores. (A) Reator agitado e aerado (STR) e (B) Reator *Airlift* de cilindros concêntricos. 38
- Figura 2.7** – Diagrama esquemático do BAABC: (A) Vista frontal; (B) Vista lateral; (C) Tampa do biorreator: uma vez dentro da câmara, o ar é forçado através de quatro furos no tubo "L" e cai até sua extremidade inferior. 41
- Figura 4.1** – (A) EPS precipitado após a adição de etanol e (B) EPS obtido após a filtração. 48
- Figura 5.1** – Valores máximos de concentração de biomassa e de EPS obtidos no cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicose, glicerol puro e glicerol residual como substratos. 52
- Figura 5.2** – Valores máximos de biomassa e produção de EPS no cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicose como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L) como fonte de nitrogênio, ambos em diferentes concentrações. 54
- Figura 5.3** – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae* em frasco agitado, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura (Ensaio G). 55
- Figura 5.4** – Valores máximos de biomassa e produção de EPS no cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicerol como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L.) como fonte de nitrogênio, ambos em diferentes concentrações. 57
- Figura 5.5** – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicerol no cultivo de *L. theobromae* em frasco agitado, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura (Ensaio O). 58

Figura 5.6 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, dos meios referentes aos ensaios A a I, em frascos, nos quais utilizou-se glicose como fonte de carbono para a produção de EPS por <i>L. theobromae</i> .	60
Figura 5.7 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, dos meios referentes aos ensaios J a R, em frascos, nos quais utilizou-se glicerol como fonte de carbono para a produção de EPS por <i>L. theobromae</i> .	60
Figura 5.8 – Diferença entre a coloração dos meios de cultivo de <i>L. theobromae</i> : (A) amarelado; (B) acinzentado e (C) azulado.	61
Figura 5.9 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de <i>L. theobromae</i> , em biorreator STR, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.	66
Figura 5.10 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator STR, utilizando-se glicose como fonte de carbono.	68
Figura 5.11 – Aspecto do meio cultivo de <i>L. theobromae</i> , em biorreator STR, utilizando-se glicose como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 4 horas; (C) – 18 horas; (D) – 28 horas; (E) e (F) fungo aderido no interior do STR.	69
Figura 5.12 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de <i>L. theobromae</i> , em BAABC sem controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.	70
Figura 5.13 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em BAABC sem controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.	72
Figura 5.14 – Aspecto do meio cultivo de <i>L. theobromae</i> , em BAABC sem controle de temperatura, utilizando-se glicose como substrato e sem controle de temperatura. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.	73
Figura 5.15 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de <i>L. theobromae</i> , em BAABC com controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.	75
Figura 5.16 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.	77
Figura 5.17 – Variação da temperatura do meio de cultivo, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.	78
Figura 5.18 – Aspecto do meio de cultivo de <i>L. theobromae</i> , em BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.	78

Figura 5.19 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de <i>L. theobromae</i> em biorreator STR, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura.	80
Figura 5.20 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator STR, utilizando glicerol como fonte de carbono.	82
Figura 5.21 – Aspecto do meio cultivo de <i>L. theobromae</i> , em biorreator STR, utilizando-se glicerol como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.	83
Figura 5.22 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicerol no cultivo de <i>L. theobromae</i> em BAABC com controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura.	84
Figura 5.23 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando glicerol como fonte de carbono.	85
Figura 5.24 – Aspecto do meio de cultivo de <i>L. theobromae</i> em BAABC com controle de temperatura, utilizando glicerol como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.	86
Figura 5.25 – (A) – EPS-glicose após a precipitação com etanol; (B) – EPS-glicerol após a precipitação com etanol; (C) – EPS-glicose liofilizado; (D) – EPS-glicerol liofilizado.	87
Figura 5.26 – Micrografia do EPS-glicose (A) e EPS-glicerol (B) Ampliação original de 50x.	88
Figura 5.27 – Difractogramas de raios-X das amostras de EPS-glicose e EPS-glicerol.	89
Figura 5.28 – Espectro de infravermelho (FT-IR) do EPS-glicose e do EPS-glicerol.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais polissacarídeos com aplicação industrial extraídos a partir de algas, plantas, animais e microrganismos.	20
Tabela 2.2 – Fungos produtores de exopolissacarídeos, glucanas produzidas e suas respectivas ligações glicosídicas.....	26
Tabela 4.1 – Denominação dos meios para os ensaios de cultivo de <i>L. theobromae</i> visando o estudo da influência da concentração de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio sobre a produção de EPS em frascos, empregando-se glicose como substrato.....	46
Tabela 4.2 – Denominação dos meios para os ensaios de cultivo de <i>L. theobromae</i> visando o estudo da influência da concentração de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio sobre a produção de EPS em frascos, empregando-se glicerol como substrato.....	46
Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> , em frascos agitados, em meios com diferentes concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio, utilizando-se glicose como fonte de carbono.....	63
Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> , em frascos agitados, em meios com diferentes concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio, utilizando-se glicerol como fonte de carbono.....	63
Tabela 5.3 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> utilizando glicose como fonte de carbono em biorreator STR.....	68
Tabela 5.4 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> utilizando-se glicose como fonte de carbono em BAABC sem controle de temperatura.....	71
Tabela 5.5 – Temperaturas da água, em função do tempo, desde o início do aquecimento do líquido pela resistência no BAABC até seu retorno ao valor inicial.	74
Tabela 5.6 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> utilizando-se glicose como fonte de carbono em BAABC com controle de temperatura.	76
Tabela 5.7 – Comparação dos parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> utilizando-se duas concentrações diferentes de glicose em biorreator BAABC: 50 g/L e 30 g/L.	79
Tabela 5.8 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> , utilizando-se glicerol como fonte de carbono, em biorreator STR.....	81

Tabela 5.9 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> utilizando-se glicerol como fonte de carbono em biorreator BAABC com controle de temperatura.	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAABC	Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento
BDA	Agar batata dextrose
C/N	Carbono/nitrogênio
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DRX	Difração de Raios-X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Exopolissacarídeo
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
UDPG	Uridina difosfato glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Polissacarídeos.....	19
2.1.1 Exopolissacarídeos microbianos	22
2.1.2 β -glucanas fúngicas.....	23
2.2 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	27
2.3 Produção de exopolissacarídeo	29
2.3.1 Condições de cultivo para produção de exopolissacarídeo.....	29
2.3.2 Glicerol como fonte de carbono alternativa	32
2.3.3 Reologia do meio de cultivo	34
2.3.4 Separação do exopolissacarídeo do meio de cultivo.....	37
2.4 Biorreatores.....	38
2.4.1 Biorreator STR e <i>Airlift</i>	38
2.4.2 Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento.....	39
3. OBJETIVOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Microrganismo.....	43
4.2 Condições de cultivo.....	43
4.2.1 Preparo do inóculo	43
4.2.2 Ensaio de fermentação em frascos agitados	43
4.2.3 Ensaio de fermentação em biorreator STR.....	44
4.2.4 Ensaio de fermentação em BAABC	44
4.3 Sequência Experimental	45
4.3.1 Teste dos substratos	45
4.3.2 Definição da concentração de substrato e de fonte de nitrogênio.....	45
4.3.3 Ensaio em biorreator STR e BAABC.....	46
4.3.4 Caracterização do EPS obtidos	47
4.4 Métodos Analíticos.....	47
4.4.1 Concentração celular.....	47
4.4.2 Concentração de EPS	47
4.4.3 Concentração das fontes de carbono empregadas.....	48

4.4.4	Diálise e liofilização do EPS	48
4.4.5	Caracterização Morfológica dos EPS	49
4.4.6	Obtenção dos padrões de Difração de Raios-X (DRX).....	49
4.4.7	Obtenção dos espectros de Infravermelho	49
4.5	Determinação dos parâmetros cinéticos	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Teste dos substratos.....	52
5.2	Ensaio para definição das concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio.....	53
5.3	Ensaio em biorreator STR e BAABC com glicose como substrato	65
5.3.1	Ensaio em biorreator STR	66
5.3.2	Ensaio em BAABC sem controle de temperatura	69
5.3.3	Desenvolvimento do sistema de controle de temperatura do meio para o BAABC	74
5.3.4	Ensaio em BAABC com controle de temperatura.....	75
5.3.5	Ensaio em BAABC com controle de temperatura utilizando menor concentração de glicose	79
5.4	Ensaio em biorreator STR e BAABC com glicerol como substrato.....	80
5.4.1	Ensaio em biorreator STR	80
5.4.2	Ensaio em BAABC com controle de temperatura.....	83
5.5	Caracterização parcial dos EPS obtidos a partir de glicose e a partir de glicerol	86
5.5.1	Aspectos visuais	86
5.5.2	Aspecto morfológico	87
5.5.3	Difração de raios-X	88
5.5.4	Espectro de Infravermelho.....	89
6.	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais que, devido as suas propriedades espessantes, gelificantes e estabilizantes, possuem diversas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, petrolífera, têxtil, de tintas e de produtos agrícolas. Além desses empregos tradicionais, pesquisas mais recentes estão impulsionando o uso de polissacarídeos para novas aplicações, principalmente na área de terapia farmacêutica, como antitumorais, antivirais, anti-inflamatórios e anticoagulantes.

Polissacarídeos podem ser extraídos de algas, de plantas, de animais ou recuperados do caldo de fermentação de culturas bacterianas ou fúngicas. Os polissacarídeos de origem microbiana, além de possuírem propriedades similares ou até mesmo de maior interesse que os tradicionais (de origem vegetal e algas marinhas), apresentam pouca variabilidade, podem ser obtidos em menos tempo e não são vulneráveis às alterações climáticas. Entretanto, embora apresentem muitas vantagens, o custo de produção para a maioria dos polissacarídeos microbianos é relativamente alto quando comparado àqueles obtidos de vegetais e algas, devido aos processos de produção e necessidade de investimentos em capital e energia.

Com o objetivo de ampliar a produção industrial de polissacarídeos microbianos, pesquisas têm se concentrado nos exopolissacarídeos (EPS), que apresentam produtividade elevada e processos de extração e purificação mais simples quando comparados aos polímeros tradicionais. Os EPS são excretados por alguns fungos e bactérias e podem formar cápsulas ao redor da célula, integrando a parede celular, ou se apresentarem externos à parede celular, na forma de um limo que se difunde no meio extracelular.

A lasiodiplodana, uma β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, é um EPS produzido por *Lasiodiplodia theobromae*, um fungo filamentoso característico de regiões tropicais e patógeno de mais de 500 espécies vegetais. No cultivo submerso de *Lasiodiplodia theobromae*, a lasiodiplodana é secretada no meio de cultura e isolada simplesmente por precipitação utilizando etanol, método de extração eficaz e de baixo custo.

Na produção de EPS, além do microrganismo, os parâmetros que mais influenciam o processo de biossíntese de EPS são: composição do meio de cultivo, temperatura, pH, agitação e aeração. Tais parâmetros têm influência direta na quantidade e nas propriedades funcionais do polissacarídeo obtido. Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas na produção de EPS por fungos, sendo glicose e sacarose as mais utilizadas. No entanto, o emprego de matérias-primas alternativas, tais como subprodutos e resíduos agroindustriais, pode não só diminuir o custo de produção, como também minimizar problemas ambientais causados pelo descarte de

efluentes industriais de maneira inadequada. O glicerol é um exemplo de subproduto, de baixo custo e ampla disponibilidade, que tem demonstrado grande potencial como substrato em processos fermentativos para obtenção de diversos produtos de interesse industrial.

O estudo cinético de um processo fermentativo é de suma importância para que seja possível compreender como as diferentes condições experimentais podem influenciar na obtenção do produto de interesse. No cultivo de microrganismos produtores de EPS um dos principais problemas é a manutenção da homogeneidade no biorreator, uma vez que, durante o processo, ocorrem mudanças na reologia do meio de cultivo. No início do processo, o meio comporta-se como um fluido newtoniano, porém, como resultado do aumento da biomassa e da produção e liberação de moléculas de EPS de alta massa molecular, ocorre o aumento da viscosidade do meio de cultura, que passa a se comportar como um fluido não-newtoniano. Nos cultivos nos quais os meios apresentam esse comportamento e nos quais são utilizados fungos filamentosos, sensíveis ao cisalhamento, o uso de biorreatores convencionais, como o *Stirred Tank Reactor* (STR) e o *Airlift*, não é adequado. No reator STR, a adesão das células cultivadas nas pás e nos micro-orifícios dos tubos de distribuição de ar do biorreator impedem a distribuição homogênea tanto de ar quanto de nutrientes no meio de cultivo. Além disso, a agitação promovida pelas pás do agitador acarreta cisalhamento significativo das hifas do fungo. Por sua vez, o reator do tipo *Airlift*, utilizado em processo em que são necessárias condições de baixo cisalhamento, não é apropriado para o cultivo em fluidos não-newtonianos, uma vez que a viscosidade evita a formação e estabilidade da camada de bolhas homogêneas, impactando negativamente na transferência de massa e oxigênio dentro do biorreator.

Com o intuito de superar as desvantagens dos biorreatores convencionais, desenvolveu-se o Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC), um sistema que permite a aeração e agitação do meio líquido de forma simultânea, evitando assim a obstrução das saídas de ar, as quais que se encontram em movimento contínuo, e apresentam um maior diâmetro quando comparado aos micro-orifícios comumente usados nos difusores de ar dos biorreatores convencionais. Destaca-se também que a distribuição das bolhas em um movimento circular contínuo promove agitação adicional do meio, contribuindo para a inibição da formação de aglomerados e para uma redução na taxa de cisalhamento.

Nesse contexto, no presente estudo tem-se como objetivo estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de EPS pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*, a partir de glicose e de glicerol, em um biorreator desenvolvido especialmente para o cultivo de células sensíveis ao cisalhamento e que aderem com facilidade (BAABC) e compará-lo com o *Stirred Tank Reactor* (STR), biorreator mais utilizado industrialmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros naturais, também chamados de biopolímeros, constituídos por monossacarídeos conectados entre si por ligações glicosídicas. Suas propriedades dependem de características como natureza dos monômeros constituintes, comprimento da cadeia, tipo de ligação glicosídica, grau de ramificações e grupos substituintes (FREIMUND et al., 2003; NASCIMENTO, 2010). Podem ser classificados como homopolímeros, quando apresentam uma única unidade monomérica, ou heteropolímeros quando apresentam dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (NELSON; COX, 2002).

A diversidade estrutural dos polissacarídeos e, conseqüentemente, a ampla variedade de propriedades físico-químicas, reflete em diferentes aplicações industriais. Há décadas os polissacarídeos têm sido utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, petrolífera, têxtil, de tintas e de produtos agrícolas. Algumas dessas aplicações incluem seu uso como: emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filme, espessantes e agentes suspensores (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Além desses empregos tradicionais na indústria, pesquisas mais recentes estão impulsionando o uso dos polissacarídeos para novas aplicações, principalmente biológicas, como antitumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano e anticoagulante (TÚRMINA, 2012).

Polissacarídeos podem ser extraídos de algas, de plantas, de animais ou recuperados do caldo de fermentação de culturas bacterianas ou fúngicas (CUNHA, PAULA; FEITOSA, 2009; ÖNER, 2013). Alguns exemplos de polissacarídeos com aplicações industriais, extraídos a partir de diversas fontes, podem ser vistos na Tabela 2.1.

Os polissacarídeos de algas mais utilizados na indústria são extraídos das algas vermelhas e pardas. A partir das algas vermelhas são obtidas a agarana e a carragenana, polissacarídeos utilizados como matérias-primas na indústria alimentícia como gelificantes e na indústria farmacêutica como antitumorais. Das algas pardas é extraído o alginato, que tem aplicação na indústria alimentícia como estabilizante e agente espessante e na indústria farmacêutica como agente antitumoral (CUNHA, PAULA; FEITOSA, 2009).

Em plantas superiores, os polissacarídeos podem ser obtidos a partir de sementes, frutos, cereais e exsudatos vegetais. Galactomanas e xiloglucanas são exemplos de polissacarídeos de sementes que se destacam por suas aplicações industriais: a goma guar e a alfarroba são

galactomananas utilizadas na indústria de alimentos, enquanto que a xiloglucana de tamarindo, devido à sua capacidade de produzir soluções aquosas viscosas, é utilizada na indústria de alimentos e farmacêutica. Dentre os polissacarídeos de exsudatos, produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque microbiano, destaca-se a goma arábica, também utilizada na indústria alimentícia (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Tabela 2.1 – Principais polissacarídeos com aplicação industrial extraídos a partir de algas, plantas, animais e microrganismos.

Origem	Fonte	Polissacarídeo
Algas	Extratos de algas marinhas	Ágar
		Goma carragena
		Alginato
Plantas	Sementes	Galactomanas
		Xiloglucanas
		Glucanas
		Mananas
	Exsudatos vegetais	Goma arábica
		Goma karaya
Animais	Frutas	Pectina
	Tubérculos e cereais	Amido
	Bovinos e galináceos	Ácido Hialurônico
	Bovinos e porcinos	Heparina
	Crustáceos	Quitina
		Quitosana
Microrganismos	Bactérias	Dextrana
		Xantana
		Gelana
		Levana
		Curdiana
	Fungos	Pululana
		Escleroglucana

Fonte: Cunha, Paula e Feitosa (2009).

Como exemplos de polissacarídeos extraídos de animais pode-se citar o ácido hialurônico, composto por unidades dissacarídicas de ácido glucorônico e N-acetilglicosamina, e a heparina, constituída por ácido urônico e glicosamina; ambos polissacarídeos com atividade biológica. O ácido hialurônico pode ser extraído do humor vítreo de bovinos e cristas de galináceos, enquanto que a heparina é extraída do pulmão de bovinos e intestino de porcinos

(CUNHA, PAULA; FEITOSA, 2009). Dependendo da pureza e tamanho, o ácido hialurônico, que não é produzido no Brasil (OGRODOWSKI, 2006), custa de 1000-5000 US\$/kg (OLIVEIRA et al., 2016); a heparina, cuja exportação pelo Brasil alcançou 80 toneladas em 2016, tem o custo de aproximadamente 400 US\$/kg (ALICEWEB, 2017).

Os polissacarídeos de origem microbiana são classificados, segundo sua localização morfológica, em três grupos: intracelulares, que fornecem carbono e fonte de energia para a célula; integrantes da parede celular, como peptidoglicanos, ácidos teicóicos e lipopolissacarídeos; e extracelulares, também conhecidos como exopolissacarídeos (EPS) e que são excretados sob a forma de cápsulas ou biofilme. Alguns exopolissacarídeos com aplicações industriais são: xantana, gelana, dextrana e pululana. Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo de origem microbiana mais importante. Em 2016, o Brasil importou mais de 5 mil toneladas de goma xantana. O mercado da dextrana, cuja principal aplicação é na indústria farmacêutica (RODRIGUES, 2009), também tem crescido. Sua importação triplicou nos últimos 5 anos, passando de 532 toneladas em 2012 para 1552 toneladas em 2016 (ALICEWEB, 2017).

Atualmente, as algas e as plantas ainda são as principais fontes de polissacarídeos para aplicações industriais (FREITAS et al. 2009; OLIVEIRA, 2014). Entretanto, os polissacarídeos de origem microbiana possuem vantagens em relação aos extraídos a partir de algas e plantas, tais como: maior uniformidade de suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de controle dos parâmetros de fermentação, menor tempo para obtenção do produto e alto rendimento e produção, independente de condições climáticas (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Além dessas vantagens, os biopolímeros microbianos apresentam menor dificuldade de recuperação e purificação comparados aos extraídos de vegetais, possibilidade de utilização de técnicas de genética molecular para obtenção de polissacarídeos com propriedades específicas (CORRADI DA SILVA et al., 2006) e ausência de concorrência com terras aráveis (DONOT et al., 2012).

Mesmo sendo atóxicos, biodegradáveis e apresentarem propriedades similares ou até mesmo superiores aos polímeros sintéticos, os biopolímeros, quando comparados com os polímeros sintéticos, ainda representam apenas uma pequena fração do mercado de polímeros atual. No Brasil, a produção de biopolímeros é de 200 mil toneladas, o que corresponde a 3% do total de plásticos produzidos no Brasil (SCHLEMMER; ANDREANI; VALADARES, 2014). O principal obstáculo à substituição de polímeros sintéticos por biopolímeros, em aplicações industriais, é o alto custo de produção. Para contornar esse problema, alternativas têm sido propostas como, por exemplo, utilização de substratos alternativos de menor custo.

Também com o objetivo de ampliar a produção industrial de biopolímeros, nos últimos anos, muitas pesquisas têm se concentrado nos exopolissacarídeos, que apresentam processos de extração e purificação mais simples e produtividade mais elevada quando comparados a polímeros de origem vegetal (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

2.1.1 Exopolissacarídeos microbianos

Os exopolissacarídeos são polissacarídeos excretados por alguns fungos e bactérias e que, dependendo do sistema microbiano, formam cápsulas ao redor da célula, integrando a parede celular, ou se apresentam externos à parede celular, na forma de limo que se difunde no meio extracelular (CORRADI DA SILVA et al., 2006; KAGIMURA et al., 2015).

Segundo Barbosa et al. (2004), o polissacarídeo mais importante obtido por fermentação, e precursor do estudo e desenvolvimento dos EPS microbianos, foi a dextrana, produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. A dextrana foi descrita pela primeira vez por Scheibler, em 1874, porém seu uso e processos de fabricação foram relatados somente em meados do século XX. Já o desenvolvimento mais acentuado da produção de EPS por fungos deu-se posteriormente ao de bactérias. Dentre os fungos produtores de EPS, o mais estudado tem sido o *Aureobasidium pullulans* (BARBOSA et al., 2004), produtor da pululana, descrita pela primeira vez na década de 1960.

Dentre os produtores de EPS microbianos, as bactérias são os microrganismos que têm a via biossintética melhor elucidada. A maioria dos EPS bacterianos são sintetizados intracelularmente e então transportados para o meio extracelular como macromoléculas. A biossíntese de EPS pode ser dividida em três etapas principais: (i) assimilação de um substrato de carbono, (ii) síntese intracelular dos polissacarídeos e (iii) exsudação de EPS para fora da célula. Apenas alguns EPS como a levana e a dextrana são sintetizados e polimerizados extracelularmente pela ação de enzimas segregadas que convertem o substrato no polímero (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Várias funções biológicas têm sido atribuídas aos EPS. Sabe-se que, no ambiente natural em que os microrganismos são encontrados, os EPS desempenham função de adesão, de interação celular e de proteção contra dessecação e contra outros microrganismos (ÖNER, 2013; MORRIS; HARDING, 2009). Podem também estar associados à virulência, funcionando como uma barreira protetora contra os compostos tóxicos produzidos pelo hospedeiro e criando assim um ambiente favorável ao crescimento do patógeno (CORRADI DA SILVA et al., 2006; LOTH, 2001). Aparentemente os EPS não funcionam como reserva de energia, já que a grande

maioria dos microrganismos não é capaz de metabolizar o próprio EPS produzido (BOELS et al., 2001; DONOT, et al., 2012). Além disso, a capacidade de produzir EPS não parece ser essencial, uma vez que a remoção física ou enzimática de EPS não afeta negativamente o crescimento celular *in vitro* (BOELS et al., 2001).

Os EPS têm sido alvo de intenso estudo devido ao seu elevado potencial de aplicação em diversos setores (CORRADI DA SILVA et al., 2006). Nos últimos anos, os polissacarídeos produzidos por fungos têm despertado grande interesse na área médica devido a algumas aplicações evidenciadas, tais como: uso como matriz hidrofílica para a liberação controlada de drogas (MATRICARDI et al., 2006; PALLESCHI, et al., 2006), agente cicatrizante e no controle de tumores (CHEN; SEVIOUR, 2007). Os EPS também apresentam potencial como hipoglicemiantes, antitrombóticos, anticoagulantes, antioxidantes, antibióticos, antivirais e anti-inflamatórios (LIU et al., 2017; NWODO; GREEN; OKOH, 2012; FUKUDA et al., 2009).

Segundo Souza e Garcia-Cruz (2004), diversas pesquisas têm tentado elucidar a rota de biossíntese e as condições que levam à produção de polissacarídeos pelos microrganismos. A biossíntese e a acumulação de polissacarídeos de origem microbiana geralmente ocorrem após a fase de crescimento do microrganismo (DONOT et al., 2012). A produção de EPS é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja carbono ou outra fonte de energia. Uma alta relação C/N tem sido considerada uma condição favorável para a produção de biopolímero (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

Para produção de EPS por microrganismos, diversos substratos podem ser utilizados, tais como: glicose, frutose, sacarose, lactose, amido hidrolisado, metanol e diferentes hidrocarbonetos, entre outros (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Segundo Barbosa et al. (2004), glicose e sacarose têm sido as fontes de carbono mais utilizadas na produção de EPS por fungos. Contudo, o emprego de matérias-primas alternativas de baixo custo, tais como subprodutos e resíduos agroindustriais, pode não só diminuir o custo do processo, como também minimizar problemas ambientais causados pelo descarte desses efluentes industriais de maneira imprópria (OLIVEIRA, 2010).

2.1.2 β -glucanas fúngicas

Glucanas são polímeros de glicose amplamente distribuídos na natureza, constituintes estruturais da parede celular de fungos e alguns cereais e classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica da cadeia principal e de acordo com as ramificações que se conectam a essa cadeia (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Nos fungos, estas moléculas participam como componentes menores do citossol, da parede celular e como polissacarídeos excretados ao meio extracelular. Além de atuarem como elemento de suporte para as hifas, as glucanas constituem uma capa extracelular ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas. Também podem impedir a desidratação das hifas, especialmente por tratar-se de molécula higroscópica, aumentando a tolerância do fungo à dessecação em ambientes com restrição hídrica, contribuir para manter o pH ótimo para as enzimas ligninolíticas e regular a concentração de glicose extracelular (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

As glucanas podem apresentar ligações tanto do tipo α como β , sendo as β -glucanas predominantes (BAUERMEISTER et al., 2010). A β -glucana mais abundante na parede celular fúngica é a β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana, que representa de 65% a 90% de toda β -glucana. Uma grande parte da β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana é ligada covalentemente à β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucana, na forma de polissacarídeos ramificados. As β -glucanas multiramificadas podem estar firmemente presas à parede celular ou apenas ligeiramente presas e se acumularem ao redor do fungo como um lodo ou material gelatinoso, como demonstrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Distribuição do EPS firmemente preso à parede celular (EPS-FP) e do EPS ligeiramente preso à parede celular (EPS-LP) ao redor da célula.

Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2015).

A síntese de β -glucanas microbianas ocorre em etapas que envolvem reações de iniciação, de alongamento da cadeia e de ramificação (RUIZ-HERRERA, 1991). Na síntese da β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana, a β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana sintase, uma enzima localizada na membrana plasmática, com múltiplos domínios transmembrana, utiliza uridina difosfato glicose (UDPG) como doador de glicose para produzir o polímero (Figura 2.2). Cada unidade de glicose é adicionada na extremidade não-redutora e assim o polímero é liberado durante o alongamento de sua cadeia,

passando através do canal formado pelos domínios transmembranas das sintases (FESEL; ZUCCARO, 2016).

Figura 2.2 – Visão esquemática da composição da parede celular fúngica. A β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana é sintetizada pela β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana sintase (amarela) que utiliza UDPG (hexágono verde) como doador para transferir glicose para a fibra de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana extrudada.

Fonte: Adaptado de Fesel e Zuccaro (2016).

Várias glucanas produzidas por fungos apresentam propriedades reológicas valiosas para a indústria e ainda não foram adequadamente exploradas. Entre as glucanas fúngicas com aplicação comercial, as principais são a escleroglucana e a pululana, produzidas por *Sclerotium glutanicum* e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente (CORRADI DA SILVA et al., 2006). Na Tabela 2.2 são mostrados esses e outros fungos produtores de glucanas extracelulares, assim como as glucanas produzidas e suas respectivas ligações glicosídicas.

Propriedades tais como solubilidade em água, estrutura molecular, massa molecular e grau de polimerização da β -glucana podem afetar a sua atividade biológica e, consequentemente, suas aplicações. As β -glucanas são conhecidas como modificadores da resposta biológica pois, ao serem reconhecidas pelo organismo, realçam a resposta imune do hospedeiro (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Contudo, a falta de solubilidade em meio aquoso das β -glucanas têm sido o maior obstáculo para sua utilização clínica. Com o objetivo de aumentar a solubilidade das β -glucanas e potencializar o seu potencial biológico, derivatizações químicas tais como sulfonação, carboximetilação, acetilação, sulfatação e fosforilação podem ser realizadas (SECHI, 2017). Durante a derivatização química ocorre a

substituição de grupos hidroxila por outros grupamentos químicos de interesse (BAI et al., 2014). Kagimura et al. (2015) observou que a carboximetilação da β -1,6-D-glucana produzida por *Lasiodiplodia theobromae* melhorou a sua solubilidade em água, possivelmente contribuindo para uma melhoria em suas propriedades biológicas.

Tabela 2.2 – Fungos produtores de exopolissacarídeos, glucanas produzidas e suas respectivas ligações glicosídicas.

Fungos	Glucana	Ligação Glicosídicas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululana	$\alpha(1\rightarrow4);(1\rightarrow6)$
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Botriosferana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$
<i>Botrytis cinérea</i>	Cinereana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$
<i>Epicoccum nigrum</i>	Epiglucana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$
<i>Pestalotia sp.</i>	Pestalotana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$
<i>Schizophyllum commune</i>	Esquizofilana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$
<i>Sclerotium glucanicum</i>	Escleroglucana	$\beta(1\rightarrow3);(1\rightarrow6)$

Fonte: Corradi Da Silva et al. (2006).

Glucanas, tais como a β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana (Figura 2.3), são incomuns e foram isoladas pela primeira vez de espécies de líquens da família Umbilicariaceae. Diferentemente das α -glucanas e da β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana, que também podem ser encontradas na parede celular de plantas, as β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas apenas podem ser encontradas na parede celular de fungos e de membros do reino Chromista (FESEL; ZUCCARO, 2016), e podem ser isoladas seguindo-se procedimentos que podem envolver extrações sequenciais com hexano, água quente e fria e álcalis (CORRADI DA SILVA et al., 2008; SOMENSI, 2014). As glucanas também podem existir como exopolissacarídeos, ficando parcialmente dissolvidas no meio de cultivo quando o fungo cresce em meio líquido (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Figura 2.3 – Estrutura da β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana.

Fonte: Vasconcelos et al. (2008).

Cunha et al. (2012) descreveu uma β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana denominada lasiodiplodana, um EPS produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Esse biopolímero é secretado no meio

de cultura e o EPS isolado simplesmente por precipitação utilizando etanol, método de extração mais eficaz e barato que os necessários para extrair glucanas da parede celular de fungos. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram o potencial da utilização da lasiodiplodana no combate a células cancerígenas.

2.2 *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae é um fungo filamentoso, pertencente à família *Botryosphaeriaceae*, e que corresponde à forma anamorfa do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* (PAVLIC et al., 2004; MESSIAS et al., 2009; LIU, 2011).

É um fungo característico de regiões tropicais e subtropicais e de pouca especialização patogênica, sendo capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais (PUNITHALINGAM, 1980 apud OLIVEIRA et al., 2013). Pode ser disseminado pelo vento, insetos e instrumentos utilizados na agricultura e penetra na planta por meio de ferimentos naturais causados por insetos e pássaros ou pelo próprio homem, por meio de práticas culturais (OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). *Lasiodiplodia theobromae* era considerado um patógeno secundário (HOLLIDAY, 1980) e pouco agressivo, contudo, estudos da Embrapa Agroindústria Tropical salientaram um aumento no número de hospedeiros e na severidade do ataque desse fungo (FREIRE et al., 2004), especialmente nas regiões semiáridas, como a do Nordeste brasileiro. Nessas regiões, a reprodução do fungo é favorecida pelo uso de sistemas de irrigação por microaspersão, que fornece a umidade necessária para a liberação de esporos, e pela ausência da prática de remoção de restos de material vegetal infectados sobre o solo após a poda, que favorece a dispersão dos esporos pelo vento (BATISTA et al., 2010).

Esse patógeno pode acarretar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo seca-descendente; cancro (em ramos, caules e raízes); lesões em estacas, folhas, frutos e sementes; além de incitar a morte de mudas e enxertos. Dentre as várias plantas hospedeiras, pode-se citar: manga, caju, milho, graviola, berinjela, abacate, mamona, maracujá e mandioca. A sua capacidade de infectar frutos coloca-o dentre os mais eficientes patógenos disseminados por meio de sementes e causadores de problemas pós-colheita (FREIRE et al., 2004), reduzindo a vida útil da planta, diminuindo a produção, desqualificando os frutos para fins de comercialização e aumentando os custos de cultivo (TAVARES, 2003).

O controle das doenças causadas por *Lasiodiplodia theobromae* é bastante difícil devido à grande variedade de hospedeiros e diferentes características morfológicas e fisiológicas entre seus isolados. Outra dificuldade é que o fungo se comporta de maneira distinta quanto ao

crescimento, esporulação e patogenicidade, de acordo com o hospedeiro e o substrato utilizado para seu crescimento (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). O manejo cultural e genético tem sido apontado como alternativa ao controle químico, principalmente devido à toxicidade dos resíduos de fungicidas sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o ambiente (LIMA et al., 2013). Além disso, quando utilizado de forma isolada, o controle químico não oferece proteção total ou controle curativo (SALES JÚNIOR et al., 2009).

Lasiodiplodia theobromae é classificado pelo Ministério da Saúde como um organismo do grupo de risco 2 (BRASIL, 2006), ou seja, moderado risco individual e limitado risco para a comunidade, sendo raramente associado a doenças em seres humanos. Alguns casos de doenças citados na literatura são de ceratites, onicomicoses e, mais raramente, casos de infecções subcutâneas (PUNITHALINGAM, 1979; MASLEN; COLLIS; STUART, 1996; SUMMERBELL et al., 2004; PAPACOSTAS et al., 2015) e pneumonia (WOO et al., 2008). Nos quatro casos de infecções subcutâneas reportados na literatura, três foram tratados com desbridamento e em apenas um foi utilizado um antifúngico no tratamento (PAPACOSTAS et al., 2015).

O crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* ocorre em uma faixa ampla de temperatura, que varia de 4 °C a 36 °C, sendo 28 °C a temperatura ótima de crescimento (BATISTA et al., 2010). De acordo com Oliveira et al. (2013), as colônias de *Lasiodiplodia theobromae* em cultura pura em meio ágar-batata-dextrose (BDA) apresentam abundante micélio aéreo, inicialmente branco, passando a cinza escuro e posteriormente a negro. Esse comportamento pode ser parcialmente visualizado na Figura 2.4.

Dentre os metabólitos secundários oriundos do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, além do EPS lasiodiplodana, destaca-se o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que controla as respostas ao estresse ambiental (ferimentos, herbívoros e ataques de patógenos) e o desenvolvimento de eventos nas plantas em floração (TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010; OLIVEIRA et al., 2002). Há também diversas lasiodiplodinas, macrolídeos que, além de também exibirem propriedade reguladora do crescimento de plantas, apresentam atividade antileucêmica (SANTOS; MAGALHÃES, 1999).

Figura 2.4 – Cultivo do fungo *Lasioidiplodia theobromae* em meio BDA em: (A) 4 dias e (B) 14 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 Produção de exopolissacarídeo

2.3.1 Condições de cultivo para produção de exopolissacarídeo

O cultivo submerso de microrganismos está sujeito a uma variedade de condições físico-químicas que atuam de forma decisiva sobre o processo fermentativo. Por isso, as condições ótimas de fermentação devem ser estabelecidas em função do produto final desejado. Além do microrganismo, os parâmetros que mais influenciam o processo de biossíntese de exopolissacarídeos são: composição do meio de cultivo, temperatura, pH, agitação e aeração. A utilização do meio de fermentação e condições mais adequadas para a produção de EPS têm influência direta nas propriedades funcionais do polissacarídeo obtido (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Segundo Barbosa et al. (2004), a produção de EPS por fungos depende do tipo de fonte de carbono e da concentração utilizada. Concentrações limitantes de alguns nutrientes e excesso de carboidrato favorecem a produção de polissacarídeos (SUTHERLAND, 1979 apud SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Fang e Zhong (2002) estudaram os efeitos de diferentes concentrações iniciais de glicose e fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e a produção de polissacarídeos e ácido ganodérico por *Ganoderma lucidum*, em cultivo submerso. Altas concentrações iniciais de glicose favoreceram a produção de EPS, porém prejudicaram a

produção de biomassa. Os autores atribuíram esse comportamento ao estresse celular causado pela alta pressão osmótica do meio.

No cultivo de fungos para produção de EPS, várias fontes de carbono podem ser utilizadas, tais como: sacarose, frutose, maltose, lactose e xilose, entre outras. Para cada microrganismo há uma concentração ótima de fonte de carbono e um tempo de cultivo que proporciona uma maior produção de EPS. Considera-se um alto rendimento quando ocorre a conversão de 70-80% da fonte de carbono utilizada em biopolímero (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Steluti et al. (2004) analisaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* em frascos agitados. Os autores utilizaram: glicose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose e sacarose (sacarose comercial e melaço de cana de açúcar). Com a exceção de manitol, o fungo produziu EPS com todas as fontes de carbono examinadas, sendo que a sacarose comercial foi o substrato que mais favoreceu a formação de EPS. Cunha et al. (2012) cultivaram *Lasiodiplodia theobromae* em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose e sacarose) e em diferentes fontes de nitrogênio (KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia, extrato de levedura e peptona), também em frascos agitados. Segundo os autores, glicose e maltose, assim como extrato de levedura, foram as fontes de carbono e nitrogênio que proporcionaram maior produção de EPS.

A maioria dos polissacarídeos produzidos responde diretamente às condições de cultivo. Para alguns microrganismos, a fonte de carbono determina não só a quantidade de polissacarídeo formado, mas também as propriedades do produto sintetizado. A manipulação da composição do EPS por modificação no meio de cultivo é um mecanismo possível pelo qual as propriedades do polímero podem ser alteradas de acordo com a aplicação desejada. Segundo Corradi da Silva et al. (2006), estudos sobre esse assunto, apesar de limitados, indicam que, embora não seja possível alterar a estrutura ou a composição da unidade básica repetitiva do polissacarídeo, é possível mudar o grau de substituição da unidade repetitiva por vários grupos, bem como o grau de polimerização. Corradi da Silva et al. (2005) caracterizaram os exopolissacarídeos produzidos por *Botryosphaeria rhodina* a partir de fermentações utilizando sacarose e frutose como substrato. Os autores verificaram que, na presença de ambos os substratos, a única diferença encontrada no EPS produzido foi o grau de ramificação. Em sacarose o grau de ramificação do EPS foi menor (21%) que o do produzido em frutose (31%), o que conferiu diferentes viscosidades às suas soluções. Os autores chegaram à conclusão de que é possível variar o grau de substituição da unidade repetitiva modificando a composição do meio nutriente, no entanto, não é possível mudar a estrutura ou constituição molecular do EPS produzido. Bongiovani et al. (2009) realizaram um estudo de caracterização reológica do EPS

produzido por *Botryosphaeria rhodina* cultivado em meios contendo glicose, sacarose e frutose. O maior rendimento em EPS foi obtido no meio contendo sacarose, seguido de glucose e frutose. O exopolissacarídeo obtido em glicose apresentou valores de tensão residual superiores, em comparação com os produzidos a partir das outras fontes de carbono, indicando uma maior resistência ao escoamento. Os autores também chegaram à conclusão de que essa diferença está relacionada com o grau e o tipo de ramificação diferentes para cada um dos exopolissacarídeos obtidos.

Outro componente importante no meio de cultivo para a produção efetiva de EPS é a fonte de nitrogênio. As fontes orgânicas mais utilizadas são: extrato de levedura, peptona, L-asparagina, glutamato e succinato de amônio. Dentre as inorgânicas pode-se citar: sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de potássio e nitrato de sódio. Segundo Barbosa et al. (2004), trabalhos relatam que polissacarídeos somente são produzidos sob condições limitantes de nitrogênio, e que altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo podem reprimir a formação de EPS. No caso da produção de xantana, alginato e gelana, foi relatado que uma alta proporção C/N favorece o acúmulo de exopolissacarídeo (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

Os meios para produção de polissacarídeos necessitam, além de fonte de carbono e nitrogênio, de microelementos, os quais têm um papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Alguns microelementos utilizados para a produção de EPS por fungos são: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $MgSO_4$, $FeSO_4$, KCl e $NaCl$. Fosfato e sulfato são requeridos em maiores concentrações em comparação com outros sais inorgânicos devido às funções que desempenham no metabolismo dos microrganismos. O fosfato é constituinte dos fosfolipídeos e ácidos nucleicos, sendo também regulador de certas enzimas. Já o sulfato é necessário para a biossíntese de aminoácidos e metabólitos secundários (BARBOSA et al., 2004). Íons metálicos como Ca^{2+} e Mg^{2+} podem não só acelerar a excreção de EPS, aumentando a permeabilidade da membrana celular, mas também participam da biossíntese de EPS atuando como cofatores das principais enzimas (LIU et al., 2017).

O pH ideal para a produção de EPS varia de acordo com o microrganismo utilizado, porém valores entre 5,0 e 7,0 são os mais utilizados. Segundo Freitas et al. (2010), no cultivo de *Pseudomonas oleovorans*, para produção de EPS, o pH do meio deve estar entre 5,0 e 9,0, preferencialmente 7,0. A produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* também ocorre em uma ampla faixa de pH. Estudos realizados mostram que o fungo cresce e produz EPS em valores de pH de 4,0 a 8,0 (OLIVEIRA, 2014). Barroso (2010) avaliou a influência de diferentes valores de pH (4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) na produção de EPS pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, em

biorreator de bancada, utilizando glicose como substrato. O autor constatou que os melhores valores de pH para a produção de EPS pelo fungo foram 5,0 e 6,0.

Em uma fermentação submersa, a agitação pode ser benéfica tanto ao crescimento do microrganismo quanto à obtenção do produto de interesse. A agitação proporciona uma melhor mistura do meio de cultivo, permitindo um fornecimento satisfatório de fonte de carbono e outros nutrientes para as células (XU et al., 2006). Porém, existem na literatura muitos resultados contraditórios sobre o efeito da agitação e da aeração na produção de EPS por fungos. Simon, Caye-Vaugie e Bouchonneau (1993) observaram que a produção máxima de pululana por *Aureobasidium pullulans* foi obtida a uma alta velocidade de agitação (450 rpm). Gibbs e Seviour (1996), por sua vez, estudaram uma grande faixa de velocidade de agitação e constataram que a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* diminuiu com o aumento da velocidade de agitação. Já Tang e Zhong (2003), cultivando o fungo *Ganoderma lucidium* em biorreator, constataram que a limitação de oxigênio foi benéfica para que o metabolismo do fungo fosse direcionado para a biossíntese de polissacarídeo.

A morfologia de microrganismos filamentosos em cultura submersa tem mostrado desempenhar um papel crítico na fermentação industrial e na produção comercial de alguns metabólitos. Durante o crescimento submerso, os fungos filamentosos podem crescer tanto em micélios livres (forma filamentosa) como em *pellets*, sendo sua forma de crescimento determinada por vários fatores, dentre os quais o efeito de cisalhamento. Microrganismos filamentosos são mais sensíveis à força de cisalhamento em reatores de tanque agitado que em outros sistemas de cultura, sendo necessária uma baixa taxa de agitação para reduzir o efeito prejudicial de cisalhamento. No entanto, a cultura de fungos filamentosos é altamente viscosa e exige alta concentração de oxigênio. Para contornar esse problema, para o qual a ação corretiva provoca efeitos conflitantes, é necessária a otimização da operação de fermentação com base na estirpe fúngica, em particular, e na configuração do sistema utilizado (XU et al., 2006).

2.3.2 Glicerol como fonte de carbono alternativa

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, foi descoberto em 1779 por Scheele, um químico sueco, durante o processo de saponificação de azeite de oliva (REHM, 1988). É um álcool que se apresenta como um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e de sabor adocicado. É solúvel em água e álcool, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano, e insolúvel em hidrocarbonetos.

Devido às características como não toxicidade e ausência de cor e odor, o glicerol tem uma ampla aplicação na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e antissépticos. É reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também reconhecido como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*) desde 1959, sendo utilizado na indústria alimentícia em preparações de molhos e sobremesas geladas, como umectante e conservante de alimentos e bebidas (MORRISON, 1994; NAE, 2005). Outras aplicações incluem seu emprego em componentes de cimento, solda, asfalto, como lubrificante de máquinas, na fabricação de dinamite e no processamento de tabaco (MORRISON, 1994; BRISSON et al., 2001; NAE, 2005; PINHEIRO, 2011).

A crescente produção de biodiesel tem causado um acúmulo de glicerol bruto e um colapso em seu valor de mercado, que diminuiu mais de 10 vezes em poucos anos (GHOSH; TOURIGNY; HALLENBECK, 2012). Cerca de 10% do volume total do biodiesel produzido corresponde ao glicerol bruto. A pureza do glicerol proveniente do biodiesel varia de 55 a 90% (AMARAL et al., 2009). As impurezas dependem da matéria-prima utilizada na obtenção do biodiesel, porém, de forma geral, pode-se citar NaOH, metanol, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais (THOMPSON; HE, 2006).

O glicerol bruto constitui uma fonte de carbono versátil, com muitas aplicações possíveis em fermentações industriais. Devido ao seu baixo custo e sua ampla disponibilidade, tem sido utilizado como fonte de substrato em processos fermentativos para a produção de 1,3-propanodiol, etanol, hidrogênio, carotenóides, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos e ácidos graxos poliinsaturados (ABAD; TURON, 2012). Durante o catabolismo aeróbio, o glicerol entra na célula microbiana por difusão facilitada e/ou transporte ativo. Em seguida, é fosforilado a glicerol-3-P, seguido por oxidação a dihidroxiacetona-3-P, a qual é convertida em gliceraldeído-3-P, que entra na via glicolítica, sendo transformado em ácido pirúvico e, em seguida, em acetil-CoA, precursor de uma variedade de produtos metabólicos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Porém, para que o glicerol bruto possa ser utilizado como substrato em processos fermentativos normalmente é necessário que ele seja tratado, de forma que compostos tóxicos para as células sejam removidos. Thompson e He (2006) caracterizaram o glicerol proveniente da fabricação de biodiesel de diferentes matérias-primas. Em todos os resíduos estudados, 60 a 70% em massa correspondiam a glicerol. Os autores também observaram a presença de metais como cálcio, potássio, magnésio, fósforo e enxofre, em pequenas quantidades, e sódio em quantidades um pouco maiores, devido ao catalisador utilizado na reação de transesterificação.

Entre os problemas em se utilizar o glicerol bruto em fermentações estão a alta concentração de sais e o metanol. Pyle (2008) relatou que a presença de metanol e sabão influenciou negativamente a produção de ácido docosaheptaenóico pela microalga *Schizochytrium limacinu*. Porém, após a remoção do metanol por evaporação e do sabão por meio de precipitação por ajuste de pH, os resultados obtidos foram similares e, em alguns parâmetros, até melhores que os obtidos com glicerol puro. Rehman et al. (2008) avaliaram a influência do tratamento do glicerol bruto obtido da fabricação de biodiesel de óleo de girassol sobre a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum*. As impurezas como o metanol e os ácidos graxos livres inibiram o crescimento da bactéria. O tratamento por acidificação com ácido fosfórico, seguida de decantação, foi utilizado para a remoção do sabão e parte dos ácidos graxos. Com o tratamento, os resultados obtidos foram próximos aos obtidos com glicerol puro.

Há, na literatura, diversos estudos de utilização de glicerol, tanto puro quanto residual, para obtenção de produtos de interesse industrial por fungos. Nitayavardhana e Khanal (2011) demonstraram a possibilidade de produção de suplemento alimentar animal a partir de glicerol bruto derivado da produção de biodiesel utilizando o fungo comestível *Rhizopus microsporus*. André et al. (2010) obtiveram ácido oxálico, também a partir de glicerol residual da produção de biodiesel, utilizando o fungo *Lentinula edodes*. Ácido araquidônico (JANG; LIN; YANG, 2005) e ácido eicosapentaenóico (ATHALYE; GARCIA; WEN, 2009), ambos ácidos graxos poli-insaturados, foram produzidos a partir de glicerol pelos fungos *Mortierella alpina* e *Pythium irregulare*, respectivamente.

O glicerol também tem sido usado em alguns trabalhos como fonte de carbono para produção de EPS. Alves et al. (2010) e Cruz et al. (2011) cultivaram a bactéria *Enterobacter sp.* em biorreator utilizando glicerol residual da indústria de biodiesel como única fonte de carbono para a produção de um EPS rico em fucose. Freitas et al. (2010) utilizaram tanto glicerol puro quanto glicerol residual da indústria do biodiesel como fontes de carbono para a produção de EPS por *Pseudomonas oleovorans* em biorreator. Nesse estudo, os valores de produtividade e rendimento em EPS foram maiores quando se utilizou glicerol residual.

2.3.3 Reologia do meio de cultivo

Reologia é o estudo do escoamento e deformação da matéria. A fim de compreender os desafios inerentes a qualquer bioprocessos de produção de EPS, é necessário um nível básico de conhecimento sobre o comportamento reológico do meio de fermentação e suas consequências para o processo (SEVIOUR et al., 2011).

É muito complexo prever a reologia no meio de cultivo, principalmente de fungos filamentosos. Os parâmetros mais importantes que devem ser levados em consideração são: distribuição do tamanho da partícula, concentração de biomassa e modo de alimentação.

Há interconexões complexas entre morfologia do fungo e reologia. O crescimento fúngico livremente disperso aumenta a viscosidade do meio de cultivo. Por isso, o crescimento em *pellets* normalmente é preferido. As condições hidrodinâmicas no biorreator influenciam o desenvolvimento morfológico do fungo e, portanto, a reologia do meio. As elevadas taxas de agitação, necessária para a transferência de massa ideal, levam ao cisalhamento das redes miceliais que, por sua vez, aumentam a quantidade de filamentos livres e, portanto, a viscosidade do meio de cultivo, comprometendo a eficiência do processo e até mesmo as propriedades do produto de interesse (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Classifica-se o comportamento reológico dos fluidos em newtonianos e não-newtonianos. Os fluidos newtonianos são aqueles que escoam, ou seja, se deformam de forma irreversível e a energia de deformação é dissipada na forma de calor. Não existem, naturalmente, fluidos perfeitos, sem viscosidade, mas há fluidos cujo comportamento se aproxima do newtoniano, como é o caso de líquidos puros, soluções verdadeiras diluídas e poucos sistemas coloidais. Por sua vez, os fluidos não-newtonianos são caracterizados pela existência de uma tensão residual que, segundo Steffe (1996), é uma tensão finita necessária para que o fluido comece a escoar. Quando submetido a tensões inferiores à essa tensão residual, o material comporta-se como um sólido, ou seja, armazena energia sob pequenas deformações e não se nivela sob a ação da gravidade, de maneira a formar uma superfície lisa (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Em sistemas microbianos simples, que apresentam comportamento newtoniano, como, por exemplo, cultivo de leveduras como *Saccharomyces* ou *Pichia*, a relação entre o gradiente de velocidade e a tensão de cisalhamento é uma constante, como demonstrado na Figura 2.5.

Em contrapartida, a reologia de sistemas produtores de EPS é bem mais complexa, uma vez que, no início do processo, o meio de fermentação comporta-se como um fluido newtoniano, porém, como resultado da produção e liberação de moléculas de EPS de alta massa molecular, ocorre o aumento da viscosidade do meio de cultura, que se torna um fluido não-newtoniano (SEVIOUR et al., 2011; CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Figura 2.5 – Tensão de cisalhamento em função do gradiente de velocidade, para líquido newtoniano e líquidos não-newtonianos.

Fonte: SCHMIDELL et al. (2011).

As interações entre as moléculas de EPS, grandes e muitas vezes ramificadas, também afetam a viscosidade do meio. Quando estão fluindo, as moléculas têm uma tendência em se emaranhar umas nas outras, resultando uma maior resistência ao fluxo, ou seja, uma maior viscosidade (SEVIOUR et al., 2011).

Esse aumento de viscosidade do meio de fermentação resulta em mudanças no comportamento do microrganismo e na formação do produto, devido a diminuição da homogeneidade do meio de cultivo, afetando a transferência de calor, massa e oxigênio do sistema. Cunha et al. (2012) constataram que a produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator (5,70 g/L) foi menor do que em frascos agitados (7,01 g/L). Segundo os autores, a transferência de massa foi prejudicada pelo aumento da viscosidade do meio de fermentação devido à presença EPS concomitantemente com biomassa fúngica. Esse aumento da viscosidade impôs restrições à transferência de oxigênio para as células fúngicas em crescimento, limitando o consumo de glicose e, consequentemente, a produção de EPS.

2.3.4 Separação do exopolissacarídeo do meio de cultivo

Um método ideal de extração de EPS deve ser eficaz, causar mínima lise celular, e não romper a estrutura do EPS (SHENG; YU; LI, 2010). Métodos químicos, físicos e combinações de métodos físicos e químicos podem ser utilizados para extrair EPS de meios de cultivo e lodos. Os diferentes métodos podem ser comparados de acordo com dois critérios: quantidade e qualidade de EPS extraído (DONOT et al., 2012). Os métodos químicos possuem a desvantagem de poder contaminar o EPS com o reagente utilizado na extração. Os métodos físicos, por sua vez, geralmente possuem menor eficiência quando comparado aos métodos químicos. Comte, Guibaud e Baudu (2006) compararam 8 métodos de extração de EPS de lodo ativado: três métodos químicos (EDTA, formaldeído + NaOH e glutaraldeído) e quatro métodos físicos (sonicação, resina de troca catiônica, sonicação + resina de troca catiônica e aquecimento), além de um método de controle (centrifugação). O rendimento de todos os métodos químicos foi superior ao dos métodos físicos. Porém, a análise de espectros de infravermelho demonstrou que os EPS foram contaminados com os reagentes utilizados na extração e com os possíveis produtos de reações entre os EPS e os reagentes. Portanto, a escolha do método de extração de EPS não deve ser limitada apenas ao rendimento de extração, mas também deve-se considerar que o EPS pode ser contaminado pelos reagentes ou até mesmo ter suas propriedades modificadas.

Na produção de EPS fúngicos, o método mais utilizado para separar as células do produto é a centrifugação (BARBOSA et al., 2004). O EPS é geralmente recuperado do sobrenadante, isento de células, por precipitação com solvente orgânico miscível em água, como etanol, acetona e isopropanol (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). O solvente diminui a solubilidade do EPS em água, favorecendo a sua separação. Porém, durante o tratamento com solvente, proteínas e sais também podem precipitar. (VENUGOPAL, 2011). Vários procedimentos adicionais podem ser utilizados para remover esses contaminantes, tais como: reprecipitação com soluções aquosas diluídas, desproteínização química e enzimática e processos envolvendo membranas, como diálise, por exemplo. A escolha do processo de recuperação do EPS deve ser feita levando-se em consideração a pureza necessária para a sua aplicação (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Já para a quantificação de EPS e biomassa fúngica, após a separação de ambos, o método gravimétrico é o mais utilizado (PINHEIRO, 2014).

2.4 Biorreatores

Os biorreatores são amplamente utilizados com o objetivo de proporcionar as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio para que os microrganismos cresçam e produzam metabólitos de interesse (SCHÜGERL, 1987 apud DOMINGOS, 2009). Vários fatores devem ser levados em consideração para a escolha do biorreator tais como: geometria, sistema de agitação e aeração, facilidade de operação e controle, capacidade de separar o produto do meio ou dos subprodutos, consumo de energia e facilidade de limpeza no final do processo (JESUS; MOREIRA NETO; MACIEL FILHO, 2017).

Existem diversos tipos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos, dentre os quais destacam-se os tanques agitados e aerados tipo *Stirred Tank Reactor* (STR) e os sistemas agitados por aeração tipo *Airlift*, demonstrados na Figura 2.6. (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; DOMINGOS, 2009).

Figura 2.6 – Exemplos de biorreatores. (A) Reator agitado e aerado (STR) e (B) Reator *Airlift* de cilindros concêntricos.

Fonte: Adaptado de Seviour et al. (2011).

2.4.1 Biorreator STR e *Airlift*

No biorreator STR, agitadores de fluxo radial criam turbulência que garantem a homogeneidade do meio e a transferência de calor, oxigênio e nutrientes para as células. Apesar de corresponder a cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente (SCHMIDELL;

FACCIOTI, 2001), o biorreator STR apresenta desvantagens em cultivos de células sensíveis ao cisalhamento, que podem ser danificadas devido ao aumento da velocidade de agitação que, por sua vez, aumenta também a tensão de cisalhamento dentro do biorreator. No cultivo de fungos filamentosos, por exemplo, os biorreatores do tipo STR acarretam cisalhamento significativo das hifas. Além disso, ocorre a adesão das células nas pás e nos micro-orifícios dos tubos de distribuição de ar do biorreator, impedindo a distribuição homogênea de ar e nutrientes no meio de cultivo, devido à formação de zonas estagnadas.

Em cultivos em que são necessárias condições de baixo cisalhamento é recomendável a utilização de biorreatores pneumáticos, caracterizados pela ausência de agitador mecânico e nos quais a agitação é realizada por borbulhamento de um gás (normalmente ar). O reator de colunas de bolhas e o *Airlift* são os representantes mais comuns. Ambos normalmente são cilíndricos e a agitação e a aeração são promovidas por meio de alto fluxo de ar injetado através de um difusor de ar colocado no fundo do reator (JESUS; MOREIRA NETO; MACIEL FILHO, 2017). No reator de coluna de bolhas, tem-se um movimento aleatório do líquido no reator, enquanto que no *Airlift* há uma movimentação cíclica, bem definida. No reator *Airlift*, o caldo na parte inferior, de menor densidade, à medida que sobe para o topo do recipiente torna-se mais denso, devido ao desprendimento de ar, quando então desce pelas laterais do reator em um fluxo descendente, promovendo a circulação do fluido no reator (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Os biorreatores pneumáticos apresentam como vantagens a facilidade de operação e o baixo custo operacional e de manutenção, devido à ausência de peças móveis. Já a principal desvantagem é que o seu uso em cultivos de fluidos viscosos não-newtonianos não é adequado, uma vez que a viscosidade evita a formação e estabilidade da camada de bolhas homogêneas, impactando negativamente na transferência de massa gás-líquido.

Uma alternativa para superar as desvantagens dos reatores comumente utilizados, como o STR e o *Airlift*, é o uso de biorreatores híbridos que, embora não sejam ainda utilizados industrialmente, têm demonstrado bons resultados em escala laboratorial (JESUS; MOREIRA NETO; MACIEL FILHO, 2017).

2.4.2 Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento

Com o intuito de solucionar os problemas existentes nos biorreatores convencionais, desenvolveu-se o Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC), que propicia vantagens importantes para o cultivo de fungos filamentosos e outras células aderentes e sensíveis ao cisalhamento (PRATA et al., 2011).

O BAABC compreende um sistema de aeração rotatória, que permite a aeração e agitação do meio líquido de forma simultânea, evitando assim a obstrução das saídas de ar que se encontram em movimento contínuo e apresentam um maior diâmetro quando comparado aos tradicionais micro-orifícios comumente usados nos difusores de ar dos biorreatores convencionais. A distribuição das bolhas em um movimento circular contínuo promove ainda agitação adicional do meio, promovendo homogeneização contínua e dissolução eficiente de oxigênio no meio líquido. Tudo isso contribui para a inibição da formação de aglomerados no interior do biorreator e para uma redução na taxa de cisalhamento, praticamente inexistente, neste caso (PRATA et al., 2011; DOMINGOS et al., 2017).

O Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC), como mostrado na Figura 2.7, consiste em um frasco Mariotte de 14 L, com 23 cm de diâmetro e com uma saída única no fundo para amostragem. A entrada principal do frasco possui uma tampa que, como descrito na patente de Prata et al. (2011), realiza várias funções: (I) fecha a entrada principal do frasco, fornecendo uma saída para os gases de exaustão e um tubo de entrada de líquido; (II) sustenta o tubo para entrada de ar, cuja extremidade fica no interior da câmara e se comunica com os micro-orifícios do eixo rotacional; (III) sustenta um tubo de aço inoxidável, em forma de L, fixado com dois rolamentos selados de esferas. Esse tubo, que atravessa a câmara de entrada de ar, tem a abertura superior fechada e é fixado em um motor elétrico externo que realiza a rotação. Dentro da câmara de entrada de ar, o tubo em forma de L tem micro-orifícios que permitem a entrada de ar para o interior do biorreator (DOMINGOS et al., 2017).

A operação e a funcionalidade do BAABC foram verificadas por Domingos et al. (2017) no cultivo do basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora*, em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Para efeito de comparação de eficiência, o mesmo tipo de cultivo foi realizado em um reator STR convencional. Nesse estudo, verificou-se que, enquanto o biorreator STR proporcionou um acúmulo máximo de biomassa igual a 7 g/L com 12 dias de fermentação, no BAABC, com 11 dias, alcançou-se 9,1 g/L de biomassa. Quando pulsos de sacarose foram adicionados ao cultivo no BAABC, a produção alcançou 14,1 g/L. Além da maior produtividade de biomassa, o BAABC foi mais eficiente que o biorreator STR em prevenir a formação de aglomerados de micélio durante o cultivo. Observou-se também que foi possível minimizar os danos às hifas causados pelas forças de cisalhamento, comumente impostas por reatores agitados por pás como o STR (PRATA et al., 2011). Esse aspecto foi evidenciado pelo menor acúmulo de clamidósporos pelo referido fungo, fenômeno característico de quando este é cultivado em condições que provocam danos às suas hifas.

Figura 2.7 – Diagrama esquemático do BAABC: (A) Vista frontal; (B) Vista lateral; (C) Tampa do biorreator: uma vez dentro da câmara, o ar é forçado através de quatro furos no tubo "L" e cai até sua extremidade inferior.

Fonte: Adaptado de Domingos et al. (2017).

3. OBJETIVOS

Geral

Estudar a cinética de crescimento e da produção de EPS pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*, a partir de glicose e de glicerol, em um biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento (BAABC).

Específicos

- Definir, em frascos, as concentrações de fontes de carbono (glicose e glicerol), bem como as concentrações de fonte de nitrogênio (extrato de levedura) necessárias para o crescimento do fungo e maior produção de EPS;
- Estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e a produção de EPS pelo fungo, em biorreator STR, utilizando-se as mesmas concentrações de fonte de carbono (glicose e glicerol) e de fonte de nitrogênio (extrato de levedura) do ensaio em frasco que obteve a maior produção de EPS;
- Estudar a cinética de crescimento, consumo de substrato e a produção de EPS pelo fungo, em biorreator BAABC, utilizando-se as mesmas concentrações de fonte de carbono (glicose e glicerol) e de fonte de nitrogênio (extrato de levedura) do ensaio em frasco que obteve a maior produção de EPS;
- Comparar os resultados obtidos no BAABC com o biorreator STR;
- Desenvolver um sistema de controle de temperatura do meio para o BAABC;
- Realizar a caracterização parcial dos EPS produzidos a partir de glicose e de glicerol por meio de análise de Difração de raios-X (DRX) e Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Em todos os ensaios foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*), cedido pelo Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UFTPR) - campus Pato Branco. O fungo foi mantido em meio BDA (agar batata dextrose) a 4 °C.

4.2 Condições de cultivo

4.2.1 Preparo do inóculo

Uma alçada de micélio fúngico da cultura foi transferida para uma placa de Petri contendo meio BDA. Essa placa foi incubada em estufa por 96 horas a 28 °C. O micélio crescido na superfície do ágar foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de meio nutriente – Meio Mínimo de Sais de Vogel (VOGEL, 1956) – e 10 mL de solução de glicose na concentração de 50 g/L.

Os frascos Erlenmeyer foram colocados em incubadora de movimento orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Innova 4000) por 48 horas, a 180 rpm e 28 °C. A biomassa obtida foi homogeneizada, em ambiente estéril, com o auxílio de um mixer, por 30 segundos e, em seguida, centrifugada. Para os ensaios em frascos, a centrifugação foi realizada por 30 minutos a 1500 x g (CENTRIBIO/Modelo TDL80-2B). Para os ensaios em biorreator, nos quais foi necessário um volume maior de inóculo, a centrifugação foi realizada por 30 minutos a 1900 x g (DAMON/IEC DIVISION/CRU-5000). Em ambos os casos, a biomassa obtida foi então diluída até se obter uma suspensão com absorbância entre 0,4 e 0,5, a 400 nm, conforme descrito por Steluti et al. (2004), com adaptações.

4.2.2 Ensaios de fermentação em frascos agitados

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultivo e 5 mL de suspensão celular obtida conforme descrito no item 4.2.1. Os frascos foram colocados em uma incubadora de movimento orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Innova 4000) operando a 28 °C e 180 rpm. Na formulação do meio de cultivo utilizaram-se:

K_2HPO_4 (2 g/L) e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/L) como fonte de minerais; extrato de levedura como fonte de nitrogênio; e glicose ou glicerol como fonte de carbono. Tanto a fonte de nitrogênio quanto as fontes de carbono foram avaliadas em diferentes concentrações, como será apresentado no item 4.3.2. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,0 com solução de HCl 5 mol/L.

Os ensaios foram realizados em duplicata e, a cada 24 horas, 2 frascos foram retirados da incubadora como amostra. Os cultivos foram interrompidos com 72 horas. As amostras foram analisadas com relação ao crescimento celular, consumo de substrato, produção de EPS e pH do meio de cultivo.

4.2.3 Ensaios de fermentação em biorreator STR

Os ensaios em biorreator STR foram realizados utilizando-se um equipamento BIOFLO III (New Brunswick Sci. Co.) de 1,25 L de volume útil, com controle de temperatura, agitação e aeração. O processo foi operado em sistema descontínuo, empregando-se um volume de meio de 1,0 L, temperatura de 28 °C e pH inicial igual a 5,0. A agitação foi mantida em 400 rpm e a aeração utilizada foi de 0,8 vvm. A inoculação foi realizada com 50 mL de suspensão celular, obtida conforme descrito no item 4.2.1.

4.2.4 Ensaios de fermentação em BAABC

Os ensaios em BCCA foram realizados em um frasco Mariotte de 14 L de volume útil. O processo foi operado em sistema descontínuo, empregando-se um volume de meio de 10 L e pH inicial igual a 5,0. A agitação foi de 300 rpm e a aeração de 0,8 vvm. A inoculação foi realizada utilizando-se 500 mL de suspensão celular, obtida conforme descrito no item 4.2.1.

Em todos os ensaios utilizou-se um sistema de amostragem automático, composto por duas bombas peristálticas (VELP Scientifica - SP311) acopladas a dois temporizadores (BRASFORT). A primeira bomba foi programada tanto para empurrar ar estéril pela mangueira antes da retirada da amostra quanto para empurrar o meio restante na mangueira de volta para o biorreator ao final do tempo de retirada de amostra. A segunda bomba foi programada para succionar a amostra por um intervalo de tempo determinado previamente de acordo com a quantidade de amostra a ser coletada. Esse sistema permitiu não só a retirada de amostras programadas como também contribuiu para diminuir o risco de contaminação do meio de cultivo e para eliminar a necessidade de descarte de meio antes da amostragem.

Nos ensaios sem controle de temperatura, o BAABC foi mantido a temperatura ambiente, de modo que a troca de calor ocorreu naturalmente.

Nos ensaios com controle de temperatura, utilizou-se um modelo de termostato digital TIC-17RGTi (controle de calibre completo) com um sensor de temperatura do tipo termistor. O terminal de carga do termostato foi conectado a uma resistência elétrica no frasco do BAABC. A resistência, em forma de colar (construído em aço inox), funciona com voltagem de 110 V e tem uma potência de 400 W. Seu diâmetro é de 23 cm, próximo ao diâmetro externo do frasco correspondente ao biorreator, e largura é de 9,8 cm, tendo sido fixada em torno do biorreator utilizando-se dois parafusos com porca, na posição horizontal, ligando suas duas extremidades. O sensor de temperatura do termostato foi colocado em contato com o meio passando-se este por um dos orifícios da tampa do biorreator.

4.3 Sequência experimental

4.3.1 Teste dos substratos

Primeiramente foi realizado um teste, em frascos agitados, para verificar a viabilidade de crescimento e produção de EPS pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* a partir de glicerol puro e glicerol residual proveniente da indústria do biodiesel. Também foi feito um ensaio com glicose, como parâmetro de comparação. Os substratos foram testados na concentração de 20 g/L e a concentração de extrato de levedura utilizada foi de 2 g/L.

4.3.2 Definição da concentração de substrato e de fonte de nitrogênio

Um estudo foi realizado, em frascos agitados, para definir a faixa de concentração de glicose e glicerol, bem como a de extrato de levedura, necessária para o crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e para maior produção de EPS. Como ponto de partida, foram testadas as concentrações de 10 g/L, 30 g/L e 50 g/L de substrato e 3 g/L, 6 g/L e 12 g/L de fonte de nitrogênio. Posteriormente, foram realizados 2 ensaios adicionais: ensaio S (75 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura) e ensaio T (75 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura). Os ensaios nos quais foi utilizada glicose como fonte de carbono estão descritos na Tabela 4.1 e os que continham glicerol encontram-se descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.1 – Denominação dos meios para os ensaios de cultivo de *L. theobromae* visando o estudo da influência da concentração de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio sobre a produção de EPS em frascos, empregando-se glicose como substrato.

Ensaio	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)
A	10	3
B	10	6
C	10	12
D	30	3
E	30	6
F	30	12
G	50	3
H	50	6
I	50	12
S	75	3

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 4.2 – Denominação dos meios para os ensaios de cultivo de *L. theobromae* visando o estudo da influência da concentração de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio sobre a produção de EPS em frascos, empregando-se glicerol como substrato.

Meio	Glicerol (g/L)	Extrato de levedura (g/L)
J	10	3
K	10	6
L	10	12
M	30	3
N	30	6
O	30	12
P	50	3
Q	50	6
R	50	12
T	75	12

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Ensaios em biorreator STR e BAABC

O fungo *Lasioidiplodia theobromae* foi cultivado, tanto em biorreator STR quanto em BAABC, utilizando-se as mesmas concentrações de glicose e de extrato de levedura do ensaio em frasco que proporcionou a maior produção de EPS. Realizou-se também o cultivo do fungo, tanto em biorreator STR quanto em BAABC, utilizando-se as mesmas concentrações de glicerol e de extrato de levedura do ensaio em frasco que proporcionou a maior produção de EPS.

Assim, foi possível comparar o crescimento celular, consumo de substrato (tanto glicose quanto glicerol) e a produção de EPS pelo fungo nos dois biorreatores estudados.

4.3.4 Caracterização do EPS obtidos

Os EPS recuperados dos cultivos nos ensaios em biorreator STR e BAABC foram comparados por meio de análises de Microscopia Óptica, Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios-X.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Concentração celular

A concentração celular foi quantificada por massa seca. As amostras dos ensaios com glicose foram primeiramente diluídas na proporção 1:2 para diminuir a viscosidade. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 1500 x g (CENTRIBIO/Modelo TDL80-2B) ou por 30 minutos a 1900 x g (DAMON/IEC DIVISION/CRU-5000) e depois lavadas com água deionizada. As amostras da fermentação com glicerol não precisaram ser diluídas antes de serem centrifugadas. Após serem lavadas, as amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana e secas em estufa (FANEM/Modelo 315 SE), a 70 °C, até que a massa permanecesse constante. A concentração celular, em g/L, foi calculada pela diferença de massas entre o cadinho com as células secas e o cadinho vazio.

4.4.2 Concentração de EPS

A quantificação do EPS produzido foi realizada por precipitação com 4 volumes de etanol 92,8° GL. O álcool a -10 °C foi adicionado ao sobrenadante resultante da centrifugação do meio fermentado, e a mistura deixada em repouso durante 24 horas a 4 °C (Figura 4.1 A). Após a precipitação, o EPS foi recuperado por meio de filtração utilizando-se papel de filtro qualitativo e bomba de vácuo (Figura 4.1 B). Em seguida, o papel foi seco em estufa a 70 °C até massa constante.

O cálculo da concentração de EPS, em g/L, feito pela diferença de massa entre o papel de filtro com o EPS e o papel de filtro previamente seco em estufa a 70 °C.

Figura 4.1 – (A) EPS precipitado após a adição de etanol e (B) EPS obtido após a filtração.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.3 Concentração das fontes de carbono empregadas

As concentrações de glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Waters), empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 °C, eluente ácido sulfúrico 0,005 mol/L, fluxo do eluente 0,6 ml/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Seppak C18 (MILLIPORE) e o eluente, antes do uso, filtrado à vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida degaseificado com ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

As concentrações de glicose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (nas mesmas condições descritas para a análise de glicerol) ou pelo método de DNS, seguindo o descrito por Bernfeld (1955), com modificações introduzidas por Miller (1959) e por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

4.4.4 Diálise e liofilização do EPS

Os EPS recuperados dos cultivos nos ensaios em biorreator STR e BAABC foram dialisados contra água destilada sob refrigeração (4 °C), utilizando-se um saco confeccionado com papel celofane. Os EPS foram submetidos à diálise por, no mínimo, 2 semanas, com trocas constantes de água. Após a diálise, os EPS foram liofilizados em um liofilizador de bancada (Terroni LT 600), instalado no Departamento de Engenharia Química da EEL-USP.

4.4.5 Caracterização Morfológica dos EPS

A caracterização morfológica dos EPS foi realizada no Departamento de Materiais da EEL – USP, utilizando-se um microscópio Leica, modelo DM-IRM, com câmera digital acoplada e *software* de aquisição de imagens. Utilizou-se o programa IMAGE-J para o processamento das imagens.

4.4.6 Obtenção dos padrões de Difração de Raios-X (DRX)

Para a obtenção dos padrões de DRX das amostras de EPS foi utilizado um difratômetro PANalytical Empyrean, instalado no Departamento de Engenharia de Materiais da EEL-USP. Utilizou-se radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, passo angular de $0,02^\circ$ e tempo de coleta de 60 segundos/ passo.

4.4.7 Obtenção dos espectros de Infravermelho

Os espectros de infravermelho dos EPS foram obtidos em Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (Perkin Elmer Spectrum™ GX - Shelton, USA) instalado no Departamento de Biotecnologia da EEL-USP. As análises foram realizadas na região de $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$, utilizando o método de discos de KBr.

4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

O perfil fermentativo do fungo foi avaliado pelas cinéticas de crescimento de biomassa, de consumo de substrato, perfil de pH e pela produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* em cultivos submersos.

Os parâmetros cinéticos a seguir foram calculados de acordo com as equações 1-7:

a) Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)

$Y_{X/S}$ foi calculado como a razão entre biomassa produzida por substrato consumido:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{biomassa máxima (g/L)}}{\text{substrato consumido (g/L)}} \quad (1)$$

b) Fator de conversão de substrato em EPS ($Y_{P/S}$)

O $Y_{P/S}$ foi calculado pela relação entre a quantidade de EPS produzido e o substrato consumido:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{EPS máximo (g/L)}}{\text{substrato consumido (g/L)}} \quad (2)$$

c) Produto formado por unidade de células ($Y_{P/X}$)

$Y_{P/X}$ foi calculado como a quantidade de EPS produzido sobre a biomassa formada:

$$Y_{P/X} = \frac{\text{concentração máxima de EPS (g/L)}}{\text{biomassa produzida (g/L)}} \quad (3)$$

d) Percentual de consumo de substrato (Y_C)

Y_C foi calculado pela razão entre o substrato consumido e seu conteúdo inicial:

$$Y_C = \frac{\text{substrato consumido (g/L)}}{\text{substrato inicial (g/L)}} \times 100 \quad (4)$$

e) Produtividade volumétrica de biomassa (Q_X)

Q_X foi calculada como a razão entre a máxima concentração de biomassa e o tempo de fermentação:

$$Q_X = \frac{\text{concentração máxima de biomassa (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (5)$$

f) Produtividade volumétrica de EPS (Q_P)

Q_P foi calculada como a relação entre a concentração máxima de EPS e o tempo de fermentação:

$$Q_P = \frac{\text{concentração máxima de EPS (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (6)$$

g) Velocidade de consumo de substrato (Q_S)

Q_S foi calculada como a razão entre a o substrato consumido e o tempo da fermentação:

$$Q_S = \frac{\text{substrato consumido (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (7)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste dos substratos

Primeiramente foi realizado um teste, em frascos agitados, para se verificar a viabilidade de crescimento e produção de EPS pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* a partir dos seguintes substratos: glicose, glicerol puro e glicerol residual proveniente da indústria do biodiesel. Não foram encontradas na literatura informações sobre o cultivo de *L. theobromae* utilizando-se glicerol puro ou glicerol residual como fonte de carbono. Apenas um outro trabalho realizado anteriormente pelo próprio grupo de pesquisa (FREITAS, 2014).

Os substratos foram testados na concentração de 20 g/L e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.1 (valores máximos).

Figura 5.1 – Valores máximos de concentração de biomassa e de EPS obtidos durante o cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicose, glicerol puro e glicerol residual como substratos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em todos os cultivos observou-se crescimento celular e produção de EPS pelo fungo. No cultivo no qual foi utilizada a glicose como fonte de carbono, a produção de biomassa foi muito superior quando comparada às demais fontes (19,02 g/L), assim como a produção de EPS (2,90 g/L). Destaca-se também que a concentração máxima de EPS no cultivo com glicose foi obtida com 48 horas de cultivo, enquanto que nos ensaios com glicerol, tanto puro quanto residual, a concentração máxima de biopolímero foi obtida com 72 horas.

A produção de biomassa nos ensaios em que se utilizou glicerol puro foi similar a obtida com glicerol residual, porém o cultivo em glicerol puro proporcionou uma produção de EPS mais de três vezes superior à obtida utilizando-se glicerol residual. No entanto, há, na literatura, trabalhos com outros fungos nos quais o glicerol residual proporcionou maior concentração de produto que o glicerol puro. Zhou et al. (2014), utilizando o fungo filamentoso *Rhizopus arrhizus* e glicerol residual da indústria do biodiesel, obtiveram cerca de 2 vezes mais ácido fumárico em comparação à concentração obtida com glicerol puro. Freitas et al. (2010) utilizaram, separadamente, glicerol puro e glicerol residual de biodiesel como fontes de carbono para a produção de EPS por *Pseudomonas oleovorans* em biorreator e observaram que os valores de produtividade e rendimento em EPS foram maiores quando utilizou-se glicerol residual.

Por se tratar de um substrato residual, proveniente da indústria do biodiesel, a composição do glicerol residual é complexa e variável. O tratamento realizado, por acidificação, permite a remoção de alguns compostos, como ácidos graxos, que podem ser tóxicos ao microrganismo, mas não elimina diversos outros componentes que também podem ser prejudiciais ao processo. Possivelmente, o glicerol residual utilizado possui compostos que não inibem consideravelmente o crescimento do fungo em estudo, porém prejudicam a produção de EPS por este. Além disso, salienta-se que os casos mencionados tratam-se de outros tipos de microrganismos e, em relação ao caso de fungo filamentoso, trata-se de um gênero diferente do empregado no presente trabalho.

5.2 Ensaios para definição das concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio

Foi realizado um estudo, em frascos agitados, com o objetivo de definir as concentrações de glicose e de glicerol puro, bem como a de extrato de levedura, necessárias para a maior produção de EPS pelo fungo *L. theobromae*. Esses ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.2.2.

Nos ensaios de A a I utilizou-se glicose como fonte de carbono e nos ensaios de J a R utilizou-se glicerol puro. Os resultados de concentração máxima de biomassa e produção de EPS dos ensaios de A a I estão apresentados na Figura 5.2.

Verifica-se que a condição do ensaio G foi a que proporcionou tanto a maior produção de biomassa ($31,74 \pm 0,59$ g/L) quanto a maior produção de EPS ($6,49 \pm 0,03$ g/L). Cunha et al. (2012), utilizando o fungo *L. theobromae*, constataram que, aparentemente, há uma correlação entre o crescimento celular e a produção do EPS para este fungo. Quando os autores

utilizaram extrato de levedura como fonte orgânica de nitrogênio, houve maior produção tanto de biomassa quanto de EPS, enquanto que a utilização de uréia, por sua vez, proporcionou o menor crescimento celular e a menor produção de EPS, quando comparados com as demais fontes de nitrogênio orgânicas testadas. Bae et al. (2000) também comprovaram a existência de proporcionalidade entre a produção de EPS e o crescimento micelial do fungo *Paecilomyces japonica*. Experimentos realizados pelos autores, utilizando diferentes concentrações de maltose, demonstraram que o maior crescimento micelial foi obtido com 30 g/L de maltose, concomitantemente com a maior produção de EPS. Tal relação foi verificada tanto em ensaios em frasco quanto em biorreator.

Figura 5.2 – Valores máximos de biomassa e produção de EPS no cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicose como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L.) como fonte de nitrogênio, ambos em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Cunha et al. (2012), no cultivo em frasco do fungo *L. theobromae*, utilizando 20 g/L de glicose e 2 g/L de extrato de levedura, obtiveram a produção de $11,26 \pm 0,48$ g/L de biomassa micelial e $2,46 \pm 0,06$ g/L de EPS. Os resultados obtidos no ensaio A do presente trabalho ($12,37 \pm 0,43$ g/L de biomassa e $2,85 \pm 0,06$ g/L de EPS) foram similares ao obtido por aqueles autores, porém utilizando-se 10 g/L de glicose, ou seja, metade da concentração da fonte de carbono, embora com 50% a mais de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Os valores de concentração de biomassa micelial, produção de EPS e consumo de substrato obtidos com o ensaio G, que foi o que apresentou maior produção de biomassa e EPS, estão apresentados na Figura 5.3. Nota-se que a partir de 48 horas de cultivo houve pouca produção tanto de biomassa quanto de EPS. Tal estagnação pode ser atribuída ao aumento da viscosidade do meio, nitidamente observado visualmente. Consequentemente, houve menor transferência de massa e principalmente oxigênio no meio de cultivo, limitando tanto o crescimento quanto a produção de EPS. Cabe salientar que no tempo de 48 horas mencionado não havia limitação de substrato no meio e um baixo suprimento de nitrogênio é considerado favorável à produção de EPS, conforme relatado por Nampoothiri et al. (2003) e Barbosa et al. (2004), por exemplo.

A concentração máxima de biomassa de $31,74 \pm 0,59$ g/L obtida com o ensaio G foi superior à de $15,4 \pm 2,2$ g/L observada por Steluti et al. (2004), cultivando *Botryosphaeria* sp. e também superior à de $16,7 \pm 1,5$ g/L encontrada por Oliveira (2014), cultivando *L. theobromae*, ambos utilizando 50 g/L de glicose, em frascos agitados.

Figura 5.3 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae* em frasco agitado, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura (Ensaio G).

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando-se a produção de EPS, observa-se que a concentração de $6,49 \pm 0,03$ g/L obtida com o ensaio G foi mais de 2 vezes superior à de $2,8 \pm 0,5$ g/L verificada por Steluti et al. (2004), e quase 4 vezes superior à de $1,7 \pm 0,4$ g/L obtida por Oliveira (2014), utilizando Meio Mínimo de Vogel e 50 g/L de glicose. Quando Cunha et al. (2012) utilizaram 40 g/L de

glicose e 2 g/L de extrato de levedura, também em frasco, obtiveram $7,01 \pm 0,07$ g/L de EPS, valor um pouco superior à concentração de EPS obtida no ensaio G, porém com um tempo maior de cultivo (120 horas).

Nas primeiras 24 horas houve o consumo de 46% da glicose presente no meio de cultivo e, no final das 72 horas, a glicose foi quase totalmente consumida, restando apenas $1,36 \pm 0,9$ g/L, que corresponde a 2,5% da concentração de glicose inicial (Figura 5.3). Steluti et al. (2004), no cultivo de *Botryosphaeria* sp., com 50 g/L de glicose, também observaram uma presença mínima de açúcar residual no meio com 72 horas ($2,4 \pm 0,8$ g/L). Já Cunha et al. (2012), utilizando 40 g/L de glicose, com 120 horas, observou que restou cerca de 30% do substrato no meio de cultivo. Nesse caso, como se trata do mesmo fungo e da mesma fonte de carbono (Cunha et al., 2012 e ensaio G do presente trabalho), uma possível explicação para a diferença de substrato residual observada é a concentração maior de fonte de nitrogênio utilizada no ensaio G, que pode ter contribuído para o maior consumo de substrato, porém sem resultar maior produção de EPS (Figura 5.3).

Outra observação relevante é que no meio de cultivo do ensaio G, no qual observou-se tanto o maior crescimento celular como a maior produção de EPS, utilizou-se a maior concentração da fonte de carbono testada (50 g/L) e a menor concentração de extrato de levedura (3 g/L). Esse resultado confirma que concentrações limitantes de alguns nutrientes e excesso de carboidrato favorecem a produção de polissacarídeos (SUTHERLAND, 1979 apud SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Segundo Barbosa et al. (2004), polissacarídeos são produzidos sob condições limitantes de nitrogênio e altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de EPS. Essa última observação pode ser comprovada analisando-se os ensaios, com glicose como substrato, nos quais utilizou-se a maior concentração de extrato de levedura. Dentre os ensaios com 50 g/L de glicose, o ensaio I foi o que resultou menor concentração de EPS (Figura 5.2). Comportamento semelhante foi observado nos ensaios com 30 g/L de glicose (D, E e F), nos quais se pode observar que a menor produção de EPS ocorreu na condição do ensaio F, no qual também foi utilizada a maior concentração de fonte de nitrogênio (12 g/L).

Na Figura 5.4 encontram-se os resultados dos ensaios com glicerol como fonte de carbono (ensaios de J a R). Dentre esses ensaios, a maior produção de EPS ($3,39 \pm 0,06$ g/L) foi observada no Ensaio O, que continha 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura. No entanto, a maior concentração celular ($15,47 \pm 0,50$ g/L) foi observada no Ensaio R, no qual utilizou-se 50 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura, as maiores concentrações testadas tanto de fonte de carbono quanto de nitrogênio. Esse comportamento evidencia uma importante

diferença entre os dois substratos testados. Nos ensaios com glicerol, ao contrário do que aconteceu com os ensaios com 30 g/L e 50 g/L de glicose, quanto maior a concentração da fonte de nitrogênio, maior a produção de EPS (ensaios J, K, L; M, N, O e P, Q, R). Esse resultado indica que a limitação da fonte de nitrogênio no meio de cultivo favorece a produção de EPS a partir de glicose, mas não a partir de glicerol. Oliveira (2010), no cultivo de *Aureobasidium pullulans* para produção de pululana a partir de sacarose (açúcar cristal) e diferentes fontes de nitrogênio, também observou que, diferentemente do que é descrito na literatura, a restrição da fonte de nitrogênio não necessariamente induz a síntese polimérica. O autor testou diferentes relações C/N (5, 25, 50 e 100) empregando fontes de nitrogênio variadas (sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de amônio, uréia e levedura residual cervejeira) e as maiores concentrações de biopolímero em questão foram alcançadas quando se empregou: sulfato de amônio com a relação C/N=5, nitrato de sódio com a relação C/N=25, nitrato de amônio com a relação C/N=150, uréia com a relação C/N=25 e levedura residual cervejeira com a relação C/N=150.

Figura 5.4 – Valores máximos de biomassa e produção de EPS no cultivo de *L. theobromae*, em frascos agitados, utilizando glicerol como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L.) como fonte de nitrogênio, ambos em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pela autora.

No presente trabalho, verificou-se que, quando utilizou-se glicerol como fonte de carbono, não só a produção de biopolímero mas também o crescimento micelial foi favorecido com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio, como uma única exceção para o ensaio K. Observando-se os ensaios em que se empregaram concentrações iguais de fonte de carbono,

verifica-se que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas naqueles em que foram utilizadas a maior concentração testada de fonte de nitrogênio (ensaios L, O e R). Com base nesses resultados, conclui-se que os meios de cultivo para *L. theobromae* que contêm glicerol como fonte de carbono necessitam de uma concentração maior de fonte de nitrogênio, tanto para o fungo produzir mais biomassa quanto para produzir mais EPS, quando comparados com os meios em que se utiliza glicose. Torres et al. (2014) estudaram o impacto da concentração de glicerol e de nitrogênio na produção de EPS por *Enterobacter* A47. Os autores também concluíram que o aumento da concentração inicial de nitrogênio, no caso $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, promoveu maior crescimento celular, porém, ao contrário do ocorrido nos ensaios de J a R deste trabalho, a maior concentração de fonte de nitrogênio prejudicou a síntese de EPS. Diante do exposto, parece razoável inferir que a síntese de EPS de origem microbiana é regida por fatores ainda não compreendidos completamente, mas que diferem de um microrganismo para outro, assim como de acordo com a fonte de carbono empregada no processo.

Os valores de concentração de biomassa micelial, produção de EPS e consumo de substrato do ensaio O, que foi o que apresentou maior produção de EPS, estão apresentados na Figura 5.5.

Figura 5.5 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicerol no cultivo de *L. theobromae* em frasco agitado, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura (Ensaio O).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que tanto o maior crescimento celular quanto a maior produção de biopolímero ocorreram no tempo de 48 horas e que, no tempo de 72 horas, houve um pequeno decréscimo na concentração de ambos. O maior consumo de glicerol deu-se no intervalo de 24 a 48 horas, tempo no qual também se observou a maior produção de biomassa e de EPS. O consumo de substrato foi de 54,16%, bastante inferior ao valor de 97,5% verificado no cultivo em que se utilizou glicose como fonte de carbono (Figura 5.3), apesar de a concentração de inicial de substrato (glicerol) ter sido consideravelmente inferior.

Foi também acompanhada a variação do pH do meio durante os ensaios com glicose e glicerol, sendo os valores apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7. Pode-se afirmar que o pH variou de forma diferente para cada substrato utilizado, indicando uma atividade metabólica diferente em relação ao consumo de determinada fonte de carbono pelo fungo em estudo. Com exceção dos ensaios A, B e D, os outros meios contendo glicose apresentaram queda no pH até 24 horas de fermentação, seguida de um aumento até 48 horas de cultivo. A redução de pH possivelmente está associada à produção de ácidos orgânicos oriundos da própria atividade microbiana.

A condição do ensaio G foi a que proporcionou o maior abaixamento do pH com 24 horas (de 5,0 para 3,75). De fato, nesse cultivo foi verificado o maior acúmulo tanto de biomassa quanto de EPS. Outra observação a ser feita sobre o ensaio G é que seu pH final foi menor (4,56) que o inicial (5,0). Steluti et al. (2004) observaram esse mesmo comportamento cultivando *Botryosphaeria* sp em meios contendo glicose em diferentes concentrações iniciais (25 g/L, 50 g/L e 75 g/L), sendo que a maior redução no pH final foi observada no ensaio com 75 g/L, meio que apresentou o maior crescimento do fungo. Do mesmo modo, Lazaridou et al. (2002) relataram que no cultivo de *Aureobasidium pullulans*, para produção do exopolissacarídeo pululana, utilizando melão de beterraba, o pH do meio caiu nas primeiras 24 horas de fermentação e aumentou posteriormente. Os autores atribuíram o aumento do pH à desaminação dos aminoácidos e produção de amônia, devido ao esgotamento da fonte de nitrogênio no meio.

Ao contrário do ocorrido nos ensaios com glicose, nos ensaios com glicerol observou-se que em todos os casos houve um aumento do pH nas primeiras 24 horas de cultivo, neste caso para valores próximos a 7,0. Ao final das 72h, o pH de todos os meios de cultivo apresentou valores maiores do que o pH inicial de 5,0. Esse aumento do pH observado com 24h pode ser resultado de uma absorção seletiva pelo fungo de alguns nutrientes do meio de cultura (BARROSO; NAHAS, 2005; CARDOSO; ASSIS; NAHAS, 2009). Steluti et al. (2004) testaram 8 fontes de carbono (glicose, frutose, manose, galactose, manitol, sorbitol, lactose e sacarose) para o cultivo de *Botryosphaeria* sp em frascos agitados, e verificaram que apenas os

meios de cultura com melaço de cana e galactose apresentaram valor de pH final superior ao pH inicial.

Figura 5.6 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, dos meios referentes aos ensaios A a I, em frascos, nos quais utilizou-se glicose como fonte de carbono para a produção de EPS por *L. theobromae*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5.7 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, dos meios referentes aos ensaios J a R, em frascos, nos quais utilizou-se glicerol como fonte de carbono para a produção de EPS por *L. theobromae*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro aspecto a ser destacado em relação ao cultivo de *L. theobromae* nos meios com glicose e glicerol é a coloração destes meios ao final da fermentação. Como exemplo, na Figura 5.8 estão apresentados os aspectos do meio referente aos ensaios K, M e D. De modo

geral, tanto para glicose quanto para glicerol, os meios que continham a menor concentração de fonte de nitrogênio apresentaram coloração acinzentada (Figura 5.8 B) ou azulada (Figura 5.8 C), enquanto que os demais meios não apresentaram alteração, permanecendo com a coloração amarelada inicial devido ao extrato de levedura (Figura 5.8 A).

Figura 5.8 – Aspecto da coloração dos meios de cultivo após o crescimento de *L. theobromae*: (A) amarelado; (B) acinzentado e (C) azulado.

Fonte: Elaborada pela autora.

A coloração acinzentada dos meios pode ser atribuída à produção de melanina pelo fungo, em virtude da condição de estresse ao qual este microrganismo foi submetido (DONG; YAO, 2012; BUTLER; DAY, 1998), principalmente devido à falta de fonte de nitrogênio no meio de cultivo. Nunes (2008) também observou coloração azulada no cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* quando utilizou 39 g/L glicose e 1 g/L de peptona. A coloração escura ou azulada do meio não é uma característica desejável, já que tem influência direta na cor do EPS recuperado, podendo aumentar o custo do produto devido a necessidade de etapas adicionais para remoção de contaminantes do EPS produzido (OLIVEIRA, 2014).

Outra observação importante a ser feita é que, visualmente, as características dos meios de cultivo contendo glicose foram diferentes das apresentadas pelos meios contendo glicerol. Os meios com glicose apresentaram maior viscosidade ao final da fermentação e, por isso, foi necessário diluí-los antes de iniciar o tratamento das amostras, procedimento que não foi necessário nos meios contendo glicerol. Observou-se também diferenças entre os biopolímeros produzidos já na etapa de adição de etanol para precipitação do EPS. Os EPS recuperados dos meios contendo glicose formaram um corpo único, com aparência de um gel consistente,

podendo ser facilmente recuperados. Já os EPS recuperados dos meios com glicerol eram mais frágeis, dificultando a sua separação. Em alguns casos, os EPS do meio com glicerol aparentemente precipitaram na forma de flocos, aderidos possivelmente nas proteínas que também precipitaram com a adição de etanol. Segundo Corradi da Silva et al. (2006), a fonte de carbono determina não só a quantidade de biopolímero formado, mas também as suas características. Portanto, tais diferenças de viscosidade do meio de cultivo e de consistência do EPS podem ser atribuídas às características dos EPS formados a partir das duas diferentes fontes de carbono. Para tentar esclarecer o motivo das diferenças observadas visualmente, análises adicionais foram feitas com o objetivo de realizar, parcialmente, a caracterização do EPS produzido pelo fungo a partir das diferentes fontes de carbono. Os resultados, assim como a avaliação dessa caracterização, encontram-se no item 5.5.

Os parâmetros cinéticos empregados para avaliar o perfil fermentativo de *L. theobromae* foram: percentual de consumo de substrato (Y_C), fator de conversão de substrato em EPS ($Y_{P/S}$) e fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$). Os valores calculados estão apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2, para os ensaios com glicose e glicerol, respectivamente. Em todos os ensaios nos quais utilizou-se glicose como substrato houve consumo total da fonte de carbono, com exceção do ensaio G, que apresentou 1,36 g/L de glicose residual no meio de cultivo. Já nos ensaios contendo glicerol, em nenhum houve consumo total do substrato, sendo que a condição do ensaio J foi a que proporcionou o maior consumo (76,32%) e a do ensaio R a que proporcionou o menor consumo (22,36%), mesmo tendo apresentado o maior crescimento celular ($15,47 \pm 0,5$ g/L).

Dentre os ensaios com glicose, o maior $Y_{P/S}$ observado foi de 0,43 g/g (ensaio C), valor superior ao $Y_{P/S}$ de 0,25 g/g obtido por Cunha et al. (2012) utilizando 40 g/L de glicose e 2 g/L de extrato de levedura, em frascos agitados, com o fungo *L. theobromae*. O ensaio C também foi o que resultou o maior valor de $Y_{X/S}$ (1,61 g/L), valor bastante superior ao $Y_{X/S}$ de 0,62 g/g obtido por Cunha et al. (2012). É interessante notar que quanto mais elevadas as concentrações de substrato, considerando a glicose, menor é a conversão substrato em células ($Y_{X/S}$), independente da concentração da fonte de nitrogênio. Além disso, verifica-se que a concentração da fonte de nitrogênio não apresentou efeito sobre esse parâmetro (ensaios A, B e C; D, E e F; G, H, I, Tabela 5.1). Situação semelhante pode-se constatar para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), embora com valores mais próximos para 30 e 50 g/L de glicose. Assim, condições que proporcionaram uma menor conversão de substrato em células não proporcionaram uma maior conversão de substrato em produto. Tal fato indica a associação

entre crescimento e formação de produto, para o caso do fungo em estudo, conforme mencionado anteriormente, com base em dados da literatura.

Tabela 5.1 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae*, em frascos agitados, em meios com diferentes concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio, utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Meio	S (g/L)	EL (g/L)	Y _C (%)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)
A	10	3	100	0,27	1,18
B	10	6	100	0,25	1,47
C	10	12	100	0,43	1,61
D	30	3	100	0,18	0,80
E	30	6	100	0,13	0,79
F	30	12	100	0,11	0,81
G	50	3	97,5	0,12	0,60
H	50	6	100	0,12	0,61
I	50	12	100	0,08	0,60

S – Substrato; EL – Extrato de Levedura; Y_C - Percentual de consumo de substrato; Y_{P/X} - Produto formado por unidade de células; Y_{X/S} - Fator de conversão de substrato em biomassa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae*, em frascos agitados, em meios com diferentes concentrações de substrato e de fonte de nitrogênio, utilizando-se glicerol como fonte de carbono.

Meio	S (g/L)	EL (g/L)	Y _C (%)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)
J	10	3	76,32	0,20	0,52
K	10	6	34,64	0,47	0,89
L	10	12	36,73	0,75	1,30
M	30	3	40,14	0,17	0,38
N	30	6	37,98	0,27	0,68
O	30	12	54,16	0,23	0,75
P	50	3	27,99	0,17	0,54
Q	50	6	29,22	0,20	0,71
R	50	12	22,36	0,28	1,33

S – Substrato; EL – Extrato de Levedura; Y_C - Percentual de consumo de substrato; Y_{P/X} - Produto formado por unidade de células; Y_{X/S} - Fator de conversão de substrato em biomassa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando-se os ensaios com meio contendo glicerol, o maior valor de Y_{P/S} foi obtido no ensaio L (0,75 g/g) que, assim como o ensaio C, continha em sua composição 10 g/L de fonte de carbono e 12 g/L de fonte de nitrogênio. Ou seja, aparentemente a relação C/N proporcionada por tais concentrações de fonte de carbono e de nitrogênio levaram à maior conversão de substrato em células e de substrato em produto, pelo fungo *L. theobromae*. Sob o

ponto de vista da produção de EPS, os resultados indicam que seu aumento seria alcançado estabelecendo-se condições que levam a maiores valores de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ em meio com elevada concentração de substrato. No caso, o mais evidente, com relação a fungo filamentosos, seria estabelecer condições que proporcionem melhor transferência de oxigênio.

Quanto aos valores de $Y_{X/S}$, algumas considerações devem ser feitas. Durante o tratamento das amostras, observou-se que as amostras utilizadas na determinação do crescimento celular ainda continham EPS, mesmo após a etapa de lavagem. Com isso, os valores de biomassa de alguns ensaios foram superestimados. Tal fato pode ser comprovado observando-se os valores de biomassa produzida e de glicerol consumido. No ensaio C, por exemplo, o valor de biomassa produzida (17,42 g/L) foi superior ao de glicose consumida (10,82 g/L), resultando um valor de $Y_{X/S}$ igual a 1,61 g/g. O mesmo aconteceu com outros ensaios nos quais foram utilizados tanto glicose quanto glicerol. Consequentemente, uma vez que os valores de $Y_{X/S}$ foram superestimados, os valores de $Y_{P/S}$ foram subestimados, tendo em vista que parte do produto formado deixou de ser computada no cálculo, e o consumo de substrato foi o mesmo. Contudo, como os valores foram empregados apenas para fins comparativos, nesta etapa do presente trabalho, entende-se que não houve prejuízo em relação às discussões apresentadas. Para evitar que esse problema ocorresse nos tratamentos de amostras posteriores, a metodologia de tratamento de amostras foi modificada, como será descrito posteriormente.

A partir dos ensaios realizados, concluiu-se que os meios que com glicerol como fonte de carbono necessitam de uma concentração maior de fonte de nitrogênio, tanto para produzirem mais biomassa quanto EPS, quando comparados com os meios que utilizam glicose. Como nos ensaios com glicose os maiores valores de biomassa e EPS foram verificados quando se utilizou a maior concentração de substrato e menor concentração de fonte de nitrogênio, decidiu-se testar uma concentração maior de glicose, mantendo-se a menor concentração de extrato de levedura testada e também uma concentração maior de glicerol, porém com a maior concentração de extrato de levedura testada.

Foi realizado então o ensaio S, no qual utilizou-se 75 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.2. A maior concentração de biomassa encontrada foi $21,66 \pm 1,2$ g/L, com 72 horas de cultivo, valor inferior à concentração de $31,74 \pm 0,59$ g/L obtida no ensaio G. A concentração máxima de EPS, de $5,0 \pm 0,25$ g/L, foi observada também no tempo de 72 horas. Essa concentração é inferior à de $6,49 \pm 0,03$ g/L obtida também no tempo de 72 horas no ensaio G, no qual foram utilizados 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura. Portanto, dentre os ensaios realizados com glicose, o que produziu

mais EPS foi o ensaio G, cujas concentrações de fonte de carbono e nitrogênio foram utilizadas nos ensaios subsequentes tanto no biorreator STR quanto no BAABC.

Realizou-se também o ensaio T, no qual foi utilizado 75 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura. A maior concentração de biomassa ($3,42 \pm 0,41$ g/L) foi obtida com 72 horas de fermentação. A maior concentração de EPS obtida foi de $0,75 \pm 0,21$ g/L, bastante inferior à de $3,39 \pm 0,06$ g/L obtida pelo ensaio O, no qual foram utilizados 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura. Portanto, o meio do cultivo do ensaio O foi escolhido para os ensaios em biorreator STR e BAABC.

O fato de não ter havido sucesso, ou seja, melhora da produção de EPS quando se empregou uma maior concentração de substrato, no caso da glicose, e maior concentração de substrato e maior concentração de extrato de levedura, no caso do glicerol, indica que outros fatores, além dos avaliados, interferem no bioprocessamento em questão, tendo em vista que estas eram as condições que apontavam para uma tendência de aumento da produção (Figura 5.2 e Figura 5.4). Novamente pode-se considerar a transferência de oxigênio como uma condição a ser estudada mais detalhadamente.

Como mencionado anteriormente, nos ensaios realizados, observou-se visualmente a presença de EPS nas amostras de quantificação de biomassa. Portanto, foram realizadas algumas modificações na metodologia de tratamento das amostras, tendo como objetivo diminuir a presença de EPS na biomassa e aumentar a recuperação do biopolímero. Para tanto, empregaram-se etapas adicionais de lavagem da biomassa e a temperatura da água, que antes era utilizada a temperatura ambiente, passou a ser de 60 °C. Anteriormente, na quantificação de EPS, somente o biopolímero presente no sobrenadante da primeira centrifugação era quantificado. Em testes realizados com 2 lavagens da biomassa, observou-se a diminuição de até 27% da biomassa e um aumento de até 55% de biopolímero recuperado quando se quantificou também o EPS presente no sobrenadante das lavagens. Portanto, nos ensaios em biorreatores, o EPS presente nas lavagens da biomassa também passou a ser quantificado.

5.3 Ensaios em biorreator STR e BAABC com glicose como substrato

O ensaio G, no qual utilizaram-se 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura, foi o que proporcionou o melhor resultado quanto à produção de EPS, sendo, portanto, o meio de cultivo escolhido para os ensaios no biorreator STR e BAABC. Os cultivos foram realizados conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4.

5.3.1 Ensaio em biorreator STR

O perfil de crescimento do fungo, consumo de glicose e produção de EPS, durante o cultivo de *L. theobromae* em biorreator STR, estão apresentados na Figura 5.9.

Figura 5.9 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae*, em biorreator STR, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A maior concentração de biomassa observada foi de $5,08 \pm 0,71$ g/L, com 28 horas de fermentação. No ensaio G, realizado em frasco, cujo meio continha a mesma composição, o crescimento celular máximo observado foi de $31,74 \pm 0,59$ g/L de biomassa com 72 horas. Portanto, o crescimento em biorreator STR foi muito inferior ao observado em frasco agitado, mesmo levando em consideração que o valor máximo de biomassa obtida no frasco possa ter sido superestimada devido à adesão de EPS na biomassa. Cunha et al. (2012) obtiveram $11,9 \pm 0,57$ g/L de biomassa fúngica utilizando meio com 40 g/L de glicose, com 120 horas, em biorreator STR. Os autores também observaram que a biomassa fúngica obtida em biorreator STR foi inferior à obtida em frascos agitados ($17,3 \pm 0,8$ g/L).

A maior concentração de EPS obtida ($0,70 \pm 0,12$ g/L) foi muito inferior à obtida em frascos agitados ($6,49 \pm 0,03$ g/L) e também muito inferior à concentração de $5,70 \pm 0,15$ g/L observada por Cunha et al. (2012) no cultivo de *L. theobromae* em biorreator STR utilizando glicose como substrato. Verificou-se também que a partir de 18 horas a concentração de EPS

praticamente não aumentou, mantendo-se constante. Mesmo com o controle de um maior número de parâmetros no biorreator STR, a menor concentração celular e de produto obtidos podem ser atribuídos ao cisalhamento provocado pelas pás da turbina e à baixa transferência de oxigênio que, por sua vez, pode ser atribuída à alta viscosidade do meio. Com 18 horas, praticamente não se observou movimento no meio de cultivo, havendo apenas um pouco de movimento na parte inferior da cuba do fermentador, próximo à turbina de agitação. Com 28 horas já não foi mais possível succionar a amostra com a bomba peristáltica do amostrador automático e, como já não havia nenhum movimento aparente do meio, a fermentação foi encerrada. Como pode ser observado na Figura 5.9, o fungo ainda não havia alcançado a fase estacionária de crescimento, na qual, segundo Steluti et al. (2014) há a maior produção de EPS. Ou seja, aparentemente o meio de fermentação e as condições iniciais eram adequadas, porém as alterações ocorridas pela ação do próprio fungo inviabilizaram o processo.

Os parâmetros cinéticos calculados podem ser visualizados na Tabela 5.3. Os valores evidenciam que, no biorreator STR, o fungo foi menos eficiente tanto na produção de biomassa quanto na produção de EPS. O valor de $Y_{P/S}$ obtido no biorreator STR ($0,03 \pm 0,01$ g/g) foi 4 vezes inferior ao obtido no ensaio em frasco ($0,12$ g/g), enquanto que o $Y_{X/S}$ ($0,19 \pm 0,03$) foi cerca de 3 vezes inferior ao observado em frasco ($0,60$ g/g). Ressalta-se que a velocidade global de consumo de substrato foi elevada, indicando que, possivelmente, nas condições estudadas, o metabolismo de outras substâncias pode ter sido priorizado ao invés do crescimento celular e principalmente da produção de EPS, uma vez que houve um consumo de glicerol similar ao observado em frasco, no qual a produção de biomassa e, principalmente, de EPS foram superiores.

O consumo de glicose foi de 48,8% com 28 horas, bastante similar aos 45,9% do observado no ensaio em frasco, com 24 horas, utilizando-se o mesmo meio de cultivo. No entanto, o consumo de substrato em frasco, com 72 horas de fermentação, foi praticamente total (97,5%, Tabela 5.1) e no presente ensaio em biorreator foi de aproximadamente 50 %.

Na Figura 5.10, nota-se que nas primeiras horas houve uma diminuição no pH, assim como aconteceu nos ensaios em frascos com glicose como substrato. Com 24 horas, o pH observado foi de 3,99. Similarmente, o pH observado com 24 horas no ensaio em frasco foi de 3,75 (Figura 5.6). O decréscimo ligeiramente inferior observado no biorreator STR pode ser atribuído ao menor crescimento e, conseqüentemente, a menor produção de ácidos orgânicos oriundos da atividade respiratória. Da mesma forma, não ocorreu a elevação do pH após o tempo de 24 horas, como observado nos ensaios em frasco, possivelmente devido aos mesmos fatores que levaram à estagnação do consumo de substrato (Figura 5.9).

Tabela 5.3 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae* utilizando glicose como fonte de carbono em biorreator STR.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_x (g/L)	$5,08 \pm 0,71$
P_p (g/L)	$0,70 \pm 0,12$
$Y_{x/s}$ (g/g)	$0,19 \pm 0,03$
$Y_{p/s}$ (g/g)	$0,03 \pm 0,01$
$Y_{p/x}$ (g/g)	$0,14 \pm 0,04$
Y_c (%)	$48,78 \pm 0,35$
Q_x (g/L.h)	$0,18 \pm 0,03$
Q_p (g/L.h)	$0,03 \pm 0,01$
Q_s (g/L.h)	$0,98 \pm 0,01$

P_X - Produção de biomassa; P_P - Produção de EPS; $Y_{X/S}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{P/X}$ - Produto formado por unidade de células; Y_C - Percentual de consumo de substrato; Q_X - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_P - Produtividade volumétrica em produto; Q_S - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5.10 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator STR, utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser verificado na Figura 5.11, durante o processo o fungo se aderiu nas chicanas, agitador, paredes da cuba do fermentador e na tampa, formando grandes aglomerados. Com 18 horas, observou-se que o meio de fermentação ficou bastante viscoso (visualmente observado), tanto pela produção de EPS quanto pela produção de biomassa, caracterizando uma completa falta de homogeneidade do cultivo. Assim como ocorreu em frasco, no biorreator STR o fungo apresentou crescimento na forma filamentosa. O crescimento fúngico livremente disperso, que ocorre quando há crescimento na forma filamentosa, aumenta a viscosidade do meio, motivo pelo qual o crescimento em *pellets* é preferido (POSCH; HERWIG; SPADIUT,

2013). Segundo Bae et al. (2000), no cultivo de *P. japonica*, utilizando maltose como substrato, o pH foi o parâmetro que mais influenciou na morfologia do fungo. Os autores estudaram a morfologia do fungo *P. japonica* em valores de pH de 4,0 a 9,0. Quando o microrganismo cresceu em pH 5,0 e 6,0 apresentou forma filamentosa, enquanto que nos demais valores observou-se crescimento na forma de *pellets*.

Figura 5.11 – Aspecto do meio de cultivo de *L. theobromae*, em biorreator STR, utilizando-se glicose como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 4 horas; (C) – 18 horas; (D) – 28 horas; (E) e (F) fungo aderido no interior do STR.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Ensaio em BAABC sem controle de temperatura

Foi realizado um ensaio no BAABC empregando meio de cultivo com a mesma composição daquele ensaio em biorreator STR que, por sua vez, foi a mesma do ensaio que apresentou os melhores resultados quanto à produção de EPS a partir de glicose em frasco agitado (Ensaio G). A fermentação foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.

Os dados obtidos de concentração celular, consumo de glicose e produção de EPS no biorreator BAABC estão apresentados na Figura 5.12. A maior concentração celular observada foi de $7,32 \pm 0,65$ g/L, com 72 horas de fermentação. Apesar desse valor ser inferior ao observado em frasco ($31,74 \pm 0,59$ g/L), é superior à concentração de $5,08 \pm 0,71$ g/L obtida em biorreator STR. Observou-se também que, assim como ocorreu em frasco e no biorreator STR, o fungo apresentou crescimento filamentososo, que contribui para o aumento da viscosidade do meio de cultivo, além da presença de EPS.

Figura 5.12 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae*, em BAABC sem controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A maior concentração de EPS obtida ($2,59 \pm 0,21$ g/L) foi muito inferior à obtida em frascos agitados ($6,49 \pm 0,03$ g/L), porém mais de 3 vezes superior à obtida em biorreator STR ($0,70 \pm 0,12$ g/L). Tal aumento da produção de EPS pode ser atribuído à maior homogeneização e dissolução mais eficiente de oxigênio no meio líquido proporcionados pela biorreator BAABC. A partir de 68 horas observou-se que houve uma pequena diminuição na concentração de EPS. Apesar de alguns autores afirmarem que a maioria dos microrganismos não é capaz de metabolizar o próprio EPS produzido (BOELS et al., 2001; DONOT, et al., 2012), essa diminuição pode indicar que o fungo consumiu parte do EPS produzido, uma vez que no final do processo havia pouco substrato disponível no meio e, devido ao aumento da viscosidade, a

transferência de massa também pode ter sido prejudicada, dificultando o acesso do fungo à fonte de carbono restante.

Os parâmetros cinéticos do ensaio em BAABC com glicose como substrato estão apresentados na Tabela 5.4. O consumo de glicose foi de 94,80% com 72 horas, bastante similar ao consumo de 97,5% observado em frasco, no mesmo tempo. Cunha et al. (2012), no cultivo de *L. theobromae* em biorreator STR, observou um consumo de 69,5% da glicose, atribuindo o consumo incompleto do substrato à dificuldade de transferência de oxigênio devido à alta viscosidade do meio. O consumo constante e quase total do substrato observado no cultivo em BAABC indica que o meio se manteve homogêneo, de modo que as transferências de oxigênio, de substrato e de nutrientes não foram prejudicadas nem limitantes para o consumo de substrato.

Tabela 5.4 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae* utilizando-se glicose como fonte de carbono em BAABC, sem controle de temperatura.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_x (g/L)	$7,32 \pm 0,65$
P_p (g/L)	$2,59 \pm 0,21$
$Y_{x/s}$ (g/g)	$0,15 \pm 0,02$
$Y_{p/s}$ (g/g)	$0,05 \pm 0,01$
$Y_{p/x}$ (g/g)	$0,35 \pm 0,06$
Y_c (%)	$94,80 \pm 0,05$
Q_x (g/L.h)	$0,10 \pm 0,01$
Q_p (g/L.h)	$0,04 \pm 0,003$
Q_s (g/L.h)	$0,70 \pm 0,02$

P_x - Produção de biomassa; P_p - Produção de EPS; $Y_{x/s}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{p/x}$ - Produto formado por unidade de células; Y_c - Percentual de consumo de substrato; Q_x - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_p - Produtividade volumétrica em produto; Q_s - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de $Y_{x/s}$ ($0,15 \pm 0,02$ g/g) e Q_x ($0,10 \pm 0,01$ g/L.h) foram inferiores aos observados no biorreator STR, enquanto que os valores de $Y_{p/s}$ ($0,05 \pm 0,01$ g/g) e Q_p ($0,04 \pm 0,003$) foram superiores, indicando que o biorreator STR foi mais eficiente em produzir biomassa enquanto que o BAABC foi mais eficiente em produzir EPS. O $Y_{p/x}$ ($0,35 \pm 0,06$ g/g) foi 3 vezes superior ao valor do biorreator STR. Uma alta relação $Y_{p/x}$ é interessante pois demonstra uma maior obtenção de EPS por grama de biomassa. A velocidade de consumo de substrato (Q_s), assim como observado no ensaio em STR, foi elevada se comparada com os valores de $0,23 \pm 0,004$ g/L e $0,30$ g/L apresentados por Cunha et al. (2012) e Luna (2016),

respectivamente, indicando que uma maior homogeneidade do meio favorece a transferência de massa.

Xu et al. (2006), ao compararem a produção de EPS por *Paecilomyces tenuipes* em biorreator STR e *Airlift*, constataram que o desempenho do fungo em ambos os reatores não foi significativamente diferente, tanto no crescimento celular quanto na produção de EPS. Ao contrário do observado por esses autores, os maiores valores de P_P , $Y_{P/S}$ e Q_P observados no BAABC indicam que este proporcionou condições mais adequadas para a produção de biopolímero pelo fungo *L. theobromae*, quando comparado com o biorreator STR.

Na Figura 5.13 estão apresentados os valores de pH do meio, em função do tempo, para o ensaio em questão.

Figura 5.13 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em BAABC sem controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que no BAABC o valor de pH apenas diminuiu, diferentemente do que aconteceu tanto no ensaio em frasco quanto no ensaio em biorreator STR, nos quais o pH diminuiu inicialmente e em seguida aumentou. No ensaio em biorreator STR, o pH diminuiu até 18 horas. Já no ensaio em frasco, o pH caiu até 24 horas e, com 72 horas, o pH alcançou um valor próximo ao inicial. Tanto no ensaio em frasco quanto no realizado em biorreator STR observou-se que o valor de pH caiu até quando houve crescimento celular intenso e, tão logo o crescimento desacelerou, o pH começou a subir. No ensaio em BAABC (Figura 5.12) não é possível notar uma desaceleração ou estagnação do crescimento celular, ou seja, provavelmente durante todo o cultivo houve produção de ácidos orgânicos que ocasionaram a queda constante

do pH. Ressalta-se também que o valor mínimo de pH alcançado (3,52) no BAABC foi mais baixo que o mínimo alcançado tanto em frasco (3,75) quanto em biorreator STR (3,92).

Na Figura 5.14 mostra-se o aspecto do meio de fermentação durante o cultivo. No biorreator BAABC há pouca superfície para o fungo aderir, mesmo assim, observou-se que o fungo aderiu um pouco no termostato e na mangueira usada para adicionar antiespumante. Foi necessário o uso de antiespumante para que o fungo não aderisse e se aglomerasse na própria espuma produzida. Ao final das 72 horas, observou-se visualmente que, apesar de muito viscoso devido à biomassa e EPS produzidos, o meio de cultivo apresentou aparência homogênea, sem formação de aglomerados no interior do biorreator. E, assim como aconteceu no cultivo em biorreator STR, não foi observado escurecimento da biomassa, bem como do biopolímero recuperado.

Figura 5.14 – Aspecto do meio cultivo de *L. theobromae*, em BAABC sem controle de temperatura, utilizando-se glicose como substrato e sem controle de temperatura. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o processo, foi observado que a temperatura do meio de cultivo apenas diminuiu, alcançando o mínimo de 23 °C, apesar da temperatura do meio ambiente permanecer em torno de 27 °C durante o ensaio. Uma possível explicação tal diminuição de temperatura é que a polimerização por condensação é um processo endotérmico, que requer calor de uma fonte externa (MIX, 2005). Esse fato não foi relatado na literatura, provavelmente devido à realização dos ensaios ocorrer em incubadora (frascos) ou biorreatores com controle automático de temperatura, como nos casos do STR e mesmo do *Airlift*.

5.3.3 Desenvolvimento do sistema de controle de temperatura do meio para o BAABC

No ensaio anterior no BAABC não foi realizado o controle de temperatura do meio de cultivo. Porém, para melhor controle do processo e visando a maior produção de EPS, foi instalado externamente no frasco uma “cinta térmica” com resistência elétrica que, acoplada a um termostato digital, permitiu o controle de temperatura do meio no biorreator, uma vez que nos ensaios anteriores observou-se que a temperatura apenas diminuiu durante o cultivo. Ressalta-se também que a viscosidade depende muito da temperatura. Em geral, os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura. Portanto, o controle da temperatura, nesse caso, pode contribuir para a diminuição da viscosidade do meio, o que pode favorecer a transferência de oxigênio e nutrientes dentro do biorreator e, conseqüentemente, a produção de EPS.

Inicialmente, foi realizado um teste no BAABC com água. Foram avaliadas três temperaturas mínimas para a mudança na resistência e aquecimento: 27,6; 27,7 e 27,8 °C. Para cada valor foram medidas as variações de temperatura, considerando o ciclo: "temperatura mínima - aquecimento até que a resistência fosse desligada – aquecimento até a temperatura máxima - arrefecimento até a temperatura inicial". Como nesse caso não houve atividade metabólica que proporcionasse variação de temperatura, sua redução foi realizada mantendo a temperatura ambiente a 23 °C (com condicionador de ar), de modo que a troca de calor ocorresse naturalmente.

Apenas os resultados de temperatura de partida igual a 27,8 °C estão apresentados na Tabela 5.5, considerando que foi a condição mais adequada, uma vez que proporcionou uma variação simétrica de 0,2 °C em torno do valor desejado.

Tabela 5.5 – Temperaturas da água, em função do tempo, desde o início do aquecimento do líquido pela resistência, no BAABC, até seu retorno ao valor inicial.

Tempo (s)	0,0	62,25	97,25	168,61	239,23	482,47	717,08	1137,11	1394,09
Temp. (°C)	27,8	27,9	28,0	28,1	28,2	28,1	28,0	27,9	27,8

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o teste com água realizou-se um teste utilizando-se meio de fermentação diluído. Verificou-se que a temperatura do meio diluído, inicialmente a 27,6 °C, alcançou 28,3 °C, correspondendo a um desvio de 0,4 °C abaixo e 0,3 °C acima do valor desejado de 28 °C. Assim, a temperatura de 27,6 °C foi a escolhida para o início do aquecimento do meio durante os ensaios de fermentação subsequentes.

Com os resultados obtidos, foi possível validar a estratégia proposta para controlar a temperatura do líquido contido no biorreator descrito por Prata et al. (2011), empregado no presente trabalho. Cabe salientar que a estrutura montada tem utilidade apenas para casos em que a temperatura do meio de fermentação apenas diminui durante o processo, tendo em vista que não foi introduzida nenhuma forma de resfriamento do meio. Por fim, deve-se mencionar que a resistência atinge uma temperatura relativamente alta até momento do seu desligamento pelo termostato, fazendo-se necessário incluir uma proteção ao seu redor, por questões de segurança.

5.3.4 Ensaio em BAABC com controle de temperatura

O perfil de crescimento do fungo, consumo de substrato e produção de EPS no BAABC com controle de temperatura, está apresentado na Figura 5.15.

A maior concentração de biomassa fúngica foi de $7,95 \pm 0,35$ g/L obtida com 64 horas de fermentação. Esse valor foi muito próximo ao observado no cultivo sem controle de temperatura ($7,32 \pm 0,65$ g/L), porém foi alcançado com 64 horas, ao passo que o anterior foi alcançado com 72 horas.

Figura 5.15 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae*, em BAABC com controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 50 g/L de glicose e 3 g/L de extrato de levedura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se que a concentração máxima de EPS foi de $3,17 \pm 0,16$ g/L, com 68 horas de cultivo. No ensaio sem controle de temperatura, a produção máxima de EPS foi de $2,59 \pm 0,21$ g/L, também com 68 horas de cultivo. Logo após 68 horas, a concentração de EPS sofreu uma ligeira queda, assim como ocorreu no ensaio em BAABC sem controle de temperatura, indicando um possível consumo de EPS pelo fungo. A concentração máxima de EPS obtida foi mais de 4 vezes superior do obtido no ensaio em biorreator STR. Porém, ainda correspondeu à metade da produção obtida em frasco.

Comparando-se com o cultivo realizado nas mesmas condições, porém sem controle de temperatura, observou-se que a concentração máxima de biomassa micelial fúngica de ambos os cultivos foram similares. Porém, verificou-se um aumento de 22,4% na produção de EPS, com o mesmo tempo de cultivo.

As curvas de concentração de EPS e variação do pH referente ao ensaio em questão permitem inferir que o início/aceleração da produção de EPS por *L. theobromae* a partir de glicose está associada com alguma atividade metabólica que provoca a diminuição do pH do meio. Na Figura 5.15 verifica-se que a produção de EPS inicia-se por volta de 6 horas e tem sua maior produção até por volta de 36-40 horas, enquanto que o pH diminui de 6 horas até cerca de 36 horas de cultivo (Figura 5.16). Comportamento similar pode ser verificado no primeiro ensaio com controle de temperatura empregando-se glicose como substrato. Neste caso ocorre início/aumento da produção de EPS por volta de 6 horas, o qual se estende de forma mais evidente até 36 horas (Figura 5.12) e abaixamento do pH mais evidente neste mesmo intervalo de tempo (Figura 5.13).

Os parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 5.6. Comparando-se com os resultados do ensaio no BAABC sem controle de temperatura, verifica-se que quase todos os parâmetros foram melhores. Ou seja, o controle de temperatura proporcionou uma maior produção de biomassa e de EPS em menor tempo. O único parâmetro cujo valor foi ligeiramente inferior foi a velocidade de consumo de substrato (Q_s).

Na Figura 5.16 observa-se que, no biorreator BAABC, o pH diminuiu, assim como aconteceu tanto no ensaio em frasco quanto no ensaio em biorreator STR, nos quais utilizou-se glicose como substrato. O menor valor de pH observado foi de 3,17, com 64 horas de fermentação. Em seguida, o valor do pH sofreu um ligeiro aumento.

A temperatura ajustada no termostato foi de $27,7^\circ\text{C}$, $0,3^\circ\text{C}$ abaixo da temperatura de cultivo. Desse modo, o aquecimento começava quando o termostato marcava a temperatura de $27,6^\circ\text{C}$. Como pode ser observado na Figura 5.17, a temperatura oscilou de $27,6$ a $28,3^\circ\text{C}$ durante as primeiras 40 horas de cultivo. De 40 horas até o final da fermentação houve uma

maior oscilação, de até ± 1 °C, devido ao aumento da viscosidade do caldo durante o processo, como resultado do aumento da biomassa e produção de EPS pelo fungo. A maior viscosidade do caldo fermentado dificulta a difusão e distribuição do calor fornecido pela resistência elétrica. Desse modo, a resistência permanece ligada mais tempo até o sensor detectar a temperatura ajustada e, assim, parar o aquecimento. No entanto, pode-se considerar que os desvios observados não comprometem o processo.

Tabela 5.6 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae* utilizando-se glicose como fonte de carbono em BAABC com controle de temperatura.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_x (g/L)	$7,95 \pm 0,35$
P_p (g/L)	$3,17 \pm 0,16$
$Y_{x/s}$ (g/g)	$0,18 \pm 0,02$
$Y_{p/s}$ (g/g)	$0,07 \pm 0,001$
$Y_{p/x}$ (g/g)	$0,40 \pm 0,04$
Y_c (%)	$100 \pm 0,68$
Q_x (g/L.h)	$0,12 \pm 0,01$
Q_p (g/L.h)	$0,05 \pm 0,002$
Q_s (g/L.h)	$0,62 \pm 0,06$

P_x - Produção de biomassa; P_p - Produção de EPS; $Y_{x/s}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{p/x}$ - Produto formado por unidade de células; Y_c - Percentual de consumo de substrato; Q_x - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_p - Produtividade volumétrica em produto; Q_s - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5.16 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5.17 – Variação da temperatura do meio de cultivo, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 5.18, o fungo aderiu ao termostato e à mangueira de injeção de antiespumante. Observou-se também que no final da fermentação o meio apresentou aspecto homogêneo, sem formação de aglomerados.

Figura 5.18 – Aspecto do meio de cultivo de *L. theobromae*, em BAABC com controle de temperatura, utilizando-se glicose como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com esse ensaio, conclui-se que o controle de temperatura foi benéfico ao processo, possibilitando o aumento da produção de biomassa e de EPS pelo fungo em menor tempo. O controle de temperatura permitiu que o fungo crescesse e produzisse o biopolímero na sua temperatura definida na literatura como adequada para o seu cultivo. E, como dito

anteriormente, o aumento da temperatura pode ter contribuído para que o meio se mantivesse mais homogêneo, facilitando a transferência de oxigênio e de nutrientes dentro do biorreator. Portanto, os ensaios subsequentes realizados no BAABC foram realizados com controle de temperatura.

5.3.5 Ensaio em BAABC com controle de temperatura utilizando menor concentração de glicose

Foi realizado um ensaio, em duplicata, com uma concentração menor de glicose (30 g/L), para comparação dos parâmetros cinéticos. Foi escolhida uma concentração menor de substrato visando proporcionar menor crescimento celular e consequentemente menor viscosidade no meio de cultivo. As condições de cultivo foram as mesmas do ensaio em BAABC com 50 g/L com controle de temperatura, descritas no item 4.2.4.

Observando-se a Tabela 5.7 é possível comparar os parâmetros cinéticos dos ensaios com 50 g/L e 30 g/L de glicose em BAABC.

Tabela 5.7 – Comparação dos parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae* utilizando-se duas concentrações diferentes de glicose em biorreator BAABC: 50 g/L e 30 g/L.

Parâmetros fermentativos	BAABC 50 g/L	BAABC 30 g/L
P_x (g/L)	$7,95 \pm 0,35$	$5,79 \pm 0,47$
P_p (g/L)	$3,17 \pm 0,16$	$1,85 \pm 0,12$
$Y_{x/s}$ (g/g)	$0,18 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,14$
$Y_{p/s}$ (g/g)	$0,07 \pm 0,001$	$0,07 \pm 0,01$
$Y_{p/x}$ (g/g)	$0,40 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,05$
Y_c (%)	$100 \pm 0,28$	$100 \pm 0,39$
Q_x (g/L.h)	$0,12 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
Q_p (g/L.h)	$0,05 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,002$
Q_s (g/L.h)	$0,62 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,05$

P_x - Produção de biomassa; P_p - Produção de EPS; $Y_{x/s}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{p/x}$ - Produto formado por unidade de células; Y_c - Percentual de consumo de substrato; Q_x - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_p - Produtividade volumétrica em produto; Q_s - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se que todos os valores dos parâmetros em meio com 30 g/L foram inferiores, com exceção dos valores de $Y_{x/s}$, que foi superior, e $Y_{p/s}$ e Y_c que foram iguais. Ou seja, a diminuição da concentração de fonte de carbono e, consequentemente, menor concentração de biomassa, não favoreceu a produção de EPS, confirmando o resultado obtido em frasco agitado.

5.4 Ensaios em biorreator STR e BAABC com glicerol como substrato

Dentre os ensaios em frasco com glicerol, o ensaio O, no qual utilizaram-se 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura, foi o que apresentou os melhores resultados quanto à produção de EPS, sendo, portanto, o meio de cultivo escolhido para os ensaios no biorreator STR e BAABC. Os cultivos foram realizados conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4.

5.4.1 Ensaio em biorreator STR

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.3. Os dados obtidos de concentração celular, consumo de glicerol e produção de EPS estão apresentados na Figura 5.19. A maior concentração celular observada foi de $11,4 \pm 0,87$ g/L, com 60 horas de fermentação. Essa concentração é semelhante à observada no ensaio em frasco, nas mesmas condições (Ensaio O), que foi de $11,22 \pm 0,34$ g/L, também com 60 horas de fermentação. Após o tempo de 60 horas, houve uma queda na concentração de biomassa, que coincide com o tempo no qual houve o esgotamento do substrato.

Figura 5.19 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicose no cultivo de *L. theobromae* em biorreator STR, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se que a concentração máxima de EPS foi de $3,02 \pm 0,19$ g/L, com 48 horas de cultivo. Após esse tempo a concentração de EPS sofreu uma ligeira queda, assim como aconteceu nos ensaios com glicose em BAABC, o que indica que possivelmente o fungo consome parte do próprio EPS produzido, embora concomitantemente com o consumo de glicerol. Assim como aconteceu com o crescimento celular, a maior concentração de EPS obtida foi muito similar a obtida em frascos agitados ($3,39 \pm 0,06$ g/L) com 48 horas de cultivo.

Os parâmetros cinéticos do ensaio em biorreator STR no qual utilizou-se glicerol como substrato estão apresentados na Tabela 5.8. Os valores evidenciam que, apesar das concentrações de biomassa e de EPS finais obtidos no cultivo em biorreator STR serem próximos dos valores obtidos em frasco, no biorreator STR o fungo foi menos eficiente tanto na produção de biomassa quando na produção de EPS. No biorreator STR, o glicerol foi totalmente consumido com 60 horas de cultivo, enquanto que em frasco o consumo de substrato foi de 54,16%, aproximadamente metade da concentração de substrato consumido no biorreator STR. Com isso, o valor de $Y_{P/S}$ obtido no biorreator STR ($0,12 \pm 0,01$ g/g) foi a metade do obtido no ensaio em frasco (0,23 g/g), assim como o valor de $Y_{X/S}$ ($0,44 \pm 0,04$) também foi inferior ao observado em frasco ($0,75$ g/g).

Tabela 5.8 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae*, utilizando-se glicerol como fonte de carbono, em biorreator STR.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_X (g.L ⁻¹)	$11,40 \pm 0,87$
P_P (g.L ⁻¹)	$3,02 \pm 0,19$
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$0,44 \pm 0,04$
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$0,12 \pm 0,01$
$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	$0,26 \pm 0,04$
Y_C (%)	$100 \pm 0,23$
Q_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$0,19 \pm 0,01$
Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$0,06 \pm 0,003$
Q_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$0,36 \pm 0,01$

P_X - Produção de biomassa; P_P - Produção de EPS; $Y_{X/S}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/S}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{P/X}$ - Produto formado por unidade de células; Y_C - Percentual de consumo de substrato; Q_X - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_P - Produtividade volumétrica em produto; Q_S - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil de pH pode ser observado na Figura 5.20. Assim como aconteceu nos ensaios com frascos, observou-se que o pH subiu nas primeiras horas de fermentação, comportamento oposto do observado no ensaio com glicose tanto em frascos quanto em

biorreator STR e BAABC. Porém, salienta-se que o valor máximo de pH verificado no biorreator STR (6,25) foi bem menor que o observado no ensaio em frasco (7,27).

Figura 5.20 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator STR, utilizando glicerol como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fenômeno de elevação de pH seguido de sua diminuição, quando o fungo *L. theobromae* é cultivado em meio contendo glicerol como substrato, não foi relatado na literatura. Trata-se de um tema que necessita de estudos mais aprofundados, que podem envolver inclusive a dosagem de outros metabólitos além do EPS. É interessante observar que tal fenômeno parece estar relacionado com o início/aceleração da produção de EPS e desaceleração do crescimento, conforme pode ser verificado no gráfico da Figura 5.19, no período de 12 a 36 horas. Tal hipótese pode ser sustentada observando-se comportamento similar ocorrido nos ensaios em frascos agitados, especificamente no ensaio O, cujos valores de concentração de biomassa, de glicerol e de EPS estão apresentados na Figura 5.5, e a variação do pH está apresentado na Figura 5.7.

Assim como aconteceu em todos os ensaios, o fungo apresentou crescimento filamentosos e disperso, como pode ser observado na Figura 5.21. Notou-se, visualmente, que o meio de fermentação, com 72 horas, ficou menos viscoso quando comparado com os meios no qual utilizou-se glicose como substrato, assim como já havia sido observado nos ensaios em frascos agitados. Mesmo assim, o fungo cresceu e aderiu nas chicanas, agitador e paredes da cuba do biorreator (Figura 5.21). A menor viscosidade do meio contendo glicerol como substrato não foi observada por Torres et al. (2014) no cultivo de *Enterobacter*, para produção de EPS. Os autores relataram que a viscosidade do meio de cultivo aumentou significativamente

durante a fermentação, ocasionando a perda total da homogeneidade e, conseqüentemente, determinando o fim do cultivo.

Figura 5.21 – Aspecto do meio de cultivo de *L. theobromae*, em biorreator STR, utilizando-se glicerol como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Ensaio em BAABC com controle de temperatura

Os valores de concentração celular, consumo de glicerol e produção de EPS estão apresentados na Figura 5.22. A maior concentração celular observada foi de $28,86 \pm 1,46$ g/L, com 30 horas de fermentação. Essa concentração foi muito superior às concentrações obtidas em frasco ($11,22 \pm 0,34$ g/L) e em biorreator STR ($11,40 \pm 0,87$ g/L). Após 30 horas, a concentração celular caiu, assim como observado no ensaio em biorreator STR (Figura 5.19). A maior homogeneidade e, conseqüentemente, maior aeração do meio, favoreceu a produção

de biomassa micelial, porém, não favoreceu a produção de EPS pelo fungo, como pode ser notado observando-se a concentração máxima de EPS, que foi de apenas $1,45 \pm 0,25$ g/L.

Figura 5.22 – Cinética do crescimento micelial, produção de EPS e consumo de glicerol durante o cultivo de *L. theobromae* em BAABC com controle de temperatura, com indicação das concentrações máximas de biomassa e produto e da concentração final de substrato. Meio contendo 30 g/L de glicerol e 12 g/L de extrato de levedura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 5.9. Comparando-se os valores com os resultados obtidos no biorreator STR, verifica-se que $Y_{X/S}$ e Q_X foram maiores, confirmando que o BAABC foi mais eficiente na produção de biomassa. Já os valores de $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P foram inferiores, ou seja, diferentemente do que aconteceu quando se utilizou glicose como substrato, não houve uma produção maior nem mais eficiente de EPS no BAABC. Apesar de ter ocorrido uma produção de EPS praticamente a metade da obtida em ensaio em biorreator STR, esse ensaio em BAABC foi importante para reforçar o que foi sugerido a respeito da variação do pH associada com o início/aceleração da produção de EPS quando o substrato é o glicerol. Na Figura 5.22 verifica-se que a produção de EPS inicia-se com 16 horas e se estende até 40 horas, enquanto que o pH aumenta de 16 horas até 30 horas de cultivo (Figura 5.23).

O perfil de pH pode ser observado na Figura 5.23. Assim como aconteceu nos ensaios com frascos, observou-se que o pH aumentou nas primeiras horas de fermentação, comportamento oposto do observado no ensaio com glicose tanto em frascos quanto em biorreator STR. O maior valor de pH observado no BAABC (6,03) foi inferior ao observado no biorreator STR (6,25).

Tabela 5.9 – Parâmetros cinéticos da produção de EPS por *L. theobromae* utilizando-se glicerol como fonte de carbono em biorreator BAABC com controle de temperatura.

Parâmetros fermentativos	Valores
P_x (g.L ⁻¹)	28,86 ± 1,46
P_p (g.L ⁻¹)	1,45 ± 0,25
$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	1,13 ± 0,09
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	0,06 ± 0,01
$Y_{p/x}$ (g g ⁻¹)	0,05 ± 0,01
Y_c (%)	93,05 ± 0,50
Q_p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,04 ± 0,01
Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,96 ± 0,05
Q_s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,40 ± 0,01

P_x - Produção máxima de biomassa, P_p - Produção máxima de EPS; $Y_{x/s}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$ - Fator de conversão de substrato em produto; $Y_{p/x}$ - Produto formado por unidade de células; Y_c - Porcentagem de consumo de substrato; Q_p - Produtividade volumétrica em produto; Q_x - Produtividade volumétrica em biomassa; Q_s - Taxa global de consumo do substrato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5.23 – Valores de pH, em função do tempo de fermentação, do ensaio em biorreator BAABC com controle de temperatura, utilizando glicerol como fonte de carbono.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como aconteceu nos ensaios anteriores o fungo aderiu apenas no termostato e na mangueira de injeção de antiespumante, como pode ser observado na Figura 5.24. Notou-se, visualmente, que o meio de fermentação, com 72 horas, também aparentou estar menos viscoso que os meios resultantes dos ensaios com glicose. Novamente o meio também apresentou aspecto homogêneo, sem formação de aglomerados.

Figura 5.24 – Aspecto do meio de cultivo de *L. theobromae* em BAABC com controle de temperatura, utilizando glicerol como substrato. (A) – tempo inicial; (B) – 24 horas; (C) – 48 horas; (D) – 72 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando-se os ensaios realizados em BAABC com os dois substratos estudados, conclui-se que os meios com glicose apresentaram uma maior produção de EPS com o aumento da disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo enquanto que os meios com glicerol, que continham uma concentração de fonte de nitrogênio quatro vezes superior comparado ao meio com glicose, apresentaram menor produção de EPS no BAABC. Esse comportamento é contrário ao descrito por Shingel (2004) para o cultivo de *A. pullulans*. Segundo o autor, uma aeração intensa durante a produção de pululana, leva a um aumento significativo da concentração do EPS, especialmente em meios ricos em nitrogênio, enquanto que uma aeração intensa suprime a produção de pululana em meios com baixa concentração de nitrogênio.

5.5 Caracterização parcial dos EPS obtidos a partir de glicose e a partir de glicerol

Para a realização das análises de caracterização, os EPS recuperados dos cultivos nos ensaios em BAABC foram dialisados e liofilizados, conforme descrito no item 4.4.4.

5.5.1 Aspectos visuais

As Figuras 5.25 A e 5.25 B mostram a aparência dos EPS obtidos nos cultivos nos quais foram utilizados glicose (EPS-glicose) e glicerol (EPS-glicerol), logo após a etapa de recuperação com etanol. Observa-se que o EPS-glicerol apresentou coloração mais escura que o EPS-glicose. Essa diferença só pode ser percebida após a retirada do EPS do álcool.

Figura 5.25 – (A) – EPS-glicose após a precipitação com etanol; (B) – EPS-glicerol após a precipitação com etanol; (C) – EPS-glicose liofilizado; (D) – EPS-glicerol liofilizado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os EPS liofilizados são mostrados nas Figuras 5.25 C e 5.25 D. O EPS-glicose apresentou aparência mais expandida e porosa, enquanto o EPS-glicerol apresentou um aspecto fibroso e mais compactado. Oliveira (2010) também descreveu diferenças entre os aspectos dos EPS obtidos em meios com diferentes fontes de nitrogênio testadas para o cultivo de *Aureobasidium pullulans*. Segundo o autor, os biopolímeros produzidos a partir das fontes de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio, nitrato de sódio e nitrato de amônio) apresentaram aspecto cristalino, de pó finamente particulado; já os biopolímeros obtidos a partir do cultivo de fontes de nitrogênio orgânico (uréia e levedura residual cervejeira) apresentaram aspecto fibroso.

5.5.2 Aspecto morfológico

Na Figura 5.26 estão ilustradas as micrografias das amostras de EPS-glicose e EPS-glicerol, nas quais é possível observar melhor a morfologia de ambos os EPS.

Figura 5.26 –Micrografia do EPS-glicose (A) e EPS-glicerol (B) Ampliação original de 50x.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que, aparentemente, o EPS-glicose apresenta fibras mais grossas, ordenadas e espaçadas, enquanto que as fibras do EPS-glicerol aparentam ser mais finas, formando estruturas mais enoveladas. Tais observações são coerentes com o observado macroscopicamente: o EPS-glicose é mais poroso, enquanto que o EPS-glicerol é mais compactado.

5.5.3 Difração de raios-X

A difração de raios-X é uma técnica utilizada para analisar a cristalinidade dos materiais, sendo uma ferramenta importante para verificar a estrutura de polissacarídeos (JEDDOU et al., 2016).

Segundo Veverka et al. (2014), devido a sua estrutura polimérica, os difratogramas de raios-X de β -glucanas apresentam picos muito largos. Como pode ser observado na Figura 5.27, tanto o EPS-glicose quanto o EPS-glicerol apresentam um pico largo na região de 20° (2θ). A ausência de picos estreitos e intensos, indicadores da presença de fases de elevada cristalinidade, sugere que ambos os EPS são amorfos. Similarmente, Kagimura et al. (2015) também observaram a presença de apenas um pico largo na mesma região ao analisarem a lasiodiplodana obtida no cultivo de *L. theobromae* em meio contendo glicose como fonte de carbono. Novák et al. (2012), ao analisarem filmes de β -glucana extraída da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, também não observaram a presença de picos cristalinos.

Figura 5.27 - Difratomogramas de raios-X das amostras de EPS-glicose e EPS-glicerol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ressalta-se que no difratograma do EPS-glicerol há 2 picos discretos em aproximadamente 20° (2θ) e 23° (2θ), mesma posição de picos relatada por Luna (2016) ao analisar um EPS produzido por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de glicose. Tais picos observados no EPS-glicerol podem indicar a presença de uma pequena fração semicristalina, não detectada no EPS-glicose, o qual se mostrou totalmente amorfo. As características cristalinas ou não-cristalinas das substâncias desempenham um papel importante em suas propriedades físico-químicas, influenciando características tais como solubilidade, viscosidade, inchaço e flexibilidade (GHRIBI et al., 2015). Portanto, uma possível diferença de cristalinidade pode contribuir para as diferenças observadas visualmente entre os EPS.

5.5.4 Espectro de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) permite a medição de vibrações moleculares de ligações covalentes e tem sido uma ferramenta útil no monitoramento de mudanças estruturais em biopolímeros (LIMBERGER-BAYER et al., 2014).

Os espectros FT-IR do EPS-glicose e do EPS-glicerol estão demonstrados na Figura 5.28. Na região de $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, os espectros de ambos os EPS apresentaram uma banda larga com absorção máxima (transmitância mínima) que pode ser atribuída a vibrações de alongamento de OH, grupo frequente em polissacarídeos (WANG et al., 2008; GHRIBI et al.

2015; KAGIMURA et al., 2015). O pico em 3000 cm^{-1} é atribuído ao estiramento CH dos grupos CH_2 (KAGIMURA et al., 2015).

O pico de absorção devido ao alongamento do anel de glicose foi observado em ambos espectros em aproximadamente 1640 cm^{-1} (XU et al. 2009). Vibrações de alongamento simétricas C-O-C (grupo característico de açúcares) aparecem por volta de 1075 cm^{-1} e as vibrações de alongamento assimétricas em 1269 cm^{-1} - 1247 cm^{-1} . Em ambos espectros, a banda de absorção em torno de 1050 cm^{-1} corresponde a vibrações de alongamento simétricas de C-O-C.

Segundo Qian et al. (2009), espectros de absorção entre 900 cm^{-1} - 930 cm^{-1} sugerem ligações do tipo β . Portanto, a absorção na região 890 cm^{-1} , em ambos os espectros, caracteriza as ligações do tipo β dos EPS. Observando os gráficos, nota-se que nessa região a absorção no EPS-glicose é mais fraca que a do EPS-glicerol. Somensi (2014), ao analisar por FT-IR a lasiodiplodana não modificada e a lasiodiplodana carboximetilada, observou intensidades diferentes na mesma região de 890 cm^{-1} : a absorção do EPS carboximetilado foi mais fraca do que a absorção do EPS não modificado.

Apesar de muitos similares, o espectro de FT-IR de glicerol apresenta dois picos de absorção que não existem no espectro do EPS-glicose, em aproximadamente 1260 cm^{-1} e 810 cm^{-1} .

Comparando os resultados obtidos com os da literatura, é possível concluir que os EPS produzidos por *L. theobromae*, tanto a partir de glicose como a partir de glicerol, correspondem à β -glucanas. Porém, para melhor caracterização de ambos os EPS, principalmente o EPS-glicerol, análises adicionais são necessárias como, por exemplo, determinação da massa molecular, hidrossolubilidade e caracterização térmica.

Figura 5.28 - Espectros de infravermelho (FT-IR) do EPS-glicose e do EPS-glicerol.

Fonte: Elaborada pela autora.

6. CONCLUSÕES

O cultivo submerso do fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* em meio contendo glicose ou glicerol, nas condições estudadas, permitiu a produção de β -(1,6)-D-glucana em frascos, biorreator STR e no BAABC. O estudo cinético do crescimento, produção de EPS e consumo de substrato pelo fungo, bem como a caracterização parcial do biopolímero, permitiram concluir que:

- Para cultivo em frascos, os meios com glicerol como fonte de carbono necessitam de uma concentração maior de fonte de nitrogênio, tanto para proporcionarem maior produção de biomassa quanto de EPS por *L. theobromae*, quando comparados com os meios contendo glicose;
- Durante o processo fermentativo em frascos e em biorreatores, o pH varia de forma distinta de acordo com a fonte de carbono utilizada: aumento no início do cultivo seguido de diminuição para valores próximos do inicial quando o substrato é glicerol e diminuição no início seguida de aumento para valores próximos do inicial quando o substrato é glicose;
- Nos cultivos do fungo em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento (BAABC), os meios permanecem homogêneos e sem formação de aglomerados, confirmando que o BAABC é apropriado para o cultivo de células sensíveis ao cisalhamento e que apresentam o inconveniente de se aderirem com facilidade às partes internas dos biorreatores convencionais;
- O controle da temperatura, pelo menos quando se emprega glicose como fonte de carbono, proporciona melhora significativa na concentração final de EPS bem como dos parâmetros cinéticos relacionados à formação do produto pelo fungo *L. theobromae*;
- O início/aceleração da produção de EPS por *L. theobromae*, tanto a partir de glicose como a partir de glicerol, está relacionada com uma atividade metabólica deste fungo que resulta a variação do pH do meio de cultivo, sendo uma diminuição deste quando o substrato é glicose e um aumento deste quando o substrato é glicerol;

- Nas condições estudadas, o BAABC proporcionou um significativo aumento na produção de EPS pelo fungo em questão, em meio contendo glicose como substrato, quando comparado ao biorreator STR;
- Comparando-se o desempenho dos dois biorreatores testados quando se utilizou glicerol, o biorreator STR proporcionou maior produção de EPS, enquanto o BAABC proporcionou maior produção de biomassa;
- Observando-se os aspectos visuais e as micrografias (ampliação de 50x), o EPS produzido por *L. theobromae* a partir de glicose (EPS-glicose) e o EPS produzido a partir de glicerol (EPS-glicerol) apresentam características distintas. Por outro lado, as análises de Difração de raios-X e Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permitiram confirmar que tanto o EPS-glicose quanto o EPS-glicerol são β -glucanas, evidenciando a similaridade estrutural entre ambos os biopolímeros.

REFERÊNCIAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 733-741, 2012.
- ALICEWEB. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- ALVES, V. D. et al. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter sp.* **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p.758–764, 2010.
- AMARAL, P. F. F. et al. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 179-186, 2009.
- ANDRÉ, A. et al. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 407-416, 2010.
- ATHALYE, S. K.; GARCIA, R. A.; WEN Z. Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Producing Eicosapentaenoic Acid (EPA) by the Fungus *Pythium irregular*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 2739-2744, 2009.
- BAE, J.-T. et al. Optimization of Submerged Culture Conditions for Exo-Biopolymer Production by *Paecilomyces japonica*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 482-487, 2000.
- BAI, N. et al. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, v. 426-427, p. 66-73, 2014.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARROSO, R. R. **Avaliação da influência do pH de cultivo na produção de biopolímero pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em Bioreator de Bancada**. Relatório de Atividades PIBIC, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2010.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.
- BATISTA, D. C. et al. **Manejo Integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em Videira no Submédio do Vale do São Francisco**. Petrolina - PE: Embrapa Semiárido, Circular Técnica 91, 2010.
- BAUERMEISTER, A et al. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, jul./dez. 2010.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, n. 9, p. 149-157, 1955

BOELS, I. C. et al. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 723–732, 2001.

BONGIOVANI, R. A. M. et al. Nota científica - Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Classificação de risco dos agentes biológicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006, 36 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRISSON, D. et al. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **Bio Essays**, v. 23, n. 6, p. 534-542, 2001.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115-1136, 1998.

CARDOSO, E. R.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.267-272, 2009.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. **Mycological Research**, Oxford, v.3, p.635 – 652, 2007.

COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 237–245, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. L. et al. Purification and structural characterization of (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- β -glucan from *Botryosphaeria* sp. produced in two different carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.61, p. 10-17, 2005.

CORRADI DA SILVA, M. L. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. L. et al. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793–798, 2008.

CRUZ, M. et al. Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 48, p. 695–699, 2011.

CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D: -glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–88, ago. 2012.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DOMINGOS, M. **Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação**. 2009, 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

DOMINGOS, M. et al. A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chemical Engineering Science**, v. 170, p. 670-676, 2017.

DONG, C.; YAO, Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 474-479, 2012.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951– 962, 2012.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2005.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 61-65, 2002.

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A. β-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53-60, 2016.

FREIRE, F. das C. O. et al. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. Embrapa Agroindústria Tropical, 6 p. (Comunicado técnico 91), 2004.

FREITAS, F. et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

FREITAS, F. et al. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297–305, 2010.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 388-398, 2011.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>, 2017.

FREITAS, M. N. **Avaliação da glicerina residual da fabricação de biodiesel como substrato para a produção de exopolissacarídeo pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae***. Relatório final de Iniciação Científica referente ao período de Agosto de 2013 a Junho de 2014 – RUSP, Escola de Engenharia de Lorena - USP, 2014.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers** v. 54, p. 159–171, 2003.

FUKUDA, E. K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GHOSH, D.; TOURIGNY, A.; HALLENBECK, P. C. Near stoichiometric reforming of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen by photofermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2273-2277, 2012.

GHRIBI, A. M. et al. Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 276-282, 2015.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Bingley, v. 46, p. 503-510, 1996.

HOLLYDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. Cambridge. Cambridge University Press, 624 p, 1980. ISBN 0-486-68647-7.

JANG H-D.; LIN Y-Y.; YANG S-S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpine*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1633-1644, 2005.

JEDDOU, K. B. et al. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. **Food Chemistry**, v. 205, p. 97-105, 2016.

JESUS S. S.; MOREIRA NETO, J.; MACIEL FILHO, R. Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 70-81, 2017.

KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.045>.

LAZARIDOU, A. et al. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 122-132, 2002.

LIMA, J.S. et al. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.

LIMBERGER-BAYER, V. M. et al. Barley β -glucans extraction and partial characterization. **Food Chemistry**, v. 154, p. 84-89, 2014.

LIU, D. *Botryosphaeria* and *Lasiodiplodia*. In: _____. **Molecular Detection of Human Fungal Pathogens**. Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis CRC Press, 2011. p. 61-63.

LIU, J. et al. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157 p. 1113–1124, 2017.

LOTH, B. S. **Isolamento de Microrganismos Produtores de Exopolissacarídeos**. 2001, 24 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

LUNA, W. N. S. **Acetilação do Exopolissacarídeo (1 $\rightarrow$ 6)- B-D-Glucana (*Lasiodiplodana*): Derivatização Química e Caracterização**. 2016, 64 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MAGNANI, M; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631-650, jul./set. 2008.

MASLEN M. M.; COLLIS T.; STUART R. *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a subcutaneous abscess in a Cambodian immigrant to Australia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 34 (4), p. 279–283, 1996.

MATRICARDI, P. et al. Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels. **International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam**, v. 316, p. 21–28, 2006.

MESSIAS, J. M. et al. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426–431, 2009.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MIX, P. E. Thermal/Infrared Testing Method. In: _____. **Introduction to Nondestructive Testing: A Trainig Guide**. 2 ed. Wiley Interscience, 2005. cap. 10, p. 407-456.

MORRIS, G.; HARDING, S. Polysaccharides, Microbial. In: **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd edition, Amsterdam: Elsevier, 2009. p. 482-494.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: _____. **ENCYCLOPEDIA of Chemical Technology**. New York: Wiley, 1994. v. 11, p. 921-932.

NAE (Núcleos de Assuntos Estratégicos da Presidência da República). Glicerol: mercados e perspectivas. In: _____. **BIOCOMBUSTÍVEIS**, 2005, p. 105-106.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.1513-1519, 2003.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum***. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 3a ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

NITAYAVARDHANA S.; KHANAL, S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: a sustainable option for a biodiesel refinery. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5808-5814, 2011.

NOVÁK, M. et al. Yeast $\beta(1-3),(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2496-2504, 2012.

NUNES, F. M. **Estudo Químico do Fungo Patogênico *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae)**. 2008, 211 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I.; Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14002-14015, 2012.

OGRODOWSKI, C. S. **Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: Estudo da fermentação e caracterização do produto**. 2016, 103 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

OLIVEIRA, J. D. **Efeito da fonte e concentração de nitrogênio na produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans***. 2010, 131 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA, J. D.; CARVALHO, L. S.; GOMES, A. M. V.; QUEIROZ, L. R.; MAGALHÃES, B. S.; PARACHIN, N. S. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 15, Article 119, 19 p., jul/2016.

OLIVEIRA, G. et al. Efeito do ácido jasmônico na atividade de lipoxigenases de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.6, p.1143-1151, nov./dez., 2002.

OLIVEIRA, K. S. M. **Otimização do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção de EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos**. 2014, 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

OLIVEIRA, M. Z. A.; PRATES JÚNIOR, P.; BARBOSA, C. J.; ASSMAR, C. C. **Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para agricultura baiana**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.

ÖNER, E. T. Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass. In: Z. FANG (ed.). **Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries, Green Energy and Technology**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 35-56, 2013.

PALLESCHI, A. et al. Investigation on a new scleroglucan/borax hydrogel: Structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 322, p. 13–21, 2006.

PAPACOSTAS, L. J. et al. An unusual skin lesion caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Medical Mycology Case Reports** 8, p. 44–46, 2015.

PAVLIC D. et al. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 313–322, 2004.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 572-578, 2006.

PINHEIRO, J. B. **Fungos Produtores de Exopolissacarídeos e suas Aplicações Funcionais e Industriais**. 2014, 31 p. Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas), Universidade Federal de São João del-Rei, Sete-Lagoas, 2014.

PINHEIRO, R. S. **Processos de inovação tecnológica para a glicerina produzida no processo de obtenção de biodiesel no Brasil**. 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p.37-44, 2013.

PRATA, A. M. R. et al. **Biorreator com sistema de agitação e aeração específico para cultivo de células aderentes e/ou sensíveis ao cisalhamento**. BR n., PI 1003119–7, 2011.

PUNITHALINGAM, Sphaeropsidales in culture from humans, **Nova Hedwig**, v. 31, p.119-158, 1979.

PYLE, D. J. **Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for the Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids by the Microalga *Schizochytrium limacinum***. 2008, 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Biológicos) - Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg - USA, 2008.

QIAN J.-Y. et al. Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, p. 620-625, 2009.

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. In: **BIOTECHNOLOGY**, Special microbial process. Weinheim: VCH, v.6B, p. 52-64, 1988.

REHMAN, A. et al. Pretreatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3- propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008.

RODRIGUES, R. **Dextrana: Produção e Aplicação Industrial**, 2009, 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2009.

RUIZ-HERRERA J. Biosynthesis of β -glucans in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 73-81, 1991.

SALES JÚNIOR, R. et al. Controle químico da podridão peduncular causada por *Lasiodyplodia theobromae* em mangas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 907-910, 2009.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodyplodin from Cardols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 1999.

SCHLEMMER, D. A.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. F. **Biomateriais: Polímeros e Compósitos**. Embrapa, 9 p. (Comunicado técnico 10), 2014.

SCHMIDELL, W.; FACIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. II, cap. 8, p. 179-204.

SECHI, N. S. M. **Fosforilação da (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glucana (Lasiodyplodana): Caracterização Físico-Química e Estrutural**. 2017, 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

SEVIOUR, R. J. et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 170-185, 2011.

SHENG, G.-P.; YU, H.-Q.; LI, X.-Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882-894, 2010.

SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 447-460, 2004.

SIMON, L.; CAYE-VAUGIE C.; BOUCHONNEAU, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 979-985, 1993.

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica**. 2014, 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2nd edition. East Lansing -Freeman Press, 412p, 1996.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, p.480-486, 2004.

SUMMERBELL, R. C. et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. **Medical Mycology**, v. 42, 543-547, 2004.

TANG, Y-J.; ZHONG, J-J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 478-484, 2003.

TAVARES, S. C. C. de H. Perigo ronda as frutas. **Revista Cultivar**, v. 4, n. 20, p. 18-23, 2003.

THOMPSON, J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.

TONELI, J. T. C. L., MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da Reologia de Polissacarídeos Utilizados na Indústria de Alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

TORRES, C. A. V. et al. Impact of glycerol and nitrogen concentration on *Enterobacter* A47 growth and exopolysaccharide production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 81-86, 2014.

TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2019-2023, 2010.

TÚRMINA, J. A. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**. 2012, 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L. Three exopolysaccharides of the β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a β -(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

VENUGOPAL, V. Extracellular Polysaccharides from Marine Microorganisms. In:_____. **Marine Polysaccharides: Food Applications**. CRC Press, 2011. cap. 5, p. 135-154.

VEVERKA, M. et al. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: Synthesis, characterization, and stability. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 309-318, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

WANG, Y. et al. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 283-288, 2008.

WOO, P. C. Y. et al. *Lasioidiplodia theobromae* Pneumonia in a Liver Transplant Recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 380-384, 2008.

XU, C. P. et al. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. **Bioresource Technology**, v. 97, p.770-777, 2006.

XU, J. et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227-234, 2009.

ZHAO, W. et al. Bacterial cell surface properties: Role of loosely bound extracellular polymeric substances (LB-EPS). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 600-607, 2015.

ZHOU, Y. et al. Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 48–53, 2014.