UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RAFAEL RODRIGUES PHILIPPINI

**Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de
subprodutos agrícolas**

Lorena
2017

RAFAEL RODRIGUES PHILIPPINI

Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Setembro, 2017

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)

Philippini, Rafael Rodrigues

Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas / Rafael Rodrigues Philippini; orientador Silvio Silvério da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017. 133 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. 2017
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Farelo de arroz. 2. Farelo de milho. 3. Hidrolisados de resíduos agrícolas. 4. Lasiodiplodana. 5. Lasiodiplodia theobromae. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

*Dedico essa tese a meus familiares,
Em especial, aos meus pais!
Meus melhores professores,
Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela amizade ao longo de todo o decorrer da minha pós-graduação e; pela confiança e liberdade de desenvolvimento do tema deste trabalho. Que todos os alunos iniciados em suas carreiras acadêmicas tenham a mesma sorte de desenvolver laços fortes com o orientador como eu tive;

A minha professora de graduação, Ana Maria Cugliana Pereira, pelo incentivo e força. Sempre serei grato pela a amizade e zelo. Minha eterna professora;

Aos meus amigos (e pesquisadores) Paulo Franco Marcelino e Ruly Terán Hilaes pelas horas gastas de ensinamentos dentro e fora do laboratório e ajuda na interpretação dos dados. Aprendi muito com vocês e espero o sucesso em suas vidas acadêmicas e pessoais.

Aos professores Dr. Júlio Cesar dos Santos e Dr. Talita Martins Lacerda pela ética e *insights* dados na elaboração e lapidação deste trabalho. Agradeço muito a colaboração e contribuição dada por vocês;

Aos meus alunos de iniciação científica Henrique Bonagurio Pavan e Juliana Napolitano Alves Pinheiro, que me auxiliaram a desenvolver os experimentos. Essa tese de doutorado não é somente minha, mas nossa;

Aos colegas de pós-graduação do LBIOS, Anuj Chandel, Adriana Dilon, Andrés Pérez, Kelly Dussán, Larissa Brumano, Felipe Antunes, Gilda Silva, Javier Cachumba, Lucas Ramos, Matheus Soler, Swapnil Gaikwad e Wagner Freitas e seus aos alunos de iniciação científica do LBIOS, Gabriela Almeida, Guilherme Peres, Michelle Garcia e Sara Galeno, que contribuíram direta e indiretamente durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos da EEL, que influenciaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Proporcionando, seja conhecimento, ou momentos de descontração;

Aos meus amigos: Carlos Augusto Nunes (Guto), Carlos Eduardo Palhares (Kadu), Celso Pereira (Celsinho), Diego Castro, Gabriel Mina (Bieh), Jonas Barros (Jonão), Oscar Figueiredo, Osmar Faria, Rafael Moura (Fusquinha), Renan Figueiredo (Canetão) e Renato Salvador (Cabeção) pelos momentos de descontração e companheirismo durante o decorrer da vida;

À Sabrina, pelo incentivo e paciência dentro e fora do ambiente laboratorial e pela dedicação para meu bem estar físico e emocional durante todos esses anos de convivência. Minha amiga e companheira: espero ter você sempre a meu lado! Conte comigo para sempre!

Aos meus familiares em especial meus pais, que acreditaram em mim. A base da pirâmide é o que nos eleva.

À Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966, objeto deste estudo

À bolsa CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

E se um dia ou uma noite um demônio se esgueirasse em tua mais solitária solidão e te dissesse: "Esta vida, assim como tu vives agora e como a viveste, terás de vivê-la ainda uma vez e ainda inúmeras vezes: e não haverá nela nada de novo, cada dor e cada prazer e cada pensamento e suspiro e tudo o que há de indivisivelmente pequeno e de grande em tua vida há de te retornar, e tudo na mesma ordem e sequência - e do mesmo modo esta aranha e este luar entre as árvores, e do mesmo modo este instante e eu próprio. A eterna ampulheta da existência será sempre virada outra vez, e tu com ela, poeirinha da poeira!". Não te lançarias ao chão e rangerias os dentes e amaldiçoarias o demônio que te falasses assim? Ou viveste alguma vez um instante descomunal, em que lhe responderias: "Tu és um deus e nunca ouvi nada mais divino!" Se esse pensamento adquirisse poder sobre ti, assim como tu és, ele te transformaria e talvez te triturasse: a pergunta diante de tudo e de cada coisa: "Quero isto ainda uma vez e inúmeras vezes?" pesaria como o mais pesado dos pesos sobre o teu agir! Ou, então, como terias de ficar de bem contigo e mesmo com a vida, para não desejar nada mais do que essa última, eterna confirmação e chancela?

RESUMO

PHILIPPINI, R. R. **Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas.** 2017. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017.

A utilização de resíduos da agroindústria na produção de biomoléculas de interesse industrial agrega valor ao produto, por não utilizar meios sintéticos, reduzindo custos totais de produção e promovendo o desenvolvimento de tecnologias mais limpas e sustentáveis. Os exopolissacarídeos, ou simplesmente EPS são polímeros naturais, excretados por algumas espécies de bactérias e fungos. Possuem grande interesse no setor industrial, dado a versatilidade da biomolécula na utilização nas áreas médica, farmacêutica e química apresentando potencial de geração de diversos produtos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando hidrolisados obtidos a partir de subprodutos agrícolas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*. Foram realizados Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR) 2² com três repetições nos pontos centrais para avaliação de condições ótimas de produção de hidrolisados de farelos de arroz e milho com concentrações estimáveis de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais. Os hidrolisados obtidos foram utilizados em ensaios fermentativos para obtenção da lasiodiplodana em meio de cultivo (LAS-M) e aderida à biomassa celular (LAS-C), bem como produção de células. Para elaboração dos ensaios foram utilizados DCCR 2³ e 2² em hidrolisados de farelos de arroz e milho, respectivamente. As variáveis escolhidas para o DCCR 2³ foram pH, volume de meio em frasco e adição de sais suplementares, enquanto o DCCR 2² apresentaram como variáveis o estudo da agitação e temperatura. Os delineamentos estudados geraram diversos modelos significativos para a produção de hidrolisados e obtenção de frações de lasiodiplodana. As frações de LAS-M e LAS-C obtidas foram caracterizadas parcialmente quanto a seus conteúdos de carboidratos e proteínas, sendo também analisadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e análises cristalográficas de Raios-X. Os hidrolisados de farelo de arroz apresentaram concentrações aproximadas para açúcares totais (40 g/L), açúcares redutores (10 g/L) e proteínas (14 g/L) enquanto o hidrolisado de farelo de milho apresentou 170, 70 e 14 g/L dos respectivos componentes. Os hidrolisados foram tratados e utilizados em ensaios fermentativos apresentando concentrações de LAS-M de 7,8 e 5,73 g/L, LAS-C 4,93 e 3,0 g/L e biomassa celular de 10,68 e 4,47 g/L respectivamente para hidrolisados de farelos de arroz e milho, apresentando consumo dos açúcares totais de 94 e 84%. As frações de lasiodiplodana LAS-M apresentaram em sua composição concentrações de açúcares redutores correspondentes a 83,62 e 92,16%, enquanto as frações LAS-C apresentaram 82,19 e 88,42% para os respectivos hidrolisados. As análises de FTIR e Raios-X demonstraram que os biopolímeros obtidos neste trabalho apresentaram estruturas semelhantes aos citados na literatura. Evidenciou-se que os hidrolisados utilizados nas condições estudadas proporcionaram condições adequadas para o fungo *L. theobromae* sintetizar o exopolissacarídeo lasiodiplodana.

Palavras-chave: Farelo de arroz; Farelo de milho; Hidrolisados de resíduos agrícolas; Lasiodiplodana; *Lasiodiplodia theobromae*.

ABSTRACT

PHILIPPINI, R. R. **Production of lasiodiplodan exopolysaccharide from agricultural byproducts**. 2017. 133 p. Thesys (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017.

The utilization of agro-industrial wastes for industrial-interest biomolecules production generates add-value products, reducing total production costs and promoting the development of cleaner and more sustainable technologies. Exopolysaccharides, or simply EPS are natural polymers, excreted by some species of bacteria and fungi. They present a great interest from industrial sector, given the versatility of the biomolecule and its use in medical, pharmaceutical and chemical sectors, generating a diversity of products. The present work had as objective to study the exopolysaccharide lasiodiplodan by fermentation of hydrolysates obtained from agricultural by-products from filamentous fungi *Lasiodiplodia theobromae*. Rotational Central Compound Designs (DCCR) 2^2 were performed for the evaluation of optimum conditions for the production of hydrolysates from rice and corn brans with estimated concentrations of total sugars, reducing sugars and total proteins. The optimized hydrolysates were used in fermentative assays for obtaining lasiodiplodan from culture medium (LAS-M) and cell biomass (LAS-C), as well as cell production. For the elaboration of the tests, DCCR 2^3 and 2^2 were performed using rice bran and corn bran hydrolysates, respectively. The chosen variables for the DCCR 2^3 were pH, medium volume in flask and addition of supplemental salts, while the DCCR 2^2 presented agitation and temperature as variables. The studied designs presented several significant models for the hydrolysates production and its lasiodiplodan fractions. Obtained fractions of LAS-M and LAS-C were partially characterized due to carbohydrate and protein contents, as well as X-ray crystallographic analysis and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy – FTIR. Rice bran hydrolysates presented estimated concentrations for total sugars (40 g / L), reducing sugars (10 g / L) and proteins (14 g / L) while corn bran hydrolysates showed 170, 70 and 14 g / L respectively. Treated rice and corn bran hydrolysates used for fermentative assays presented respective concentrations for LAS-M (7.8 and 5.73 g/L), LAS-C (4.93 and 3.0 g/L) and cellular biomass (10.68 and 4.47 g/L) and total sugar consumption of 94 and 84%, respectively. The lasiodiplodan fractions LAS-M presented reducing sugars compositions of 83.62 and 92.16%, while LAS-C fractions presented 82.19 and 88.42% for rice and corn bran hydrolysates. FTIR and X-ray anlysis showed that the present obtained biopolymers presented similar structures to those mentioned in the literature. It was evidenced that the hydrolysates used under the studied conditions provided adequate conditions for *L. theobromae* to synthesize the exopolysaccharide lasiodiplodan.

Keywords: Rice bran; Corn bran; Agricultural residue hydrolysates; Lasiodiplodan; *Lasiodiplodia theobromae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Hifas maduras de <i>L. theobromae</i> após cultivos em meio YPD; (B) conídios imaturos são hialinos enquanto os conídios maduros são escuros. 400x.	25
Figura 2 – Proposta para síntese da parede celular em fungos.	31
Figura 3 – Estruturas das estruturas dos exopolissacarídeos $\beta(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)$ (A) e $\beta(1 \rightarrow 6)$ (B) produzidas pelo fungo <i>L. theobromae</i>	34
Figura 4 – Principais aplicações industriais dos exopolissacarídeos produzidos por fungos	35
Figura 5 – Fluxograma das atividades envolvidas no presente trabalho.	47
Figura 6 – Diagrama para análise do crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> em placa de Petri. O pontos cinzas centrais representam os discos de ágar contendo o micélio fúngico inicial.	50
Figura 7 – Teste de incidência de luz em <i>L. theobromae</i> para a avaliação do crescimento da colônia, desenvolvimento de picnídios e produção de pigmentos. t=0h (A); t=96 horas com alternância de luz (B) e; ausência de luz (C). Meios de cultivo: 1 (YPX); 2 (YPD); 3 (N-Glicose); 4 (PDA); 5 (YPMG).	60
Figura 8 – Crescimento radial do fungo em placas de Petri e em diferentes meios de e cultivo sob incidência parcial de luz (A) e ausência de luz (B). ■: YPX; ■: YPD; ■: N-glicose; ■: PDA; ■: YPMG.	61
Figura 9 – Crescimento radial (A e B) e velocidade de crescimento radial (C e D) do fungo <i>L. theobromae</i> em sob incidência e ausência de luz.	62
Figura 10 – Microscopia de luz de (A) picnídio intacto (400x); (B) após rompimento mecânico com liberação de conídios imaturos em detalhe (400x) e; (C) Conídios imaturos e maduros livres (1000x).	64
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura dos picnídios em 500X (A) e 1000x (B).	64
Figura 12 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores; ■: Proteínas totais.	66
Figura 13 – Superfícies de resposta para a obtenção de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e proteínas totais (C) em hidrolisados de farelo de arroz.	72
Figura 14 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados de farelo de arroz. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores e; ■: Proteínas totais.	75
Figura 15 – Superfícies de resposta para a obtenção de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e proteínas totais (C) em hidrolisados de farelo de milho.	81
Figura 16 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados de farelo de milho. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores e; ■: Proteínas totais.	83
Figura 17 – Comparação da produção de EPS por <i>L. theobromae</i> em cultivos estáticos (A e B) e agitados (C e D) para fermentações em N-glicose e N-xilose, respectivamente. ■: Carboidrato; △: Biomassa celular; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ○: pH.	84
Figura 18 – Microscopia de luz. Conídios jovens atrelados às células conidiogênicas livres com conídios "em cacho". (400X).	86
Figura 19 – Crescimento celular e consumo de açúcares totais. ■: AT – açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M e; △: Biomassa celular.	87
Figura 20 – Morfologia de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> cultivado em hidrolisado de cana-de-açúcar (400x).	88
Figura 21 – Cinética de crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e produção de lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de arroz segundo DCCR 2 ³ . ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.	91
Figura 22 – Relação de recuperação total de lasiodiplodana presentes no meio de cultivo e aderido à biomassa celular. (A) 72 horas de cultivo e (B) 96 horas de cultivo. ■: lasiodiplodana livre no meio fermentativo (LAS-M) e; ■: lasiodiplodana aderida à biomassa celular (LAS-C).	93

Figura 23 – Superfícies de resposta para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana (A) e biomassa celular (B) em hidrolisados de farelo de arroz.....	96
Figura 24 – Experimento para validação do DCCR 2 ³ para produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz. ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo;◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.....	98
Figura 25 – Fungo <i>L. theobromae</i> em hidrolisado de farelo de arroz. (100x).	99
Figura 26 – Cinética de crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e produção de lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de milho segundo DCCR 2 ² . ■: AT – açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.	102
Figura 27 – Relação percentual de recuperação total de lasiodiplodana livre em hidrolisados de farelo de milho e aderida à biomassa celular em 72 horas de cultivo (A) e 96 horas de cultivo (B). ■: lasiodiplodana livre no meio fermentativo e; ■: lasiodiplodana aderida à biomassa celular.	104
Figura 28 – Superfícies de resposta para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre no meio de cultivo (A), lasiodiplodana aderida à biomassa celular (B) e biomassa celular (C) em hidrolisados de farelo de milho.....	107
Figura 29 – Validação do DCCR 2 ² para produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho. ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT – Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.	108
Figura 30 – Fungo <i>L. theobromae</i> em hidrolisado de farelo de milho. (100x).	110
Figura 31 – Recuperação da lasiodiplodana (LAS-M) em hidrolisado de farelo de arroz. (A): precipitação com etanol gelado; (B): LAS-M tratada e recuperada; (C): LAS-M seca e pulverizada.	112
Figura 32 – Recuperação da lasiodiplodana (LAS-M) em hidrolisado de farelo de milho. (A): precipitação com etanol gelado; (B): LAS-M tratada e precipitada em etanol; (C): LAS-M seca e pulverizada.	112
Figura 33 – Percentuais de açúcares redutores e proteínas totais em diferentes frações de lasiodiplodana. ■: açúcares redutores e; ■: proteínas totais.	113
Figura 34 – Espectros de absorção na região do infravermelho da lasiodiplodana (LAS-M), produzidas em meio sintético de glicose (A), hidrolisado de farelo de arroz (B) e hidrolisado de farelo de milho (C).	114
Figura 35 – Difratoogramas de Raios-X das amostras de lasiodiplodana produzidas por <i>L.theobromae</i> em hidrolisados de farelo de arroz ■, farelo de milho ■ e meio sintético ■.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais culturas de importância econômica afetadas por <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	24
Tabela 2 – Metabólitos de interesse biotecnológico produzidos por <i>L. theobromae</i>	27
Tabela 3 – Principais fungos produtores de α -glucanas estruturais.	30
Tabela 4 – Principais fungos produtores de β -glucanas estruturais.	32
Tabela 5 – Principais fungos filamentosos produtores de exopolissacarídeos e suas aplicações.	37
Tabela 6 – Reagentes do preparo dos sais de Vogel.	48
Tabela 7 – Reagentes do preparo dos elementos traço.	49
Tabela 8 – Composição dos meios para testes de iluminação de <i>L. theobromae</i>	50
Tabela 9 – Valores codificados e reais das variáveis independentes do delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliação do efeito dos parâmetros concentração de H_2SO_4 e massa de farelo na produção de hidrolisados de arroz e de milho.	54
Tabela 10 – Nomenclatura das frações dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e farelo de milho após cada etapa de tratamento.	55
Tabela 11 – Composição dos meios para testes de fermentação submersa.	56
Tabela 12 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com três repetições no ponto central.	57
Tabela 13 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com três repetições no ponto central.	58
Tabela 14 – Equação do raio em função do tempo e velocidade do crescimento radial de <i>L. theobromae</i>	62
Tabela 15 . Produção de picnídios em diferentes meios de cultivo sob incidência parcial e ausência de luz.....	63
Tabela 16 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e diluído.	65
Tabela 17 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por cromatografia líquida de alta eficiência.	65
Tabela 18 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliação da influência da concentração ácida e massa de farelo na obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais em hidrolisados de farelo de arroz.	67
Tabela 19 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de <i>t</i> e <i>p</i> obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de arroz.....	70
Tabela 20 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R^2) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de arroz.....	70
Tabela 21 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado farelo de arroz.	74
Tabela 22 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado farelo de arroz por cromatografia líquida de alta eficiência.	74
Tabela 23 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliação da influência da concentração ácida e massa de farelo na obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais em hidrolisados de farelo de milho.	76
Tabela 24 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de <i>t</i> e <i>p</i> obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.....	79
Tabela 25 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R^2) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.....	79

Tabela 26 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado de farelo de milho.	82
Tabela 27 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado de farelo de milho por cromatografia líquida de alta eficiência.	82
Tabela 28 – Parâmetros fermentativos para produção de lasiodiplodana por <i>L. theobromae</i> em cultivos sintéticos estáticos e agitados contendo xilose e glicose.	85
Tabela 29 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2^3 para avaliação da influência do pH, volume de meio e suplementação com sais de Vogel em hidrolisados de farelo de arroz para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre, aderida as células e produção de biomassa celular em 96 horas de cultivo.	89
Tabela 30 – Consumo percentual de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e pH final do DCCR 2^3 em hidrolisados de farelo de arroz.	92
Tabela 31 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de <i>t</i> e <i>p</i> obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana e biomassa celular a partir de hidrolisados de farelo de arroz.	95
Tabela 32 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R^2) dos modelos ajustados para a obtenção exopolissacarídeo lasiodiplodana e biomassa celular a partir de hidrolisados de farelo de arroz.	95
Tabela 33 – Otimização de variáveis para maximização da produção de lasiodiplodana no meio de fermentação (LAS-M), com valores preditos e testados. A: Condição estipulada pelo software Design-Expert 7.0. B: Validação em triplicata.	97
Tabela 34 – Parâmetros fermentativos para produção de LAS-M por <i>L. theobromae</i> em cultivo em hidrolisado de arroz.	98
Tabela 35 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliação da influência da agitação e temperatura em hidrolisados de farelo de milho para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre e aderido às células, produção de biomassa celular e consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais.	100
Tabela 36 – Consumo percentual de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e pH final do DCCR 2^2 em hidrolisados de farelo de milho.	103
Tabela 37 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de <i>t</i> e <i>p</i> obtenção de lasiodiplodana livre no meio, lasiodiplodana aderida a biomassa e biomassa celular a partir de hidrolisado de farelo de milho.	105
Tabela 38 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R^2) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.	105
Tabela 39 – Otimização de variáveis para maximização da produção de lasiodiplodana no meio de fermentação (LAS-M), com valores preditos e testados. A: Condição estipulada pelo software Design-Expert 7.0. B: Validação em triplicata.	108
Tabela 40 – Parâmetros fermentativos para produção de LAS-M por <i>L. theobromae</i> em cultivo em hidrolisado de arroz.	109
Tabela 41 – Peso e composição química parcial da lasiodiplodana após tratamento quanto a percentuais de açúcares redutores e proteínas totais.	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	O fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	23
2.1.1	Considerações taxonômicas, morfológicas e fisiológicas	24
2.1.2	A utilização de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> no cenário biotecnológico	26
2.2	Os polissacarídeos estruturais	27
2.2.1	A síntese de α -glucanas microbianas	29
2.2.2	A síntese de β -glucanas microbianas	30
2.3	Exopolissacarídeos	33
2.3.1	O exopolissacarídeo lasiodiplodana	34
2.4	Aplicação industrial dos exopolissacarídeos	34
2.4.1	Aplicações na indústria alimentícia	35
2.4.2	Aplicação na indústria farmacêutica e química	36
2.5	Composição nutricional, parâmetros físicos e métodos de fermentação para produção de exopolissacarídeos	38
2.5.1	Fontes de carbono	38
2.5.2	Fontes de nitrogênio	39
2.5.3	Micronutrientes, aditivos e vitaminas	39
2.5.4	Temperatura, pH e tempo de cultivo	40
2.5.5	Métodos de fermentação para a produção de exopolissacarídeos	41
2.6	Subprodutos agrícolas	41
2.6.1	Biomassa lignocelulósica	41
2.6.2	A biomassa amilácea	43
3	OBJETIVOS	46
3.1	Geral	46
3.2	Específicos	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Cultivo e manutenção do <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	48
4.1.1	Preparo dos Sais de Vogel (Meio N)	48
4.2	Perfil de crescimento de <i>L. theobromae</i> cultivadas em placas de Petri em condições sob a presença e ausência de luz	49
4.3	Subprodutos agrícolas	51
4.3.1	Obtenção do hidrolisado de cana-de-açúcar	51
4.3.2	Obtenção dos farelos de arroz e milho e hidrolisados	51
4.4	Caracterização química parcial dos hidrolisados de bagaço-de-cana-de-açúcar e de farelos de arroz e milho	52
4.4.1	pH	52
4.4.2	Açúcares totais	52

4.4.3	Açúcares redutores	52
4.4.4	Proteínas totais.....	53
4.4.5	Fenóis totais.....	53
4.4.6	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	53
4.5	Análise estatística e validação de dados	54
4.6	Estudo dos farelos de arroz e milho como fonte de carboidratos e proteínas por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ²	54
4.6.1	Tratamento dos hidrolisados de farelos arroz e milho para fermentação.....	55
4.7	Estudos preliminares para a produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando meios sintéticos, recuperação e tratamento dos biopolímeros.....	56
4.8	Estudo da produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando hidrolisado de farelo de arroz por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ³	56
4.9	Estudo da produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando hidrolisado de farelo de milho por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ²	58
4.10	Caracterização estrutural parcial das frações de lasiodiplodana obtidas em meio sintético e em hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho.....	59
4.10.1	Determinação da pureza da lasiodiplodana.....	59
4.10.2	Análises espectroscópicas de infravermelho (FTIR)	59
4.10.3	Análises cristalográficas (Raios-X)	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Perfil de crescimento de <i>L. theobromae</i> cultivadas em placas de Petri sob a presença e ausência de luz60	
5.1.1	Crescimento radial do micélio	60
5.1.2	Formação de estruturas de reprodução	63
5.2	Caracterização química parcial do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência	65
5.2.1	Composição do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado.....	66
5.3	Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ² para obtenção de hidrolisados de farelo de arroz. 67	
5.3.1	Caracterização química parcial do hidrolisado de farelo de arroz por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência	73
5.3.2	Composição do hidrolisado de farelo de arroz tratado para fermentação	75
5.4	Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ² para obtenção de hidrolisados de farelo de milho. 76	
5.4.1	Caracterização química parcial do hidrolisado de farelo de milho por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência	82
5.4.2	Composição do hidrolisado de farelo de milho tratado para fermentação	83
5.5	Fermentação em meio sintético	84
5.6	Produção de lasiodiplodana em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.....	86
5.7	Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ³ para obtenção de do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisado de farelo de arroz	88
5.7.1	Obtenção de exopolissacarídeo a partir do micélio fúngico em hidrolisado de farelo de arroz.....	93
5.7.2	Validação do modelo experimental da produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz ..	97

5.8	Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ² para obtenção de do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisado de farelo de milho.....	100
5.8.1	Obtenção de exopolissacarídeo a partir do micélio fúngico em hidrolisado de farelo de milho	103
5.8.2	Validação do modelo experimental da produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho	108
5.9	Caracterização estrutural parcial da lasiodiplodana	111
5.9.1	Pureza da lasiodiplodana obtidas em hidrolisados de farelo de arroz e milho e frações aderidas à biomassa celular	111
5.9.2	Espectroscopia de infravermelho – FTIR.....	114
5.9.3	Cristalografia de Raios-X.....	115
6	CONCLUSÕES	117
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	118
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICES	131
	Apêndice A - Curva de calibração: Açúcares totais	131
	Apêndice B - Curva de calibração: Açúcares redutores	132
	Apêndice C - Curva de calibração: Proteínas totais	133

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os fungos filamentosos, popularmente conhecidos como mofo e bolores, estão distribuídos praticamente em todas as áreas do planeta sendo capazes de sintetizar diversos metabólitos primários e secundários de interesse humano. Esses metabólitos podem ser utilizados principalmente nas áreas agrícolas, alimentícias e farmacêuticas, como por exemplo, na produção de bioinseticidas, biocorantes e antibióticos, respectivamente, dentre outros. São de extrema importância para a manutenção do equilíbrio ecológico, por serem capazes de realizar a decomposição da matéria orgânica a nível básico – principalmente na degradação da celulose, hemicelulose e lignina vegetal. A degradação dessa biomassa permite o reciclo de nutrientes e faz dos fungos um protagonista ativo dos ciclos do carbono e do nitrogênio.

Muitas vezes os fungos são vistos como antagonistas, por serem causadores de diversas doenças em animais e humanos. O setor agrícola mundial também é comprometido por fungos, o que ocasiona prejuízos na ordem de 60 bilhões de dólares. Contudo, a utilização desses microrganismos proporciona o desenvolvimento de novos produtos em diversos setores industriais e contribui para a melhoria do bem estar humano.

O Brasil é em sua maioria um país agrícola, com montante responsável por mais de 20% do PIB. A grande produção agrícola gera uma grande diversidade de subprodutos agroindustriais e que apresentam como principais componentes estruturais a celulose, a hemicelulose e a lignina, além de serem fontes ricas em amido, proteínas e lipídeos. Esses materiais apresentam um grande potencial energético para a síntese biotecnológica de diversos produtos, que podem ser metabólitos primários e secundários, oriundos dos cultivos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

O destino dessas biomassas é na grande maioria para a utilização na produção de ração animal, queima para a geração de energia e muitas vezes, o simples descarte no solo. Esse trabalho, com o intuito de aproveitamento da biomassa vegetal para síntese de produtos de alto valor agregado propôs a utilização do fungo filamentoso *Lasioidiplodia theobromae*, para a produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de subprodutos da agroindústria. A lasiodiplodana é uma β -glucana e apresenta grande potencial de valor de mercado, devido a suas atividades anti-inflamatória, imunomoduladora e anti-proliferativa. A sua utilização somada a utilização de fontes de carbono e nitrogênio renováveis, como os obtidos por hidrolisados oriundos de subprodutos agrícolas colaboram para o desenvolvimento de uma economia sustentável e verde.

A nova tendência global de utilização de *biobased products* promove como alternativa aos métodos tradicionais o desenvolvimento de novos compostos biotecnológicos. Nesse contexto, os exopolissacarídeos, ou simplesmente EPS, são produtos de grande destaque no cenário nacional, devido a sua versatilidade de emprego. A produção de lasiodiplodana ocorre preferencialmente pela utilização de meios quimicamente definidos, contendo fontes de carbono e nitrogênio. Visando uma alternativa ao uso de meios sintéticos, dado ao grande volume de farelos gerados como beneficiamento de grãos no Brasil, o presente trabalho propõe a utilização de hidrolisados de farelos de arroz e milho, em substituição à utilização de fontes sintéticas de carbono e de nitrogênio para uma produção sustentável de lasiodiplodana. O presente projeto está inserido no tema “Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais” e “Desenvolvimento de Processos Fermentativos” e proporcionou o fortalecimento das linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBIOS), da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), majoritariamente executados nos laboratórios de Microbiologia Aplicada do Departamento de Biotecnologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fungo *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatogênico, cosmopolita, polífago e oportunista, geralmente associado à deficiência nutricional e ferimentos provocados no decorrer das práticas de manejo (LIMA et al., 2014). Oriundo de zonas tropicais e subtropicais é o causador da decomposição de mais de 500 tipos de plantas dando destaque para as principais culturas brasileiras como: café, cana-de-açúcar, laranja e soja (ENG, 2009), além de diversos outros cultivos de importância econômica, levando a prejuízos (Tabela 1). Este fungo causa a “morte regressiva” (*dieback*) dos vegetais, fenômeno que ataca as plantas pelas extremidades, causando queda das folhas, progredindo para ramos e galhos (RODRIGUES, 2003; ISMAIL, et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Pode causar também o cancro em caules, raízes e ramos; lesões em folhas, frutos e sementes e eventual morte em enxertos e mudas (FREIRE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013). A contaminação da planta por esse fungo ocorre por lesões naturais, ou ferimentos ocasionados por insetos, aves ou até mesmo ação antrópica. O enfraquecimento das plantas ocasionado pela contaminação do fungo torna-as vulneráveis ao ataque de insetos e outros agentes. A disseminação do fungo acontece de modo semelhante, sendo realizado por artrópodes, vento e por instrumentos de poda de plantas (OLIVEIRA, 2013).

Embora esteja amplamente associado a enfermidades em vegetais, o fungo *L. theobromae* apresenta Nível de Biossegurança 1 (NB-1), ou seja, é apto ao trabalho não necessitando de barreiras primárias ou secundárias de contenção. Assim como outros microrganismos NB-1, fungo *L. theobromae* não provoca doenças em seres humanos saudáveis, possuindo risco mínimo ao ambiente laboratorial e meio ambiente e exigindo apenas a adoção de boas práticas de laboratório (BPL) durante a sua manipulação (ANVISA, 2008; FIOCRUZ, 2017).

O desenvolvimento da patogenicidade de *L. theobromae* em vegetais pode estar relacionado, dentre outros fatores ao desenvolvimento de monoculturas, que causam restrições às interações ambientais, exaustão de recursos do solo e baixa ciclagem de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2013). O processo de evolução da patogenicidade do fungo pode ainda estar associado a mudanças climáticas e ações antrópicas, como o desmatamento e a aplicação de agrotóxicos. Esses fatores podem ocasionar alterações em todos os estágios de desenvolvimento tanto do fungo quanto do vegetal hospedeiro, o que torna necessário um

melhor entendimento da interação hospedeiro-patógeno-ambiente de modo a delinear estratégias para um controle mais eficaz (OLIVEIRA, 2013).

Tabela 1 – Principais culturas de importância econômica afetadas por *Lasiodiplodia theobromae*.

Nome científico	Nome Popular	Referência
<i>Gossypium</i> sp.	algodão	OLIVEIRA, MACHADO, ANDRADE, 1996
<i>Oryza</i> sp.	arroz	OLIVEIRA, 1986
<i>Musa</i> sp.	banana	ALVES et al., 2008 BURGESS et al., 2006 RESPLANDY et al., 1954
<i>Theobromae cacao</i>	cacau	PEREIRA, SILVA & RIBEIRO, 2006
<i>Coffea arabica</i>	café	RESPLANDY et al., 1954 ENG SÁNCHEZ, 2009
<i>Anacardium occidentale</i>	caju	CARDOSO et al., 2009
<i>Saccharum</i> sp.	cana-de-açúcar	ENG SÁNCHEZ, 2009
<i>Phaseolus vulgaris</i>	feijão	RESPLANDY et al., 1954
<i>Citrus</i> sp.	laranja/limão	ENG SÁNCHEZ, 2009
<i>Zea mays</i>	milho	RESPLANDY et al., 1954
<i>Nicotiana tabacum</i>	tabaco	ENG SÁNCHEZ, 2009
<i>Vitis vinifera</i>	uva	ALVES et al., 2008
<i>Glycine max</i>	soja	MILLER; ROY, 2011

Fonte: Autoria própria

2.1.1 Considerações taxonômicas, morfológicas e fisiológicas

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um Ascomiceto, pertencente a classe dos Deuteromicetos, Ordem Botryosphaeriales e Família Botryosphaeriaceae. É a forma anamórfica de *Botryosphaeria rhodina* por apresentar apenas a reprodução assexuada pela produção de conídios. Apresenta como sinônimas os nomes científicos *Botryodiplodia theobromae* e *Diplodia theobromae*, embora estes não sejam mais utilizados.

O fungo apresenta abundante micélio aéreo de coloração que varia do branco-acinzentado ao preto, de acordo com o meio de cultivo e estágio de maturação. As hifas ao serem observadas ao microscópio são septadas e apresentam coloração hialina quando jovens e castanhas quando maduras (Figura 1) (SANDOVAL-SÁNCHEZ et al., 2013). O fungo *L. theobromae* apresenta como característica a presença de receptáculos de armazenamento assexuado, os picnídios. Os picnídios possuem coloração escura, apresentam-se de forma individual ou composta e estão firmemente ligados ao micélio fúngico (ENG, 2008). A lise da parede do picnídio por ação mecânica leva à liberação dos conídios, estruturas responsáveis

pela reprodução assexuada do fungo. Os conídios são ovais, asseptados, apresentando coloração hialina quando imaturos, de modo que os conídios maduros são mais escuros e septados (Figura 1B). Devido a outras espécies da família apresentar conídios como estrutura de reprodução assexuada, a identificação de gêneros por visualização das estruturas é dificultada (ABDOLLAHZADEH et al., 2009)

Figura 1 – (A) Hifas maduras de *L. theobromae* após cultivos em meio YPD; (B) conídios imaturos são hialinos enquanto os conídios maduros são escuros. 400x.

Fonte: Autoria própria

O fungo *L. theobromae* apresenta crescimento em temperaturas variadas, que vão de 15 a 40 °C (ENG SÁNCHEZ, 2009), sendo que a produção micelial é escassa em temperaturas inferiores 15 °C, sendo inexistente a 10 °C e promovida em temperaturas de 30 a 40 °C (KHANZADA; RAJPUT; SHAHZAD, 2006). A temperatura ótima de crescimento utilizada em diversos estudos varia entre 25 e 30 °C, sendo suficiente para que o micélio fúngico tome por completo a placa de Petri em 72 horas (GOOS; COX; STOTZKY, 1961). A formação de picnídios, estruturas de reprodução do fungo, também foi promovida por temperaturas entre 30 e 35°C, não havendo formação em baixas temperaturas (KHANZADA; RAJPUT; SHAHZAD, 2006). A exposição a temperaturas mais elevadas (55 a 75 °C), mesmo que por breves períodos (10 a 30 min) leva a morte do fungo e pôde ser utilizado com o intuito erradicar o fungo sem danificar os embriões de *Musa balbisiana* (GOOS; COX; STOTZKY, 1961).

O pH de crescimento para *L. theobromae* é de 4 a 10, o que junto com a ampla faixa de temperatura mostra sua alta adaptabilidade a condições adversas de crescimento (ENG SÁNCHEZ, 2009). Tandon e Srivastava (1963) realizaram um estudo variando o pH entre 2,5 e 9,0 e verificaram que a faixa ótima de crescimento do fungo é próxima a neutralidade.

Alguns estudos relataram que a formação dos picnídios no meio de cultura também ocorre em relação a sua exposição à luz. Rao e Singhal (1978) descreveram o efeito da maturação do micélio fúngico e consequente produção de picnídios em testes realizados na presença e ausência de luz sobre o cultivo. A produção de estruturas reprodutivas pode ser afetada por diferentes comprimentos de onda. As condições ideais para a germinação de conídios não são influenciada pela luz, mas pela umidade relativa e temperatura (ADISA¹, 1977 *apud* RODRIGUES, 2003).

A oxigenação do meio é um fator preponderante para o crescimento dos microrganismos, direcionando o seu metabolismo para diferentes rotas metabólicas. Sua disponibilidade define a taxa de absorção pelas células e determina se a fonte de carbono utilizada será direcionada para a produção de micélio ou síntese de diferentes produtos de interesse industrial (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Cultivos de *L. theobromae*, realizados sob condições de aeração favorecem a produção de exopolissacarídeos (CUNHA et al., 2012; TÚRMINA et al., 2012), enquanto fermentações estáticas provem, por exemplo, a síntese do ácido jasmônico (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007; ENG SÁNCHEZ; GUTIÉRREZ-ROJAS; FAVELA-TORRES, 2008; FCANAENG SÁNCHEZ, 2008).

2.1.2 A utilização de *Lasiodiplodia theobromae* no cenário biotecnológico

Os fungos, de um modo geral, são amplamente utilizados na indústria devido a seu grande espectro de produção de metabólitos de interesse comercial. Esses compostos bioativos ocorrem naturalmente e geralmente resultam da interação que o fungo realiza com seu hospedeiro. A utilização desses compostos é ampla, destacando-se produtos com atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, citotóxica e imunossupressora (CUNHA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2013; KAGIMURA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* apresenta uma vasta capacidade de produção de compostos bioativos. Esta característica é interessante, dado que a síntese desses produtos é uma alternativa promissora a produção industrial de diversos produtos. Destacam-se fármacos de uso animal e humano, hormônios reguladores do crescimento vegetal e pesticidas agrícolas. Podem também ser utilizados na produção de pigmentos (ENG SÁNCHEZ, 2009) utilizados na indústria alimentícia, em alternativa aos pigmentos sintéticos e; na produção de cosméticos, por apresentar compostos que apresentam funções de reparar, proteger e melhorar

¹ ADISA, V. A. Storage rots of banana fruits in some Nigerian markets. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 29-36, 1983.

a aparência da pele (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Atualmente, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de produzir biomoléculas fúngicas que causem a apoptose de células leucêmicas ou apresentem alguma atividade antitumoral (LIU; WANG, 2007; REKHA; SHARMA, 2007; SMIDERLE et al., 2010).

O fungo *L. theobromae* é conhecido pela síntese de diversos compostos bioativos, principalmente compostos em seu metabolismo secundário, o que o torna sua utilização atrativa ao cenário biotecnológico. A Tabela 2 resume alguns compostos produzidos por *L. theobromae* e suas potenciais utilizações no contexto industrial.

Tabela 2 – Metabólitos de interesse biotecnológico produzidos por *L. theobromae*.

Nome	Molécula	Atividade	Referências
Ácido Indole-3-carboxílico		antiinflamatória hormônio vegetal	ALDRIDGE et al., 1971 QIAN et al., 2014
Ácido Jasmônico		antibacteriana hormônio vegetal inseticida cosmético	ALDRIDGE et al., 1971 DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007 SÁNCHEZ, 2008
Lasiodiplodana		antivirais, antitumorais, antiinflamatórios imunomoduladoras	CUNHA et al., 2012 VASCONCELOS et al., 2013 KAGIMURA et al., 2015 OLIVEIRA et al., 2015
Lasiodiplodina		antitumoral hormônio vegetal	ALDRIDGE et al., 1971 HUANG; MINNAARD; FERINGA, 2011
Maleína		antibacteriano antifúngico antitumoral	ALDRIDGE et al., 1971 QIAN et al., 2014

Fonte: Autoria própria

2.2 Os polissacarídeos estruturais

Os polissacarídeos são as macromoléculas de maior abundância encontradas naturalmente na biosfera. Esses polímeros participam da constituição da biomassa dos seres vivos, como o amido, a celulose e a hemicelulose em plantas e o glicogênio em animais e cianobactérias.

Os polissacarídeos produzidos na natureza podem ser classificados em dois tipos, os homopolissacarídeos e os heteropolissacarídeos (CORRADI DA SILVA et al., 2006; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Os homopolissacarídeos possuem apenas um tipo de unidade monomérica, apresentando tanto características inerentes à constituição estrutural dos seres vivos, quanto ao armazenamento de carboidratos. A celulose e a quitina atuam, por exemplo, na formação da parede celular vegetal e exoesqueletos em diversos animais, respectivamente; enquanto o amido e o glicogênio atuam como reservas de glicose para os diversos seres vivos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Por outro lado, os heteropolissacarídeos possuem em sua composição dois ou mais tipos de unidades monoméricas, como a hemicelulose em plantas, que possui a função de conexão entre as fibrilas de celulose e a lignina, além de desempenhar funções de regulação e crescimento das plantas (BARBOSA et al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Assim como observado nas plantas, a produção microbiológica de polissacarídeos ocorre por de bactérias, fungos e microalgas, com a geração de produtos de importantes aplicações biotecnológicas para diversos setores como o alimentício, o farmacêutico e o químico-industrial, colaborando também para o desenvolvimento de melhorias para a saúde humana e animal (CORRADI DA SILVA et al., 2005; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; VASCONCELOS et al., 2013).

As glucanas são os principais exopolissacarídeos produzidos na natureza, apresentando grande variedade estrutural devido a suas diferentes configurações anoméricas, pontos de ramificação pela cadeia principal e variação quanto à espécie de microbiológica (PAVLOVA et al., 2004; RAVELLA et al., 2010; VALASQUES et al., 2014). Os aspectos estereoquímicos de α - e β -glucanas são diferenciados dado que as ligações do tipo α - estão presentes na posição axial, enquanto as ligações do tipo β - adotam uma posição equatorial na conformação da cadeia dos carboidratos (KAGIMURA et al., 2014). Existem também as heteroglucanas, que apresentam em sua estrutura ligações glicosídicas do tipo α - e β - ao longo da cadeia, como por exemplo os produzidos pelos fungos comestíveis *Astraeus hygrometricus* e *Termitomyces microcarpus* (CHAKRABORTY et al., 2004; CHANDRA et al., 2007).

Diversos microrganismos são produtores de polissacarídeos e sua síntese pode ser dividida em três tipos principais que são definidos de acordo com a sua localização celular, possuindo características específicas: 1- polissacarídeos intercelulares, responsáveis pelo armazenamento de fontes de carbono; 2- polissacarídeos da parede celular, como o peptidoglicano ou ácido teicóico e; 3- polissacarídeos extracelulares, como a cápsula associada a parede celular e os exopolissacarídeos secretados no meio de cultivo (STELUTI et

al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2006; ABDEL-AZIZ et al., 2012; KAGIMURA et al., 2014). A determinação de açúcares e proteínas presentes nos exopolissacarídeos pode ser feita pela utilização de metodologias espectrofotométricas tradicionais (SYNYTSYA; NOVAK, 2014). Para a determinação das estruturas das glucanas, muitos métodos analíticos podem ser empregados. Dentre esses, pode-se citar os métodos de metilação, oxidação, degradação Smith, além de técnicas de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) e modificações químicas com ^{13}C para a identificação de formas anoméricas e posicionamento das ligações glicosídicas (CORRADI DA SILVA et al., 2006; SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

2.2.1 A síntese de α -glucanas microbianas

As α -glucanas são constituídas de carboidratos monoméricos em ligações α -glicosídicas. Dentre os principais microrganismos produtores de α -glucanas, podemos citar os fungos filamentosos e as leveduras, devido a sua importância econômica e social. Essas glucanas apresentam estrutura variável e dependente da espécie (CORRADI DA SILVA et al., 2006), como demonstrado na Tabela 3. Podem apresentar ligações glicosídicas variáveis, do tipo $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$, sendo lineares ou mistas, apresentando ou não ramificação (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). As $\alpha(1\rightarrow3)$ -glucanas se apresentam em um grande número de fungos, principalmente em Ascomycetos e Basidiomycetos, em concentrações que variam de 9 a 46% da parede celular alcançando níveis de concentração com constituição de até 88% da parede celular e alguns corpos de frutificação (GRÜN, 2003). Sua estrutura é normalmente linear, com grau de polimerização variado entre 60 e 3500, formando hélices duplas simples que são estabilizadas por pontes de hidrogênio, porém podem apresentar resíduos alternados de $\alpha(1\rightarrow4)$ (BOCK; VINCENDON, 1983; CHOMA et al., 2013; GRÜN et al., 2005; WAKSMAN, 1977). O arranjo de empacotamento apresenta comportamento semelhante ao da celulose, sugerindo que as $\alpha(1\rightarrow3)$ -glucanas tenham função estrutural semelhante (CHANDRASEKARAN, 1997² apud GRÜN, 2003).

² CHANDRASEKARAN, R. Molecular architecture of polysaccharide helices in oriented fibers. **Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v.52, p.311-439, 1997.

Tabela 3 – Principais fungos produtores de α -glucanas estruturais.

Nome científico	Glucana	Tipo	Ligação	Referências
<i>Agaricus bisporus</i>	ND	R	(1→4),(1→6)	SMIDERLE et al., 2010
<i>Agaricus blazei</i>	ND	L	(1→4),(1→6)	MIZUNO et al., 1990
<i>Amanita muscaria</i>	ND	L	(1→3)	RUTHES et al., 2013
<i>Armillariella tabescens</i>	HCP	L	(1→6)	LUO et al., 2008
<i>Aspergillus niger</i>	nigerana	L	(1→3)-(1→4)	BOCK; VINCENDON, 1983
	pseudonigerana		(1→3)	WAKSMAN, 1977
<i>Aspergillus nidulans</i>	ND	L	(1→4)	GIENTKA et al., 2016
<i>Aspergillus wentii</i>	ND	L	(1→3)-(1→4)	CHOMA et al., 2013
<i>Cordiceps sinensis</i>	ND	R	(1→4),(1→6)	YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006
<i>Flammulina velutipes</i>	FVP2	R	(1→4),(1→6)	PANG et al., 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ND	L	(1→4)	PALACIOS et al., 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glicogênio	R	(1→4),(1→6)	GUNJA-SMITH; SMITH, 1974
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ND	L	(1→3)-(1→4)	GRÜN et al., 2005
<i>Sarcodon aspratus</i>	IPS-B2	L	(1→6)	HAN et al., 2011
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	ND	R	(1→3),(1→6)	PAVLOVA et al., 2004; POLI et al., 2010
<i>Termitomyces eurhizus</i>	ND	L	(1→3)-(1→6) (1→6)	MONDAL et al., 2004
<i>Tremella mesenterica</i>	tremelana	L	(1→4)-(1→6)	DE BAETS et al., 2002 FRASER; JENNINGS, 1971

ND: Não Definido **L:** linear **R:** ramificado

Fonte: Autoria própria

2.2.2 A síntese de β -glucanas microbianas

As β -glucanas são, por sua vez, constituídas por açúcares monoméricos em ligações β -glicosídicas. As β -glucanas estão presentes em muitos fungos, incluindo líquens (simbiose entre um fungo e uma alga/cianobactéria) (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Apresenta-se como estrutura predominante da parede celular a $\beta(1\rightarrow3)$ glucana, sendo extensivamente estudada em fungos desde 1950 quanto a sua estrutura química, propriedades físico-químicas e biossíntese (GRÜN, 2003). Possui como estrutura de hélice sêxtupla em tripla paralela, estabilizada por pontes de hidrogênio e grau de polimerização estimado em aproximadamente 1500 (JELSMA; KREGER, 1975). Resíduos $\beta(1\rightarrow4)$ semelhantes à celulose, não são apresentadas na estrutura de fungos, embora sua combinação linear com $\beta(1\rightarrow3)$ seja observada em fungos liquenizados (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Esses polímeros estão associados à proteína, lipídeos e outros carboidratos – como por exemplo, a manana, formando uma rede robusta que protege a célula e impede que as manoproteínas extravasem

para o meio extracelular (CABIB; ARROYO, 2013; CORRADI DA SILVA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2008).

A $\beta(1\rightarrow3)$ -glucano sintase (GS) é uma enzima localizada na membrana plasmática que catalisa o transporte da $\beta(1\rightarrow3)$ -glucana intracelular para o espaço extracelular, supostamente por permeases (GRÜN, 2003). A proposta desenvolvida por Cabib e Arroyo (2013) para síntese da parede celular em *Saccharomyces cerevisiae* é apresentada na Figura 2. Inicialmente é realizada a síntese da cadeia principal de $\beta(1\rightarrow3)$ -glucana a partir do açúcar nucleotídeo uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose), realizada pela enzima β -1,3-glucano sintase, seguido da adição de unidades de $\beta(1\rightarrow6)$ -glucana. Em seguida, a manoproteína (MP) e o glicosilfosfatidilinositol (GPI) são adicionadas a $\beta(1\rightarrow6)$ -glucana. Finalmente a quitina é sintetizada pela UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), pela quitina sintase III (CSIII) e também transferidas a $\beta(1\rightarrow6)$ -glucana. Embora não completamente esclarecida, cogita-se que o papel da manana tenha papel estrutural na parede celular, auxiliando na sua manutenção e rigidez, enquanto a quitina se apresenta como um material essencial para o desenvolvimento do espaço periplasmático, onde há atuação de diversas enzimas (CABIB; ARROYO, 2013; ZABED et al., 2014). Embora não apresentado, acredita-se que um mecanismo similar possa ser realizado na síntese da parede celular de fungos filamentosos.

Figura 2 – Proposta para síntese da parede celular em fungos.

Fonte: adaptado de Cabib e Arroyo, 2013.

Um tipo secundário de polissacarídeo amplamente encontrado em fungos é a $\beta(1\rightarrow6)$ glucana, que consiste em uma cadeia principal de $\beta(1\rightarrow6)$ e ramificações laterais de $\beta(1\rightarrow3)$. Apresenta-se na parede celular em concentrações que variam de 5 a 20%, conectando as $\beta(1\rightarrow3)$ e a quitina com as proteínas da parede celular. O grau de ramificação em O-4 e O-2 também podem ocorrer de acordo com a espécie fúngica, modo de isolamento e purificação do polissacarídeo (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013). Essa diferenciação estrutural faz com que muitas β -glucanas possuam nomes específicos, derivados da fonte fúngica. A Tabela 4 apresenta os principais fungos produtores de β -glucana estruturais.

Tabela 4 – Principais fungos produtores de β -glucanas estruturais.

Nome científico	Glucana	Tipo	Ligação	Referências
<i>Agaricus bitorquis</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 6)	SMIDERLE et al., 2010
<i>Agaricus blazei</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 6)	MIZUNO et al., 1990
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Ab2-2N	R	(1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 3)	DONG et al., 2002
<i>Alternaria solani</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 3)	PIOTROWSKI et al., 2015
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	botriosferana	R	(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)	CORRADI DA SILVA et al., 2005
<i>Bulgaria inquinans</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 6)	BI et al., 2013
<i>Calocybe indica</i>	calocibana	R	(1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 4) (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)	MANDAL et al., 2010
<i>Claviceps purpurea</i>	ND	R	1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)	PERLIN; TABER, 1963
<i>Ganoderma lucidum</i>	GLG	R	(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)	SHI; ZHANG; YANG, 2013
<i>Ganoderma resinaceum</i>	ND	R	(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)	AMARAL et al., 2008
<i>Grifola frondosa</i>	grifolana	R	(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)	TADA et al., 2009
<i>Laetiporus sulphureus</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 3)	ALQUINI et al., 2004
<i>Lentinula squarrosulus</i>	lentinana	R	(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6),(1 $\rightarrow$ 6)	BHUNIA et al., 2011
<i>Parmotrema austrosinense</i> ¹	liquenana	L	(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)	CARBONERO et al., 2005
<i>Phytophthora parasitica</i>	ND	R	(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)	FABRE et al., 1984
<i>Poria cocos</i>	paquimana	L	(1 $\rightarrow$ 3)	HUANG; ZHANG, 2011
<i>Rimelia cetrata/ R. reticulata</i>	liquenana	L	(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)	CARBONERO et al., 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 3)	GRÜN, 2003
<i>Termitomyces eurhizus</i>	ND	L	(1 $\rightarrow$ 3)	MONDAL et al., 2004
<i>Umbilicaria mammulata</i> ¹	ND	L	(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)	CARBONERO et al., 2006
ND: Não Definido ¹ fungos liquenizados L: linear R: ramificado Fonte: Autoria própria				

Por fim podem ser citados os fungos produtores de polissacarídeos mistos, que contém tanto ligações glicosídicas do tipo α - quanto do tipo β -. Essas ligações podem ocorrer em diversas combinações, sejam cadeias principais de α -glucana com ramificações do tipo β -,

como é o caso do fungo *Piptoporus betulinus* (OLENNIKOV et al., 2012) ou; cadeias principais de β -glucana com ramificações do tipo α - obtidas em uma fração polissacarídica pelo fungo *Calocybe indica* (MANDAL et al., 2010) Podem, por fim, apresentar cadeia mista com ligações glicosídicas do tipo α - e β - intercaladas, bem como respectivas ramificações α - ou β -, como apresentadas por *Pleurotus florida* (ROUT et al., 2005) e *Pleuotus sajor-caju* (PRAMANIK et al., 2007), respectivamente.

2.3 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos, ou simplesmente EPS são polímeros naturais, excretados por algumas espécies de bactérias e fungos. Em alguns casos, pode ocorrer a formação de cápsulas – estruturas intrínsecas a parede celular, enquanto em outros há a formação de limo, com capacidade de difusão para o líquido durante o processo fermentativo. Essas biomoléculas possuem propriedades de adesão ao hospedeiro – proporcionando maior fixação; proteção celular contra agentes externos – como dessecação, ataques de bacteriófagos e protozoários, quanto como reserva de carboidratos para o metabolismo, sendo muitas vezes relacionada à virulência do microrganismo para com o tecido hospedeiro de plantas e animais (BARBOSA et al., 2004; SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

As propriedades físicas e fisiológicas dos EPS podem variar de acordo com suas composições químicas, que estão diretamente relacionadas com as espécies de microrganismos sintetizadoras das biomoléculas. Assim como as glucanas estruturais presentes na parede celular dos microrganismos, a composição dos exopolissacarídeos também varia de acordo com diversos fatores, tais como a espécie produtora, composição monossacarídica, ligações glicosídicas, grau de ramificação e propriedades reológicas (CUNHA et al., 2012; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Diversos fungos produtores de EPS têm sido reportados na literatura. Dentre os fungos leviduriformes, podemos destacar o *Aureobasidium pullulans* produtor da α -glucana pululana, contendo unidades de maltotriose e *Rhodotorula glutinins*, uma β -glucana composta de manose, glicose e arabinose, (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; REKHA; SHARMA, 2007). Quanto aos fungos filamentosos (Zygomycota) podem ser destacados o *Absidia corymbifera* e *Mucor racemosus*, que embora sejam causadores de infecções fúngicas em humanos possuem EPS com propriedades antigênicas (DE RUITER et al., 1994; OĞUZHAN; YANGILAR, 2013).

2.3.1 O exopolissacarídeo lasiodiplodana

A lasiodiplodana é um exopolissacarídeo produzido pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*. Esse fungo é descrito na literatura como produtor de três β -glucanas diferenciadas, a PEPS: $\beta(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)$ glucana insolúvel em água gelada e duas SEPS: caracterizadas como $\beta(1 \rightarrow 6)$ glucanas de 7 e 1800 kDa (OLIVEIRA et al., 2015). A lasiodiplodana é destacada na literatura devido a suas diversas propriedades na área farmacêutica, apresentando atividades anticoagulantes, antioxidantes, antiproliferativas e imunomodulatórias (CUNHA et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2013; KAGIMURA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). Assim como os demais EPS, a produtividade da lasiodiplodana é dependente dos parâmetros nutricionais e físicos inerentes à fermentação. A Figura 3 apresenta a estrutura dos dois tipos de EPS produzidos pelo fungo.

Figura 3 – Estruturas das estruturas dos exopolissacarídeos $\beta(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)$ (A) e $\beta(1 \rightarrow 6)$ (B) produzidas pelo fungo *L. theobromae*.

Fonte: adaptado de Synytsya e Novak, (2014).

2.4 Aplicação industrial dos exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos podem ser utilizados em diversos setores industriais, como o alimentício, farmacêutico e químico, na elaboração de diversos produtos e para o desenvolvimento de melhorias para a saúde humana e animal. A tendência global em *biobased products* promove como alternativa os métodos tradicionais o desenvolvimento de novos compostos biotecnológicos. Nesse contexto os exopolissacarídeos são atualmente

produtos de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos, considerando sua versatilidade de aplicações. Dentre os exopolissacarídeos a pululana é a principal biopolímero comercial produzido pelo fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (RAVELLA et al., 2010; SUGUMARAN; JOTHI; PONNUSAMI, 2014), sendo utilizada em substituição a polímeros sintéticos para o desenvolvimento em diversos produtos, dadas as propriedades atóxicas e biodegradáveis da biomolécula (OLORUNSOLA; ADEDOKUN, 2014). Outros EPS produzidos por diversos microrganismos possuem diversas aplicações industriais, apresentadas, mas não limitadas a Figura 4.

Figura 4 – Principais aplicações industriais dos exopolissacarídeos produzidos por fungos .

Fonte: adaptado de Kagimura et al., 2015.

2.4.1 Aplicações na indústria alimentícia

A aplicação de exopolissacarídeos na indústria alimentícia varia de agente hidrocolóide (hidrogel), revestimento alimentar, filme comestível, substituinte de amido em formulações de alimentos com baixa caloria e utilização como agente aromatizantes e condimentante. Exopolissacarídeos podem ser utilizados como filmes comestíveis ou revestimento para alimentos, proporcionando uma barreira mecânica contra agentes externos (JINDAL et al., 2013; KAGIMURA et al., 2014). A utilização de filmes comestíveis e revestimentos em alimentos vêm aumentando, devido principalmente ao fato de novas oportunidades e mudanças referentes a padrões ambientais para o mercado, permitindo a substituição de materiais sintéticos por materiais biodegradáveis. Essas mudanças permitem a comercialização de frutas e vegetais contendo barreiras comestíveis, visando à obtenção de

produtos com maior tempo de prateleira (PAVIATH; ORTS; PAVLATH, 2009). Ainda a utilização de EPS segue certos requerimentos que são necessários para a utilização em alimentos, como baixo custo de produção, apresentação de características sensoriais, boas propriedades mecânicas (elastoplásticidade), apresentando-se como barreiras adequadas para gases, líquidos e microrganismos, além de estabilidade físico-química e bioquímicas (DIAB et al., 2001). Os EPS devem ser seguros a saúde (livres de microrganismos perigosos e compostos tóxicos) e capazes de carregar antioxidantes, odores, pigmentos, além de aditivos antimicrobianos e/ou nutricionais (DIAB et al., 2001).

2.4.2 Aplicação na indústria farmacêutica e química

A indústria farmacêutica apresenta grande interesse no desenvolvimento de produtos a partir de exopolissacarídeos. As propriedades hidrocolóides apresentadas pelos EPS proporcionam diversas aplicações no desenvolvimento de diversos produtos para cuidado da pele, oferecendo atividade bioadesiva, emulsificante, espumante e solubilizante para cremes e loções de proteção (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Esse hidrogel permite a formação de uma estrutura que em contato com a água é amplamente utilizado em cosméticos, devido a sua alta compatibilidade com tecidos biológicos, impedindo o ressecamento e agindo como agente anti-idade (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH, 2014). Os EPS ainda possuem atividades fisiológicas únicas, como por exemplo, atuando como agentes antivirais, antitumorais, antiinflamatórios e imunomoduladoras, podendo ser utilizados no tratamento de enfermidades em substituição a diversos fármacos em medicamentos tradicionais (SHI; ZHANG; YANG, 2013; WANG et al., 2014).

Os EPS fúngicos podem atuar também no controle dos níveis de glicose, insulina e lipídeos no sangue e diminuindo os riscos relacionados ao sistema cardiovascular, cânceres do colón e mama, obesidade e trato gastrointestinal, uma vez que o consumo de fibras dietéticas, como as β -glucanas, está associado à redução de doenças crônicas (REGAND et al., 2009; TÚRMINA et al., 2012).

Os processos de *upstream* e *downstream* para a produção de EPS fúngico são simplificados, permitindo a produção da biomolécula em grande quantidade e em espaço de tempo relativamente curto e; por ser excretada no meio de cultivo, facilitando os processos de recuperação, purificação e caracterização química do biopolímeros (OLIVEIRA, 2014). A Tabela 5 apresenta os principais fungos produtores de exopolissacarídeos α - e β -glucanas e suas atividades biológicas em condições laboratoriais definidas.

Tabela 5 – Principais fungos filamentosos produtores de exopolissacarídeos e suas aplicações.

Nome científico	Glucana	Tipo	Ligação	Aplicação	Referência
<i>Aureobasidium pullulans</i>	pululana	L	$\alpha(1\rightarrow4)-(1\rightarrow6)$	encapsulamento liberação de medicamento	REKHA; SHARMA, 2007 RAVELLA et al., 2010
<i>Cordyceps sp.</i>	nd	R	$\alpha(1\rightarrow4),(1\rightarrow6)$	antitumoral hipoglicêmica imunomoduladora	KIM; YUN, 2005 YALIN; CUIRONG; YUANJIANG, 2006 XIAO et al., 2010
<i>Agaricus brasiliensis</i>	nd	L	$\beta(1\rightarrow6)$	imunoestimuladora	GERN et al., 2015
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	botriosferana	R	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	hipocolesterolêmica hipoglicêmica	SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002 VASCONCELOS et al., 2008
<i>Botrytis cinerea</i>	cinereana		$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	antitumoral	GIESE et al., 2011 BARBOSA et al., 2004
<i>Ganoderma lucidum</i>	GLP	L	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	antitumoral	AMARAL et al., 2008
<i>Lasioidiplodia theobromae</i>	lasioidiplodana	L	$\beta(1\rightarrow6)$	anticoagulante antiproliferativa	CUNHA et al., 2012 VASCONCELOS et al., 2013
<i>Microdochium nivale</i>	nd	L	$\beta(1\rightarrow4)$	celulose extracelular	SCHWEIGER-HUFNAGEL et al., 2000
<i>Pestalotia sp</i>	pestalotana	R	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	antitumoral	MISAKI et al., 1984
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	nd	R	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	imobilização enzimática	BUCHALA, 1987
<i>Phellinus sp</i>	PRP	R	$\beta(1\rightarrow4)-(1\rightarrow6), \beta(1\rightarrow3)$	antitumoral imunoestimuladora	CAO; PENG; CUI, 2013 LIU; WANG, 2007
<i>Phlebia radiata</i>	nd	L	$\beta(1\rightarrow3)$	imobilização enzimática	KRCMAR et al., 1999
<i>Phoma herbarum</i>	YCP	R	$\alpha(1\rightarrow4),(1\rightarrow6)$ $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	antioxidante remoção de radicais livres	SELBMANN et al., 2002 YANG et al., 2005
<i>Pleorotus ostreatus</i>	nd	L	$\beta(1\rightarrow3)$	imobilização enzimática terapia anti-câncer	BURNS et al., 1994 ROSADO et al., 2003
<i>Schizophyllum commune</i>	esquizofilana	R	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	antitumoral	HAO et al., 2010
<i>Sclerotium sp.</i>	escleroglucana	R	$\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$	liberação de medicamento	COVIELLO et al., 2005
ND: Não Definido L: linear R: ramificado Fonte: Autoria própria					

2.5 Composição nutricional, parâmetros físicos e métodos de fermentação para produção de exopolissacarídeos

A composição do meio de crescimento para microrganismos é de fundamental importância para a produção máxima dos exopolissacarídeos. Os EPS são normalmente produzidos no interior das células, sendo em seguida excretados para o meio de cultivo. Poucas vias metabólicas de EPS fúngicos vêm sendo estudadas, havendo pouca ou nenhuma informação sobre a síntese dessas biomoléculas em diferentes espécies (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Assim, as pesquisas referentes à produção de EPS são direcionadas para a otimização em cada espécie estudada, afetando diretamente a produtividade de exopolissacarídeos. Assim, três principais fatores devem ser destacados: 1- composição do meio de cultivo: como fontes de carbono, nitrogênio, além de micronutrientes (sais suplementares), aditivos e vitaminas; 2- Parâmetros físicos: pH, nível de oxigênio, temperatura, tempo de incubação e; 3- Métodos de fermentação: referentes a cultivo agitada ou estática, em frasco ou reator.

2.5.1 Fontes de carbono

Diferentes fontes de carbono têm sido testadas para a produção de exopolissacarídeos em diversas espécies de fungos. Dentre elas, citam-se os açúcares monoméricos arabinose, galactose, glicose, dissacarídeos celobiose lactose, maltose e sacarose, além dos poliálcoois inositol, manitol, sorbitol e xilitol (GIENTKA et al., 2016; LEE et al., 2015; RUSINOVA-VIDEVA; PAVLOVA; GEORGIEVA, 2011; STELUTI et al., 2004). A glicose, maltose e sacarose são os substratos mais utilizados, devido a seus baixos custos e fácil obtenção. Fontes de carbono com origem vegetal direta como o amido de milho e farinhas de batata, de mandioca e de milho e melaço de cana-de-açúcar foram utilizadas para a produção de EPS fúngicos (SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI, 2002). Embora, na maioria dos casos, o tipo de carboidrato utilizado seja indiferente para a produção do EPS, a intensidade de produção é dependente da fonte de carbono e concentração do mesmo. As concentrações de carboidratos apresentadas para a elaboração dos meios de cultura variam entre 1,5 a 12%, embora a maioria dos trabalhos utilizem concentrações de 3 e 6%, pois altas concentrações de carboidratos no meio podem desencadear a repressão catabólica no microrganismo, inibindo suas funções (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

2.5.2 Fontes de nitrogênio

A produção de EPS também está diretamente relacionada com a fonte de nitrogênio utilizada. Essas fontes podem ser orgânicas – extrato de levedura, L-asparagina, glutamato, peptona e ureia; ou inorgânicas – nitrato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de amônio (BARBOSA et al., 2004; CUNHA et al., 2012; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; OLIVEIRA, 2014). Dentre os sais inorgânicos mais utilizados, destacam-se os sais de amônio por apresentarem maior eficácia que os demais sais (GIBBS; SEVIOUR, 1998). Baixas concentrações de nitrogênio estimulam a produção de EPS enquanto altos níveis de nitrogênio inibem a sua produção (BARBOSA et al., 2004), sendo necessárias concentrações que variam entre 0,1 e 1%. Ainda, de acordo com muitas observações, sugere-se que os fungos produzem menos EPS em fontes inorgânicas de nitrogênio do que em fontes orgânicas (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Embora esse mecanismo de regulação possa depender da fonte de nitrogênio utilizada para suplementação do meio, deve-se também considerar que existem condições adequadas de crescimento vinculadas para cada espécie de microrganismo e que estas devem ser avaliadas individualmente.

2.5.3 Micronutrientes, aditivos e vitaminas

Os micronutrientes são microelementos utilizados em pequenas quantidades pelos microrganismos, participando ativamente na composição de enzimas, nucleotídeos, proteínas e vitaminas (BARBOSA et al., 2004). Dentre os principais sais utilizados na suplementação microbiana para a produção de exopolissacarídeos, são destacados os fosfatos de potássio (KH_2PO_4 e K_2HPO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloretos de sódio (NaCl) e de cálcio (CaCl_2). Outros aditivos como, aminoácidos (glutamato), óleos vegetais (algodão, azeite, gergelim, milho e soja), surfactantes (Tween 80) e vitaminas (A e D), podem ser adicionados ao meio, visando maior produção de EPS (YANG; HE, 2008; XIAO et al., 2010). Assim como para fontes de carbono e nitrogênio, as concentrações utilizadas para a adição de micronutrientes, aditivos e vitaminas devem ser adequados para cada espécie de microrganismo.

2.5.4 Temperatura, pH e tempo de cultivo

A temperatura é um dos fatores limitantes para a sobrevivência de todos os seres vivos. Os fungos, de um modo geral, apresentam crescimento em um amplo espectro de temperatura, o que leva a sua disseminação em todos os locais do planeta. A temperatura exerce alta significância aos microrganismos, podendo ser responsável por alterações em seu crescimento vegetativo, patogenicidade, reprodução e aspectos fisiológicos (CARVALHO; CARVALHO, 1973). A maioria dos fungos produtores de exopolissacarídeos possuem temperaturas ótimas variáveis entre 22°C e 30°, com poucos casos reportados de que temperaturas iguais a 20 °C tenham favorecido a produção dos biopolímeros (KIM; YUN, 2005; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

O pH do meio de cultivo é outro fator que reflete na produção de exopolissacarídeos nos microrganismos. Geralmente a produção de EPS é favorecida no ajuste de pH baixos nos meios de cultivo, em valores variantes entre 3 e 6,5 , embora alguns fungos tenham apresentado perfis de produção máxima desses biopolímeros nas faixas de pH neutra ou alcalina (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Relatos na literatura ainda demonstram que diferentes faixas de pH podem afetar o peso molecular dos EPS, sendo que faixas mais baixas de pH apresentam uma produção reduzida de biopolímero com alto peso molecular, enquanto faixas mais elevadas apresentaram maior produtividade da biomolécula de menor peso molecular (SHU; LUNG, 2004). Abdel-Aziz e colaboradores (2012) demonstram uma redução brusca no pH do meio de cultivo induziram a produção de EPS por *Mucor rouxii*, conclusivamente para a proteção das células fúngicas.

O tempo de cultivo é outro fator de fundamental importância para a produção dos exopolissacarídeos. Estudos demonstram que a produção de EPS é maximizada tanto no ultimo estágio do crescimento exponencial dos fungos quanto no estágio inicial da fase estacionária (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013), uma vez que a produção desses biopolímeros está associada ao metabolismo secundário dos microrganismos (ZHU et al., 2012; GIENTKA et al., 2016). Ao contrario da produção de EPS bacteriana, os fungos necessitam de um tempo de incubação maior para maximização da produção do biopolímero, geralmente variável entre 4 a 15 dias de fermentação (KIM; YUN, 2005; PAVLOVA et al., 2011).

2.5.5 Métodos de fermentação para a produção de exopolissacarídeos

Os ensaios fermentativos envolvendo microrganismos produtores de exopolissacarídeos sugerem que a maioria dos fungos filamentosos são aeróbicos ou aeróbicos facultativos, elucidando que a limitação de oxigênio não é viável para a produção de EPS (SANDFORD³, 1979 apud MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). De acordo com a literatura consultada, a produção de exopolissacarídeos foi majoritariamente realizada em frascos, com um número reduzido de trabalhos utilizando biorreatores (GIBBS; SEVIOUR, 1998; CUNHA et al., 2012; KIM; YUN, 2005). As condições de aeração são facilmente alcançáveis pela simples agitação dos frascos, e não se demonstram limitantes quando o oxigênio está disponibilizado no meio (SANDFORD³, 1979 apud MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). A agitação em frascos torna a obtenção de EPS mais produtiva comparado aos ensaios utilizando frascos estáticos, reduzindo o tempo necessário para a obtenção da produção máxima do biopolímero (LEAL; RUPÉREZ, 1978). As taxas de aeração para a produção de EPS em reatores de tanque agitado (STR) e/ou *airlift* podem apresentar variação significativa, com valores entre 0,05 e 3,5 vvm, para diferentes microrganismos (BUCHALA, 1987; XU; YUN, 2004). Altas taxas de aeração em biorreatores para a produção de exopolissacarídeos pode ser justificadas devido ao intenso crescimento micelial dentro reator e elevação da viscosidade, que acabam por diminuir transferência de oxigênio dissolvido no meio (CUNHA et al., 2012).

2.6 Subprodutos agrícolas

2.6.1 Biomassa lignocelulósica

As biomassas lignocelulósicas compreendem os subprodutos agrícolas e florestais, tais como bagaços, folhas, palhas e cavacos de madeiras. A composição dos materiais lignocelulósicos varia de acordo com cada espécie vegetal. Representa a mais abundante fonte de materiais renováveis do solo, porém apenas uma pequena fração é utilizada como subproduto pelos setores agrícola e florestal, sendo o restante considerado resíduo (SÁNCHEZ, 2009). Dentre os principais materiais lignocelulósicos, destacam-se o bagaço de cana de açúcar, palha de arroz e de trigo e o sabugo de milho, com relevante aplicação científica e industrial para esse primeiro.

³ Sandford P. A. Exocellular, microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v.36, p.265–313, 1979.

2.6.1.1 O bagaço de cana-de-açúcar

A produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2017/18 está estimada em aproximadamente 647 milhões de toneladas em uma área estimada de 8,84 milhões de hectares (CONAB, 2017a). Em média, cada tonelada de cana-de-açúcar processada produz aproximadamente 125 kg de bagaço seco (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), utilizado em grande parte dentro das próprias usinas sucroalcooleiras para a geração de energia. Dentre os principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar destacam-se a celulose, a hemicelulose e a lignina. Outros componentes como ceras, extrativos, minerais e pectina estão presentes nessa biomassa, porém em percentuais reduzidos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante no planeta, sendo composto basicamente por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Essas ligações são responsáveis pela síntese dos dissacarídeos de celobiose (CAMPBELL, 2000), apresentando um grau de polimerização de 100 a 15000 unidades de glicose, que alinhadas linearmente resultam na estrutura desse polissacarídeo (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Constitui entre 23 a 53% da composição química dos vegetais, com cerca de 45% no bagaço de cana-de-açúcar (KLOCK et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010). Uma vez que a glicose é facilmente assimilada por diversas espécies de microrganismos e que sua distribuição ocorre em todas as partes do globo, a utilização dessa fração vegetal é promissora dentro do cenário biotecnológico industrial, permitindo a obtenção de diversos produtos denominados como *biobased products*, menos agressivos ao meio ambiente e descritos como ecologicamente corretos.

A hemicelulose é também como um importante constituinte estrutural da parede celular vegetal. Atua como conectora das fibras de celulose e lignina, conferindo a biomassa vegetal maior rigidez estrutural e colaborando para o desenvolvimento das plantas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Estruturalmente, a hemicelulose difere-se da celulose dado que é um heteropolímero, contendo uma cadeia principal unida por unidades de D-xilose e L-arabinose, (GIRIO et al., 2010), podendo ou não apresentar ramificações de açúcares, como a D-glicose, D-galactose e D-manose (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). Constitui de 20 a 35% da composição química dos vegetais e, aproximadamente 25% no bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2010). O interesse industrial pela fração hemicelulósica é destacado, uma vez que alguns microrganismos são capazes de utilizar a xilose para a síntese de diversos

produtos, dentre esses o etanol e o xilitol (CARVALHO et al., 2004; FELIPE et al., 1996; MILESSI et al., 2012; MARTINIANO et al., 2013)

A lignina é uma macromolécula amorfa e de grande complexidade molecular, com finalidade de formar junto aos demais componentes um matriz de excelente resistência a fatores externos, como ataque de microrganismos e condições edafoclimáticas (BALAT, 2011). Representa a fração não-polissacarídica mais abundante na biomassa vegetal, apresentando de 10 a 25% da composição química dos vegetais e cerca de 23% do bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2010).

2.6.2 A biomassa amilácea

As biomassas amiláceas estão diretamente ligadas ao desenvolvimento humano, uma vez que as principais civilizações prosperaram com o implementação da agricultura de pelo menos um tipo de grão. As famílias das Poáceas e Fabáceas são as primeiras em importância econômica global por serem amplamente utilizadas na alimentação humana e animal, além de serem empregadas na produção de bebidas e na confecção de fármacos. Isso se deve ao fato de que os grãos possuem em sua constituição a amilose e a amilopectina, constituintes do amido (EMBRAPA, 2011).

Esses polímeros são compostos por unidades de D-glicose em ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$. As ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ são responsáveis pela síntese dos dissacarídeos de maltose, conferindo à amilose a conformação helicoidal, enquanto a amilopectina é uma molécula mais ramificada, e que contem ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ a cada 20-25 unidades de glicose, aproximadamente (CAMPBELL, 2000).

Os grãos são estruturalmente divididos em três porções: o endosperma, o embrião (germe) e o farelo. O endosperma é a porção amilácea do grão, responsável pela manutenção das sementes durante sua fase dormente, antes da germinação (WESENDONCK, 2012). Está subdividido em três porções o aleurona (proteína que auxilia a semente a clivar o amido na germinação), camada de transferência (interface entre semente e planta para captação de nutrientes) e a massa da semente (porção amilácea). O embrião contém vitaminas, proteínas, minerais e óleos e é responsável pela germinação da planta. O farelo é por fim, a porção externa, que cobre os grãos protegendo o endosperma e o germe contra agentes externos (EL KHOURY et al., 2012; CONAB, 2015). Essa porção é muitas vezes removida em processos industriais de beneficiamento dos grãos como, o arroz, centeio, cevada, milho soja e trigo, gerando como subproduto materiais ricos em carboidratos, proteínas, óleos, componentes

bioativos, fibras alimentares, vitaminas e compostos fenólicos antioxidantes (PAES, 2006). Devido a seu alto valor energético, muitos farelos são utilizados na alimentação animal e humana, embora países como o Brasil não utilizem adequadamente o potencial desses subprodutos agrícolas para o desenvolvimento de tecnologias de ordem biológica. Dentre os principais grãos produzidos no Brasil, podem-se citar o arroz, milho e soja, que abastecem o mercado interno e externo (CONAB, 2017b).

2.6.2.1 Farelo de arroz

O arroz (*Oryza* sp.) é uma planta da família das gramíneas que possui cerca de 20 espécies, sendo a mais cultivada *Oryza sativa* L. O arroz pode ser consumido na sua forma integral ou polido, sendo este último mais tradicionalmente comercializado (LACERDA et al., 2010). O Brasil é o maior produtor de arroz em casca do Mercosul, com colheita estimada para a safra 2016/2017 de aproximadamente 12 milhões de toneladas. Esses valores são correspondentes cerca de 75% da produção total do bloco comercial, embora representem apenas de 2,5% do total de arroz colhido mundialmente e são ínfimos quando comparados com as produções da China (144,5 milhões de toneladas) e Índia (102 milhões de toneladas) (CONAB, 2015, 2017b).

Para a realização do beneficiamento do arroz, os processos de brunição e polimento são utilizados para remoção do farelo e embrião, resultando em grãos com menor teor nutricional (CASTRO et al., 1999). O farelo de arroz resultante, rico em nutrientes, consiste também em algumas camadas externas de arroz integral. Durante o processo de beneficiamento as frações obtidas correspondem ao arroz polido (65 a 75% de grãos inteiros ou quebrados), 19 a 23% de casca, 8 a 10% de farelo e de 3 a 5% de impurezas (SANTOS et al., 2010). Com isso, o Brasil possui capacidade de geração de aproximadamente 1 milhão de toneladas de farelo de arroz. No Brasil, o farelo de arroz possui baixo valor comercial, sendo utilizado preferencialmente para extração de óleo de arroz, como matéria-prima para ração animal, como fertilizante orgânico (LACERDA et al., 2010), ou até mesmo tostado e utilizado na alimentação humana por pessoas de baixa renda. Devido a seu alto teor nutricional, os hidrolisados de farelo de arroz são utilizados na suplementação de nitrogênio orgânico, reduzindo em até 50% os custos da produção de bioetanol ao substituir componentes como a peptona e o extrato de levedura (MILESSI et al., 2013; MARTINIANO et al., 2013).

2.6.2.2 Farelo de milho

O milho (*Zea* sp.) é também uma planta da família das gramíneas sendo a espécie domesticada *Zea mays* L. extensivamente utilizada como alimento para animais e humanos. A produção de milho ocupa destacada importância nas atividades agrícolas brasileiras, sendo seu valor de produção superado somente pelo da soja. De distribuição em todo o território nacional, seu plantio é dividido em duas épocas do ano, com produtividades estimadas para 2016/2017 de 29,86 milhões de toneladas e 61,6 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2017b).

O beneficiamento do milho é realizado para obtenção do amido e, em menor quantidade, o óleo de milho, amplamente utilizados na indústria alimentícia (PAES, 2006). Esses processos geram como subproduto o farelo de milho, que corresponde aproximadamente a 20% do total de milho processado e pode representar uma produção de até 18 milhões de toneladas. O farelo de milho é comumente utilizado principalmente na alimentação de animais de corte, como aves, bovinos e suínos, por apresentar baixo conteúdo de fibras, e alto conteúdo proteico (10%) (EZEQUIEL et al., 2006; ZAMBOM et al., 2008).

2.6.2.3 Pré-tratamento de biomassas vegetais

O pré-tratamento de biomassas vegetais visando à recuperação de carboidratos fermentescíveis em processos biotecnológicos é extensivamente estudado visando a fragmentação da biomassa de modo a proporcionar uma maior recuperação de açúcares e menor formação de inibidores do crescimento microbiano. Os tratamentos utilizados podem ser de origem biológica, física e/ou química. Cada um destes tipos de pré-tratamentos apresenta efeitos específicos sobre um determinado tipo de biomassa vegetal, podendo ou não agir de maneira mais eficiente sobre uma dada fração do material utilizado (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Observa-se na literatura uma diversidade de ácidos que são utilizados para pré-tratamento de biomassas vegetais, em especial o ácido sulfúrico (H_2SO_4), extensivamente utilizado em diversos trabalhos (ADEL et al., 2010; GÁMEZ et al., 2006). O H_2SO_4 atua como catalizador da reação na solubilização e obtenção de açúcares em hidrolisados a serem utilizados por diferentes microrganismos na síntese de diversos produtos (CHANDEL et al., 2011). Fatores pré-estabelecidos como, concentração do ácido e as condições de pré-tratamento (teor de sólidos, tempo de residência, temperatura) podem variar de acordo com o material a ser estudado.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial biotecnológico do fungo *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 para a produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana, a partir dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisados de farelos de arroz e milho.

3.2 Específicos

- Avaliar o crescimento, formação de estruturas de reprodução e diferenças morfológicas do fungo *L. theobromae* em diferentes meios de cultivo;
- Verificar a produção de lasiodiplodana, utilizando meios sintéticos (glicose e xilose) como fontes de carbono e condições de crescimento variadas;
- Verificar a produção de lasiodiplodana em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar;
- Verificar o potencial biotecnológico dos hidrolisados de farelos de arroz e milho, utilizando delineamento composto central (DCCR), na obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais;
- Otimizar a produção de lasiodiplodana em hidrolisados de farelos de arroz e milho por meio de fermentação submersa, utilizando delineamento composto central (DCCR);
- Caracterizar parcialmente a composição química da lasiodiplodana produzida em hidrolisados de farelos de arroz e milho quanto a açúcares, lipídeos e proteínas presentes.
- Verificar a estrutura da lasiodiplodana por técnicas de FTIR, e difração de Raios-X.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em 3 etapas, conforme apresentado na Figura 5, que descreve sucintamente todas as atividades desenvolvidas.

Figura 5 – Fluxograma das atividades envolvidas no presente trabalho.

Fonte: Autoria própria

1ª ETAPA – Ensaios Iniciais

4.1 Cultivo e manutenção do *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *L. theobromae* CCT 3966 foi gentilmente cedido pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia (Campinas, SP). O fungo foi isolado do solo da Mata Atlântica, na Estação Ecológica Juréia-Itatins (Peruíbe, São Paulo, Brasil) e crescido em ágar farinha de aveia em tubos inclinados. O micélio fúngico foi cultivado em placas de Petri (diâmetro de 6 cm) contendo ágar YPMG (0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 0,3 % extrato de malte, 1,0% glicose e 2,0% ágar) a 28 °C durante 5 dias e armazenados a 4 °C para estoque.

4.1.1 Preparo dos Sais de Vogel (Meio N)

O preparo dos sais de Vogel foi realizado conforme citado por Vogel, 1956. Para a produção de 1L de meio (50 vezes concentrado), foram adicionados 750 mL de água destilada em temperatura ambiente, dissolvendo sucessivamente os reagentes (Tabela 6), agitando-se:

Tabela 6 – Reagentes do preparo dos sais de Vogel.

Reagente	Massa/Volume
Citrato de Sódio	150 g
Fosfato de Potássio (anidro) – KH_2PO_4	250 g
Nitrato de Amônio (anidro) – NH_4NO_3	100 g
Sulfato de Magnésio – $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 g
Cloreto de Cálcio – $CaCl_2$	5g
Solução de Biotina	2,5 mL
Elementos Traço	5 mL

Fonte: Autoria própria

Para a preparação da Solução de Biotina, foi dissolvido 5 mg de biotina em 50 mL de água destilada. A solução obtida foi armazenada em vidraria e congelada. Para o preparo da solução de elementos traços: em 95 mL de água destilada, foram dissolvidos sucessivamente os reagentes (Tabela 7), enquanto misturados:

Tabela 7 – Reagentes do preparo dos elementos traço.

Reagente	Massa/Volume
Ácido Cítrico	5 g
Sulfato de Zinco – $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	5 g
Sal de Ferro e Amônio – $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	1 g
Sulfato de Cobre – $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	250 mg
Sulfato de Manganês – $MnSO_4 \cdot H_2O$	50 mg
Acido Bórico (anidro) – H_3BO_3	50 mg
Molibdato de Sódio – $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	50 mg

Fonte: Autoria própria

Ao conteúdo final foi adicionado clorofórmio (1 mL), como conservante da solução e armazenada em frasco âmbar em temperatura ambiente para utilização na realização dos experimentos. O preparo do meio N consistiu na diluição de 20 mL de sais de Vogel em 1L de água, acrescidos da fonte de carbono desejada.

4.2 Perfil de crescimento de *L. theobromae* cultivadas em placas de Petri em condições sob a presença e ausência de luz

Para a avaliação dos efeitos da luz sobre o crescimento de *L. theobromae* foram realizados testes em diferentes meios de cultivo. Os níveis de açúcares presentes nos meios foram padronizados para 10 g/L e todos os experimentos realizados em duplicata e sem alteração de pH. Para realização dos testes, discos de ágar YPMG (diâmetro de 0,75 cm) contendo o micélio fúngico foram retirados de uma placa de Petri mãe após um cultivo de 168 h. Foram acondicionados dois discos por placa de Petri, de modo que as faces miceliais ficassem viradas para baixo e em contato com o ágar dos meios a serem testados. Os experimentos foram conduzidos em estufa a 28 °C sob incidência de luz alternada entre 12 h claro/escuro e sob total ausência de luz por um período de 72 horas. Foram avaliados os perfis de crescimento dos fungos e formação de estruturas de reprodução. Os diferentes meios de cultivo utilizados e suas respectivas composições estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição dos meios para testes de iluminação de *L. theobromae*.

Meio	Composição
YPD	glicose (10 g/L) peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), ágar-ágar (20 g/L)
YPX	xilose (10 g/L) peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), ágar-ágar (20 g/L)
Meio N-glicose	glicose (10 g/L), sais de Vogel (20 mL/L), ágar-ágar (20 g/L)
PDA	glicose (10 g/L), caldo de cozimento de batatas (200g/L), ágar-ágar (20 g/L)
YPMG	glicose (10 g/L), extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), peptona (5 g/L), ágar-ágar (20 g/L)

Fonte: Autoria própria

A verificação da velocidade de crescimento radial (VCR) da colônia nos meios descritos foi realizada nos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas, com o auxílio de um paquímetro, descontado do raio do disco inoculante, conforme a equação:

$$r_{(h)} = V_{cr} * t + b \quad 1)$$

Onde: $r_{(h)}$: raio (mm); V_{cr} : velocidade de crescimento radial; t: tempo (h); b: raio do objeto inoculante.

Para a determinação dos raios de crescimento foi realizada a média dos menores e maiores raios, uma vez que o crescimento celular não ocorre de maneira uniforme. A placa foi também foi dividida em zonas hipotéticas, segundo metodologia adaptada de Rao e Singhal (1978), para determinação das características morfológicas em cada meio (Figura 6).

Figura 6 – Diagrama para análise do crescimento do fungo *L. theobromae* em placa de Petri. O pontos cinzas centrais representam os discos de ágar contendo o micélio fúngico inicial.

Fonte: Adaptado de Rao e Singhal (1978).

O fungo cultivado foi também submetido à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise estrutural. Com o auxílio de uma espátula, amostras de micélio e picnídio foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetida ao revestimento metálico de 10 nm de ouro em um metalizador (Coating System BAL-TEC MED 020) e mantidas em dessecador até o momento da análise. O material contendo as amostras foi então fotomicrografado, em equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais – DEMAR/USP).

4.3 Subprodutos agrícolas

4.3.1 Obtenção do hidrolisado de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho foi gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Franco Marcelino. A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em reator de aço inox (AISI 316), com volume útil de operação de 350 L, aquecido por resistência elétrica em meio de camisa de óleo. As condições operacionais foram de 100 mg de H_2SO_4 por grama de bagaço, temperatura de 121 °C, tempo de reação de 10 minutos e agitação de 50 rpm. Após a hidrólise, o líquido sobrenadante foi separado da fração sólida e armazenado em bombonas de 50 L sob refrigeração a 4 °C. O hidrolisado foi então concentrado em concentrador à vácuo (SPENCER SCIENTIFIC) de 28 L, a 70 °C para redução a 20% do volume inicial e novamente armazenado em câmara refrigerada a 4 °C. O hidrolisado concentrado (HBC-0) foi utilizado para análises, tratamentos e fermentações subsequentes deste estudo.

4.3.2 Obtenção dos farelos de arroz e milho e hidrolisados

Os farelos de arroz e de milho foram respectivamente cedidos pelas empresas: Beneficiadora de Arroz Irmãos Ligabo (Canas-SP) e Capivariana (Pavan Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios LTDA – Capivari-SP). Os farelos foram armazenados em frascos plásticos individuais e acondicionados em refrigerador a 4 °C, de modo a preservar sua umidade original e evitar sua contaminação contra insetos oportunistas. A determinação do teor de umidade das biomassas vegetais utilizadas foi realizada em balança analítica, por exposição do material à radiação infravermelha sob temperatura de 105 °C por 30 minutos.

4.4 Caracterização química parcial dos hidrolisados de bagaço-de-cana-de-açúcar e de farelos de arroz e milho

Os hidrolisados obtidos foram caracterizados parcialmente por técnicas espectrofotométricas tradicionais quanto às concentrações de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais. As amostras foram também submetidas CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Agilent Technology 1200 Series), para determinação de açúcares e inibidores. O pH dos hidrolisados também foi monitorado em todos os experimentos. As metodologias utilizadas estão descritas abaixo.

4.4.1 pH

A verificação do pH dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisados de farelo de arroz e milho foram realizadas em aparelho pH-metro Hanna HI221.

4.4.2 Açúcares totais

A determinação dos açúcares totais foi realizada pelo método do Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A cada 0,5 mL de amostra foram adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após reserva de 20 minutos, a amostra foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm, utilizando água como controle em substituição a amostra. A curva de calibração foi elaborada a partir de uma solução estoque de glicose na concentração de 1 g/L. (Apêndice A).

4.4.3 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do DNS (ácido-2,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para isso, foi adicionado 0,5 mL de reativo de DNS a cada 1 mL de amostra seguido por banho de água fervente por 10 minutos. Após o período, o volume foi ajustado para 5 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando água destilada como controle. A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de glicose na concentração de 1g/L (Apêndice B).

4.4.4 Proteínas totais

A determinação de proteínas totais nas amostras foi realizada pela metodologia de Lowry (LOWRY et al., 1951), com utilização dos reativos descritos no Apêndice C e o reativo de Folin-Ciocalteu. Em 1 mL de amostra foram adicionados 5 mL da mistura reativa, permanecendo em repouso por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído. Após o tempo de reação de 10 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 660 nm. Ocorreu a reação da proteína com o reativo cuproalcalino seguida pela redução dos sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin-Ciocalteu, quando este reage com as proteínas. A determinação das proteínas totais foi realizada de acordo com uma curva de calibração elaborada a partir de uma solução estoque contendo 1000 µg/mL de soroalbumina bovina, utilizando água destilada como controle, em substituição à amostra, e leitura de absorbância em espectrofotômetro a 660 nm.

4.4.5 Fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados a partir da correlação com uma curva de calibração com ácido tânico (1 g/L) como padrão (Apêndice D). Adicionou-se 520 µL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 e 1,25 mL de solução de carbonato de cálcio 20%. Os tubos foram agitados e acondicionados sob a proteção da luz e em repouso, por 40 minutos. Após esse período foi realizada leitura em espectrofotômetro a 725 nm, utilizando água destilada como controle (SIMÕES et al., 2003).

4.4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A determinação das concentrações de açúcares e ácidos orgânicos presente nas amostras foi realizada utilizando-se o cromatógrafo Agilent Technology series A1100 (Palo Alto, California). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep-Pak C18 (Millipore) e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração Agilent; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6mL/min. Para a determinação das concentrações de furfural e HMF, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas em equipamento Waters 2487/USA, sob as seguintes condições: coluna RP 18 (200 X 4,6mm) mantida à temperatura de 25°C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta SPD-10a UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila / água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,8 ml/min.

4.5 Análise estatística e validação de dados

Os dados apresentados durante o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho foram analisados estatisticamente com o auxílio *softwares* Design-Expert 7.0 e Statistica 8.0.

4.6 Estudo dos farelos de arroz e milho como fonte de carboidratos e proteínas por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2²

Para a avaliação do uso dos farelos de arroz e milho como fontes de carboidratos e nitrogênio e subsequente utilização em processos fermentativos, foram realizados planejamentos experimentais do tipo DCCR 2², com três repetições no ponto central de modo a avaliar a condição mais favorável para a obtenção de açúcares e proteínas. Foram estudadas as concentrações de ácido em % m/v (X₁) e as concentrações de massa de farelo, em % (X₂), conforme Tabela 9. As hidrólises foram realizadas em frascos Erlenmeyer contendo farelo de arroz e milho em base seca (9% de umidade), que foram devidamente fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após o término das hidrólises, os frascos foram resfriados e então filtrados, para recuperação dos respectivos sobrenadantes. Os hidrolisados recuperados foram acondicionados em frascos individuais e armazenados em *freezer* a -20 °C.

Tabela 9 – Valores codificados e reais das variáveis independentes do delineamento composto central rotacional 2² para avaliação do efeito dos parâmetros concentração de H₂SO₄ e massa de farelo na produção de hidrolisados de arroz e de milho.

Ensaio	X ₁	X ₂	Concentração ácida (%)	Massa de Farelo (%)
1	-1	-1	0,146	7,2
2	+1	-1	0,854	7,2
3	-1	+1	0,146	17,8
4	+1	+1	0,854	17,8
5	-α	0	0	12,5
6	+α	0	1	12,5
7	0	-α	0,5	5
8	0	+α	0,5	20
9	0	0	0,5	12,5
10	0	0	0,5	12,5
11	0	0	0,5	12,5

Fonte: Autoria própria

Os respectivos hidrolisados obtidos foram analisados quanto às concentrações de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais, utilizando as técnicas

espectrofotométricas descritas em 4.4. Os resultados obtidos foram analisados em *softwares* conforme 4.5, com a análise de tabelas de efeitos, gerando-se modelos matemáticos.

4.6.1 Tratamento dos hidrolisados de farelos arroz e milho para fermentação.

Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e os hidrolisados de farelos de arroz e milho obtidos após hidrólise ácida foram submetidos à tratamentos para remoção de partículas sólidas presentes no líquido sobrenadante. Das etapas efetuadas a este processo, consistem na filtração em filtro de papel dos hidrolisados obtidos (H-0), seguidos por centrifugação a 1500 xg por 15 minutos para precipitação das partículas sólidas (H-1), correção do pH com solução de NaOH 6,5 N (H-2) e re-centrifugação (H-3). Por fim, os hidrolisados foram autoclavados e novamente centrifugados de modo estéril para utilização em ensaios fermentativos (H-4), conforme apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Nomenclatura das frações dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e farelo de milho após cada etapa de tratamento.

Biomassa	<i>In natura</i>	Diluído e / ou centrifugado	pH corrigido	Centrifugado	Autoclavado e centrifugado
Bagaço de cana	HBC-0	HBC-1	HBC-2	HBC-3	HBC-4
Farelo de arroz	HFA-0	HFA-1	HFA-2	HFA-3	HFA-4
Farelo de milho	HFM-0	HFM-1	HFM-2	HFM-3	HFM-4

As frações descritas foram utilizadas nas diferentes etapas dos processos: H-0 foram utilizadas para os delineamentos de hidrólise e caracterizações parciais dos hidrolisados; as amostras H-1 foram utilizadas como padrão de obtenção de hidrolisados contendo a concentração de açúcares totais em 40 g/L; H-2 foram utilizadas nas amostras de farelo de arroz para elaboração do DCCR 2³; enquanto as amostras H-3 elucidam a diferenciação do material antes após a centrifugação a 1500 xg diante ajuste do pH; por fim as amostras H-4 foram utilizadas para nas análises fermentativas na produção de lasiodiplodana pelo fungo filamentoso *L. theobromae* em hidrolisados bagaço de cana-de-açúcar e DCCR 2² do hidrolisado de farelo de milho.

ETAPA 2 – Ensaios Fermentativos

4.7 Estudos preliminares para a produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando meios sintéticos, recuperação e tratamento dos biopolímeros

O estudo foi conduzido em duplicata e em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de solução dos meios N-glicose e N-xilose, como descritos na Tabela 11. Os frascos foram acondicionados em agitador orbital a 28°C, sob agitação de 200 rpm. Foram realizadas coletas a cada 24 horas durante 4 dias.

Tabela 11 – Composição dos meios para testes de fermentação submersa.

Meio	Composição
N-glicose	glicose (40 g/L), sais de Vogel (20 mL/L)
N-Xilose	xilose (40 g/L), sais de Vogel (20 mL/L)

Fonte: Autoria própria

Após o término da fermentação submersa, o conteúdo dos frascos Erlenmeyer foram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e centrifugadas a 1500 x g por 20 minutos em centrífuga (CU-5000) para separação da biomassa fúngica do sobrenadante. A biomassa recuperada foi armazenada em cadinhos previamente tarados, secas em estufa a 60 °C e medidas quanto a sua massa em balança analítica (Bel Engineering, MB 200). A lasiodiplodana presente no meio sobrenadante (LAS-M) foi precipitada pela adição de três volumes de etanol absoluto gelado, e acondicionada em freezer por 24 horas. O material precipitado foi recuperado e ressuspensão no volume inicial com água destilada aquecida a 60 °C. Visando a purificação da lasiodiplodana, novas etapas de precipitação em etanol e ressuspensão em água destilada aquecida foram realizadas de modo a remover a coloração presente no biopolímero, de acordo com cada meio de cultivo estudado. O material resultante foi seco em estufa para medição da massa de EPS produzido.

4.8 Estudo da produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando hidrolisado de farelo de arroz por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³

Para a avaliação do uso do hidrolisado de farelos de arroz em ensaios fermentativos para produção de lasiodiplodana, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ com três repetições no ponto central, visando a avaliação das variáveis pH (X₁),

volume de meio utilizado (X_2) e suplementação do meio de cultivo com sais de Vogel (X_3). Como variáveis resposta, foram analisadas a produção de lasiodiplodana livre no meio (LAS-M), lasiodiplodana aderida a biomassa celular (LAS-C) e biomassa celular produzida. Para a elaboração dos ensaios, foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo o hidrolisado obtido na condição ótima, segundo item 4.6, após tratamento (HFA-2), com volumes de meio, pH e suplementação de sais adequados a cada condição do delineamento. Aos frascos foram adicionados 2 discos de ágar contendo o fungo *L. theobromae* cultivado nas condições adequadas, conforme apresentado em 4.1. Os ensaios foram realizados durante 96 horas com remoções de frascos a cada 24 horas. A matriz do DCCR 2^3 pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com três repetições no ponto central.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	pH Inicial	Volume de meio (%)	Suplementação – Vogel (mL/L)
1	-	-	-	4,31	30	8,1
2	+	-	-	6,69	30	8,1
3	-	+	-	4,31	50	8,1
4	+	+	-	6,69	50	8,1
5	-	-	+	4,31	30	31,89
6	+	-	+	6,69	30	31,89
7	-	+	+	4,31	50	31,89
8	+	+	+	6,69	50	31,89
9	$-\alpha$	0	0	3,50	40	20
10	$+\alpha$	0	0	7,50	40	20
11	0	$-\alpha$	0	5,50	23	20
12	0	$+\alpha$	0	5,50	57	20
13	0	0	$-\alpha$	5,50	40	0
14	0	0	$+\alpha$	5,50	40	40
15	0	0	0	5,50	40	20
16	0	0	0	5,50	40	20
17	0	0	0	5,50	40	20

Fonte: Autoria própria

A recuperação da lasiodiplodana aderida à biomassa celular foi feita pela ressuspensão da mesma em água aquecida a 60 °C seguida de agitação em vórtice, centrifugação para separação da biomassa e sobrenadante contendo o EPS celular. Os demais métodos analíticos, referentes a composição química dos meios fermentados como consumo de açúcares e proteínas além das concentrações das variáveis-resposta obtidas seguiram as metodologias

apresentadas nos itens 4.4 e 4.7, respectivamente. Os resultados obtidos pelo DCCR foram analisados em *softwares* conforme 4.5, com a análise de tabelas de efeitos, gerando modelos matemáticos.

4.9 Estudo da produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana utilizando hidrolisado de farelo de milho por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2

A elaboração do estudo de produção da lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de milho segue um DCCR 2^2 com três repetições no ponto central. Foram avaliados os efeitos da agitação (X_1) e temperatura (X_2). As variáveis-resposta observadas foram a produção de LAS-M, LAS-C e produção de biomassa celular. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 50 mL (40% do volume) do hidrolisado de farelo de milho (HFM-4), obtido na condição ótima segundo item 4.6. Para inoculação de *L. theobromae*, foram utilizados 2 discos de ágar contendo o micélio fúngico, conforme apresentado em 4.1. Os ensaios foram realizados por um período de 96 horas com retiradas de frascos a cada 24 horas. A matriz do DCCR 2^2 , contendo os níveis codificados e reais pode ser observada na Tabela 13.

Tabela 13 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com três repetições no ponto central.

Ensaio	X_1	X_2	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	41,4	20,5
2	1	-1	241,4	20,5
3	-1	1	41,4	32,5
4	1	1	241,4	32,5
5	$-\alpha$	0	0	26,5
6	$+\alpha$	0	282,8	26,5
7	0	$-\alpha$	141,4	18
8	0	$+\alpha$	141,4	35
9	0	0	141,4	26,5
10	0	0	141,4	26,5
11	0	0	141,4	26,5

Fonte: Autoria própria

A determinação do consumo de açúcares e proteínas foi realizada conforme descritos no item 4.4, enquanto as análises das variáveis-resposta seguem conforme descritos no item 4.7. Os resultados obtidos foram analisados em *softwares* conforme item 4.5.

Etapa 3 – Otimização da produção de lasiodiplodana

4.10 Caracterização estrutural parcial das frações de lasiodiplodana obtidas em meio sintético e em hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho

4.10.1 Determinação da pureza da lasiodiplodana

As frações de lasiodiplodana obtidas após cada fermentação em meio sintético e em hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho foram averiguadas quanto à pureza dos materiais. Para esta determinação foram utilizados os exopolissacarídeos secos, conforme item 4.7. Em triplicata, foram pesados aproximadamente 20 mg dos respectivos materiais, aos quais foram adicionados 1 mL de ácido sulfúrico 72%, em banho termostático a 30 °C por 1h. Os materiais hidrolisados foram diluídos a um volume final de 20 mL e autoclavados a 121 °C por 1h. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução padrão de glicose para avaliar possíveis degradações de açúcares. Os materiais resultantes foram caracterizados quanto a concentrações de açúcares redutores e proteínas conforme itens 4.4.2 e 4.4.4, respectivamente.

4.10.2 Análises espectroscópicas de infravermelho (FTIR)

As amostras de lasiodiplodana secas foram caracterizadas utilizando a espectroscopia de infravermelho em aparelho Perkin Elmer® Spectrum™ GX (Shelton, USA), em resolução de número de onda variável de 4000 a 600 cm⁻¹. Os materiais foram preparados pela mistura de 1,5 mg de lasiodiplodana a 250 mg de brometo de potássio em pó (KBr) e submetidas a secagem em dessecador a 50 °C sob pressão reduzida antes de serem analisadas.

4.10.3 Análises cristalográficas (Raios-X)

A difração de Raios-X foi realizada no EPS seco e pulverizado. Utilizou-se um difratômetro de Raios-X (PANalytical – EMPYREAN) com radiação CuK – α e medidas no intervalo angular (2 θ) de 10 – 80 °, com um passo de 0,02 ° e tempo de contagem de 20 seg.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de crescimento de *L. theobromae* cultivadas em placas de Petri sob a presença e ausência de luz

O fungo *L. theobromae* crescido em diferentes meios de cultivo sob a presença e ausência de luz foram retirados da estufa para avaliação do seu crescimento, formação de estruturas de reprodução e produção de pigmentos em condições de iluminação variadas (Figura 7).

Figura 7 – Teste de incidência de luz em *L. theobromae* para a avaliação do crescimento da colônia, desenvolvimento de picnídios e produção de pigmentos. t=0h (A); t=96 horas com alternância de luz (B) e; ausência de luz (C). Meios de cultivo: 1 (YPX); 2 (YPD); 3 (N-Glicose); 4 (PDA); 5 (YPMG).

Fonte: Autoria própria

5.1.1 Crescimento radial do micélio

Os cultivos do fungo *L. theobromae*, exposto a ensaios de incidência de luz em diferentes meios de cultivo foram avaliados quanto ao crescimento radial do micélio nos tempos de 24, 48 e 72 horas, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Crescimento radial do fungo em placas de Petri e em diferentes meios de e cultivo sob incidência parcial de luz (A) e ausência de luz (B). ■: YPX; ■: YPD; ■: N-glicose; ■: PDA; ■: YPMG.

Fonte: Autoria própria

Os resultados demonstram que a presença de luz não exerceu influência no crescimento micelial dos fungos. A maior expansão do micélio ocorreu entre nas primeiras 24 horas de cultivo, provavelmente por se tratarem de inóculos pré-ativados e a fácil absorção de carboidratos simples presentes nos meios de cultivo. Os mesmos resultados foram observados por Rao e Singhal (1978), no qual a influência da luz sob o crescimento de *B. theobromae* (forma teleomórfica de *L. theobromae*) apresentou uma taxa de crescimento de 2,2 a 2,4 cm a cada 24 horas, porém utilizando placas de Petri e ferramentas inoculante de diâmetros maiores. Em outro estudo realizado por Khanzada, Rajput e Shahzad (2006) foi observado que o crescimento do fungo não foi afetado pela exposição a diversas combinações de iluminação direta ou ausência de iluminação.

O diâmetro da placa de Petri foi um fator limitante para a continuidade do crescimento da cultura, sendo completamente tomada em 96 horas de cultivo. A Figura 9 elucida os crescimentos radiais do fungo bem como suas velocidades de crescimento radial (VCR) nos diversos meios de cultivo testados sob as diferentes condições de luz. A Tabela 14 apresenta a equação para determinação do crescimento radial nos diferentes meios, e a VCR específica para cada fungo ao final de 72 horas.

Figura 9 – Crescimento radial (A e B) e velocidade de crescimento radial (C e D) do fungo *L. theobromae* em sob incidência e ausência de luz.

Fonte: Autoria própria

Tabela 14 – Equação do raio em função do tempo e velocidade do crescimento radial de *L. theobromae*.

Meio	Equação	R ²	VCR	Equação	R ²	VCR (mm h ⁻¹)
YPX	Incidência parcial de luz $r = 0,3324t - 0,1475$	0,9987	0,29	$r = 0,3472t - 0,0425$	0,9964	0,29
YPD				$r = 0,3472t + 0,2575$	0,9919	0,29
N-glicose				$r = 0,3747t - 0,1325$	0,9998	0,33
PDA				$r = 0,328t + 0,4475$	0,9911	0,28
YPMG				$r = 0,332t + 0,0175$	0,9917	0,29
				Ausência total de luz		

r: raio (mm) t: tempo (h) VCR: velocidade de crescimento radial.

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 14, pode-se observar que não houve diferenças significativas nas VCR dos fungos em função do meio utilizado apresentando valores entre 0,26 e 0,33 mm h⁻¹. Esses valores são menores do que aqueles encontrados por Eng, Gutiérrez-Rojas e Favela-Torres (2003), que estudaram a influência da temperatura e do pH no crescimento superficial de *B. theobromae*, demonstrando que esses parâmetros não influenciaram significativamente na VCR do fungo, embora tenham utilizado maiores concentrações de carboidratos do que o

presente estudo. A VCR de *L. theobromae* se demonstra elevada quando comparada com outros fungos de importância comercial, como o *Monascus ruber*, com crescimento radial de 0,049 mm h⁻¹ (OLIVEIRA; VENDRUSCOLO, 2011).

Utilizando o diagrama para análise do crescimento do fungo descrito no item 4.3 podem ser observadas diferenças morfológicas no crescimento micelial do fungo. Nas amostras com iluminação parcial, o micélio presente nas áreas A e B se apresentaram escuras em todos os meios estudados, enquanto aqueles crescidos com a prevalência de micélio mais claro na região C. Quando comparados com as amostras em ausência de luz pode ser observado um maior escurecimento em todas as amostras, com destaque para o meio PDA, que apresentou coloração escura distribuída em grande parte da superfície da placa. O escurecimento do micélio indica o amadurecimento do mesmo (SANDOVAL-SÁNCHEZ et al., 2013) e pode ter relação com o desenvolvimento de estruturas de reprodução e provavelmente modificam o metabolismo do microrganismo.

5.1.2 Formação de estruturas de reprodução

Outra resposta observada pela incidência da iluminação foi a produção de estruturas de armazenamento das estruturas de reprodução, os picnídios. Os picnídios são receptáculos que possuem a função de proteger os conídios, responsáveis pela reprodução. A prevalência das estruturas pode ser observada na Tabela 15.

Tabela 15 – Produção de picnídios em diferentes meios de cultivo sob incidência parcial e ausência de luz.

Meio	Incidência parcial de luz		Ausência total de luz	
	A	B	A	B
YPX	++	++	+	+
YPD	+	+	++	++
N-glicose	+++	+++	+++	+++
PDA	+	+	+	+
YPMG	++	++	++	++

(+++): Grande presença de picnídios; (++) : Moderada presença de picnídios; (+): Pequena presença de picnídios; (–) ausência de picnídios.

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 15, pode-se observar que a incidência parcial/ausência de luz afetou ligeiramente a produção de picnídios nas amostras contendo meios sólidos YPX e YPD, promovendo e inibindo respectivamente a geração dos mesmos nas condições de

exposição parcial de luz. Utilizando o diagrama para análise do crescimento do fungo descrito em 4.3, pode-se observar uma prevalência de produção de picnídios nas áreas C, com exceção do meio N-glicose que apresentou as estruturas amplamente distribuídas sob ambas as condições de luz. Rao e Singhal (1978) observaram a produção de picnídios em placas de Petri incubadas por 120 horas, obtendo a produção uniforme de picnídios em placas submetidas a luz constante, enquanto placas cultivadas em ausência de luz demonstraram ausência total das estruturas. A Figura 10 apresenta a microscopia de luz de um picnídio intacto (A), isolado de cultivo YPMG, seguido do rompimento mecânico do mesmo (B) enquanto a Figura 11 expõe a estrutura analisada sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Figura 10 – Microscopia de luz de (A) picnídio intacto (400x); (B) após rompimento mecânico com liberação de conídios imaturos em detalhe (400x) e; (C) Conídios imaturos e maduros livres (1000x).

Fonte: Autoria própria

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura dos picnídios em 500X (A) e 1000x (B).

Fonte: Autoria própria

Honda e Aragaki (1978) estudaram a produção de picnídios em comprimentos de onda que variaram entre 300 e 700 nm, obtendo maior produção em fotoensaio de comprimentos

entre 344,5 e 519 nm e liberação de conídios em comprimento inferior a de 333 nm, próximos na região do espectro ultravioleta.

5.2 Caracterização química parcial do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e ajustado (HBC-0) foram caracterizados espectrofotometricamente quanto a concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e por cromatografia líquida de alta eficiência quanto as concentrações de glicose, xilose e arabinose, ao conteúdo dos compostos inibidores ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, conforme apresentados na Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e diluído.

Hidrolisado	AT (g/L)	AR (g/L)	PT (g/L)
HBC-5x concentrado	175,88 ± 13,53	85,53 ± 0,56	0,8 ± 0,57
HBC-0	45,84 ± 1,30	20,51 ± 0,23	0,19 ± 0,02
AT: Açúcares totais Fonte: Autoria própria	AR: Açúcares redutores	PT: Proteínas totais	

Tabela 17 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por cromatografia líquida de alta eficiência.

Hidrolisado	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético (g/L)	5-HMF (g/L)	Furfural (g/L)
HBC-5x concentrado	3,93	76,67	6,64	3,62	0,03	0,07
HBC-0	0,93	20,17	1,55	0,91	0,01	0,02

5-HMF: Hidroximetilfurfural

Fonte: Autoria própria

A hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar é facilmente solubilizada na presença de ácidos em baixas concentrações, gerando um caldo rico em açúcares (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). O hidrolisado obtido pode ser concentrado para facilitar o armazenamento, também evitando a contaminação, uma vez que a alta concentração de açúcares promova a repressão catabólica e o estresse osmótico em microrganismos potencialmente indesejáveis (BEKATOROU; PSARIANOS; KOUTINAS, 2006). Os hidrolisados concentrados podem ser ressolubilizados na concentração desejada em etapas futuras, sem perdas de açúcares. O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar resultante

é rico em pentoses, em especial a xilose, o principal açúcar presente em biomassas hemicelulósicas sendo amplamente utilizado na síntese de diversos bioprodutos, em especial o xilitol e o etanol lignicelulósico (CARVALHO et al., 2004; GÍRIO et al., 2010; BALAT, 2011).

5.2.1 Composição do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado

Para a realização da avaliação de produção de lasiodiplodana foi necessário ajustar a concentração o hidrolisado (HBC-0) de bagaço de cana-de-açúcar. Em triplicata, o hidrolisado foi diluído para uma concentração de aproximadamente 40 g/L de açúcares totais (HBC-1), centrifugado (HBC-2), tendo o pH corrigido para 5,5 (HBC-3), autoclavado e novamente centrifugação (HBC-4) para então serem utilizados nos ensaios fermentativos. Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar tiveram suas concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais analisadas em todas as etapas do tratamento, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores; ■: Proteínas totais.

Fonte: Autoria própria

Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar tratados apresentaram baixa remoção de açúcares redutores (16,36%), açúcares redutores (6,58%) e proteínas totais (10,51%), demonstrando que o tratamento empregado para os hidrolisados estudados foi satisfatório. Santos, Marton e Felipe (2014) demonstraram uma remoção de 10,25% de xilose ao neutralizar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com NaOH, enquanto Martiniano e

colaboradores (2013) obtiveram perdas de 32% do açúcar ao tratar o hidrolisado com óxido de cálcio. A redução das concentrações de açúcares durante o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pode ocorrer pela adsorção dos mesmos na torta formada durante o tratamento dos hidrolisados. Um tratamento eficaz dos hidrolisados deve reduzir a perda de açúcares, promovendo somente a remoção de compostos inibidores aos processos de fermentação, uma vez que são capazes de afetar a habilidade de afetar as membranas celulares que servem como barreiras seletivas (SANTOS; MARTON; FELIPE, 2014).

5.3 Delineamento composto central rotacional DCCR 2² para obtenção de hidrolisados de farelo de arroz.

Os hidrolisados de farelo de arroz obtidos utilizando o modelo DCCR 2² com três repetições no ponto central foram analisados quanto a concentrações de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais, conforme demonstrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2² para avaliação da influência da concentração ácida e massa de farelo na obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais em hidrolisados de farelo de arroz.

Ensaio	Concentração Ácida (% m/v)	Massa de Farelo (%)	AT (g/L)	AR (g/L)	PT (g/L)	Fenóis totais (mg/L)
1	0,146 (-1)	7,2 (-1)	9,14	3,87	6,63	95,62
2	0,854 (+1)	7,2 (-1)	18,42	13,80	12,13	184,64
3	0,146 (-1)	17,8 (+1)	23,56	7,95	16,13	179,38
4	0,854 (+1)	17,8 (+1)	23,22	17,59	22,75	168,99
5	0 (- α)	12,5 (0)	18,22	6,80	9,25	191,25
6	1 (+ α)	12,5 (0)	40,53	12,57	18,13	145,25
7	0,5 (0)	5,00 (- α)	6,61	5,62	6,63	22,11
8	0,5 (0)	20,00 (+ α)	21,84	10,43	21,88	237,24
9	0,5 (0)	12,5 (0)	23,05	8,96	14,13	203,12
10	0,5 (0)	12,5 (0)	25,31	7,37	13,75	174,93
11	0,5 (0)	12,5 (0)	24,86	8,02	13,63	121,51

AT: Açúcares totais

AR: Açúcares redutores

PT: Proteínas totais

Fonte: Autoria própria

Pode-se observar que os hidrolisados de farelo de arroz demonstraram quantidades estimáveis de açúcares totais, com concentrações que variam de 6,61 a 40,53 g/L, de acordo com as variáveis estudadas. A variação nas concentrações de açúcares está preponderantemente relacionada às concentrações de ácido utilizadas nas condições apresentadas, uma vez que maiores concentrações foram responsáveis por maior liberação de

açúcares. Isso se deve ao fato que o ácido sulfúrico atua como catalizador da reação de hidrólise da biomassa solubilizando os açúcares presentes em sua estrutura (ADEL et al., 2010; GÁMEZ et al., 2006). A utilização de ácidos diluídos tem sido extensivamente empregada industrialmente, por permitir atingir taxas relativamente altas de açúcares, poucos produtos de degradação de açúcares e muito menos corrosão em tanques de hidrólise e tubulações do que quando utilizados ácidos concentrados (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

As concentrações de açúcares redutores variaram de acordo com a severidade do processo ácido apresentando concentrações entre 3,87 a 17,59 g/L. Embora tenha ocorrido com a liberação de açúcares totais, maiores concentrações de ácido não foram responsáveis por maiores obtenções de açúcares redutores no meio. Isso pode se dar ao fato que o processamento do arroz pode causar quebras irregulares nos grãos, ricos em amido, que acabam por ficar aderidos ao farelo e resultam em concentrações variáveis do mesmo (CASTRO et al., 1999). O amido presente nos fragmentos de arroz junto ao farelo ao serem hidrolisados geram maltose e glicose, açúcares redutores que podem ser prontamente utilizados em processos microbiológicos (MORITZ, 2005).

São destacadas também altas concentrações de proteínas totais nos hidrolisados de farelo de arroz nas condições estudadas, com concentrações que variaram entre 6,63 e 22,75 g/L. O farelo de arroz possui 13,13% de proteína bruta em sua composição (ROSTAGNO, 2011), apresentando nos ensaios estudados, relações entre carboidratos e proteínas de aproximadamente 2:1 e 1:1. A proteína de farelo de arroz pode ser facilmente extraída após um processo de pré-tratamento e utilizado como uma fonte de nitrogênio de baixo custo em processos fermentativos (MILESSI et al., 2012; MARTINIANO et al., 2013).

Foram também observados compostos fenólicos em concentrações que variaram entre 22,11 e 237,24 g/L. A lignina presente nos fragmentos de casca do farelo de arroz, oriundos do beneficiamento industrial do grão, pode estar associada a presença de compostos fenólicos nos hidrolisados, uma vez que a macromolécula se apresenta na biomassa vegetal em concentrações variáveis entre 7,7 e 20,9% (LUH; BARBER; BARBER, 1991; DIAS et al., 1994). Os compostos fenólicos são potenciais inibidores dos microrganismos em processos fermentativos, levando a menores rendimentos e produtividades de compostos de interesse industrial (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Foram consideradas as variáveis-resposta referentes a açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais, sendo os efeitos estimados das variáveis estudadas apresentados na Tabela 19. Os modelos matemáticos gerados para açúcares totais, açúcares

redutores e proteínas totais, com no mínimo 90% de confiança são demonstrados conforme as Equações 2, 3 e 4, seguidos da Análise de Variância (ANOVA) na Tabela 20.

$$\text{Açúcares totais (g/L)} = 25,99 + 5,06 * X_1 + 5,1 * X_2 - 6,39 * X_2^2 \quad (2)$$

$$\text{Açúcares redutores (g/L)} = 9,36 + 3,47 * X_1 + 1,83 * X_2 \quad (3)$$

$$\text{Proteínas totais (g/L)} = 13,85 + 3,08 * X_1 + 5,23 * X_2 + 0,32 * X_2^2 \quad (4)$$

Onde: X_1 : concentração de ácido (m/v); X_2 : massa de farelo de arroz em relação ao volume de solução (%).

Tabela 19 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de t e p obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de arroz.

Açúcares totais (g/L)					Açúcares redutores (g/L)				Proteínas totais (g/L)				Fenóis totais (mg/L)			
Fator	Efeito	Erro padrão	t	p	Efeito	Erro padrão	t	p	Efeito	Erro padrão	t	p	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	24,41	2,43	10,054	<0,001 ^c	8,12	1,3	6,258	0,001 ^c	13,83	0,22	63,190	<0,001 ^c	166,51	29,57	5,632	0,002 ^c
X ₁ ^a	10,13	2,98	3,404	0,019 ^c	6,94	1,59	4,365	0,007 ^c	6,17	0,27	23,009	<0,001 ^c	3,42	36,23	0,094	0,928
X ₂ ^b	10,19	2,97	3,427	0,019 ^c	3,67	1,59	2,310	0,069 ^d	10,46	0,27	39,040	<0,001 ^c	5,84	43,19	0,135	0,898
X ₁ X ₂	-4,81	4,2	-1,145	0,304	-0,15	2,25	-0,065	0,951	0,69	0,38	1,813	0,129	-49,7	51,21	-0,971	0,376
X ₁ ²	3,36	3,55	0,947	0,387	2,55	1,89	1,348	0,235	0,03	0,32	0,084	0,936	93,08	36,2	2,571	0,050 ^c
X ₂ ²	-11,78	3,54	-3,333	0,021 ^c	0,88	1,89	0,467	0,660	0,65	0,32	2,040	0,097 ^d	-32,72	43,05	-0,760	0,481

^aNível codificado para concentração ácida. ^bNível codificado para percentual de farelo. ^cNível de confiança a 95%. ^dNível de confiança a 90%.

Fonte: Autoria própria

Tabela 20 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R^2) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de arroz.

Açúcares totais (g/L)						Açúcares redutores (g/L)						Proteínas totais (g/L)						Fenóis totais (mg/L)					
Fator	SQ	GL	QM	F	p	Fator	SQ	GL	QM	F	p	Fator	SQ	GL	QM	F	p	Fator	SQ	GL	QM	F	p
X ₁ ^a	204,98	1	204,98	11,28	0,012 ^c	X ₁ ^a	96,08	1	96,08	22,29	0,001 ^c	X ₁ ^a	76,11	1	76,11	445,66	< 0,001 ^c	X ₂ ^b	17330,15	1	17330,15	8,914	0,015 ^c
X ₂ ^b	207,69	1	207,69	11,42	0,012 ^c	X ₂ ^b	26,93	1	26,93	6,25	0,037 ^c	X ₂ ^b	219,12	1	219,12	1283,01	< 0,001 ^c						
X ₂ ²	252,41	1	252,41	13,88	0,007 ^c							X ₂ ²	0,64	1	0,64	3,75	0,094 ^d						
FA	124,38	5	24,88	17,31	0,055 ^d	FA	33,21	6	5,53	8,69	0,107	FA	1,06	5	0,21	3,13	0,260	FA	14062,16	7	2008,88	1,169	0,535
EP	2,87	2	1,44			EP	1,27	2	0,64			EP	0,14	2	0,07			EP	3435,50	2	1717,75		
Total	792,34	10				Total	157,49	10				Total	297,07	10				Total	34827,82	10			
R ²	0,839					R ²	0,781					R ²	0,996					R ²	0,498				

^aNível codificado para concentração ácida. ^bNível codificado para percentual de farelo. ^cNível de confiança a 95%. ^dNível de confiança a 90%.

FA: falta de ajuste. **EP:** erro puro. **SQ:** Soma dos quadrados. **GL:** Graus de liberdade. **QM:** Médio quadrático.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que os efeitos para as variáveis, concentração ácida (X_1) e massa de farelo (X_2) foram significantes ($p < 0,05$) e positivas, indicando que a maximização para a obtenção de açúcares totais possa ser atingida em maiores concentrações de ambas. O aumento da concentração ácida acrescida de uma concentração de farelo de arroz mais elevada pode promover a liberação de açúcares totais solubilizados no meio. A obtenção de açúcares redutores obteve respostas positivas significativas para X_1 a 95% de nível de significância, enquanto X_2 foi significativa a 90%, também indicando que maiores concentrações de açúcares redutores serão obtidas em maiores concentrações de ácido e de farelo de arroz. A obtenção de proteínas totais apresentou o mesmo perfil ($p < 0,05$), demonstrando-se em maiores concentrações nos ensaios com maior volume de ácido sulfúrico e maior disponibilidade de biomassa. A utilização de extratos de farelo de arroz como alternativa para a diminuição de custos para a suplementação de fontes de nitrogênio tem sido utilizada, por exemplo, na produção de etanol de segunda geração (MILESSI et al., 2012; MARTINIANO et al., 2013). Os fenóis totais não apresentaram variáveis lineares com *p*-valor adequado sendo apenas a variável quadrática X_1^2 significativa a 95% de confiança.

O modelo matemático obtido para a variável-resposta de fenóis totais não foi adequado ao ajuste dos dados, pois apresenta uma alta porcentagem de variação e valor de R^2 muito baixo e uma falta de ajuste significativa. Devem ser observadas que as concentrações de fenóis totais obtidas dentro das condições estudadas demonstraram, em geral, pouca variação e baixas concentrações quando comparadas com os compostos fenólicos presentes em outros subprodutos agrícolas (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; SANTOS; MARTON; FELIPE, 2014), o que promove a utilização dos hidrolisados de farelo de arroz em processos fermentativos.

Os modelos matemáticos gerados para açúcares totais e açúcares redutores foram significantes a 95% de confiança, apresentando R^2 com valores 83,9 e 78,1%, respectivamente, enquanto a variável de proteínas totais apresentou um R^2 de 99,6% e significantes a 90% confiança. Assim, os modelos foram utilizados para avaliar os processos por meio de superfícies de resposta, conforme demonstrado na Figura 13, de modo a facilitar o entendimento sobre os efeitos combinados de concentrações de ácido e massa de farelo de arroz utilizada no pré-tratamento.

Figura 13 – Superfícies de resposta para a obtenção de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e proteínas totais (C) em hidrolisados de farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria

A maior disponibilidade de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas apresentadas nos ensaios estudados estão diretamente relacionados ao aumento das concentrações de ácido sulfúrico e massa de farelo presentes no pré-tratamento. Embora maiores concentrações de ácido possam solubilizar uma maior quantidade de componentes, deve-se atentar para um limite de sua concentração, dado a adição desse tipo de catalisador possa aumentar os custos de produção além de causar danos a equipamentos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A concentração de farelo de arroz utilizado no pré-tratamento também deve ser adequada, uma vez que o farelo pode conter resíduos de arroz quebrado, material altamente higroscópico (CASTRO et al., 1999) que pode capturar a água do meio reativo tornando o pré-tratamento da biomassa ineficaz.

A utilização do farelo de arroz como de fonte de nitrogênio orgânico em substituição a sais nitrogenados se demonstrou promissora uma vez que a sua utilização promove a redução de custos na produção de diversos produtos, como exopolissacarídeos, biodiesel e pigmentos (MORITZ, 2005; ZULLAIKAH et al., 2005; ANANDA NANJUNDA; VADLANI; MADL, 2011; ABDUL RAZACK; VELAYUTHAM; THANGAVELU, 2013).

Altas concentrações de ácido podem também gerar uma maior quantidade de inibidores da fermentação microbiana, acarretando em maior solubilização de lignina e consequentemente maior disponibilidade de fenóis totais no meio (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). As concentrações observadas se demonstraram bem reduzidas quando comparadas, por exemplo, com hidrolisados *in natura* de bagaço de cana-de-açúcar que apresentaram concentrações variáveis entre 1,95 a 4,25 g/L (RODRIGUES et al., 2010; SANTOS; MARTON; FELIPE, 2014).

Conforme elucidado pelas superfícies de resposta geradas acima, as condições com maiores concentrações de ácido sulfúrico e farelo de arroz foram responsáveis pelas maiores obtenções de açúcares redutores e proteínas, apresentando também altas concentrações de açúcares totais. Sendo assim, as concentrações de ácido sulfúrico a 1% (m/v) e massa de farelo a 20% foram utilizadas nas etapas subsequentes deste trabalho.

5.3.1 Caracterização química parcial do hidrolisado de farelo de arroz por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

O hidrolisado de farelo de arroz obtido por meio da hidrólise ácida a 1% m/v com 20% de massa foi devidamente filtrado (HFA-0) e caracterizado por técnicas espectrofotométricas quanto suas concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, seguidos

por cromatografia líquida de alta eficiência para determinar as concentrações de glicose, xilose e arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, conforme apresentados na Tabela 21 e Tabela 22.

Tabela 21 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado farelo de arroz.

Hidrolisado	AT (g/L)	AR (g/L)	PT (g/L)
HFA-0	38,57 ± 4,88	10,69 ± 0,54	14,12 ± 0,67
AT: Açúcares totais	AR: Açúcares redutores	PT: Proteínas totais	
Fonte: Autoria própria			

Tabela 22 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado farelo de arroz por cromatografia líquida de alta eficiência.

Hidrolisado	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético (g/L)	5-HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Glicerol (g/L)
HFA-0	1,56	4,12	4,71	2,36	0	0,025	0,055	10,44

5-HMF: Hidroximetilfurfural

Fonte: Autoria própria

Dentre os açúcares obtidos, a xilose foi o açúcar predominante, seguido pela glicose, arabinose e celobiose. A concentração de xilose obtida no hidrolisado de arroz foi menor quando comparada, por exemplo, com os hidrolisados hemicelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar, quando tratados em condições similares (SANTOS; MARTON; FELIPE, 2014). Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que o farelo de arroz apresente menor percentual de hemicelulose que o bagaço. Dias e colaboradores (1994) encontraram teores de hemicelulose de 17,3% enquanto as composições da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar descritas na literatura com, em média, 25% (ROCHA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010). Outro fator a ser considerado é que a hemicelulose presente na parede celular dos cereais é descrita como arabinoxilana, e é composta por uma cadeia principal de xilose com substituições de arabinose nas posições 2 e 3, enquanto a hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar ser descrita como arabinoglucoronoxilana, (GÍRIO et al., 2010).

O hidrolisado de farelo de arroz apresentou a relação entre carboidratos e proteínas na proporção de 3:1. O alto conteúdo proteico do farelo de arroz está de acordo com o apresentado na literatura, possuindo aproximadamente 14% de proteína bruta (SANTOS et al., 2010). Por ser prontamente hidrolisada, a proteína do farelo de arroz pode ser utilizada na suplementação de meios de cultivo microbiológicos, em substituição as fontes de nitrogênio tradicionais, reduzindo custos (MARTINIANO et al., 2013; MILESSI et al., 2013).

O hidrolisado apresentou alta concentração de glicerol, quando comparado aos açúcares obtidos. O glicerol pode ser proveniente do extrato etéreo, ou gordura bruta, abundantemente presente no farelo de arroz e podendo representar, em média, 16,14% da biomassa vegetal (SANTOS et al., 2010). Assim, pôde-se concluir que o hidrolisado ácido de farelo de arroz é rico em açúcares e proteínas, e pode ser utilizado como fontes de carboidratos e proteínas por microrganismos na síntese de diversos produtos de interesse biotecnológico.

5.3.2 Composição do hidrolisado de farelo de arroz tratado para fermentação

Visando à adequação do hidrolisado de farelo de arroz, foram tratados conforme descrito no item 4.4 e apresentaram concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais conforme a Figura 14. Os tratamentos empregados no hidrolisado de farelo de arroz exibiram baixas remoções de açúcares totais (16,36%), açúcares redutores (6,58%) e proteínas totais (10,51%), demonstrando que, assim como observado para o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, o tratamento empregado foi satisfatório. Um pré-tratamento adequado da biomassa visa baixos custos de operação, alta recuperação de açúcares, sem a presença de compostos inibidores.

Figura 14 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados de farelo de arroz. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores e; ■: Proteínas totais.

Fonte: Autoria própria

O hidrolisado de farelo de arroz obtido ao final do tratamento (HFA-4) apresentou uma relação de carboidratos e proteínas de aproximadamente 2,5:1, com 14,93 g/L, demonstrando-se uma excelente fonte de proteínas. Lacerda e colaboradores (2010)

observaram a composição do farelo de arroz cru, obtendo 13,34% da massa em proteínas. Assim, o hidrolisado ajustado foi utilizado na etapa de validação do modelo experimental para produção de lasiodiplodana utilizando hidrolisado de farelo de arroz.

5.4 Delineamento composto central rotacional DCCR 2² para obtenção de hidrolisados de farelo de milho.

Assim como os hidrolisados de farelo de arroz, os hidrolisados de farelo de milho foram analisados utilizando o modelo DCCR 2² com três repetições no ponto central. Foram obtidas as como variáveis resposta as de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais, conforme demonstrados na Tabela 23.

Tabela 23 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2² para avaliação da influência da concentração ácida e massa de farelo na obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais em hidrolisados de farelo de milho.

Ensaio	Concentração Ácida (% m/v)	Massa de Farelo (%)	AT (g/L)	AR (g/L)	Proteínas totais (g/L)	Fenóis totais (mg/L)
1	0,146 (-1)	7,2 (-1)	96,81	8,13	6,50	6,60
2	0,854 (+1)	7,2 (-1)	62,69	32,07	11,13	51,85
3	0,146 (-1)	17,8 (+1)	55,31	16,72	10,13	131,90
4	0,854 (+1)	17,8 (+1)	154,13	92,40	18,13	370,62
5	0 (-α)	12,5 (0)	47,63	4,50	3,75	58,53
6	1 (+α)	12,5 (0)	122,88	71,79	16,88	361,72
7	0,5 (0)	5,00 (-α)	52,06	28,06	4,38	125,96
8	0,5 (0)	20,00 (+α)	113,94	39,46	19,00	220,92
9	0,5 (0)	12,5 (0)	99,56	36,22	9,38	188,28
10	0,5 (0)	12,5 (0)	102,06	43,54	10,75	203,12
11	0,5 (0)	12,5 (0)	98,69	40,43	9,38	179,38

AT: Açúcares totais

AR: Açúcares redutores

Fonte: Autoria própria

Os hidrolisados de farelo de milho apresentaram altas concentrações de açúcares totais, com valores que de 47,63 a 154,13 g/L. Assim como elucidado no delineamento apresentado para hidrolisados de farelo de arroz, os ensaios que apresentaram maiores valores são os que apresentaram maiores concentrações ácidas.

Os ensaios 1, 3 e 5, apresentaram a recuperação do hidrolisado dificultada durante a centrifugação, apresentando sobrenadantes com alta viscosidade que ao serem resfriados, gelificaram-se. O aquecimento do amido em solução causa o intumescimento dos grânulos, desordenando irreversivelmente a amilopectina e a amilose estruturais (MORRIS, 1990). A

gelatinização do amido ocorre pela formação de associações intra e intermoleculares, nos quais o oxigênio hemiacetal, hidroxilas ou metilas presentes nos açúcares contribuem para a atração dos resíduos por formação de pontes de hidrogênio ou força de Van der Waals (TAKO et al., 2014). As similaridades de características físicas entre os hidrolisados obtidos e o amido sugerem que a solubilização não ocorreu de modo efetivo devido a baixas concentrações ácidas, uma vez que os ensaios exibiram menores concentrações de açúcares totais do que os demais experimentos. O mesmo padrão pode ser observado para a obtenção de açúcares redutores, sendo que a variação das concentrações de ácido do pré-tratamento resultaram em níveis mínimos e máximos de 4,5 e 71,79 g/L, respectivamente. A maior liberação de açúcares totais e redutores em hidrolisados de farelo de milho, quando comparadas com valores obtidos em hidrolisados de farelo de arroz estão relacionados à composição dos subprodutos, uma vez que apresentaram aproximadamente 65,7% e 22,7% de amido em sua matéria seca, respectivamente (EZEQUIEL et al., 2006; LACERDA et al., 2010).

As concentrações de proteínas obtidas em hidrolisados de farelo de milho variaram em concentrações mínimas e máximas em valores de 3,75 e 19 g/L, respectivamente. O farelo de milho possui aproximadamente 10% de proteína bruta (EMBRAPA, 2011). Embora tenham sido obtidas concentrações similares de proteínas totais, quando comparados aos conteúdos proteicos de hidrolisados de farelo de arroz, as relações entre carboidratos e proteínas variaram aproximadamente, entre 6:1 a 10:1.

As concentrações de fenóis totais apresentadas no seguinte estudo variaram entre 6,6 e 370,62 mg/L. Assim como observado para o beneficiamento industrial do farelo de arroz, a presença de cascas de milho no farelo corresponde a 2,99% de sua massa seca e pode estar diretamente relacionado a presença de compostos fenólicos nos hidrolisados estudados (ZAMBOM et al., 2008). A concentração de compostos fenólicos no hidrolisado de farelo de milho é baixa, quando comparadas, por exemplo, com hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando a possibilidade da utilização deste hidrolisado como meio fermentativo em processos biotecnológicos.

Assim, foram consideradas as variáveis-resposta referentes a açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e fenóis totais, sendo os efeitos estimados das variáveis estudadas apresentados na Tabela 24. A Análise de Variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 25, seguidos dos modelos matemáticos para açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, com no mínimo 95% de confiança conforme as Equações 5, 6 e 7.

$$\text{Açúcares totais (g/L)} = 91,43 + 21,39 * X_1 + 17,18 * X_2 + 33,23 * X_1 * X_2 \quad (5)$$

$$\text{Açúcares redutores (g/L)} = 37,58 + 24,35 * X_1 + 10,63 * X_2 + 12,93 * X_1 * X_2 \quad (6)$$

$$\text{Proteínas totais (g/L)} = 10,85 + 3,9 * X_1 + 3,91 * X_2 \quad (7)$$

Onde: X_1 : concentração de ácido (m/v); X_2 : massa de farelo de milho em relação ao volume de solução (%).

Tabela 24 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de *t* e *p* obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.

Açúcares totais (g/L)					Açúcares redutores (g/L)				Proteínas totais (g/L)				Fenóis totais (mg/L)			
Fator	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	100,10	5,96	16,798	<0,0001	40,07	5,04	7,942	0,001 ^c	9,83	1,12	8,794	<0,001 ^c	190,28	36,74	5,179	0,003 ^c
X₁^a	42,80	7,30	5,860	0,0021 ^c	48,73	6,18	7,882	0,001 ^c	7,80	1,37	5,692	0,002 ^c	178,28	45,03	3,959	0,011 ^c
X₂^b	34,35	7,30	4,708	0,0053 ^c	21,25	6,18	3,440	0,018 ^c	7,83	1,37	5,716	0,002 ^c	144,52	44,99	3,212	0,024 ^c
X₁X₂	66,47	10,32	6,440	0,0013 ^c	25,87	8,74	2,961	0,031 ^c	1,69	1,94	0,871	0,423	96,74	63,64	1,520	0,189
X₁²	-10,81	8,70	-1,242	0,2693	-1,23	7,37	-0,167	0,874	0,72	1,63	0,438	0,679	-6,00	53,67	-0,112	0,915
X₂²	-13,03	8,68	-1,502	0,1934	-5,61	7,35	-0,764	0,479	2,09	1,63	1,281	0,256	-42,52	53,50	-0,795	0,463

^aNível codificado para concentração ácida, ^bNível codificado para percentual de farelo, ^c Nível de confiança a 95%.

Fonte: Autoria própria

Tabela 25 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R²) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.

Açúcares totais (g/L)						Açúcares redutores (g/L)						Proteínas totais (g/L)						Fenóis totais (mg/L)					
Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
X₁^a	3659,70	1	3659,70	30,24	<0,001 ^c	X₁^a	4743,37	1	4743,37	77,837	<0,001 ^c	X₁^a	121,58	1	121,58	35,022	<0,001 ^c	X₁^a	63501,85	1	63501,85	15,78	0,004 ^c
X₂^b	2361,29	1	2361,29	19,513	0,003 ^c	X₂^b	903,60	1	903,60	14,828	0,006 ^c	X₂^b	122,52	1	122,52	35,29	<0,001 ^c	X₂^b	41811,47	1	41811,47	10,39	0,012 ^c
X₁X₂	4418,09	1	4418,09	36,51	<0,001 ^c	X₁X₂	669,25	1	669,25	10,982	0,013 ^c												
FA	840,93	5	168,19	54,82	0,018	FA	399,36	5	79,87	5,915	0,151	FA	26,51	6	4,42	7,01	0,130	FA	31914,57	6	5319,09	36,98	0,027 ^c
EP	6,14	2	3,07			EP	27,01	2	13,50			EP	1,260	2	0,63			EP	287,64	2	143,82		
Total	11286,15	10				Total	6742,80	10				Total	271,87	10				Total	137515,52	10			
R²	0,92					R²	0,94					R²	0,90					R²	0,77				

^aNível codificado para concentração ácida, ^bNível codificado para percentual de farelo, ^c Nível de confiança a 95%.

FA: falta de ajuste. **EP:** erro puro. **SQ:** Soma dos quadrados. **GL:** Graus de liberdade. **QM:** Médio quadrático.

Fonte: Autoria própria

As variáveis concentração ácida (X_1) e massa de farelo (X_2), assim como observado para os hidrolisados de farelo de arroz, foram significantes ($p < 0,05$) e positivas, indicando que a maximização para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais também pode ser atingida em altas concentrações. O milho possui concentrações estimáveis de amido, óleos e proteínas bruta e (ROSTAGNO, 2011), tornando o farelo de milho resultante do processo de beneficiamento do grão adequado ao processo de hidrólise para a solubilização destes nutrientes, gerando um caldo rico em nutrientes que podem ser utilizados por microrganismos na síntese de produtos de interesse biotecnológico.

A tabela ANOVA dos modelos ajustados para açúcares totais demonstrou significância para as variáveis estudadas e suas interações, apresentando um coeficiente de determinação R^2 de 92%. A análise dos açúcares redutores e proteínas totais também apresentaram significâncias semelhantes, embora esta última não tenha exibido interação de X_1 e X_2 , com valores de R^2 de 0,94 e 0,9, respectivamente. A obtenção de fenóis totais também se demonstrou significativa e apresentou um R^2 de 0,71.

Os modelos gerados e ANOVA foram utilizados para gerar superfícies de resposta com o intuito de observar as condições que apresentaram melhor produção dos nutrientes estudados. A Figura 15 apresenta as superfícies de resposta para açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais.

Pode-se observar claramente pelas superfícies de resposta que as condições com maiores concentrações ácidas e maiores concentrações de massa de farelo favoreceram a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas nos hidrolisados de farelo de milho. Portanto as concentrações de 1% de ácido e 20% de massa de farelo foram utilizadas nas etapas subsequentes de fermentação do hidrolisado para obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana por *Lasiodiplodia theobromae*.

Figura 15 – Superfícies de resposta para a obtenção de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e proteínas totais (C) em hidrolisados de farelo de milho.

Fonte: Autoria própria

5.4.1 Caracterização química parcial do hidrolisado de farelo de milho por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

O hidrolisado de farelo de milho obtido por validação do modelo experimental (HFA-0) foi caracterizado por técnicas espectrofotométricas quanto suas concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, seguidos por cromatografia líquida de alta eficiência para as concentrações de glicose, xilose e arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, conforme apresentados nas Tabelas 26 e Tabela 27.

Tabela 26 – Análises espectrofotométricas de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais e compostos inibidores do hidrolisado de farelo de milho.

Indicadores do hidrolisado de farelo de milho:			
Hidrolisado	AT (g/L)	AR (g/L)	PT (g/L)
HFM-0	170,68 ± 3,88	70,28 ± 3,25	14,93 ± 1,89
AT: Açúcares totais	AR: Açúcares redutores	PT: Proteínas totais	
Fonte: Autoria própria			

Tabela 27 – Análise de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado de farelo de milho por cromatografia líquida de alta eficiência.

Hidrolisado	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético (g/L)	5-HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Glicerol (g/L)
HFA-0	5,35	4,83	3,69	3,35	0,33	0	0	0,67
5-HMF: hidroximetilfurfural								
Fonte: Autoria própria								

O hidrolisado de farelo de milho apresentou concentrações superiores de açúcares totais (170,68 g/L) e açúcares redutores (70,28 g/L) quando comparados, por exemplo, ao hidrolisado de farelo de arroz deste trabalho. Dentre os açúcares analisados por cromatografia, a celobiose foi o açúcar predominantemente detectado, seguido pela glicose, xilose e arabinose. Embora não tenha sido analisado, acredita-se que a maltose, resultante do amido residual e presente no farelo de milho, seja responsável pela alta concentração de açúcares redutores detectados no hidrolisado na Tabela 27, uma vez que as concentrações não coincidam com os valores obtidos por cromatografia líquida. O milho possui aproximadamente 87% do seu peso em matéria seca e cerca de 63% de seu peso em amido (ROSTAGNO, 2011; ZAMBOM et al., 2008). O amido pode estar presente em menores percentuais no farelo de milho, uma vez que não é completamente removido durante o processo de moagem.

O presente hidrolisado apresentou em 14,93 g/L de proteínas. A relação entre carboidratos proteínas do hidrolisado de farelo de milho foi de aproximadamente 11:1. A alta concentração de carbono em relação a fontes de nitrogênio se demonstraram viáveis para a produção de lasiodiplodana, uma vez que é descrito na literatura que a relação entre fontes de carbono e nitrogênio são favorecidas por valores inferiores a 10 g/L (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

De uma forma geral, pode-se concluir que o hidrolisado de farelo de milho apresentou potencial para produção de biomoléculas de interesse industrial por uma vez que possui concentrações suficientemente adequadas de açúcares e proteínas para a fermentação por microrganismos.

5.4.2 Composição do hidrolisado de farelo de milho tratado para fermentação

Para averiguação dos nutrientes em cada etapa de tratamento, o hidrolisado de farelo de milho foi inicialmente diluído para atingir a concentração inicial de aproximadamente 40 g/L de açúcares totais, de modo a apresentar valores iniciais de açúcares semelhantes ao hidrolisado de farelo de arroz. Após o tratamento do hidrolisados de farelo de milho, conforme descrito no item 4.4, foram averiguadas as concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais conforme apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais durante o tratamento de hidrolisados de farelo de milho. ■: Açúcares totais; ■: Açúcares redutores e; ■: Proteínas totais.

Fonte: Autoria própria

Observou-se que o tratamento do hidrolisado não afetou significativamente as concentrações de nutrientes avaliados. A relação entre carboidratos final foi de 10:1, basicamente inalterada quando comparada ao hidrolisado antes da diluição e tratamento. O emprego do tratamento no hidrolisado de farelo de milho implicou na remoção dos nutrientes, apresentando ligeiras quedas nas concentrações de açúcares totais e proteínas totais de 7,43 e 9,86%, respectivamente. O tratamento de hidrolisados para preparação dos meios para fermentação também apresentou remoção de açúcares e outros componentes, uma vez que mudanças no pH e emprego dos meios a altas temperaturas possam precipitar e/ou alterar a disponibilidade dos nutrientes (CARVALHO et al., 2004; MARTONE et al., 2009; MARTINIANO et al., 2013).

5.5 Fermentação em meio sintético

As fermentações para a produção de EPS foram interrompidas após 96 horas para separação da biomassa do sobrenadante, recuperação de lasiodiplodana livre no meio fermentado (LAS-M) e biomassa celular, conforme descrito no item 4.7. Foram plotados gráficos para avaliar o desempenho de produção dos EPS em cultivos estáticos e agitados para os meios N-glicose e N-xilose, conforme a Figura 17.

Figura 17 – Comparação da produção de EPS por *L. theobromae* em cultivos estáticos (A e B) e agitados (C e D) para fermentações em N-glicose e N-xilose, respectivamente. ■: Carboidrato; △: Biomassa celular; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ○: pH.

Fonte: Autoria própria

Conforme os resultados apresentados houve o consumo completo da glicose para as condições agitada e estática enquanto o consumo da xilose foi de 17,65 e 27,91% respectivamente. A produção máxima de EPS para os meios estudados foi obtida em frascos agitados contendo glicose, com uma produção total de 5,1 g/L. Os cultivos suplementados com xilose como fonte de carbono não apresentaram produção de EPS em frascos estáticos, contudo 1,3 g/L foram obtidos em frascos submetidos à agitação. Os parâmetros fermentativos são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Parâmetros fermentativos para produção de lasiodiplodana por *L. theobromae* em cultivos sintéticos estáticos e agitados contendo xilose e glicose.

Parâmetro	Glicose		Xilose	
	Estática	Agitada	Estática	Agitada
Pp (g/L ⁻¹)	2,70	5,10	-	1,3
Px (g/L ⁻¹)	11,74	19,60	1,45	3,96
Qp (g/L h ⁻¹)	0,028	0,053	-	0,328
Qs (g/L h ⁻¹)	0,418	0,412	0,015	0,041
Qx (g/L h ⁻¹)	0,122	0,204	0,02	0,014
Yp/s (g/g)	0,067	0,129	-	0,118
Yx/s (g/g)	0,292	0,496	0,203	0,350
Ye (g/g)	0,230	0,260	-	10,073
Yc (%)	96,06%	100,00%	17,65%	27,91%

Pp: Produção de EPS; **Px:** produção de biomassa; **Yp/s:** rendimento de EPS no consumo de substrato; **Yx/s:** rendimento de biomassa no consumo de substrato; **Qs:** consumo volumétrico de glicose; **Qx:** produtividade volumétrica de biomassa; **Qp:** produtividade volumétrica de EPS; **Ye:** rendimento específico; **Yc:** percentual de consumo de substrato.

Fonte: Autoria própria

Em um estudo Cunha e colaboradores (2012) obtiveram produção de 7,01 g/L de EPS por *L. theobromae* em um cultivo de 120 horas em frascos agitados, apresentando *Yp/s* de 0,25. Esse valor se deve ao fato da fonte de carbono não ter sido completamente exaurida, entanto no presente trabalho houve completa depleção dos carboidratos presentes no meio. O crescimento do fungo ocorreu durante todo o período de cultivo em todos os meios estudados, observando-se o início do crescimento da biomassa nas primeiras 24 horas nos ensaios contendo glicose, enquanto que os ensaios contendo xilose apresentaram crescimento mais lento, com concentração celular de aproximadamente 4 g/L. O crescimento do microrganismo pode ser limitado a alta viscosidade do meio, devido a produção do EPS bem como o próprio conteúdo celular (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; CHO et al., 2006).

A aeração também é um fator determinante no crescimento dos microrganismos, e tem como função melhorar a distribuição do oxigênio e nutrientes do meio para as células fúngicas, embora Cunha e colaboradores (2012) tenham obtido valores similares de produtividade volumétrica (Q_p) de lasiodiplodana em concentração de açúcares e agitação das hélices do reator variadas.

Houve a averiguação das estruturas morfológicas dos fungos centrifugados onde foi constatada presença de células conidiogênicas livres no meio de cultivo (Figura 18). Essas células somadas com os picnídios realizam a liberação de conídios, responsáveis pela reprodução assexuada do fungo (ABDOLLAHZADEH et al., 2009).

Figura 18 – Microscopia de luz. Conídios jovens atrelados às células conidiogênicas livres com conídios "em cacho". (400X).

Fonte: Autoria própria

5.6 Produção de lasiodiplodana em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HBC-4) por *Lasioidiplodia theobromae* para a produção de lasiodiplodana, biomassa celular e consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Crescimento celular e consumo de açúcares totais. ■: AT – açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M e; △: Biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

Embora a produção de lasiodiplodana em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar não tenha ocorrido, o fungo *L. theobromae* apresentou crescimento de biomassa celular favorável no meio, com concentração final de 3,9 g/L. O crescimento da biomassa celular e ausência da produção do exopolissacarídeo pode se dar ao fato da xilose ser o principal açúcar constituinte do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar e de que o fungo *L. theobromae* não possa polimerizar esse tipo de açúcar. Ainda, não são evidenciados na literatura os mecanismos enzimáticos para este microrganismo de modo a elucidar a conversão da xilose em compostos poliméricos que possam ser excretados no meio. O consumo de açúcares totais e açúcares redutores por *L. theobromae* foi de 36 e 58%, respectivamente, apresentando um consumo de proteínas de 41%. Esses dados demonstraram que embora não possa ser utilizado como substrato para a produção do EPS, o hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar se apresentou como um potencial meio para crescimento do micélio fúngico, em substituição aos meios sintéticos tradicionais, podendo reduzir custos relativos ao cultivo do microrganismo na elaboração de outros bioprodutos.

O fungo *L. theobromae* crescido em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar apresentou mudança estrutural, apresentando formato unicelular (Figura 20). Embora se apresente em grumos, o crescimento do fungo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar demonstra clara evidência da capacidade de dimorfismo. O dimorfismo fúngico é definido como uma interconversão reversível e controlada entre as formas leviduriformes e miceliais, dependentes do ambiente de cultivo do microrganismo. O fungo pode ter se desenvolvido na forma leviduriforme ao consumir a xilose presente no do hidrolisado de cana-de-açúcar, ou

ainda devido a outros compostos presentes no meio. Apresenta-se como um fenômeno de interesse, dado sua utilidade como modelo de estudo do desenvolvimento eucariótico e diferenciação celular podendo também permitir uma vez que o modelo unicelular (KULKARNI; NICKERSON, 1981).

Figura 20 – Morfologia de *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em hidrolisado de cana-de-açúcar (400x).

Fonte: Autoria própria

5.7 Delineamento composto central rotacional DCCR 2³ para obtenção de do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisado de farelo de arroz

O estudo dos efeitos do pH, volume de meio e suplementação com sais de Vogel em hidrolisado de farelo de arroz apresentou como variáveis resposta a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre no meio celular (LAS-M), lasiodiplodana aderida à biomassa celular (LAS-C) e produção de biomassa celular, conforme apresentado na Tabela 29.

Tabela 29 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2^3 para avaliação da influência do pH, volume de meio e suplementação com sais de Vogel em hidrolisados de farelo de arroz para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre, aderida as células e produção de biomassa celular em 96 horas de cultivo.

Ensaio	pH inicial	Volume de meio (%)	Suplementação Vogel (mL/L)	LAS-M (g/L)	LAS-C (g/L)	Biomassa Celular (g/L)
1	4,31 (-1)	37,5 (-1)	8,1 (-1)	9,20	0,60	10,48
2	6,69 (+1)	37,5 (-1)	8,1 (-1)	2,64	2,26	15,71
3	4,31 (-1)	62,5 (+1)	8,1 (-1)	8,47	2,13	11,01
4	6,69 (+1)	62,5 (+1)	8,1 (-1)	4,54	2,56	8,89
5	4,31 (-1)	37,5 (-1)	31,89 (+1)	0,00	1,41	13,61
6	6,69 (+1)	37,5 (-1)	31,89 (+1)	8,50	7,04	7,06
7	4,31 (-1)	62,5 (+1)	31,89 (+1)	0,00	12,56	7,54
8	6,69 (+1)	62,5 (+1)	31,89 (+1)	5,60	7,52	7,47
9	3,5 (- α)	50 (0)	20 (0)	0,00	0,00	13,65
10	7,5 (+ α)	50 (0)	20 (0)	4,70	3,40	8,43
11	5,5 (0)	28,75 (- α)	20 (0)	0,00	0,00	9,77
12	5,5 (0)	71,25 (+ α)	20 (0)	7,18	6,28	7,19
13	5,5 (0)	50 (0)	0 (- α)	8,78	5,70	9,63
14	5,5 (0)	50 (0)	40 (+ α)	10,80	4,98	10,16
15	5,5 (0)	50 (0)	20 (0)	12,38	6,22	17,81
16	5,5 (0)	50 (0)	20 (0)	9,70	6,02	18,42
17	5,5 (0)	50 (0)	20 (0)	10,54	6,10	17,24

LAS-M: lasiodiplodana livre

LAS-C: lasiodiplodana aderida a células

Fonte: Autoria própria

A lasiodiplodana livre no meio fermentativo (LAS-M) apresentou variações para a produção em hidrolisados de farelo de arroz em concentrações que variaram da ausência de produção a um máximo de 12,38 g/L. Evidenciou-se que o ensaio que apresentou o pH inicial de 3,5 (ensaio 9) não favoreceu a produção do biopolímero. Geralmente, a produção dos exopolissacarídeos é favorecida por pHs nos valores entre 3 e 6, embora alguns fungos tenham a produção favorecida em pHs neutros ou alcalinos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). A produção de lasiodiplodana celular (LAS-C) apresentou o mesmo perfil, não sendo produzida na condição com o menor valor de pH e apresentando concentração máxima de 12,56 g/L. O ensaio que apresentou menor volume percentual de meio (ensaio 11) também não apresentou produção de LAS-M e LAS-C.

As produções de biomassa celular não foram afetadas pela variação do pH, apresentando concentrações mínimas e máximas de 7,06 e 18,42 g/L, respectivamente. A biomassa celular apresentou um excelente crescimento em todos os hidrolisados de farelo de arroz, tendo em alguns casos apresentado o crescimento de hifas até o topo dos frascos

Erlenmeyer. O ensaio 11, devido a seu baixo volume de meio, apresentou grande crescimento micelial, impossibilitando a recuperação de qualquer volume de sobrenadante, demonstrando que baixos volumes de meio no frasco de fermentação não favorecem a recuperação do exopolissacarídeo. A matriz exopolissacarídica produzida pelos microrganismos promove a proteção contra dissecação e ataque de fagos, tornando-os inacessíveis a agentes antimicrobianos e aumentando a resistência à penetração de íons metálicos tóxicos as células (ABDEL-AZIZ et al., 2012).

A Figura 21 apresenta as cinéticas de crescimento do fungo *L. theobromae* utilizando o hidrolisado de farelo de arroz, evidenciando a produção da LAS-M, LAS-C e biomassa celular, bem como os consumos de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais para os 17 ensaios do DCCR 2³.

A produção de lasiodiplodana livre no meio fermentativo (LAS-M) apresentou, de uma maneira geral, maiores concentrações ao final das 96 horas, porém em alguns ensaios os valores de LAS-M decaíram nas últimas 24 horas de fermentação. Esse fenômeno pode ter ocorrido pelo consumo do exopolissacarídeo pelo fungo, uma vez que os níveis de açúcares presentes no meio de cultivo foram praticamente exauridos. Os EPS fúngicos além de proporcionarem proteção a células a agentes externos, atuam como reserva de nutrientes (ABDEL-AZIZ et al., 2012). A produção da LAS-M se demonstrou diretamente relacionada à produção de biomassa celular. Isso ocorreu por que a maioria dos fungos produtores de EPS são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, sendo que a limitação de oxigênio não favorece a produção de EPS (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Figura 21 – Cinética de crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e produção de lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de arroz segundo DCCR 2³. ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 30 apresenta os dados complementares do consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, além dos valores de pH finais obtidos utilizando hidrolisados de farelo de arroz.

Tabela 30 – Consumo percentual de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e pH final do DCCR 2³ em hidrolisados de farelo de arroz

Exp	Consumo de AT (%)	Consumo de AR (g/L)	Consumo de PT (g/L)	pH final
1	87,33%	81,26%	48,89%	5,41
2	86,81%	80,29%	30,06%	5,69
3	94,69%	85,08%	53,06%	5,15
4	95,94%	76,99%	19,88%	5,17
5	94,26%	83,89%	47,22%	5,27
6	92,06%	81,26%	39,88%	5,44
7	89,99%	86,16%	47,66%	5,45
8	88,05%	76,34%	43,98%	5,31
9	95,47%	86,70%	49,71%	5,42
10	95,30%	88,32%	46,18%	5,29
11	87,76%	84,22%	35,99%	5,31
12	91,82%	77,75%	54,48%	5,41
13	93,36%	84,96%	29,48%	5,15
14	90,09%	77,30%	66,04%	5,27
15	92,79%	82,10%	43,33%	5,22
16	95,85%	82,10%	47,22%	5,2
17	98,03%	75,66%	48,06%	5,26

AT: Açúcares totais

AR: Açúcares redutores

PT: Proteínas totais

Fonte: Autoria própria

Como podem ser observados houve o consumo dos açúcares presentes nos hidrolisados de farelo de arroz em valores superiores a 85 e 75%, respectivamente, demonstrando que os meios elaborados são adequados para o desenvolvimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae*. As proteínas foram consumidas em menor quantidade com valores que variaram entre 19,88 e 66,04%. As altas concentrações de proteínas presentes nos hidrolisados de farelo de arroz podem ser utilizadas por microrganismos para o desenvolvimento de diversos produtos de ordem biotecnológica, podendo substituir fontes de nitrogênio como peptona e extrato de levedura para redução do custo desses processos (MARTINIANO et al., 2013; MILESSI et al., 2013).

5.7.1 Obtenção de exopolissacarídeo a partir do micélio fúngico em hidrolisado de farelo de arroz

A ressuspensão da biomassa celular com água aquecida a 60 °C removeu satisfatoriamente a lasiodiplodana aderida às células (LAS-C), permitindo a sua recuperação. Pode-se observar que a biomassa celular do fungo *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em hidrolisados de farelo de arroz apresenta uma grande quantidade de biopolímero aderida às células e que este pode ser facilmente removido pela adição de água aquecida. O ensaio 5 não apresentou produção de LAS-M, porém ao realizar a extração com água aquecida, pode-se recuperar aproximadamente 1,5 g/L de LAS-C em 96 horas de cultivo. Não foi detectada LAS-C nos ensaios 9 e 11, provavelmente devido a estes apresentarem valores de pH baixo e volume de meio reduzido. A relação de recuperação total entre a lasiodiplodana livre no meio fermentativo e a lasiodiplodana aderida à biomassa celular pode ser observada na Figura 22.

Figura 22 – Relação de recuperação total de lasiodiplodana presentes no meio de cultivo e aderida à biomassa celular. (A) 72 horas de cultivo e (B) 96 horas de cultivo. ■: lasiodiplodana livre no meio fermentativo (LAS-M) e; ■: lasiodiplodana aderida à biomassa celular (LAS-C).

Fonte: Autoria própria

A recuperação da LAS-C se demonstra promissora, uma vez que representou em alguns ensaios um aumento de até 100% na obtenção do EPS total. Observou-se também que a LAS-C é mais presente nos tempos finais da fermentação. Isso pode se dar ao fato de que a

biomassa celular apresentou, em alguns casos, um grande aumento da massa micelial nas últimas 24 horas de fermentação, o que pode acabar por dificultar a sua recuperação.

Com base nos resultados obtidos por DCCR foram avaliados os efeitos estimados das variáveis estudadas apresentados na Tabela 31. A elaboração dos modelos matemáticos com 90% de confiança para LAS-M e biomassa celular são apresentados nas equações 8 e 9. A Análise de Variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 32.

$$LAS - M (g/L) = 10,38 + 0,84 * X_1 + 0,76 * X_2 - 0,54 * X_3 + 3,07 * X_1 * X_3 - 2,91 * X_1^2 - 2,47 * X_2^2 \quad (8)$$

$$Biom. Celular (g/L) = 17,74 - 0,63 * X_1 - 1,19 * X_2 - 0,7 * X_3 - 2,51 * X_1^2 - 3,02 * X_2^2 - 2,52 * X_3^2 \quad (9)$$

Onde: X_1 : pH; X_2 : volume de meio em frasco (%) e; X_3 : suplementação com sais de Vogel.

Observa-se que as variáveis, pH (X_1), volume de meio em frasco (X_2) e suplementação com sais de Vogel (X_3) não foram significantes ($p > 0,1$), indicando que a obtenção da lasiodiplodana livre (LAS-M) em hidrolisado de farelo de arroz não é dependente destas quando empregando as condições estudadas. A tabela de efeitos estimados indicou uma interação significativa entre pH e suplementação de sais de Vogel, assim como significância nos fatores quadráticos das variáveis pH e volume de meio em frasco. A utilização de pH mais ácido promove uma maior preservação do meio de cultivo, auxiliando na inibição do desenvolvimento de bactérias, por exemplo. O volume de meio no frasco deve ser maximizado uma vez que resulte em maior volume de lasiodiplodana recuperada, desde que não interfira na aeração do meio para o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae*, uma vez que a produção dos exopolissacarídeos seja dependente da oxigenação do meio (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Por fim a suplementação com sais de Vogel apenas se faria necessária se o fungo não consumisse as proteínas presentes no hidrolisado.

Os efeitos estimados para obtenção da biomassa celular demonstraram um efeito positivo para volume do meio em frasco, indicando que os valores possam ser aumentados. Esse resultado deve ser destacado, uma vez que a produção do exopolissacarídeo está diretamente relacionada à produção da biomassa e que o aumento do volume de meio em frascos não inibiu sua produção.

Tabela 31 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de *t* e *p* obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana e biomassa celular a partir de hidrolisados de farelo de arroz.

Fator	LAS-M (g/L)				LAS-C (g/L)				Biomassa celular (g/L)			
	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	10,88	1,4	7,770	<0,001 ^d	6,04	1,45	4,15	0,004 ^d	17,75	1,36	13,043	<0,001 ^d
X _{1a}	1,69	1,31	1,28	0,241	1,23	1,37	0,90	0,398	-1,25	1,28	-0,978	0,367
X _{2b}	1,52	1,31	1,162	0,283	3,50	1,36	2,58	0,037 ^d	-5,05	1,41	-3,580	0,009 ^d
X _{3c}	-1,08	1,31	-0,819	0,440	2,90	1,37	2,12	0,072 ^e	-2,37	1,27	-1,863	0,105
X ₁ X ₂	-0,07	1,72	-0,039	0,970	-2,97	1,78	-1,67	0,139	-5,94	1,38	-4,298	0,004 ^d
X ₁ X ₃	6,15	1,72	3,580	0,009 ^d	-0,37	1,78	-0,21	0,840	-1,39	1,28	-1,091	0,311
X ₂ X ₃	-1,02	1,72	-0,592	0,572	2,45	1,78	1,37	0,212	-5,06	1,41	-3,594	0,009 ^d
X ₁ ²	-6,07	1,45	-4,187	0,004 ^d	-2,57	1,51	-1,70	0,132	-0,22	1,67	-0,129	0,901
X ₂ ²	-5,08	1,42	-3,569	0,009 ^d	-1,52	1,48	-1,03	0,337	-2,43	1,67	-1,455	0,189
X ₃ ²	-0,8	1,45	-0,554	0,597	0,01	1,51	0,01	0,995	0,16	1,67	0,095	0,927

^aNível codificado para pH, ^bNível codificado para volume de meio em frasco, ^cNível codificado para suplementação com sais de Vogel. ^dNível de confiança a 95%. ^eNível de confiança a 90%. **LAS-M:** lasiodiplodana livre no meio de fermentativo, **LAS-C:** lasiodiplodana aderida a biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

Tabela 32 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R²) dos modelos ajustados para a obtenção exopolissacarídeo lasiodiplodana e biomassa celular a partir de hidrolisados de farelo de arroz.

LAS-M (g/L)						LAS-C (g/L)						Biomassa celular (g/L)					
Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
X ₁ ^a	9,71	1	9,71	2,15	0,173	X ₂ ^b	42,25	1	42,25	5,74	0,0311 ^d	X ₁ ^a	5,34	1	5,34	1,04	0,332
X ₂ ^b	7,84	1	7,84	1,73	0,217	X ₃ ^c	28,62	1	28,62	3,89	0,0687 ^e	X ₂ ^b	19,42	1	19,42	3,78	0,080 ^c
X ₃ ^c	3,96	1	3,96	0,88	0,371							X ₃ ^c	6,64	1	6,64	1,29	0,282
X ₁ X ₃	75,58	1	75,58	16,73	0,002 ^d							X ₁ ²	70,78	1	70,78	13,77	0,004 ^d
X ₁ ²	104,27	1	104,27	23,07	<0,001 ^d							X ₂ ²	102,51	1	102,51	19,95	0,001 ^d
X ₂ ²	75,18	1	75,18	16,64	0,002 ^d							X ₃ ²	71,36	1	71,36	13,89	0,004 ^d
FA	41,43	8	5,18	2,76	0,293	FA	103,01	12	8,58	847,08	0,0012 ^d	FA	50,69	8	6,34	18,13	0,053 ^e
EP	3,76	2	1,88			EP	0,02	2	0,01			EP	0,7	2	0,35		
Total	288,97	16				Total	173,90	16				Total	238,09	16			
R ²	0,84					R ²	0,41					R ²	0,78				

^aNível codificado para pH, ^bNível codificado para volume de meio em frasco, ^cNível codificado para suplementação com sais de Vogel. ^dSignificância a nível de 95%,

^eSignificância a nível de 95%. **LAS-M:** lasiodiplodana livre no meio de fermentativo, **LAS-C:** lasiodiplodana aderida a biomassa celular. **FA:** falta de ajuste. **EP:** erro puro.

SQ: Soma dos quadrados. **GL:** Graus de liberdade. **QM:** Média quadrática.

Fonte: Autoria própria

A variável-resposta de lasiodiplodana aderida à biomassa celular (LAS-C) apresentou falta de ajuste significativa com R^2 de 0,41, portanto não foi utilizado na geração de modelo. Embora não tenha gerado modelo matemático adequado, destaca-se a importância da recuperação da LAS-C visando maiores rendimentos de produtividade da lasiodiplodana por fermentação.

Os modelos matemáticos apresentados LAS-M e biomassa celular foram significantes a 95% de confiança, apresentando R^2 com valores 84,4% e 78,4%, respectivamente. Porpondo a visualização das condições ótimas de produção da lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de arroz, os modelos apresentados foram utilizados para o delineamento de superfícies de resposta, conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23 – Superfícies de resposta para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana (A) e biomassa celular (B) em hidrolisados de farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria

5.7.2 Validação do modelo experimental da produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz

Visando a maximização da produção de lasiodiplodana (LAS-M) em hidrolisados de farelo de arroz, foi utilizada a ferramenta de otimização do *software* Design-Expert 7.0, para obtenção dos valores de pH, volume de meio em frasco e suplementação com Vogel. Baseado nos dados observados obtidos por DCCR, as variáveis foram ajustadas de modo a obter valores que proporcionem a maior produção de LAS-M. A condição estipulada para o software e a condição experimental obtida após fermentação são demonstradas na Tabela 33.

Tabela 33 – Otimização de variáveis para maximização da produção de lasiodiplodana no meio de fermentação (LAS-M), com valores preditos e testados. **A:** Condição estipulada pelo software Design-Expert 7.0. **B:** Validação em triplicata.

Tabela 1. D: Variação em triplicata.						
	pH inicial	Volume (%)	Sais Vogel	LAS-M	Biomassa Celular	Desejabilidade
A	4,64	49,56	0	11,36 ± 5,92	7,04 ± 6,63	84%
B				7,80 ± 1,0	10,68 ± 0,34	
AT: Açúcares totais			AR: Açúcares redutores		PI _{95%} : intervalo de previsão	

As condições apresentadas demonstraram um pH inicial de 4,64, com um volume de 49,56% de hidrolisado de farelo de arroz em frasco, não sendo necessária a suplementação do meio com sais de Vogel. Os valores de LAS-M e biomassa celular apresentados nos experimentos realizados para a validação do modelo se apresentaram dentro dos valores estipulados pelo *software*. Os dados fermentativos obtidos na validação do DCCR 2³ utilizando o hidrolisado de farelo de arroz para a obtenção de LAS-M, LAS-C e biomassa celular, bem como os consumos de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, podem ser observados na Figura 24.

O consumo de açúcares totais e açúcares redutores foram de 94 e 90% respectivamente, ao final de 96 horas de fermentação. O consumo de proteínas totais no hidrolisado foi de 60%. A obtenção de LAS-M e LAS-C nos hidrolisados de farelo de arroz ocorreram a partir de 48 horas de cultivo, tendo a biomassa iniciado seu crescimento exponencial após 24 horas de inoculação. Esses resultados demonstraram que a produção da lasiodiplodana é, dentre outros fatores, dependente das concentrações de biomassa celular (BARBOSA et al., 2004), não sendo produzida quando a mesma é baixa.

Figura 24 – Experimento para validação do DCCR 2³ para produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz. ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

As LAS-M representaram respectivamente 67 e 61% da produção de total exopolissacarídeos após 72 e 96 horas de fermentação. Assim como os ensaios do DCCR uma maior quantidade de EPS pode ser encontrada aderida a biomassa conforme o tempo de cultivo aumenta. A produção dos EPS está associada ao metabolismo secundário do fungo, sendo que sua estrutura assim como as propriedades físico-químicas dependentes de muitos fatores, como fontes de carbono e nitrogênio, grau de oxigenação e temperatura (GIENTKA et al., 2016). Os parâmetros fermentativos da obtenção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz por *L. theobromae* para a produção de LAS-M são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 – Parâmetros fermentativos para produção de LAS-M por *L. theobromae* em cultivo em hidrolisado de arroz

Parâmetro	Hidrolisado de farelo de arroz
Q_p (g/L h ⁻¹)	0,08
Q_s (g/L h ⁻¹)	0,34
Q_x (g/L h ⁻¹)	0,11
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,24
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,33
Y_e (g/g)	0,73
Y_c (%)	94

Q_p : produtividade volumétrica de lasiodiplodana; **Q_s :** taxa global de consumo da glicose; **Q_x :** produtividade volumétrica de biomassa; **$Y_{p/s}$:** fator de conversão do substrato em lasiodiplodana; **$Y_{x/s}$:** fator de conversão do substrato em biomassa; **Y_e :** produtividade específica; **Y_c :** percentual de consumo de substrato.

Fonte: Autoria própria

Os parâmetros foram analisados utilizando a concentração de açúcares totais presentes no hidrolisado, uma vez que devido a baixas concentrações de açúcares detectados por cromatografia não gerariam valores adequados com os valores de açúcares totais apresentados. Os dados dos parâmetros fermentativos do hidrolisado de farelo de arroz podem ser comparados aos descritos na fermentação sintética da glicose em meios agitados. Os valores de Q_p , Y_p/s e Y_e do hidrolisado são superiores aos obtidos em meio sintético, enquanto Q_s , Q_x e Y_x/s são inferiores. Esses resultados demonstraram que o hidrolisado de farelo de arroz possui melhores características de produção do exopolissacarídeo, enquanto o meio sintético demonstra maior potencial para a produção de biomassa celular. Isso se deve ao fato de que o meio sintético possui apenas glicose como fonte de carbono, açúcar facilmente assimilado pelo microrganismo, enquanto o hidrolisado de farelo de arroz possui açúcares não redutores em sua composição, o que pode retardar o processo de crescimento microbiano.

O crescimento de biomassa celular do fungo *L.theobromae* em hidrolisado de farelo de arroz apresentou hifas aglomeradas longas e segmentadas, conforme observado na Figura 25. Ao contrário do comportamento apresentado em hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar as estruturas vegetativas do fungo não foram alteradas, indicando que o meio utilizado não apresenta compostos atípicos a seu desenvolvimento.

Figura 25 – Fungo *L theobromae* em hidrolisado de farelo de arroz. (100x).

Fonte: Autoria própria

O pH final da fermentação apresentou-se em 5,43. Observou-se ligeiro aumento em relação ao pH inicial, demonstrando que o fungo *L. theobromae* mantém o pH do meio fermentativo entre valores 5 e 5,5, fenômeno também observado no ensaios do DCCR 2³.

5.8 Delineamento composto central rotacional DCCR 2² para obtenção de do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisado de farelo de milho

O DCCR 2² sob o estudo das variáveis agitação e temperatura gerou como variáveis resposta a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre no meio de cultivo (LAS-M), lasiodiplodana aderida à biomassa celular (LAS-C) e produção de biomassa celular, conforme apresentado na Tabela 35. O consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais foram avaliados em todos os ensaios fermentativos, visando acompanhar o perfil de consumo dos substratos em todos os ensaios.

Tabela 35 – Matriz do delineamento composto central rotacional 2² para avaliação da influência da agitação e temperatura em hidrolisados de farelo de milho para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre e aderido às células, produção de biomassa celular e consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais.

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	LAS-M (g/L)	LAS-C (g/L)	Biomassa Celular (g/L)
1	41,4 (-1)	20,5 (-1)	0	1,32	1,33
2	241,4 (+1)	20,5 (-1)	1,87	1,51	5,07
3	41,4 (-1)	32,5 (+1)	1,63	0,61	2,47
4	241,4 (+1)	32,5 (+1)	6,17	3,51	5,88
5	0 (-α)	26,5 (0)	0	0,35	3,58
6	282,8 (+α)	26,5 (0)	6,39	3,87	9,62
7	141,4 (0)	18 (-α)	0	1,20	3,69
8	141,4 (0)	35 (+α)	2,47	2,26	3,66
9	141,4 (0)	26,5 (0)	6,92	3,41	6,97
10	141,4 (0)	26,5 (0)	5,98	3,81	8,42
11	141,4 (0)	26,5 (0)	6,12	3,21	7,34

LAS-M: lasiodiplodana livre no meio de cultivo

LAS-C: lasiodiplodana aderida a células

Fonte: Autoria própria

Conforme apresentado pode-se observar que as concentrações de lasiodiplodana livre no meio de cultivo (LAS-M) variaram de 0 a 6,39 g/L, sendo que as baixas temperaturas foram não foram favoráveis à obtenção do exopolissacarídeo. A biomassa celular apresentada também teve suas concentrações reduzidas em temperaturas mais baixas apresentando variação de 1,33 a 9,62 g/L em todos os ensaios. A temperatura de cultivo dos fungos desempenha um papel importante em seu crescimento, sendo que a maioria das cepas

produtoras de EPS apresentaram maiores concentrações do biopolímero em intervalos de 22 a 30 °C (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

A alta agitação dos frascos proporcionou maior produção de biomassa quando comparados aos ensaios com baixa ou ausência de rotatividade. Isso se deve ao fato de que maiores agitações do frasco proporcionam maior disponibilidade de oxigênio no meio fermentativo, promovendo o crescimento microbiano. A produção de exopolissacarídeos pode ser comprometida se o oxigênio não estiver dissolvido no meio, uma vez que os microrganismos produtores da biomolécula são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). A própria presença dos EPS pode impossibilitar a transferência de oxigênio uma vez este altera a viscosidade do meio, somado ao intenso crescimento de micelial dentro do frasco (CUNHA et al., 2012).

A produção de lasiodiplodana aderida a biomassa celular (LAS-C) demonstrou baixa produção em hidrolisado de farelo de milho, apresentando concentrações que variaram de 0,61 a 3,87 g/L. Os valores reduzidos para LAS-C podem ser referentes a menores concentrações de biomassa celular, quando comparadas, por exemplo a produção em hidrolisado de farelo de arroz, uma vez que há a indicação de que o EPS aderido a biomassa está proporcionalmente relacionado a produção celular.

A Figura 26 apresenta a representação gráfica dos ensaios fermentativos do DCCR 2². Podem ser observados os consumos de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, bem como a produção de LAS-M, LAS-C e biomassa celular. Nos gráficos foi possível observar que os ensaios nos quais a agitação e/ou temperatura foram mais baixos houve uma inibição do consumo dos açúcares enquanto em ensaios que apresentaram valores médios e altos para as variáveis apresentaram maior depleção dos açúcares ao final de 96 horas.

As maiores concentrações de LAS-M foram recuperadas no tempo final de 96 horas. A produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho foi observada a partir de 48 horas de cultivo, enquanto a produção do EPS em hidrolisados de farelos de arroz apresentou produção à partir de 72 horas de cultivo. A redução de tempo para obtenção do exopolissacarídeo se demonstra promissora, uma vez que a máxima produção de EPS apresentada na literatura é em média de cinco dias de fermentação para culturas agitadas (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Figura 26 – Cinética de crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e produção de lasiodiplodana em hidrolisados de farelo de milho segundo DCCR 2². ■: AT – açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT- Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular; △: Biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 36 apresenta os dados complementares do consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, além dos valores de pH finais obtidos utilizando hidrolisados de farelo de milho.

Tabela 36 – Consumo percentual de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais e pH final do DCCR 2² em hidrolisados de farelo de milho.

Exp	Consumo de AT (%)	Consumo de AR (g/L)	Consumo de PT (g/L)	pH final
1	17%	23%	56%	5,41
2	49%	47%	20%	5,69
3	39%	32%	48%	5,15
4	85%	81%	26%	5,17
5	43%	33%	30%	5,27
6	86%	79%	78%	5,44
7	39%	52%	45%	5,45
8	66%	71%	44%	5,31
9	77%	74%	50%	5,42
10	86%	76%	43%	5,29
11	81%	72%	43%	5,31

AT: Açúcares totais

AR: Açúcares redutores

PT: Proteínas totais

Fonte: Autoria própria

Pôde-se observar que as condições de menores temperaturas e/ou agitação apresentaram consumo de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, reduzidos com valores mínimos de 17, 23 e 20% e máximos de 86, 81 e 78%, respectivamente. O consumo de açúcares e proteínas em temperaturas menos extremas demonstrou a capacidade do fungo *L. theobromae* em assimilar os nutrientes presentes no hidrolisado de farelo de milho, evidenciando que sua utilização seja adequada para a produção do biopolímero. O pH dos meios de fermentação apresentaram valores finais que variaram entre 5,17 e 5,69.

5.8.1 Obtenção de exopolissacarídeo a partir do micélio fúngico em hidrolisado de farelo de milho

A ressuspensão da biomassa celular obtida no hidrolisado de farelo de milho com água aquecida a 60 °C permitiu a recuperação de LAS-C. Pôde-se observar uma grande adesão de LAS-C à biomassa do fungo *Lasiodiplodia theobromae* a partir de 48 horas de cultivo. Conforme descrito anteriormente, os ensaios que apresentaram menores valores de temperatura e agitação não produziram LAS-M, entretanto todas as condições foram produtoras de LAS-C, mesmo que em baixas concentrações. Assim como observado para os ensaios de farelo de arroz, a produção da LAS-C está relacionada ao desenvolvimento do

micélio fúngico, apresentando-se em maiores percentuais no tempo de 96 horas. A relação de recuperação total entre a lasiodiplodana livre no meio fermentativo e a lasiodiplodana aderida à biomassa celular pode ser observada na Figura 27. O emprego do aquecimento da biomassa celular para recuperação de LAS-C se torna atrativa uma vez que esta fração pode representar um aumento de até 150% na produção do EPS total.

Figura 27 – Relação percentual de recuperação total de lasiodiplodana livre em hidrolisados de farelo de milho e aderida à biomassa celular em 72 horas de cultivo (A) e 96 horas de cultivo (B). ■: lasiodiplodana livre no meio fermentativo e; ■: lasiodiplodana aderida à biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

Com base nos valores obtidos no DCCR, foram avaliados os efeitos estimados para variáveis estudadas apresentados na Tabela 37. A elaboração dos modelos matemáticos com 90% de confiança para LAS-M e biomassa celular são apresentados nas equações 10, 11 e 12. A Análise de Variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 38.

$$LAS - M (g/L) = 6,34 + 1,93 * X_1 + 1,18 * X_2 - 1,52 * X_1^2 - 2,5 * X_2^2 \quad (10)$$

$$LAS - C (g/L) = 3,48 + 1,01 * X_1 + 0,35 * X_2 + 0,68 * X_1 * X_2 - 0,73 * X_1^2 - 0,92 * X_2^2 \quad (11)$$

$$Biom. celular (g/L) = 6,67 + 1,96 * X_1 + 0,24 * X_2 - 2,06 * X_2^2 \quad (12)$$

Onde: X_1 : agitação (rpm) e; X_2 : temperatura (%).

Tabela 37 – Efeitos estimados das variáveis estudadas, erro padrão e valores de *t* e *p* obtenção de lasiodiplodana livre no meio, lasiodiplodana aderida a biomassa e biomassa celular a partir de hidrolisado de farelo de milho.

LAS-M (g/L)					LAS-C (g/L)				Biomassa Celular (g/L)			
Fator	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>	Efeito	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	6,34	0,38	16,553	<0,001 ^c	3,48	0,22	16,017	<0,001 ^c	7,58	0,64	11,854	<0,001 ^c
X₁^a	3,86	0,47	8,232	<0,001 ^c	2,02	0,27	7,587	<0,001 ^c	3,92	0,78	5,013	0,004 ^c
X₂^b	2,35	0,47	5,021	0,004 ^c	0,70	0,27	2,623	0,047 ^c	0,48	0,78	0,609	0,569
X₁X₂	1,34	0,66	2,012	0,100	-1,83	0,32	-5,807	0,002 ^c	-0,17	1,11	-0,149	0,887
X₁²	-3,05	0,56	-5,458	0,003 ^c	-1,46	0,32	-4,611	0,006 ^c	-1,71	0,93	-1,83	0,127
X₂²	-4,99	0,56	-8,963	<0,001	1,36	0,38	3,604	0,015	-4,61	0,93	-4,963	0,004 ^c

^aNível codificado para agitação, ^bNível codificado para temperatura, ^c Nível de confiança a 95%.

LAS-M: lasiodiplodana livre no meio de cultivo **LAS-C:** lasiodiplodana aderida a células.

Fonte: Autoria própria

Tabela 38 – Análise de Variância (ANOVA) e Coeficiente de Determinação (R²) para os modelos ajustados para a obtenção de açúcares totais, açúcares redutores, proteínas totais, e fenóis totais em hidrolisado de farelo de milho.

LAS-M (g/L)						LAS-C (g/L)						Biomassa Celular (g/L)					
Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>	Fator	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
X₁^a	29,80	1	29,80	44,99	<0,001 ^c	X₁^a	8,14	1	8,14	57,80	<0,001 ^c	X₁^a	30,81	1	30,81	21,22	0,002 ^c
X₂^b	11,09	1	11,09	16,75	0,006 ^c	X₂^b	0,97	1	0,97	6,91	0,047 ^c	X₂^b	0,45	1	0,45	0,31	0,596
X₁²	13,08	1	13,08	19,75	0,004 ^c	X₁X₂	1,83	1	1,83	13,03	0,015 ^c	X₂²	26,29	1	26,29	18,10	0,004 ^c
X₂²	35,35	1	35,35	53,37	<0,001 ^c	X₁²	3,00	1	3,00	21,31	0,006 ^c						
						X₂²	4,77	1	4,77	33,85	0,002 ^c						
FA	3,47	4	0,87	3,41	0,24	FA	0,52	3	0,17	1,85	0,370	FA	9,03	5	1,81	3,18	0,257
EP	0,51	2	0,25			EP	0,19	2	0,09			EP	1,14	2	0,57		
Total	84,04	10				Total	17,72	10				Total	67,72	10			
R²	0,95					R²	0,96					R²	0,85				

^aNível codificado para agitação, ^bNível codificado para temperatura, ^c Nível de confiança a 95%.

LAS-M: lasiodiplodana livre. **LAS-C:** lasiodiplodana aderida a células. **FA:** falta de ajuste. **EP:** erro puro.

SQ: Soma dos quadrados. **GL:** Graus de liberdade. **QM:** Média quadrática.

Fonte: Autoria própria

Pôde-se observar na tabela de efeitos estimados que as variáveis agitação (X_1) e temperatura (X_2) foram significativas para a recuperação de LAS-M é hidrolisado de farelo de milho, sendo que seus valores quadráticos também foram significativos a 95%. A obtenção de LAS-C apresentou a variáveis lineares, quadráticas e interações como significantes, enquanto a biomassa celular apresentou apenas X_1 e X_2^2 . Os fungos produtores de exopolissacarídeos apresentaram produção máxima de exopolissacarídeos favorecida em meios agitados, reduzindo o tempo para produção do biopolímero, quando comparado a ensaios estáticos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). O mesmo padrão pode ser observado para a temperatura, onde apenas poucos fungos apresentaram menores temperaturas como favorecedoras da produção de EPS em maiores concentrações (KIM; YUN, 2005).

As três variáveis-resposta apresentaram para X^1 e X^2 valores de T_{calc} positivos, indicando que devem ser aumentadas para melhores obtenções de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho. Assim como observado para o hidrolisado de farelo de arroz, a produção de biomassa está concomitantemente relacionada à produção de lasiodiplodana.

Com base nos modelos gerados, foi possível a elaboração da tabela ANOVA para demonstração das significâncias. Os coeficientes de determinação (R^2) para LAS-M, LAS-C e biomassa celular com percentuais de 95, 96 e 85%, respectivamente. Uma vez verificados os modelos, foram plotadas superfícies de resposta, conforme apresentado na Figura 28.

Figura 28 – Superfícies de resposta para a obtenção do exopolissacarídeo lasiodiplodana livre no meio de cultivo (A), lasiodiplodana aderida à biomassa celular (B) e biomassa celular (C) em hidrolisados de farelo de milho.

Fonte: Autoria própria

5.8.2 Validação do modelo experimental da produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho

Com o objetivo de maximizar a obtenção de (LAS-M) em hidrolisados de farelo de milho, foi utilizada a ferramenta de otimização do *software* Design-Expert 7.0, para obtenção dos valores ótimos de agitação e temperatura. A condição estipulada para o software e a condição experimental obtida após fermentação são demonstradas na Tabela 39.

Tabela 39 – Otimização de variáveis para maximização da produção de lasiodiplodana no meio de fermentação (LAS-M), com valores preditos e testados. **A:** Condição estipulada pelo software Design-Expert 7.0. **B:** Validação em triplicata.

	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	LAS-M	Biomassa Celular	Desejabilidade
A	185,47	27,56	7,02 ± 2,27	7,61 ± 3,11	100%
B			5,73 ± 0,61	4,47 ± 0,22	

AT: Açúcares totais AR: Açúcares redutores PI_{95%}: intervalo de previsão

As condições apresentadas demonstraram níveis para as variáveis agitação a 185,47 rpm e temperatura de 27,56 °C. Os valores de LAS-M apresentado nos experimentos de validação se encontram dentro do intervalo estipulado pelo *software*. O gráfico de crescimento de *L. theobromae* em hidrolisado de farelo de milho, produção de LAS-M e LAS-C, bem como os consumos de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais são apresentados na Figura 29.

Figura 29 – Validação do DCCR 2² para produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho. ■: AT – Açúcares totais; ◆: AR – Açúcares redutores; ▲: PT – Proteínas totais; □: LAS-M – lasiodiplodana livre no meio fermentativo; ◇: LAS-C – lasiodiplodana aderida à biomassa celular e; △: Biomassa celular.

Fonte: Autoria própria

Ao final das 96 horas de fermentação o fungo *L. theobromae* havia consumido 84% dos açúcares totais e 76% dos açúcares redutores, sendo o consumo de proteínas totais baixo, apresentando apenas 19%. A obtenção de LAS-M foi observada à partir de 48 horas de fermentação. Curiosamente, a recuperação de LAS-C no tempo de 48 horas resultou em uma concentração elevada de exopolissacarídeo, apresentando concentração de 11,47 g/L.

A concentração de LAS-M produzida correspondeu a 68% da lasiodiplodana produzida, sendo os outros 32% referentes a recuperação de LAS-C. Esses valores se assemelham aos encontrados no ensaio de validação do hidrolisado de farelo de arroz, demonstrando que a recuperação de EPS aderido a biomassa pode melhorar os rendimentos de obtenção do biopolímero, resultando em maiores concentrações do mesmo. Muitos trabalhos realizam a recuperação do exopolissacarídeo aderido à biomassa celular, resultando em concentrações que variam de acordo com a espécie estudada (ROSADO et al., 2003; ALQUINI et al., 2004). Os parâmetros fermentativos da fermentação do hidrolisado de farelo de arroz por *L. theobromae* para a produção de LAS-M são apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 – Parâmetros fermentativos para produção de LAS-M por *L. theobromae* em cultivo em hidrolisado de arroz.

Parâmetro	Hidrolisado de farelo de milho
Q_p (g/L h ⁻¹)	0,06
Q_s (g/L h ⁻¹)	0,37
Q_x (g/L h ⁻¹)	0,05
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,16
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,13
Y_e (g/g)	1,28
Y_c (%)	84%

Q_p : produtividade volumétrica de EPS; Q_s : consumo volumétrico de substrato; Q_x : produtividade volumétrica de biomassa; $Y_{p/s}$: produtividade de EPS por consumo de substrato; $Y_{x/s}$: produtividade de biomassa por consumo de substrato; Y_e : produtividade específica; Y_c : percentual de consumo de substrato.

Fonte: Autoria própria

Assim como apresentado para os hidrolisados de farelo de arroz, as concentrações de açúcares totais foram utilizadas para a determinação dos parâmetros fermentativos. Os valores de Q_p , Q_x , $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$ para a fermentação do hidrolisado de farelo de milho se apresentaram inferiores aos obtidos em hidrolisado de farelo de milho no tempo de 96 horas.

Embora as concentrações de LAS-M em hidrolisado de farelo de milho tenha sido inferiores as obtidas em hidrolisado de farelo de arroz, observou-se um maior rendimento específico (Y_e), fator que favoreceu a recuperação do exopolissacarídeo, dado que o biopolímero pode também ficar aderido a biomassa celular. Contudo, maiores concentrações

de proteínas totais presentes no hidrolisado de farelo de arroz, podem ter promovido uma maior produção de biomassa celular e, conseqüentemente, a produção do exopolissacarídeo. O consumo de proteínas presente na validação da produção em hidrolisado de farelo de arroz foi de 60%, enquanto o do hidrolisado de milho foi de 19%. A produção de exopolissacarídeos raramente é favorecida em ensaios que apresentaram concentrações superiores 10 g/L (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

O crescimento de biomassa celular do fungo *L.theobromae* em hidrolisado de farelo de milho também apresentou hifas longas e segmentadas, conforme observado na Figura 30. Contudo, conforme pode ser observado, o micélio fúngico se apresentou característica mais aglomerada do que as descritas em hidrolisados de farelo de arroz. O crescimento em hidrolisado de farelo de milho não promoveu alterações morfológicas nas células, conforme apresentado em hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar, demonstrando que o meio utilizado pode ser utilizado para o desenvolvimento celular e produção do exopolissacarídeo sem causar estresse ao microrganismo.

Figura 30 – Fungo *L. theobromae* em hidrolisado de farelo de milho. (100x).

Fonte: Autoria própria

Até o presente momento, existem poucos relatos na literatura descrevendo a produção de lasiodiplodana, sendo os meios utilizados na sua produção sintéticos. Zanatta e colaboradores (2012) utilizaram o melaço de cana-de-açúcar diluído (40 g/L), suplementado com extrato de levedura (2 g/L), K_2HPO_4 (2 g/L) e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/L) apresentando concentração inicial de açúcares totais de 40 g/L e pH de 5,5 e produções de lasiodiplodana e biomassa celular de 10,84 e 11,42 g/L respectivamente. A produção de lasiodiplodana e

outros exopolissacarídeos utilizando hidrolisados produzidos a partir de biomassa propõem novas estratégias de produção, recuperação e purificação frente aos métodos tradicionalmente utilizados dados a complexidade dos meios utilizados e visando a obtenção de exopolissacarídeos de maior pureza.

5.9 Caracterização estrutural parcial da lasiodiplodana

5.9.1 Pureza da lasiodiplodana obtidas em hidrolisados de farelo de arroz e milho e frações aderidas à biomassa celular

A determinação da pureza das frações de lasiodiplodana obtidas foi realizada pela hidrólise dos exopolissacarídeos em ácido 72% dos açúcares redutores e proteínas totais presentes no material após a extração, purificação e secagem dos EPS obtidos. A Tabela 41 apresenta a recuperação de açúcares após a hidrólise das amostras.

Tabela 41 – Peso e composição química parcial da lasiodiplodana após tratamento quanto a percentuais de açúcares redutores e proteínas totais.

Amostra	Peso médio (mg)	Recuperação de AR (g/L)	Recuperação de PT (g/L)
Padrão de glicose	20,02 ($\pm 0,03$)	1,96 ($\pm 0,02$)	-
LAS-glicose	20,01 ($\pm 0,04$)	1,96 ($\pm 0,04$)	-
LAS-M Arroz	20,02 ($\pm 0,02$)	1,78 ($\pm 0,14$)	0,17 ($\pm 0,1$)
LAS-C Arroz	20,00 ($\pm 0,03$)	1,52 ($\pm 0,03$)	0,33 ($\pm 0,06$)
LAS-M Milho	20,01 ($\pm 0,03$)	1,91 ($\pm 0,01$)	0,16 ($\pm < 0,01$)
LAS-C Milho	20,00 ($\pm 0,01$)	1,66 ($\pm 0,04$)	0,22 ($\pm 0,01$)

AR: Açúcares Redutores

PT: Proteínas Totais

-: não detectado

LAS-glicose: lasiodiplodana livre em meio sintético

LAS-M: lasiodiplodana livre no meio de cultivo

LAS-C: lasiodiplodana aderida a células

Fonte: Autoria própria

As Figuras 31 e 32 demonstraram o processo de recuperação da lasiodiplodana em hidrolisados de farelos de arroz e milho com etanol a 4 °C, após tratamento e após secagem e pulverização. As amostras de lasiodiplodana quando precipitadas em etanol apresentaram colorações características do meio fermentativo, indicando que açúcares, proteínas e sais pertencentes ao meio de cultivo estão adsorvidos na matriz polissacarídica, devendo ser propriamente removidos. Com o emprego de sucessivas etapas de purificação, a coloração foi propriamente removida, tornando as frações de lasiodiplodana mais purificadas e aptas para análises composicionais.

Figura 31 – Recuperação da lasiodiplodana (LAS-M) em hidrolisado de farelo de arroz. (A): precipitação com etanol gelado; (B): LAS-M tratada e recuperada; (C): LAS-M seca e pulverizada.

Fonte: Autoria própria

Figura 32 – Recuperação da lasiodiplodana (LAS-M) em hidrolisado de farelo de milho. (A): precipitação com etanol gelado; (B): LAS-M tratada e precipitada em etanol; (C): LAS-M seca e pulverizada.

Fonte: Autoria própria

Pode-se observar que o processo de hidrólise empregado não degradou os açúcares presentes no material, uma vez que as concentrações após o tratamento foram similares para o padrão controle de glicose e para todas as amostras de lasiodiplodana analisadas. As amostras do padrão de glicose e LAS-glicose não apresentaram concentrações de proteínas totais. A ausência de proteínas no meio sintético se dá ao fato que a suplementação de nitrogênio utilizada nos ensaios fermentativos é feita pela adição dos sais de Vogel na concentração de 20 mL/L, resultando em meios fermentados mais puros, sem a presença destas macromoléculas. A Figura 33 apresenta a representação gráfica dos percentuais da lasiodiplodana obtidos nas diversas frações estudadas.

Figura 33 – Percentuais de açúcares redutores e proteínas totais em diferentes frações de lasiodiplodana. ■: açúcares redutores e; ■: proteínas totais.

Fonte: Autoria própria

As frações de lasiodiplodana hidrolisadas apresentaram composição diversificada de acordo com o meio de produção. As frações obtidas a partir de hidrolisado de farelo de arroz apresentaram 83,62% de açúcares redutores no meio fermentado (LAS-M) e 82,19% referente ao biopolímero da fração celular (LAS-C). Os valores percentuais referentes a proteínas aderidas aos exopolissacarídeos obtidos podem ser justificados uma vez que os biopolímeros possuem função de acúmulo de nutrientes excessivos (BURNS et al., 1994; ABDEL-AZIZ et al., 2012). Esses nutrientes, se não devidamente removidos podem ficar aderidos ao biopolímero, que ao serem secos e submetidos a análises composicionais atuam com falso positivo na obtenção das concentrações dos exopolissacarídeos totais. As amostras de LAS-C obtidas nos hidrolisados de farelo de arroz e milho apresentaram maior conteúdo proteico, indicando que a proteína presente na biomassa celular possa ter sido recuperada juntamente com o biopolímero durante o processo de extração. Os exopolissacarídeos produzidos na parede celular, geralmente ligados a proteínas, lipídeos e outros carboidratos, como a manana (CABIB; ARROYO, 2013) Contudo, as concentrações de lasiodiplodana obtidas se apresentaram superiores a 80%, apresentando concentrações de açúcares significantes, uma vez que foram produzidas a partir resíduos da agroindústria.

Após os experimentos de produção, os EPS produzidos por *L. theobromae* em diferentes fontes de carbono foram parcialmente purificados e caracterizados estruturalmente por métodos espectrométricos, tais como espectrofotometria, Infravermelho com Transformada de Fourier e difração de raio-X.

5.9.2 Espectroscopia de infravermelho – FTIR

As amostras de lasiodiplodana obtidas foram submetidas à análise de espectroscopia de infravermelho. Observando os espectros de FTIR dos EPS produzidos por *L. theobromae* em meio sintético e hidrolisados de farelo de arroz e de farelo de milho revelam uma possível similaridade estrutural destes compostos, conforme apresentado na Figura 34.

Figura 34 – Espectros de absorção na região do infravermelho da lasiodiplodana (LAS-M), produzidas em meio sintético de glicose (A), hidrolisado de farelo de arroz (B) e hidrolisado de farelo de milho (C).

Fonte: Autoria própria

As bandas de absorção com aspecto sinoidal situadas na região entre aproximadamente 3000 e 3600 cm^{-1} são de deformações axiais de grupos hidroxilas (R-OH). Próximo à 2900 e 1400 cm^{-1} , observa-se picos referentes as deformações axiais de ligações R-C-H típicas de grupos alquila, como as metilas (R-CH₃) e os metilenos (R-CH₂-R). Deve-se ressaltar que foram detectados sinais na região próxima a 1700 cm^{-1} , referente a carbonila (R-C=O) dos ácidos carboxílicos presentes em alguns resíduos de ácidos orgânicos, como o urônico e pirúvico, que comumente são encontrados na estrutura de EPS microbianos (SUTHERLAND, 2001). Os picos e bandas entre 1000 e 1200 cm^{-1} são típicos de deformações axiais em ligações C-C, C-H e R-C-O-C-R (éter). Além disso, nas regiões de *fingerprint* dos espectros observou-se que próximo há 900 cm^{-1} foram encontradas bandas do tipo “ombro” características de ligações glicosídicas com conformação do tipo β comumente relatadas em algumas glucanas microbianas já estudadas (VASCONCELOS, 2009; MONTEIRO et al., 2012). Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os polissacarídeos obtidos neste estudo são semelhantes a outros β -polissacarídeos de origem microbiana caracterizada previamente.

Corradi da Silva et al. (2003) relataram a produção de uma glucana fúngica por *Botryosphaeria sp.* com estrutura química similar as β -glucanas obtidas no presente trabalho. Tal fato é validado, uma vez que o fungo *L. theobromae* é uma forma anamórfica de *Botryosphaeria sp.*, apresentando diferenciação na forma estrutural de reprodução, enquanto a conformação estrutural dos exopolissacarídeos produzidos pelos dois gêneros de fungos sejam similares (CUNHA et al., 2012).

5.9.3 Cristalografia de Raios-X

As análises de difração de raio-X mostraram que as três amostras de lasiodiplodana produzidas por *L. Theobromae* em meios de cultivo com diferentes fontes de carbono apresentaram algumas similaridades, como pode ser observado na Figura 35.

Figura 35 – Difrátogramas de Raios-X das amostras de lasiodiplodana produzidas por *L.theobromae* em hidrolisados de farelo de arroz ■, farelo de milho ■ e meio sintético ■.

Fonte: Autoria própria

A região angular de difração entre aproximadamente 15 e 30 ° (2θ) nos EPS produzidos em hidrolisados de farelo de arroz, farelo de milho e glicose sintética demonstraram um pico intenso e largo, na forma de ombro, e a partir de 30 ° (2θ), não sendo relatado mais nenhum pico. Os picos largos são resultantes da estrutura polimérica dos exopolissacarídeos. Tais dados são semelhantes aos relatados por Verveka et al. (2014), indicando que os biopolímeros obtidos apresentaram ligeira cristalinidade embora sejam em sua maioria amorfos. Além disso, Kagimura e colaboradores (2014) apresentaram perfis de difração em lasiodiplodana produzida por *L. theobromae* em meio sintético idênticos aos retratados neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

- O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 visando a produção de hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho permitiu a geração de modelos matemáticos que elucidam a produção de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais, ao utilizar como variáveis concentrações ácidas e massa de farelo em níveis diferenciados;
- O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 visando à produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de arroz permitiu a geração de modelos matemáticos para a produção do exopolissacarídeo e produção de biomassa celular. Os modelos foram validados permitindo a obtenção de LAS-M e biomassa celular nas concentrações de 7,80 e 10,68 g/L, respectivamente;
- O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 visando à produção de lasiodiplodana em hidrolisado de farelo de milho geraram modelos matemáticos para a produção dos exopolissacarídeos obtidos a partir do meio fermentativo e aderido à biomassa celular, bem como para a produção de células. Os modelos obtidos foram validados com produção de LAS-M, LAS-C e biomassa celular nas concentrações de 5,73, 4,93 e 4,47 g/L, respectivamente;
- Os hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho, obtidos após DCCR apresentaram concentrações estimáveis de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas, apresentando perdas reduzidas de nutrientes durante o processo de tratamento e demonstrando seus potenciais na utilização em processos fermentativos, em especial para a produção de exopolissacarídeos, como meios ricos em carbono e nitrogênio;
- A determinação da pureza das frações de LAS-M por hidrólise ácida dos exopolissacarídeos obtidos em hidrolisados de farelos de arroz e de milho apresentaram em média 83,62 e 92,16% de açúcares redutores, respectivamente. As frações LAS-C obtidas apresentaram 82,19 e 88,42% de açúcares, demonstrando que todos os EPS recuperados apresentaram sua composição de carboidratos superior a 80%;
- As análises espectroscópicas e de cristalografia de Raios-X apresentaram similaridade de bandas quando comparados com valores citados na literatura, evidenciando que os biopolímeros produzidos por *L. theobromae* apresentaram composição similar aos demais estudos.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os trabalhos futuros, espera-se que as seguintes etapas sejam realizadas:

- Faz-se necessária uma caracterização específica dos açúcares presentes nos hidrolisados de farelo de arroz e milho, com a determinação das concentrações de maltose resultante da hidrólise dos materiais amiláceos;
- Determinação da relação carbono:nitrogênio dos hidrolisados para melhor entendimento do consumo e adequação dos meios para maiores produtividades de lasiodiplodana;
- Uma vez que a produção da lasiodiplodana se demonstrou promissora para os hidrolisados de farelos de arroz e milho, espera-se a prospecção de novos meios fermentativos a partir de biomassas agrícolas;
- Fazem-se necessárias as determinações das características viscosimétricas e reológicas das frações de lasiodiplodana obtidas nos hidrolisados de farelo de arroz e farelo de milho;
- Caracterização detalhada das frações de lasiodiplodana obtidas nos hidrolisados estudados por diferentes técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Escalonamento dos processos empregados para validação da produção industrial da lasiodiplodana em reatores de maior capacidade volumétrica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, S. M. et al. Acidic pH-Shock induces the production of an exopolysaccharide by the fungus *Mucor rouxii*: utilization of beet-molasses. **New York Science Journal**, v. 5, n. 2, p. 52–61, 2012.
- ABDOLLAHZADEH, J. et al. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the Botryosphaeriaceae from trees in Iran. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 23, p. 1–8, 2009.
- ABDUL RAZACK, S.; VELAYUTHAM, V.; THANGAVELU, V. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 3, p. 280–288, 2013.
- ADEL, A. M. et al. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4446–4455, 2010.
- ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journa of Chemical Society C**, p. 1623–1627, 1971.
- ALQUINI, G. et al. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 47–52, 2004.
- ALVES, A. et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1–13, 2008.
- AMARAL, A. E. et al. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 473–478, 2008.
- ANANDA NANJUNDA; VADLANI, P. V. .; MADL, R. L. Rice bran is an effective substitute for yeast extract in ethanol fermentation. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 4, n. 1, p. 70–74, 2011.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Noções gerais para boas práticas em microbiologia clínica**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo1/biosseguranca.htm>. Acesso em 14 abr. 2017
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 216–228, 2006.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29–41, 2004.
- BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 407–415, 2006.

- BHUNIA, S. K. et al. Isolation and characterization of an immunoenhancing glucan from alkaline extract of an edible mushroom, *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 13, p. 2039–2044, 2011.
- BI, H. et al. Structures of (1 → 6)-β-d-glucans from *Bulgaria inquinans* (Fries) and their immunological activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 547–552, 2013.
- BOCK, K.; VINCENDON, M. High resolution nuclear magnetic resonance studies of nigeran. **Carbohydrate Polymers**, v. 3, p. 13–22, 1983.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199–204, 2009.
- BUCHALA, A. J. Structure of the β-D-glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. **Carbohydrate Research**, v. 165, p. 146–149, 1987.
- BURGESS, T. I. et al. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423–435, 2006.
- BURNS, P. J. et al. Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycete *Pleurotus* sp. Florida. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 566–572, 1994.
- CABIB, E.; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 648–655, 2013.
- CAO, C.; PENG, F.; CUI, B.-K. Chemical characterization and structure of exopolysaccharides from submerged culture of new medicinal mushroom from China, *Phellinus mori* (higher Basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 15, n. 1, p. 57–69, 2013.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: ARTMED Ed., 2000. 751p.
- CARBONERO, E. R. et al. Glucans of lichenized fungi: Significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 8, p. 929–934, 2005.
- CARBONERO, E. R. et al. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 13–18, 2006.
- CARDOSO, J. E. et al. Transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p. 262–266, 2009.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.
- CARVALHO, W. et al. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 11, p. 1308–1312, 2004.
- CARVALHO, Y. DE; CARVALHO, C. G. DE S. E. Efeitos da temperatura de incubação sobre o fungo *Colletotrichum gossypii* South. var. *Cephalosporioides*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 1, n. 3, p. 11, 1973.

- CASTRO, E. D. M. DE et al. Qualidade de grãos em arroz. **Revista EMBRAPA Arroz e Feijão**, v. 34, p. 1–30, 1999.
- CHAKRABORTY, I. et al. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 13, p. 2249–2254, 2004.
- CHANDEL, A. K. et al. Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1709–1714, 2011.
- CHANDRA, K. et al. A water-soluble glucan isolated from an edible mushroom *Termitomyces microcarpus*. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 16, p. 2484–2489, 2007.
- CHO, E. J. et al. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 1, p. 129–140, 2006.
- CHOMA, A. et al. Chemical characterization of a water insoluble (1→3)- β -d-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 603–608, 2013.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **A cultura do arroz**, Brasília-DF, p.1-180, 2015.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 4 - Safra 2017/18, n.1 - Primeiro levantamento, Brasília, p.1-57, 2017a.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v.4 - Safra 2016-2017 - Oitavo Levantamento, Brasília, p. 1-144, 2017b.
- CORRADI DA SILVA, M. DE L. et al. Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)- β - D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 1, p. 10–17, 2005.
- CORRADI DA SILVA, M. DE L. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.
- COVIELLO, T. et al. Scleroglucan: a versatile polysaccharide for modified drug delivery. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 6–33, 2005.
- CUNHA, M. A. A. DA 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 and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 2012.
- DE BAETS, S. et al. Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 181–4, 2002.
- DE RUITER, G. A. et al. 2-O-methyl-D-mannose residues are immunodominant in extracellular polysaccharides of *Mucor racemosus* and related molds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 4299–4306, 1994.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, V. R. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 707–712, 2007.

DIAB, T. et al. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 10, p. 988–1000, 2001.

DONG, Q. et al. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 337, p. 1417–1421, 2002.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL KHOURY, D. et al. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, 2011, 338p.

ENG SÁNCHEZ, F.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Estudio del efecto de la relación carbono:nitrógeno, el tipo de inóculo y la adición de extracto de levadura en la producción de ácido jasmónico con *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 188–192, 2008.

ENG SÁNCHEZ, F. Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte 1. Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas. **Icidca**, v. 1–3, p. 51–59, 2008.

ENG SÁNCHEZ, F. Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte 2. Vías de producción. **ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar**, v. 43, n. 0138–6204, p. 3–9, 2009.

EZEQUIEL, J. M. B. et al. Desempenho de novilhos nelore alimentados com casca de soja ou farelo de gérmen de milho em substituição parcial ao milho moído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 569–575, 2006.

FABRE, I. et al. Isolement et étude structurale de glucanes de *Phytophthora parasitica*. **European Journal of Biochemistry**, v. 142, n. 1, p. 99–103, 1984.

FELIPE, M. G. A. et al. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 2–3, p. 281–283, 1996.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ) **Nível de Biossegurança (NB-1)**. Disponível em: < www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/nb1.html > Acesso em: abr 2017.

FRASER, C.; JENNINGS, H. A glucan from *Tremella mesenterica* NRRL-Y6158. **Canadian journal of chemistry**, n. 6, 1971.

FREIRE, F. das C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. Fortaleza Embrapa Agroindústria Tropical, 2004, 6p (Comunicado técnico, 91).

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78–88, 2006.

GERN, J. C. et al. Exopolysaccharide from *Agaricus brasiliensis* LPB and its scale up studies in a stirred tank fermenter. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 6, p. 10945–10950, 2015.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 168–174, 1998.

GIENTKA, I. et al. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 31–37, 2016.

GIESE, E. C. et al. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 239–243, 2011.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOOS, R. D.; COX, E. A.; STOTZKY, G. Mycological Society of America *Botryodiplodia theobromae* and Its Association with *Musa* Species BOTRYODIPLODIA THEOBROMAE AND ITS ASSOCIATION WITH MUSA SPECIES. v. 53, n. 3, p. 262–277, 1961.

GRÜN, C. **Structure and biosynthesis of fungal α -glucans**. 2003. 144p. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Utrecht, Holanda, 2003.

GRÜN, C. H. et al. The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. **Glycobiology**, v. 15, n. 3, p. 245–257, 2005.

GUNJA-SMITH, Z.; SMITH, E. E. Evidence for the periplasmic location of glycogen in *Saccharomyces*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 56, n. 3, p. 588–592, 1974.

HAN, X. Q. et al. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 489–493, 2011.

HAO, L. M. et al. Optimization of effect factors for mycelial growth and exopolysaccharide production by *schizophyllum commune*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 621–631, 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.

HUANG, Q.; ZHANG, L. Preparation, chain conformation and anti-tumor activities of water-soluble phosphated (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Poria cocos* mycelia. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1363–1369, 2011.

HUANG, Y.; MINNAARD, A. J.; FERINGA, B. L. Formal synthesis of (R)-(+)-lasiodiplodin. **Synthesis**, n. 7, p. 1055–1058, 2011.

JELSMA, J.; KREGER, D. R. Ultrastructural observations on (1→3)-β-glucan from fungal cell-walls. **Carbohydrate Research**, v. 43, p. 200–203, 1975.

ISMAIL, A. M.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. LOMBARD, L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p.649–660, 2012.

JINDAL, M. et al. Sulfation of Aegle marmelos gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1660–1668, 2013.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2014.

KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1→6)-β-glucan (lasiodiplodan): preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Biopolysaccharides for skin hydrating cosmetics. **Polysaccharides**, p. 1–23, 2014.

KHANZADA, M. A.; RAJPUT, A. Q.; SHAHZAD, S. Effect of medium, temperature, light and inorganic fertilizers on in vitro growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from mango. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 885–889, 2006.

KIM, H. O.; YUN, J. W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 728–738, 2005.

KLOCK, U. et al. Química da Madeira. **Manual Didático**. Local: Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal - Fupef do Paraná, 2005. p.86.

KRCMAR, P. et al. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 1, p. 61–64, 1999.

KULKARNI, R. K.; NICKERSON, K. W. Nutritional control of dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. **Experimental Mycology**, v. 5, n. 2, p. 148–154, 1981.

LACERDA, D. B. C. L. et al. Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 521–530, 2010.

LEAL, J. A.; RUPÉREZ, P. Extracellular polysaccharide production by *Aspergillus nidulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 70, n. 1, p. 115–120, 1978.

LEE, M. J. et al. The fungal exopolysaccharide galactosaminogalactan mediates virulence by enhancing resistance to neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–22, 2015.

LIMA, J. S. et al. *Lasiodiplodia theobromae* em plantas de cajaraneira. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 296–302, 2014.

LIU, Y.; WANG, F. Structural characterization of an active polysaccharide from *Phellinus ribis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 386–392, 2007.

LOWRY, O. H. et al.. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO, X. et al. Characterisation and immunostimulatory activity of an α -(1 $\rightarrow$ 6)-d-glucan from the cultured *Armillariella tabescens* mycelia. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 357–363, 2008.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.

MANDAL, S. et al. Chemical analysis of new water-soluble (1 $\rightarrow$ 6)-, (1 $\rightarrow$ 4)- α , β -glucan and water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 4)- β -glucan (Calocyban) from alkaline extract of an edible mushroom, *Calocybe indica* (Dudh Chattu). **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p. 2657–2663, 2010.

MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of rice bran extract as a nitrogen source for improved hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by new xylose-fermenting yeast strains isolated from brazilian forests. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2013.

MARTONE, P. T. et al. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. **Current Biology**, v. 19, n. 2, p. 169–175, 2009.

MILESSI, T. S. S. et al. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373–379, 2013.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426–428, 1959.

MISAKI, A. et al. Structure of pestalotan, a highly branched (1 $\rightarrow$ 3) β -D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrate Research**, v. 129, n. C, p. 209–227, 1984.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake,” the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2889–2896, 1990.

MONDAL, S. et al. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1135–1140, 2004.

MORITZ, D. E. **Produção do pigmento Monascus por Monascus ruber cct 3802 em cultivo submerso**. p. 134, 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MORRIS, V. J. Starch gelation and retrogradation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, p. 2–6, 1990.

OĞUZHAN, P.; YANGILAR, F. Pullulan: production and usage in food industry. **African Journal of Food Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 57–63, 2013.

OLENNIKOV, D. N. et al. Branched glucan from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 65–70, 2012.

OLIVEIRA, K. S. M. **Otimização do cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* para obtenção**

de EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos. p. 133, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Rio Claro, 2014.

OLIVEIRA, K. S. M. et al. (1→6)- and (1→3)(1→6)- β -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 539–546, 2015.

OLIVEIRA, M. Z. A. de. Fungos associados a sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) produzidas na região de Além São Francisco. Bahia: EPABA, 1986. 5 p. (Comunicado Técnico, 16).

OLIVEIRA, M. Z. A. et al. Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para a agricultura baiana. **Revista Bahia Agrícola**, v.9, n.2, 2013.

OLORUNSOLA, E. O.; ADEDOKUN, M. O. Surface activity as basis for pharmaceutical applications of hydrocolloids: a review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 10, p. 110–116, 2014.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **EMBRAPA. Circular Tecnica**, v. 75, p. 6, 2006.

PALACIOS, I. et al. Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. **Carbohydrate Research**, v. 358, p. 72–77, 2012.

PANG, X. et al. Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 3, p. 291–297, 2007.

PAVIATH, A. E.; ORTS, W.; PAVLATH, A. Edible films and coatings: why, what, and how? **Edible Films and Coatings for Food Applications**, p. 1–23, 2009.

PAVLOVA, K. et al. Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 435–439, 2004.

PAVLOVA, K. et al. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 8, p. 1038–1052, 2011.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31 n.6, p.572-578, 2006.

PERLIN, A. S.; TABER, W. A. A glucan produced by *Claviceps purpurea*. **Canadian Journal of Chemistry**, v.41, p. 2278-2282, 1963.

PIOTROWSKI, J. S. et al. Plant-derived antifungal agent poacic acid targets beta-1,3-glucan. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 12, p. E1490-7, 2015.

POLI, A. et al. Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL1 isolated from Livingston Island, Antarctica. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 6, p. 576–581, 2010.

- PRAMANIK, M. et al. Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 17, p. 2670–2675, 2007.
- QIAN, C.-D. et al. *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 297, 2014.
- RAO, P. V.; SINGHAL, G. S. Characterization of light dependent, synchronous pycnidial production in *Botryodiplodia theobromae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 70, n. 1, p. 121–129, 1978.
- RAVELLA, S. R. et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 728–732, 2010.
- REGAND, A. et al. Physicochemical properties of glucan in differently processed oat foods influence glycemic response. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8831–8838, 2009.
- REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: A perspective. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 20, n. 2, p. 111–116, 2007.
- RESPLANDY, R. et al. Première liste annotée de champignons parasites de plantes cultivées en Cote D'Ivoire. **Annales des Épiphyties**, p. 1-29, 1954.
- ROCHA, G. J. DE M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663–670, 2011.
- RODRIGUES, R. Caracterização Morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das prodrições de tronco e raízes da videira. 53 p. 2003. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical), Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2003.
- RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1247–1253, 2010.
- ROSADO, F. R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “florida” (Jack.: Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 230–237, 2003.
- ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Universidade Federal de Viçosa Ed., 2011. 252p.
- ROUT, D. et al. Chemical analysis of a new (1->3)-, (1->6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 16, p. 2533–2539, 2005.
- RUSINOVA-VIDEVA, S.; PAVLOVA, K.; GEORGIEVA, K. Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL 62. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. sup1, p. 80–84, 2011.

RUTHES, A. C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 761–769, 2013.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANDOVAL-SÁNCHEZ, M. et al. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). **Agrociencia**, v.47, n.1, jan-fev, 2013.

SANTOS, J. C.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A. Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 42, p. 16494–16501, 2014.

SANTOS, J. W. et al. Farelo de arroz em dietas para ovinos. **Revista Brasileira de Saúde e produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 193–201, 2010.

SCHWEIGER-HUFNAGEL, U. et al. Identification of the extracellular polysaccharide produced by the snow mold fungus *Microdochium nivale*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 3, p. 183–187, 2000.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 585–592, 2002.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glucanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51–55, 2002.

SHI, M.; ZHANG, Z.; YANG, Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 200–206, jun. 2013.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 931–937, 2004.

SIMÕES OIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

SMIDERLE, F. R. et al. High molecular weight glucan of the culinary medicinal mushroom *Agaricus bisporus* is an β -glucan that forms complexes with low molecular weight galactan. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5818–5830, 2010.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of *Botryosphaera* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480–486, 2004.

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

SUTHERLAND, O. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework *Microbiology*.v.147, p.3–9, 2001.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, p. 17, 2014.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 2013.

TADA, R. et al. An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 3, p. 400–404, 2009.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p.1621-1651, 2008.

TAKO, M. et al. The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 3, p. 280–291, 2014.

TANDON, R. N.; SRIVASTAVA, M. P. Influence of hydrogen-ion concentrations on the utilization of sodium nitrite by *Diplodia typhina* Sacc and *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Current Science**, v.1, p.35–36, 1963.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological assessment of β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298–14309, 2012.

VALASQUES, G. L. et al. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 293–299, 2014.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. 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, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1908–1914, 2013.

WAKSMAN, N. H. **Hidratos de carbono en Cyttaria hariatii Fischer** : Determinación de la estructura de un Pululano . Estudio de azúcares simples , aislamiento e identificación de ácido D-arabino hexulosónico alfa, alfa-D-trehalosa. 1977. 204 p. Tese (Doutorado em Química). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1977.

WANG, D. et al. Optimization of extraction and enrichment of steroidal alkaloids from bulbs of cultivated *Fritillaria cirrhosa*. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WESENDONCK, W. R. **Valor nutricional de diferentes substratos do trigo para suínos em crescimento**. 2012. 81p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Porto Alegre (RS), Brasil, 2012.

XIAO, J. H. et al. Nutritional requirements for the hyperproduction of bioactive exopolysaccharides by submerged fermentation of the edible medicinal fungus *Cordyceps*

taii. Biochemical Engineering Journal, v. 49, n. 2, p. 241–249, 2010.

XU, C. P.; YUN, J. W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 33–39, 2004.

YALIN, W.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P. Studies on isolation and structural features of a polysaccharide from the mycelium of an Chinese edible fungus (*Cordyceps sinensis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 251–256, 2006.

YANG, H.; HE, G. Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 2903–2907, 2008.

YANG, X. B. et al. Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 747–754, 2005.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ZAMBOM, M. A. et al. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 23, p. 937–943, 2008.

ZANATTA, M. et al. Avaliação da produção de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio formulado com melaço de cana-de-açúcar suplementado com sais minerais. p. 1–5, 2012.

ZHU, H. et al. A three-stage culture process for improved exopolysaccharide production by *Tremella fuciformis*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 526–528, 2012.

ZULLAIKAH, S. et al. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. **Bioresource technology**, v. 96, n. 17, p. 1889–96, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A - Curva de calibração: Açúcares totais

Apêndice B - Curva de calibração: Açúcares redutores

Apêndice C - Curva de calibração: Proteínas totais

Reativo A: 20 g de Na_2CO_3 ;
4 g de NaOH ;
 H_2O q.s.p 1000 mL.

Reativo B: 2 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
 H_2O q.s.p 100 mL.

Reativo C: 4 g de tartarato de sódio
 H_2O q.s.p 100 mL.