UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JESÚS JIMÉNEZ ASCENCIO

Produção e caracterização do exopolissacarídeo lasiodiplodana por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Lorena

2020

JESÚS JIMÉNEZ ASCENCIO

Produção e caracterização do exopolissacarídeo lasiodiplodano por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração em Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Anuj Kumar

Versão Corrigida

Lorena

2020

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)

Ascencio, Jesús Jiménez

Produção e caracterização do exopolissacarídeo lasiodiplodana por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar / Jesús Jiménez Ascencio; orientador Anuj Kumar Kumar
Versão Corrigida. - Lorena, 2020.
114 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Resíduos agroindústrias. 2. Pré-tratamentos. 3. Fermentação submersa. 4. *Lasiodiplodia theobromae*. 5. Caracterização de lasiodiplodana. I. Título. II. Kumar, Anuj Kumar, orient.

Deus obrigado por iluminar o meu caminho!

Dedico essa dissertação a minha família,

Meus melhores professores,

Eu só quero agradecer muito!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar a oportunidade de realizar muitos sonhos nesta vida. Muito obrigado por me permitir errar, aprender, crescer e amadurecer, bem como pelo seu infinito amor, o qual não me permitiu desistir. Agradeço também por ter me dado uma família que eu amo muito;

Ao **Prof. Dr. Anuj Kumar**, pela orientação, profissionalismo, competência, dedicação e amizade sincera. Eu tive alguns momentos estressantes, mas bastavam alguns minutos de conversa de qualidade para eu ficar motivado a seguir em frente. Obrigado por acreditar em mim, pelos elogios e incentivos. Pode ter certeza, eu consegui chegar até aqui, em grande parte, por sua ajuda. Eu sempre vou considerar a você como meu mestre e amigo;

Ao **Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva**, pela confiança, conhecimentos compartilhados, apoio, liberdade de me permitir desenvolver este trabalho e de ser parte da família do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBIOS). Muito obrigado;

Ao **Prof. Dr. Nagamani Balgurusamy**, agradeço por ter sido a pessoa chave para eu incursionar na área da pesquisa;

À minha estudante de iniciação científica **Letícia Fernanda de Oliveira Flores**, que me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos com muita responsabilidade e compromisso. Essa dissertação é nossa;

Aos meus amigos e pesquisadores favoritos, **Dr. Rafael Rodrigues Philippini** e **Dra. Sabrina Martiniano**, pelo compromisso e dedicação em todos os momentos comigo e com o trabalho desenvolvido. Acredito que vocês foram cruciais para a boa qualidade desta dissertação. Eu nunca vou conseguir agradecer o suficiente por todo o conhecimento fornecido em especial a Rafael, realmente muito obrigado;

Aos Professores **Dr. Júlio César dos Santos** e **Dra. Talita Martins Lacerda**, pelos conhecimentos e contribuições para a melhoria deste trabalho. Eu sou muito grato por suas colaborações;

Aos **colegas do LBIOS**, pela amizade, preocupação e apoio demonstrado. Obrigado: Rafael Philippini, Sabrina Martiniano, Paulo Franco, Felipe Antunes, Bruna Curry, Itzcoátl Muñoz, Gilda Marino, Leticia Flores, Leticia Fernandes, Nayelen Sayuri, Fernanda Gonçalves, João Barbosa, Matheus, Lloisy, Salvador, Guilherme, Roberta, Mónica, Erick, Sofy, Majo, Roger;

Aos amigos **Barbara Pereira**, **Fabício Ferreira** e **André Silva**, pela amizade sincera, pelos dias de cafés que terminaram em boas conversas, e por toda a ajuda que vocês sempre me forneceram. Vocês foram essenciais nos meus dias. Vocês são ótimos;

A todos da **EEL-USP**, que influenciaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais **Martín Jiménez Hernández** e **Bellanires Ascencio Guzmán**, que sempre acreditaram em mim. Embora o destino nós tenha traçado caminhos diferentes, vocês estarão em meu coração sempre;

Ao meu amigo **Paulo Willians Lopes**, pela preocupação e apoio constante. Obrigado pela amizade, convívio e apoio demonstrado nas conversas que aliviaram meus momentos de estresse;

Ao chefe do Laboratório Didático de Engenharia Bioquímica, **Fabício Batista Ferreira**, por me disponibilizar o uso contínuo de alguns equipamentos e ensinamentos para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Fabricio M. Gomes** e **Prof. Dr. Félix M. Pereira**, pela paciência durante as semanas invertidas para uma maior compreensão e análise dos dados experimentais, utilizando modelagem matemática. Muito obrigado por todas as dicas, conhecimento e disponibilidade em todo momento. Sou muito grato de ter aprendido muito com vocês.

À **Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe**, chefe do Laboratório de Fermentação II, pelo fornecimento de alguns equipamentos necessários para esta pesquisa;

À **Ms. Barbara Pereira**, pela ajuda na preparação das amostras de biopolímero; e à **Profa. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza**, chefe do Laboratório de Ressonância Magnética (RMN) e de Análise Elementar, por me permitir fazer as análises de infravermelho (FTIR);

Ao **Prof. Dr. André Luís Ferraz**, chefe do Laboratório de Ciências da Madeira, e sua estudante de mestrado **Ana Maria Camargo**, por toda ajuda fornecida para a análise de massa molecular dos biopolímeros;

Ao **Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos**, chefe do Laboratório de polímeros, por me permitir realizar as análises de calorimetria de varredura diferencial dos biopolímeros;

Ao **Prof. Dr. Durval Rodrigues Junior**, chefe do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo auxílio na análise da superfície de amostras de bagaço de cana-de-açúcar e biopolímeros;

Ao **Prof. Dr. Paulo Atsushi Suzuki**, chefe do Laboratório de Fluorescência e Difração de Raios X, por me permitir realizar a análise de raios x nas amostras de biopolímeros;

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

À usina **Ipiranga Agroindustrial**, por ceder gentilmente o bagaço de cana-de-açúcar empregado neste trabalho;

À bolsa **CAPES**, **CNPq** e **FAPESP** pelo apoio financeiro.

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida, e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso”.

Antoine de Saint-Exupéry – In: O pequeno príncipe, 1943

RESUMO

ASCENCIO, J. J. **Produção e caracterização do exopolissacarídeo lasiodiplodana por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar.** 2020. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

A conversão da biomassa lignocelulósica para açúcares de segunda geração (2G) é crucial para a produção de biocombustíveis e produtos de maior valor agregado. No entanto, devido à sua natureza recalcitrante da biomassa lignocelulósica, o pré-tratamento é um passo essencial para aumentar a acessibilidade das enzimas celulolíticas à hemicelulose e à celulose para obter açúcares 2G. Neste estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com ácido nítrico e hidróxido de sódio sequencialmente. O bagaço submetido à pré-tratamento sequencial ácido-base levou a produzir uma polpa celulósica que reteve 92,33% da celulose e eliminou 70,63% de lignina. A polpa celulósica obtida foi hidrolisada enzimaticamente (10% de sólidos totais) por Cellic Ctec 2, Novozyme (Curitiba, Brasil), apresentando um rendimento de 72,05%, com 67,89 g/L de glicose. Foi avaliado o potencial biotecnológico do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HCBCA) suplementado com extratos de farelo de soja e arroz na produção de lasiodiplodana (LAS) por *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966, utilizando DCCR 2² para o estudo da relação carbono/nitrogênio, gerando modelos matemáticos com níveis de confiança de 95% e *p*-valores menores que 0,05. As melhores condições com a suplementação de farelo de soja possibilitaram a obtenção 16,2 g/L LAS e 8,34 g/L biomassa celular, enquanto a suplementação com farelo de arroz produziu 22,03 g/L e 14,03 g/L às 120 h, respectivamente. Algumas propriedades das frações de LAS obtidas foram caracterizadas, tais como alto grau de pureza, baixa solubilidade, comportamento pseudoplástico; além disso, usou-se técnicas de SEM, DSC e GPC, que demonstraram novas características, enquanto as análises de XRD e FTIR demonstraram composição e valores semelhantes às reportadas na literatura para LAS produzida por *L. theobromae*.

Palavras-chave: Resíduos agroindústrias. Pré-tratamentos. Fermentação submersa. *Lasiodiplodia theobromae*. Caracterização de lasiodiplodana.

ABSTRACT

ASCENCIO, J. J. **Production and characterization of exopolysaccharide lasiodiplodan by *Lasiodiplodia theobromae* from sugar cane bagasse cellulosic hydrolysate.** 2020. 114 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

The conversion of lignocellulosic biomass to second generation (2G) sugars is crucial for production of biofuels and value added products. However, due to their recalcitrant nature of lignocellulosic biomass, pretreatment is an essential step to increase in increasing the accessibility of cellulolytic enzymes to hemicellulose and cellulose to obtain fermentable 2G sugars. In this study, sugarcane bagasse was pretreated with nitric acid and sodium hydroxide sequentially. The bagasse submitted to sequential acid-base pretreatment led to the production of cellulosic pulp that retained 92.33% of cellulose and eliminated 70.63% of lignin. The obtained cellulosic pulp was enzymatically hydrolyzed (10% of total solids) by Cellic Ctec 2, Novozyme (Curitiba, Brazil), showed a yield of 72.05%, with 67.89 g/L of glucose. The biotechnological potential of cellulosic hydrolyzate supplemented with soybean and rice bran extracts for lasiodiplodan (LAS) production by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 was evaluated by using DCCR 2² to study the carbon/nitrogen relationship, generating mathematical models with 95% confidence levels and *p*-values less than 0.05. The best conditions with soybean bran supplementation allowed to obtain 16.2 g/L of LAS and 8.34 g/L of cell biomass, while supplementation with rice bran produced 22.03 g/L and 14.03 g/L at 120 h, respectively. Some properties from obtained LAS fractions were characterized, such as high purity, low solubility, pseudoplastic behaviour. In addition, SEM, DSC and GPC techniques were used, demonstrated new characteristics, whereas the XRD and FTIR analyzes demonstrated composition and similar values to those reported in the literature for LAS produced by *L. theobromae*.

Keywords: Agroindustrial wastes. Pretreatments. Submerged fermentation. *Lasiodiplodia theobromae*. Lasiodiplodan characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da celulose.	27
Figura 2 – Estrutura química dos compostos hemicelulósicos xilana e glucomanana.	28
Figura 3 – Estrutura química da macromolécula lignina.	29
Figura 4 – Pré-tratamentos empregados no processamento do bagaço de cana-de-açúcar.	30
Figura 5 – Estrutura química da macromolécula lignina.	33
Figura 6 – <i>Lasiodiplodia theobromae</i> CBS164.96. A) Hifas; B) célula conidiogênica e conídios jovens; C) conídios maduros.	35
Figura 7 – Tipos de polissacarídeos: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. As diferentes cores representam diferentes monossacarídeos.	39
Figura 8 – Estrutura química da pululana.	41
Figura 9 – Estrutura química de botriosferana sintetizada por <i>Botryosphaeria rhodina</i>	43
Figura 10 – Biossíntese de escleroglucano a partir de <i>Sclerotium rolfsii</i> ATC15205.	45
Figura 11 – Estrutura química da lasiodiplodana obtida por <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	46
Figura 12 – Representação estrutural da lasiodiplodana modificada quimicamente. A) Sulfonação; B) carboximetilação; C) fosforilação; D) acetilação.	47
Figura 13 – Fluxograma das atividades envolvidas no presente trabalho.	56
Figura 14 – Análise por SEM mostrando a imagem da superfície do bagaço de cana-de-açúcar A) in natura; B) pré-tratado com ácido nítrico; C) pré-tratado com hidróxido de sódio; D) pré-tratado com ácido-base diluído.	73
Figura 15 – Perfil da hidrólise enzimática (5% ST) das biomassas pré-tratadas durante 72 h de reação. A) Açúcares redutores e B) glicose recuperada. ●–Celulignina; ■–Holocelulose; ▲–Polpa celulósica.	75
Figura 16 – Perfil da hidrólise enzimática (10% ST) das biomassas pré-tratadas durante 72 h de reação. A) Açúcares redutores e B) glicose recuperada. ●–Celulignina; ■–Holocelulose; ▲–Polpa celulósica.	76
Figura 17 – Crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> e produção de LAS em meio de glicose suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. ■■–Biomassa celular; ■■–LAS: Lasiodiplodana.	78
Figura 18 – Cinética de crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> e produção de LAS em meio sintético de glicose suplementado com A) farelo soja e B) farelo de arroz. ▲–Consumo de glicose; ●–Biomassa celular; ■–LAS: Lasiodiplodana.	79
Figura 19 – Cinética de crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> e produção de LAS em HCBCA suplementado com A) farelo de soja e B) farelo de arroz. ▲–Consumo de glicose; ◆–Consumo de proteínas; ●–Biomassa celular; ■–LAS: Lasiodiplodana.	80

Figura 20 – Ajuste das superfícies de resposta aos dados experimentais para suplementação com extrato de farelo de arroz.	85
Figura 21 – Ajuste das superfícies de resposta aos dados experimentais para suplementação com extrato de farelo de soja.	86
Figura 22 – Validação dos modelos matemáticos para produção de LAS a partir da cinética de crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> em HCBCA suplementado com A) farelo soja e B) farelo de arroz. ▲–Consumo de ART; ◆–Consumo de proteínas; ●–Biomassa celular; ■–LAS: Lasiodiplodana.	87
Figura 23 – Taxa de cisalhamento dependente da viscosidade. A) LAS obtida de HCBCA com suplementação com farelo de soja; B) LAS por suplementação com farelo de arroz.	90
Figura 24 – Perfil da massa molecular das amostras de LAS obtidas de HCBCA suplementadas com farelo de soja e arroz.	91
Figura 25 – Micrografias de LAS obtidas de HCBCA em ampliações de 50x, 400x e 1200x.	92
Figura 26 – Perfil de raio-X de LAS obtida de HCBCA suplementada com farelo de ■ soja e ■ arroz.	93
Figura 27 – Espectros de absorção na região do infravermelho de LAS - ■ soja e ■ arroz.	94
Figura 28 – Curva de DSC de LAS obtido de HCBCA com suplementação de farelo A) soja e B) arroz.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas mais comuns.....	26
Tabela 2 – Drogas polissacarídicas naturais disponíveis comercialmente obtidas de diferentes fontes.....	37
Tabela 3 – Relação entre a estrutura e a atividade antioxidante das β -glucanas obtidas de diferentes fontes.....	42
Tabela 4 – Produção de lasiodiplodana a partir por fermentação submersa.....	48
Tabela 5 – Níveis utilizados no planejamento de experimentos para a otimização das condições experimentais.	63
Tabela 6 – DCCR 2 ² para avaliação da relação carbono/nitrogênio com três repetições no ponto central.	63
Tabela 7 – Composição química em peso seco do bagaço de cana-de-açúcar in natura e após pré-tratamento do bagaço com ácido diluído, alcalino diluído e sequencial ácido-base diluído.	70
Tabela 8 – Perfil da hidrólise enzimática com 5% e 10% ST, mostrando os ART (g/L) nas diferentes condições do BCA pré-tratado (ácido diluído, alcalino diluído e sequencial ácido-base).	74
Tabela 9 – Resultados obtidos a partir do planejamento experimental para suplementação com farelo de arroz.	82
Tabela 10 – Resultados obtidos a partir do planejamento experimental para suplementação com farelo de soja.	82
Tabela 11 – Significância estatística dos parâmetros das Equações 11-14.	83
Tabela 12 – Análise estatística da regressão dos modelos aos dados experimentais.	84
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para produção de LAS por <i>L. theobromae</i> em HCBCA suplementado com extrato de farelo de soja e arroz.	88
Tabela 14 – Composição química das amostras de LAS, quanto à açúcares e proteínas.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX	Explosão de Fibra com Amônia
AFM	Microscopia de Força Atômica
ART	Açúcares Redutores Totais
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
DCCR	Delineamento de Composto Central Rotacional
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Análise Termogravimétrica Derivada
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
EPS	Exopolissacarídeo
FPU	Unidades de Papel Filtro
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GEE	Gases de Efeito Estufa
GP	Grau de Polimerização
GPC	Cromatografia por Permeação em Gel
HCBCA	Hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar
HFA	Hidrolisado de Farelo de Arroz
HFM	Hidrolisado de Farelo de Milho
HHBCA	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LAS	Lasiodiplodana
LBIOS	Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis
MALDI-TOF/TOF	Espectrometria de Massas
MRB	Modificadores da Resposta Biológica
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
Q_p	Produtividade volumétrica da lasiodiplodana
Q_s	Produtividade volumétrica do substrato
Q_x	Produtividade volumétrica de biomassa fúngica
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
ST	Sólidos Totais
TGA	Análise Termogravimétrica
USP	Universidade de São Paulo
XRD	Difração de Raios X
Y_c	Rendimento específico
Y_{P/S}	Rendimento da lasiodiplodana
Y_{X/S}	Taxa de consumo de substrato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Resíduos agroindustriais no mundo	25
2.1.1	Biomassa lignocelulósica	25
2.1.1.1	Celulose	26
2.1.1.2	Hemicelulose	27
2.1.1.3	Lignina	28
2.1.2	Bagaço de cana-de-açúcar no Brasil	29
2.2	Pré-tratamentos no bagaço de cana-de-açúcar	30
2.2.1	Pré-tratamento ácido	31
2.2.2	Pré-tratamento alcalino	32
2.2.3	Pré-tratamento sequencial ácido-base	33
2.2.4	Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada	34
2.3	O fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	35
2.4	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> como ferramenta biotecnológica	36
2.5	Polissacarídeos naturais	37
2.5.1	Exopolissacarídeos	38
2.5.2	Glucanas	39
2.5.2.1	α -glucanas	40
2.5.2.2	β -glucanas	41
2.6	Lasiodiplodana	45
2.7	Fermentação submersa para produção de lasiodiplodana	48
2.7.1	Requerimentos nutricionais	49
2.7.2	Fonte de nitrogênio	50
2.7.2.1	Farelo de soja	51
2.7.2.2	Farelo de arroz	52
2.7.3	Fonte de carbono	53
2.7.4	Técnicas de caracterização de lasiodiplodana	53
3	OBJETIVOS	55
3.1	Geral	55
3.2	Específicos	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	Etapa 1 – Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	58
4.1.1	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	58
4.1.1.1	Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar	58

4.1.1.2	Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar	58
4.1.1.3	Pré-tratamento sequencial ácido-base do bagaço de cana-de-açúcar.....	58
4.1.2	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado	59
4.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) do BCA <i>in natura</i> e pré-tratado	59
4.1.4	Análise comparativa da hidrólise enzimática do BCA <i>in natura</i> e pré-tratado	59
4.2	Etapa 2 – Otimização e verificação da produção de lasiodiplodana.....	60
4.2.1	Cultura e manutenção de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	60
4.2.2	Preparo dos Sais do Vogel (Meio N)	60
4.2.3	Preparo dos extratos de farelo de soja e arroz	61
4.2.4	Preparo do hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	61
4.2.5	Ensaio fermentativo I – Glicose com diferentes fontes de nitrogênio	62
4.2.6	Ensaio fermentativo II – Glicose suplementado com farelo de soja e arroz	62
4.2.7	Ensaio fermentativo III – HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz	62
4.2.8	Ensaio fermentativo IV – Otimização da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz por DCCR 2 ²	63
4.2.9	Ensaio fermentativo V – Validação dos modelos matemáticos da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz.....	64
4.3	Etapa 3 – Caracterização física e química de lasiodiplodana	65
4.3.1	Determinação da pureza de lasiodiplodana	65
4.3.2	Determinação da solubilidade de lasiodiplodana	65
4.3.3	Determinação da viscosidade de lasiodiplodana	65
4.3.4	Determinação da massa molecular por GPC de lasiodiplodana	66
4.3.5	Análise SEM da lasiodiplodana	66
4.3.6	Análise XRD da lasiodiplodana.....	66
4.3.7	Análise FTIR da lasiodiplodana.....	67
4.3.8	Análise DSC da lasiodiplodana	67
4.4	Análises estatística e validação de dados	67
4.5	Métodos analíticos	67
4.5.1	Determinação de biomassa celular	67
4.5.2	Recuperação da lasiodiplodana.....	67
4.5.3	Determinação de umidade	68
4.5.4	Determinação de pH	68
4.5.5	Determinação das concentrações de açúcares totais e inibidores por HPLC.....	68
4.5.6	Determinação de compostos fenólicos totais	68
4.5.7	Determinação de açúcares redutores	69
4.5.8	Determinação de proteínas totais	69
4.5.9	Determinação de açúcares totais	69

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	Etapa 1 – Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	70
5.1.1	Caracterização química do BCA <i>in natura</i> e pré-tratado	70
5.1.1.1	Caracterização do hidrolisado hemicelulósico obtido com pré-tratamento ácido	71
5.1.2	Análise estrutural por SEM do BCA <i>in natura</i> e pré-tratado	72
5.1.3	Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada	74
5.2	Etapa 2 – Otimização e verificação da produção de lasiodiplodana	77
5.2.1	Ensaios fermentativo I – Glicose com diferentes fontes de nitrogênio	77
5.2.2	Ensaios fermentativo II – Glicose suplementado com farelo de soja e arroz	79
5.2.3	Ensaio fermentativo III – HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz	80
5.2.4	Ensaio fermentativo IV – Otimização da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz por DCCR 2 ²	81
5.2.5	Ensaio fermentativo V – Validação dos modelos matemáticos da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz	86
5.3	Etapa 3 – Caracterização física e química de lasiodiplodana	88
5.3.1	Determinação da pureza de lasiodiplodana	88
5.3.2	Determinação da solubilidade da lasiodiplodana	89
5.3.3	Determinação da viscosidade da lasiodiplodana	90
5.3.4	Determinação da massa molecular por GPC de lasiodiplodana	90
5.3.5	Análise SEM da lasiodiplodana	91
5.3.6	Análise XRD da lasiodiplodana	93
5.3.7	Análise FTIR da lasiodiplodana	93
5.3.8	Análise DSC da lasiodiplodana	94
6	CONCLUSÕES	96
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICES	110
	Apêndice A – Curva de calibração de GPC (GUERRA, 1998).	110
	Apêndice B – Curva de calibração de compostos fenólicos totais (SINGLETON; ROSSI, 1965).	111
	Apêndice C – Curva de calibração de açúcares redutores totais (MILLER, 1959).	112
	Apêndice D – Curva de calibração de proteínas totais (LOWRY <i>et al.</i> , 1951).	113
	Apêndice E – Curva de calibração de açúcares totais (DUBOIS <i>et al.</i> , 1956).	114

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda excessiva de energia e o crescente consumo de combustíveis fósseis contribuem para as mudanças climáticas, aumentando as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (CHANDEL *et al.*, 2018). Devido a isto, os desafios da sustentabilidade global relacionados à poluição, mudanças climáticas, perda de biodiversidade, energia, pobreza e segurança alimentar, estão aumentando (CHANDEL; DA SILVA, 2013). Por esse motivo, o uso de recursos energéticos alternativos, como a biomassa lignocelulósica, está recebendo atenção mundial para atender à crescente demanda por energia, além de mitigar a poluição ambiental (VALDIVIA *et al.*, 2016).

A biomassa lignocelulósica oferece uma oportunidade para a produção de açúcares de segunda geração (2G), atuando como matéria-prima na produção de biocombustíveis e outros bioprodutos de valor agregado e contribuindo para estabelecer uma economia biológica sustentável e integrada (CHANDEL; DA SILVA, 2013; VALDIVIA *et al.*, 2016). O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um importante resíduo agrícola em países como Brasil, Índia, China, Tailândia e outros.

Em geral, o BCA é composto por celulose (38–46%), hemicelulose (23–27%) e lignina (19–32%) (CANILHA *et al.*, 2012). A celulose consiste em unidades de glicose, enquanto a hemicelulose é constituída principalmente por xilose e outros açúcares como glicose, galactose, arabinose ou manose, sendo que a lignina é uma macromolécula complexa de polifenóis, que confere suporte estrutural às plantas e também atua como uma barreira impermeável para as enzimas celulolíticas (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017).

Portanto, os processos de pré-tratamento são necessários para quebrar a estrutura complexa do BCA, permitindo reduzir a cristalinidade da celulose e diminuir o teor de lignina (KUMAR; SHARMA, 2017). A combinação de pré-tratamentos pode ser benéfica para a maior conversão de carboidratos em açúcares do que os métodos individuais, o que gera uma maior recuperação dos açúcares durante a hidrólise enzimática.

Estes açúcares podem ser aproveitados em processos biotecnológicos para a obtenção de diferentes biomoléculas de interesse, tais como ácidos orgânicos, enzimas, proteínas, biocombustíveis, pigmentos, biossurfactantes, biopolímeros, entre outras (CHANDEL *et al.*, 2014; PHILIPPINI *et al.*, 2017). Estes últimos, os biopolímeros, são biomoléculas de grande importância biológica, especificamente os exopolissacarídeos (EPS), que são considerados polissacarídeos extracelulares, produzidos a partir de bactérias, fungos e algas (DONOT *et al.*, 2012; ZHU; DU; XU, 2016). Os fungos filamentosos são um importante grupo produtor

de EPS, que protegem ao microrganismo de fatores ambientais externos (VU *et al.*, 2009; VALAYIL; KURIAKOSE; JAYABASKARAN, 2015; KAMAL *et al.*, 2017).

Os EPS do tipo β -glucana apresentam grande potencial industrial devido às suas propriedades físicas de espessamento, estabilização, emulsificação e gelificação e podem ter múltiplas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (ZHU; DU; XU, 2016). As β -glucanas são homopolissacarídeos construídos a partir de monômeros de glicose em ligações β (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 6) (KAGIMURA *et al.*, 2015a).

A β -glucana lasiodiplodana (LAS) é sintetizada pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae*, descrita como um EPS com ligações β -(1 $\rightarrow$ 6), que possui atividade antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, anti-inflamatória e antiproliferativa em estudos realizados com células de câncer de mama (VASCONCELOS *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2012; KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018).

A produção dos EPS a partir de fungos depende do tipo de microrganismo, das condições físicas empregadas durante a fermentação, dos componentes nutricionais do meio de cultura e da relação carbono/nitrogênio (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). No entanto, sabe-se que a produção dos EPS a partir de meios sintéticos é geralmente limitada devido às necessidades fisiológicas do microrganismo e ao custo de produção, sendo necessário explorar novos substratos para a produção de LAS, como a biomassa lignocelulósica.

Os exemplos atuais são os hidrolisados de farelo de milho e arroz, que já foram utilizados eficientemente como substitutos aos meios sintéticos para a produção de LAS (PHILIPPINI, 2017). Os estudos subsequentes às fermentações concentram-se no produto obtido, em relação à sua caracterização física e química, o que representa uma etapa crucial na análise da amostra. A confirmação da presença de LAS na amostra requer técnicas de caracterização altamente específicas para determinar as propriedades químicas e físicas, morfologia, massa molecular, estrutura molecular, térmica e outras propriedades químicas com a máxima precisão (SRIKANTH *et al.*, 2015).

Assim, esse trabalho visou avaliar a produção de LAS pelo fungo filamentoso *L. theobromae* CCT 3966 a partir do estudo da relação carbono/nitrogênio, usando hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HCBCA) obtido após um pré-tratamento sequencial ácido/base do BCA, suplementado com farelo de arroz e farelo de soja, como fontes de nitrogênio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resíduos agroindustriais no mundo

O crescimento acelerado da população nos últimos anos, juntamente com o crescimento econômico favoreceram diretamente o investimento na indústria agroalimentar. Conforme relatado pela Valoral Advisors (2018), o setor agroalimentar recebeu um investimento de US\$ 83 bilhões. Estima-se que o crescimento da população mundial aumentará de 7,4 bilhões em 2016 para 8,1 bilhões em 2025 (FAO, 2017).

A indústria agroalimentar produz anualmente uma grande quantidade de resíduos que, se forem descartados no meio ambiente sem serem previamente tratados com procedimentos de eliminação, podem causar efeitos negativos para a saúde humana e animal. Esses resíduos quando não são tratados podem gerar mudanças climáticas, aumentando as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (SADH; DUHAN S.; DUHAN J. S., 2018).

Zuin e Ramin (2018) estimaram que cerca de 140 bilhões de toneladas de biomassa são geradas a cada ano no setor agrícola no mundo. Cerca de 5 bilhões de toneladas de resíduos são produzidas a partir da agricultura, incluindo bagaço e palha de cana-de-açúcar, farelo de arroz, farelo de soja, palha de arroz, farelo de trigo, folhas de algodão, torta de noqueira etc. (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017). Além disso, frutas, legumes, raízes e tubérculos têm as maiores taxas de desperdício de todos os alimentos, representando de 40 a 50% da quantidade total anual (RAVINDRAN *et al.*, 2018).

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica compreende os diferentes grupos de biomassa vegetal, representados por: resíduos agrícolas (palha de milho, palha de trigo, bagaço e palha de cana-de-açúcar etc.), resíduos florestais (resíduos da colheita de madeira, como galhos, folhagens, raízes etc.) e biomassas herbáceas e lenhosas (particularmente gramíneas perenes, tais como *Miscanthus*, grama de capim, capim-pradaria e espécies florestais de rotação curta, por exemplo, Eucalipto, Choupo e Robinia) (ULLAH *et al.*, 2015).

Devido ao aumento populacional mundial, os resíduos agrícolas estão sendo produzidos em maiores quantidades a cada ano, causando a insuficiência de manejo e subutilização desta potencial matéria prima, que é muitas vezes descartada ou simplesmente queimada (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

A Tabela 1 demonstra que a biomassa vegetal é composta principalmente pelos polissacarídeos celulose (40–80%), hemicelulose (15–30%) e lignina (10–25%) (HALDER *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas mais comuns.

Biomassa lignocelulósica	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Cinzas (% m/m)
Bagaço de cana-de-açúcar	30,2	56,7	13,4	1,9
Palha de arroz	39,2	23,5	36,1	12,4
Talos de milho	61,2	19,3	6,9	10,8
Serragem	45,1	28,1	24,2	1,2
Resíduos de beterraba	26,3	18,5	2,5	4,8
Palha de cevada	33,8	21,9	13,8	11
Talos de algodão	58,5	14,4	21,5	9,98
Palha de aveia	39,4	27,1	17,5	8
Talos de soja	34,5	24,8	19,8	10,39
Talos de girassol	42,1	29,7	13,4	11,17
Palha de trigo	32,9	24,0	8,9	6,7

Fonte: Adaptado de Sadh, Duhan S. e Duhan J. S., (2018)

Os polissacarídeos celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos e, portanto, podem ser utilizados como fontes potenciais de açúcares fermentáveis em processos biotecnológicos (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018), enquanto a lignina pode ser usada para a produção de resinas fenólicas e resinas epóxis, poliésteres, poliuretanos, ligantes em sistemas de argamassa e construção, sequestro de metal em soluções, hidrogéis, aditivos, etc. (STEWART, 2008; AHMAD; PANT, 2018).

Atualmente, o uso de biomassa lignocelulósica tem despertado grande interesse na conversão de subprodutos da agroindústria para a síntese de biocombustíveis (bio-óleo, bioetanol, biohidrogênio, biogás, singas etc.) e bioprodutos, tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), sorbitol, xilitol, glicerol, ácido láctico, ácido succínico, compostos fenólicos, biopolímeros, pigmentos, entre outros; além disso, a biomassa lignocelulósica também tem sido usada para o desenvolvimento de produtos de tecnologia avançada para armazenamento de energia, transporte, aplicações médicas, biossensores, remediação ambiental, etc. (KUMAR; SHARMA, 2017).

2.1.1.1 Celulose

A celulose (Figura 1) é um homopolímero semicristalino, consistindo de uma cadeia linear de unidades de glicose covalentemente ligadas por ligações β -(1→4) (HALDER *et al.*, 2019). A cadeia de celulose possui um grande número de grupos hidroxila que formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, resultando na estrutura cristalina da celulose (PU *et al.*, 2008).

O grau de polimerização (GP) da celulose depende da origem e pré-tratamento da matéria-prima, em resíduos agrícolas varia de aproximadamente 925 a 5500 unidades

monoméricas de glicose, possuindo o bagaço de cana e o arroz os mais baixos GP (em torno de 1000) (HALLAC; RAGAUSKAS, 2011).

Figura 1 – Estrutura química da celulose.

Fonte: Adaptado de Lee, Hamid e Zain (2014)

A celulose é insolúvel em água devido à sua alta massa molecular e baixa flexibilidade de suas cadeias geradas pela interação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares com as interações de van der Waals, permitindo uma disposição ordenada das cadeias de celulose (BRANDT *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero amorfo de baixa massa molecular com grupos funcionais incluindo acetila e metila, bem como ácidos urônicos ligados por ligações β-(1→3) e β-(1→4) (Figura 2) (HALDER *et al.*, 2019). Este polímero de cadeia curta tem um GP que varia de ~70 a 200 (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

A hemicelulose inclui resíduos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e/ou ácidos urônicos (glucuronídeos, metilgalacturônicos e galacturônicos), além de outros açúcares como ramnose e fucose que também podem estar presentes em pequenas quantidades (GÍRIO *et al.*, 2012). A xilana representa o principal componente da hemicelulose em madeiras duras e biomassa herbácea, enquanto a glucomanana é a hemicelulose mais abundante em madeiras moles (JUTURU; WU, 2013).

Figura 2 – Estrutura química dos compostos hemicelulósicos xilana e glucomanana.

Fonte: Adaptado de Lee, Hamid e Zain (2014)

Devido à sua natureza não cristalina, a hemicelulose é mais suscetível à depolimerização do que a celulose em condições ácidas (BRANDT *et al.*, 2013). No entanto, também é possível degradar a hemicelulose em soluções alcalinas fortes (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

2.1.1.3 Lignina

A lignina (Figura 3) é formada por compostos fenólicos, principalmente álcoois *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, unidos por ligações éter β -O-4 e algumas ligações C-O e C-C (SINGH *et al.*, 2014). Geralmente, atua como um ligante para unir os componentes celulósicos e é considerada a principal barreira contra a desconstrução da biomassa lignocelulósica (HALDER *et al.*, 2019). Além disso, também impede a permeabilidade da célula vegetal e aumenta a resistência contra ataques microbianos (LEE; HAMID; ZAIN, 2014). Zhao, Zhang e Liu (2012) apontam que a presença de lignina é um fator importante que limita a velocidade e extensão da hidrólise enzimática na liberação de açúcares e, portanto, é necessário eliminar a lignina por meio de pré-tratamentos que visam aumentar a digestibilidade da celulose.

Figura 3 – Estrutura química da macromolécula lignina.

Fonte: Adaptado de Lee, Hamid e Zain (2014)

A lignina *in natura* dificulta o acesso das enzimas aos seus substratos e, quando modificada após um pré-tratamento, adere-se à polpa celulósica, gerando uma união improdutiva das enzimas, podendo também ser uma fonte de compostos inibidores (vanilil, siringil e cinamil) para as enzimas e os microrganismos (BRANDT *et al.*, 2013). Isso leva à necessidade de usar cargas enzimáticas maiores para a hidrólise dos carboidratos presentes na biomassa vegetal, evitando a reciclagem eficiente das enzimas celulolíticas.

2.1.2 Bagaço de cana-de-açúcar no Brasil

Em 2019/2020, o Brasil ficou em primeiro lugar na produção de cana-de-açúcar no mundo, com 622,3 milhões de toneladas na safra em uma área de 8,38 milhões de hectares (CONAB, 2019a). Essa produção é destinada à indústria açucareira, com produção de 31,8 milhões de toneladas de açúcar e 30,3 bilhões de litros de etanol, sendo 10,5 bilhões de litros de etanol anidro e 19,8 bilhões de litros de etanol hidratado (CONAB, 2019a).

Um dos maiores subprodutos agroindustriais lignocelulósicos produzidos nesta indústria é o bagaço cana-de-açúcar (BCA), um resíduo fibroso de caules de cana-de-açúcar, que permanece após o esmagamento e a extração do caldo de cana. Sendo assim, que 1 tonelada moída de BCA corresponde a 125 kg de bagaço seco (BRIENZO; SIQUEIRA;

MILAGRES, 2009) ou 280 kg de bagaço úmido (CHANDEL *et al.*, 2012). Este resíduo lignocelulósico da indústria sucroalcooleira é quase totalmente utilizado pelas próprias fábricas como combustível para as caldeiras (PANDEY *et al.*, 2000). É constituído por celulose (38–46%), hemicelulose (22–30%), lignina (19–32%), cinzas (1–3%) e extrativos (5–9%) (CANILHA *et al.*, 2012).

As frações celulósica e hemicelulósica são compostas por uma mistura de polímeros de carboidratos e, portanto, diferentes estratégias têm sido previstas para converter os polissacarídeos em açúcares fermentáveis. A fração de celulose é rica em glicose, enquanto a fração hemicelulósica é rica em xilose e arabinose (CANILHA *et al.*, 2012).

2.2 Pré-tratamentos no bagaço de cana-de-açúcar

Devido à natureza recalcitrante do BCA, nas últimas décadas foram desenvolvidos vários métodos de pré-tratamento visando a remoção da lignina (altamente resistente à despolimerização) e da hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose, aumentando a suscetibilidade da celulose às enzimas (KELLER; HAMILTON; NGUYEN, 2003).

Os pré-tratamentos empregados no BCA (Figura 4) são classificados como físicos ou mecânicos (moagem, pirólise, micro-ondas); físico-químicos (explosão à vapor ou hidrotérmico, explosão de fibra com amônia (AFEX), explosão de CO₂, água quente); químicos (ácido diluído, meio alcalino, deslignificação oxidativa, ozonólise, organossolução, oxidação úmida); e biológicos (microrganismos degradadores de madeira, fungo pardo e branco, bactérias e arqueias) (CANILHA *et al.*, 2012).

Figura 4 – Pré-tratamentos empregados no processamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

Geralmente, os pré-tratamentos podem custar mais de 40% do custo total do processo de produção de bioetanol e representam os aspectos mais intensivos de energia na conversão de biomassa em produtos de alto valor agregado (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Esses pré-tratamentos aumentam a suscetibilidade do material à ação enzimática de celulases. A aplicação de um pré-tratamento eficaz deve preservar a utilidade dos açúcares, prevenindo a formação de potenciais inibidores ao processo fermentativo (LASER *et al.*, 2002), ser econômico ao utilizar produtos químicos de baixo custo e exigir equipamentos e procedimentos simples (MARTIN *et al.*, 2007).

2.2.1 Pré-tratamento ácido

A fração hemicelulósica do BCA representa até 30% do total de carboidratos que podem ser hidrolisados a açúcares monoméricos (xilose, arabinose, manose, glicose, galactose) e produtos de decomposição de monossacarídeos como oligômeros, fenóis, furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético (ZHANG *et al.*, 2011).

A concentração de açúcares redutores no hidrolisado é relativamente baixa devido à alta relação sólido/líquido durante o pré-tratamento ácido, o que torna necessária sua concentração antes da fermentação (CHENG *et al.*, 2008). O pré-tratamento com ácido diluído é um processo rápido e eficiente para a recuperação da hemicelulose (fração líquida) e de um material sólido chamado celulignina (CANILHA *et al.*, 2012).

O uso de diferentes ácidos diluídos no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e ácido sulfúrico, tem sido estudado para a obtenção de açúcares fermentáveis (AGBOR *et al.*, 2011).

O mais usado comercialmente é o ácido sulfúrico, devido ao seu baixo custo, e tem sido amplamente utilizado para o pré-tratamento de gramíneas, palha de milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar, abeto, álamo, palha e farelo de trigo e arroz (KUMAR; SHARMA, 2017). No entanto, apresenta certas desvantagens, como a produção de compostos inibitórios e a corrosão de equipamentos empregados na reação (LEE; JEFFRIES, 2011).

Rodríguez-Chong *et al.* (2004) estudaram o uso de ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico para o pré-tratamento do BCA e descobriram que o ácido nítrico diluído é o catalisador químico mais eficiente porque requer um curto período de catálise para obter uma alta concentração de açúcares e uma baixa concentração de inibidores, quando comparado com os outros ácidos.

Em geral, o ácido nítrico é pouco utilizado como catalisador no pré-tratamento da biomassa vegetal devido ao seu alto custo. No entanto, esse ácido tem sido usado em baixa

concentração por um curto tempo de reação para a otimização do processo de hidrólise da palha de milho, reduzindo consideravelmente o custo do processo (ZHANG *et al.*, 2011). Além disso, também foi relatado o uso de ácido nítrico diluído como catalisador no pré-tratamento de palha de arroz com o aproveitamento da formação de nitratos como fonte de nitrogênio (nitrato obtido após a neutralização por meio da lavagem da biomassa pré-tratada) na produção de bioetanol por *Pichia stipitis* (KIM *et al.*, 2014).

2.2.2 Pré-tratamento alcalino

Em comparação com os pré-tratamentos ácidos, os pré-tratamentos alcalinos são geralmente realizados à temperatura e pressão ambiente. Kumar *et al.* (2009) apontam que os reagentes alcalinos mais comumente utilizados são os compostos hidroxilados derivados dos sais de sódio, potássio, cálcio e amônio, sendo o hidróxido de sódio o mais eficaz.

O pré-tratamento com NaOH é um processo de deslignificação da biomassa no qual uma quantidade considerável de hemicelulose é degradada e a lignina é removida, aumentando eficientemente a acessibilidade da enzima à celulose (PANDEY *et al.*, 2000; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O resíduo fibroso que permanece após pré-tratamento alcalino da biomassa é conhecido como holocelulose (BASU, 2018).

Os reagentes alcalinos degradam as cadeias laterais de ésteres urônicos e ligações glicosídicas, levando à modificação estrutural da lignina, intumescimento e descristianização da celulose, e solvatação com hemicelulose (KUMAR; SHARMA, 2017). Em comparação com os pré-tratamentos ácidos, onde a hemicelulose é removida quase completamente, os pré-tratamentos alcalinos geram menos degradação dos açúcares (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017).

A eficácia do pré-tratamento da soqueira de algodão com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e ozônio foi estudada para sua posterior conversão enzimática em açúcares fermentáveis, sendo o pré-tratamento com 2% de NaOH a 121 °C por 90 min foi o método que apresentou o maior nível de deslignificação e conversão da celulose em açúcares fermentáveis (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Por outro lado, os pré-tratamentos alcalinos também podem ser efetuados a baixas temperaturas com longo tempo de reação e uma alta concentração da base, por exemplo, a palha de soja embebida em amônia 10% durante 24 h à temperatura ambiente resultou em uma diminuição considerável em seus teores de hemicelulose e lignina (XU *et al.*, 2007).

De acordo com Peng *et al.* (2009), o pré-tratamento sequencial do BCA com água destilada sob agitação e soluções aquosas de 1% e 3% de NaOH durante 3 h de reação a 50

°C, clivou significativamente as ligações éter entre a lignina e a hemicelulose da parede celular do bagaço, o que resultou na despolimerização substancial da hemicelulose e da lignina.

2.2.3 Pré-tratamento sequencial ácido-base

A seleção de uma tecnologia de pré-tratamento adequada é essencial para a conversão eficaz dos açúcares presentes no BCA e está diretamente ligada ao desenvolvimento de tecnologias para produção de bioprodutos (CHANDEL *et al.*, 2014). Atualmente, não existe uma estratégia estabelecida de pré-tratamento que se adapte a todos os tipos de biomassa lignocelulósica, e isso depende principalmente do tipo de biomassa lignocelulósica e dos bioprodutos desejados (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

Existem poucas tecnologias de pré-tratamento disponíveis que convertam eficientemente a fração de celulose da matriz lignocelulósica em açúcares (AGBOR *et al.*, 2011). Porém, o uso de uma combinação de duas ou mais estratégias de pré-tratamento pode aumentar significativamente a recuperação de açúcares e minimizar a produção de inibidores indesejados (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2018).

O pré-tratamento sequencial ácido-base esquematizado na Figura 5, demonstrou uma efetiva remoção da hemicelulose e da lignina no BCA, obtendo altos teores de glicose no hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HCBCA) a partir da reação enzimática da polpa celulósica (CHANDEL *et al.*, 2014).

Figura 5 – Estrutura química da macromolécula lignina.

Fonte: Autoria própria

Philippini *et al.* (2017) utilizaram um pré-tratamento sequencial ácido-base em BCA de diferentes variedades híbridas de cana-de-açúcar que extraiu aproximadamente 77% da

hemicelulose e 58% da lignina, gerando uma polpa celulósica com 80% de celulose, apresentando um rendimento máximo de sacarificação de 55,39%.

O HCBCA geralmente apresenta altas concentrações de açúcares fermentáveis, permitindo a obtenção de produtos de interesse comercial com maior valor agregado, por exemplo, xilitol, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, ração animal, alcaloides, biohidrogênio, biopigmentos, biopolímeros, etc. (CHANDEL *et al.*, 2012).

2.2.4 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica tem sido estudada há muito tempo como um método para despolimerizar a biomassa em açúcares fermentáveis para conversão em bioprodutos de interesse industrial, recentemente com foco na operação com cargas de sólidos altos.

Modenbach e Nokes (2013) apontam que a hidrólise enzimática realizada em cargas com alto teor de sólidos será necessária para tornar o processo de conversão lignocelulósica mais economicamente viável. Um processo é considerado “alto teor de sólidos” se a proporção de sólido/líquido for tal que muito pouca ou nenhuma água livre esteja presente na pasta, aproximadamente $\geq 15\%$ (m/m).

As condições ideais de reação para a degradação da polpa celulósica em açúcares redutores durante a hidrólise enzimática, inclui pH entre 4,8-5,0 e temperatura entre 45-50 °C, e requer três classes de enzimas celulasas e ocasionalmente hemicelulasas (CANILHA *et al.*, 2012):

1. Endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanases, que ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose;
2. Celobiohidrolases ou exoglucanase, que degradam ainda mais a molécula removendo unidades de celobiose das extremidades da cadeia;
3. β -glucosidases, que hidrolisa a celobiose para produzir glicose;
4. Para decompor a hemicelulose, são necessárias várias enzimas, como xilanase, β -xilosidase, glucuronidase, acetilesterase, galactomananase e glucomananase.

A conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustível e produtos de valor agregado está ganhando destaque globalmente. As bactérias, leveduras e os fungos são os principais grupos de microrganismos empregados industrialmente para a obtenção desses bioprodutos. Sendo assim, os fungos filamentosos representam a maior fonte de enzimas e metabólitos primários e secundários dentro da indústria biotecnológica.

2.3 O fungo *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* é um fungo filamentoso, endofítico, fitopatogênico, pertencente à família *Botryosphaeriaceae* (SANTOS *et al.*, 2017; FÉLIX *et al.*, 2018), representando a forma assexuada de *Botryosphaeria rhodina* (MUNIZ *et al.*, 2011). Devido ao seu ótimo crescimento em temperaturas que variam entre 27 e 33 °C, tem uma ampla distribuição no planeta em áreas tropicais e subtropicais (ALVES *et al.*, 2008).

De acordo com o banco de dados de distribuição de fungos e hospedeiros do Banco de Dados de Coleções de Fungos Nacionais dos EUA (*U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service*), existem cerca de 424 registros de literatura distribuídos em 71 locais em todo o mundo e 1195 hospedeiros associados a *L. theobromae* (FARR; ROSSMAN, 2019).

Em todo o mundo há registros de *L. theobromae* afetando as culturas de manga, abacate, mamão, banana, rambutão, lichia, uva, graviola, caju, cítricos, pêssegos entre outros, causando perdas econômicas nas diferentes etapas de produção (PICOS-MUÑOZ *et al.*, 2015). As doenças causadas nas culturas por este patógeno incluem morte progressiva (*dieback*), câncer, queima das folhas e podridão radicular em plantas e culturas lenhosas (SHAHBAZ *et al.*, 2009). Com menor frequência, também tem sido associado como patógeno oportunista em humanos, causando pneumonia e infecções subcutâneas, oculares e dos órgãos internos (MUNIZ *et al.*, 2011; PICOS-MUÑOZ *et al.*, 2015).

As principais características morfológicas são mostradas na Figura 6, onde *L. theobromae* distingue-se de outros gêneros proximalmente relacionados pela presença de hifas, formação de picnídios e estrias longitudinais em conídios maduros (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2010).

Figura 6 – *Lasiodiplodia theobromae* CBS164.96. A) Hifas; B) célula conidiogênica e conídios jovens; C) conídios maduros.

Fonte: Adaptado de Alves *et al.* (2008)

L. theobromae geralmente não esporula ou tem baixa esporulação nos meios comuns, o que dificulta a formação de esporos. No entanto, verificou-se que o meio ágar dextrose de batata suplementado com extrato de raiz de *Camellia sinensis* com pH 6,0 e 28 °C é adequado para o crescimento micelial, esporulação do fungo e produção de conídios, sendo que a exposição por períodos de luz aponta que não houve efeito significativo sobre o crescimento, mas a esporulação se incrementa com a presença da luz (SAHA *et al.*, 2008).

O fungo cresce em temperaturas entre 15 e 40 °C, com um ótimo crescimento a 28 °C (ALIKHANZADA; RAJPUT; SHAHZAD, 2006). Cunha *et al.* (2012) determinaram que a glicose e a sacarose foram as melhores fontes de carbono analisadas para o crescimento do fungo filamentosos. O fungo cresce em pH 3,0 a 8,0, com um pH ótimo de 6,0 (ALIKHANZADA; RAJPUT; SHAHZAD, 2006).

2.4 *Lasiodiplodia theobromae* como ferramenta biotecnológica

Os fungos filamentosos representam o maior grupo de microrganismos utilizados para a produção de diversos metabólitos secundários de importância industrial (VALAYIL; KURIAKOSE; JAYABASKARAN, 2015; KAMAL *et al.*, 2017). A síntese de compostos bioativos derivados de fungos endofíticos apresentam amplas variações de atividades biológicas em relação à atividade antitrombótica, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, prebiótica, anticoagulante e antiproliferativa em células de câncer de mama (VASCONCELOS *et al.*, 2013; KAMAL *et al.*, 2017).

O fungo *L. theobromae* é considerado um produtor biotecnologicamente relevante de compostos bioativos durante o seu metabolismo secundário. Esse fungo tem a capacidade de produzir uma grande variedade de biomoléculas, tais como lasiodiplodana (VASCONCELOS *et al.*, 2008), lasiodiplodina, de-O-metil-lasiodiplodina, cis-4-hidroxicinnamaldeído, ácido indole-3-carboxílico, 3-formilindole, etil hidrogênio fumarato, maleína (ALDRIDGE *et al.*, 1971), ácido jasmônico (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007), theobróxido (LI *et al.*, 2007), ciclohexenona (KITAOKA; NABETA; MATSUURA, 2009), colestanol glicosídeo (VALAYIL; KURIAKOSE; JAYABASKARAN, 2015), cladospirona B (KAMAL *et al.*, 2017), lasiodiplactona A (CHEN *et al.*, 2017), depsidona (UMEOKOLI *et al.*, 2018), lasiosana (KUMAR; MONGOLLA; POMBALA, 2018) e uma variedade de enzimas que estão geralmente envolvidas na degradação da parede celular das plantas e sua patogênese, como amilases, gelatinases, caseinases, celulasas, lipases, lacases, xilanases, pectinases e pectina liases (FÉLIX *et al.*, 2018).

Esta característica distintiva no fungo para produzir vários compostos com diferentes atividades biológicas demonstra o potencial de *L. theobromae* como uma alternativa biotecnológica com aplicações farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e químicas. Especificamente, os polissacarídeos naturais estão ganhando atenção comercial devido a suas funções e propriedades biológicas, que abrem a possibilidade de desenvolver aplicações tecnológicas a partir de processos biotecnológicos sustentáveis.

2.5 Polissacarídeos naturais

Os polissacarídeos naturais são macromoléculas de carboidratos poliméricos compostos de longas cadeias de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas (DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011). Estão amplamente disponíveis em quase todos os organismos vivos, inclusive em tecidos de sementes, caules e folhas de plantas herbáceas, fluidos corporais de animais, paredes celulares e fluidos extracelulares de bactérias, leveduras e fungos que podem ser usados comercialmente na indústria farmacêutica (GARCÍA, 2018).

A Tabela 2 apresenta diferentes exemplos de drogas comerciais baseadas em polissacarídeos obtidos de várias fontes naturais.

Tabela 2 – Drogas polissacarídicas naturais disponíveis comercialmente obtidas de diferentes fontes.

Classificação	Polissacarídeo	Drogas listadas
Polissacarídeo animal	Heparina	Crema de sódio de heparina; pastilha de sódio de heparina; gel de sódio heparina de baixa massa molecular; heparina cálcio para injeção; injeção de heparina (sódio, cálcio)
	Sulfato de condroitina	Comprimidos de sulfato de condroitina; cápsulas de sulfato de condroitina (sulfato de condroitina A sódico); injeção sulfato de condroitina (sulfato de condroitina sulfato de sódio)
Polissacarídeo vegetal	Ácido hialurônico	Injeção de hialuronato de sódio; colírio de hialuronato de sódio
	Polissacarídeo do astrágalo	Injeção de polissacarídeo do astrágalo (2-clorometil-4,4-nitrofenil-1,3-tiazole)
	Polissacarídeo de ginseng	Injeção de polissacarídeo de ginseng
Polissacarídeo microbiano	Fucoidano	Ingrediente ativo farmacêutico
	Lentinano	Injeção de lentinano; cápsulas de lentinano, comprimidos de polissacarídeo de <i>Lentinula edodes mycelia</i>
	Polissacarídeos de <i>Poria cocos</i>	Solução oral de polissacarídeo de <i>Poria Cocos</i>
	Polissacarídeo capsular	Vacina de polissacarídeos contra febre tifoide VI; vacina pneumocócica polivalente; vacina meningocócica polissacarídica grupo A e C
	Dextrana	Injeção de glicose - dextrana 40; colírio dextrana 70; dextrana 40 de baixa massa molecular

Fonte: Adaptado de Yu *et al.* (2018)

Os polissacarídeos são essenciais nas atividades macromoleculares, tais como armazenamento de energia, estrutura da parede celular (celulose e quitina) ou formação de gel (mucilagem), desempenhando um papel importante na comunicação célula-célula, adesão celular e reconhecimento molecular no sistema imunológico (XIE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2018).

A biossíntese e o acúmulo de polissacarídeos geralmente ocorrem após a fase de crescimento do microrganismo. Segundo Donot *et al.* (2012), os polissacarídeos produzidos por microrganismos podem ser classificados em três grupos principais, de acordo com sua localização na célula:

1. Polissacarídeos citosólicos, que fornecem uma fonte de carbono e energia para a célula, como o amido e o glicogênio;
2. Polissacarídeos que compõem a parede celular, incluindo peptidoglicano, ácido teicoico e lipopolissacarídeos;
3. Polissacarídeos que são excretados no ambiente extracelular na forma de cápsulas ou biofilmes.

2.5.1 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares de grande importância biológica, produzidos por fungos e algas, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio extracelular, na forma de limo (BARBOSA *et al.*, 2004; DONOT *et al.*, 2012).

Essas estruturas extracelulares desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e podem gerar uma camada capsular altamente hidratada para minimizar a desidratação frente às condições ambientais adversas e bloquear a infecção pela maioria dos bacteriófagos, fornecendo também maior aderência ao hospedeiro (VU *et al.*, 2009; WILLIAMS; LINHARDT; KOFFAS, 2018).

A estruturação dos EPS na formação dos biofilmes pode gerar propriedades de natureza aniônica na camada externa dos biopolímeros auxiliando na captura de minerais e nutrientes, permitindo a quelação de metais e íons que lhe conferem a capacidade de degradar alguns metais (DONOT *et al.*, 2012).

Com base nos monossacarídeos presentes na estrutura do EPS, há uma classificação que permite que sejam agrupados como homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Xie *et al.* (2016) indicaram que o carboidrato pode ser ligado linearmente ou ramificado em ambos tipos de EPS, em conformações complexas (Figura 7).

Figura 7 – Tipos de polissacarídeos: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. As diferentes cores representam diferentes monossacarídeos.

Fonte: Adaptado de Xie *et al.* (2016)

Os homopolissacarídeos são definidos como uma cadeia repetitiva de um único tipo de monossacarídeo, tais como dextrana e levana; enquanto um heteropolissacarídeo é composto de dois ou mais tipos de monossacarídeos, tais como xantana e gelana (DONOT *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2016). Vandamme, Baets e Steinbüchel (2002) apontam que existem três etapas essenciais na biossíntese do EPS:

1. Assimilação de um substrato de carbono;
2. Síntese intracelular de polissacarídeos;
3. Excreção do EPS.

2.5.2 Glucanas

As glucanas são homopolissacarídeos compostos por monômeros de glicose em ligações glicosídicas entre o carbono anomérico de um carboidrato e o grupo hidroxila de outro carboidrato na cadeia polimérica (EL KHOURY *et al.*, 2011). Apesar da simplicidade de sua composição de monossacarídeos, essas biomacromoléculas podem ser encontradas em uma ampla variedade de configurações ramificadas ou lineares, com ligações α e β ou ambas configurações anoméricas (CUNHA *et al.*, 2017).

Outros aspectos a se considerar para a diversificação das glucanas são a posição e a sequência das ligações glicosídicas ao longo da cadeia polimérica, o grau de ramificação e a frequência dos pontos da cadeia (KAGIMURA *et al.*, 2015a). Em sua maioria, as glucanas são considerados moléculas insolúveis, pois as cadeias interagem por meio de ligações de hidrogênio com resíduos de hidroxila, o que resulta em fortes associações entre cadeias (BACIC; FINCHER; STONE, 2009).

Estes biopolímeros são produzidos por bactérias, leveduras, fungos, algas e plantas (cereais, como aveia e cevada) (NOVAK; VETVICKA, 2009). As glucanas também são conhecidas como Modificadores da Resposta Biológica (MRB), por apresentarem atividade direta no sistema imunológico dos seres vivos (KAGIMURA *et al.*, 2015a).

Atualmente, vários estudos têm se concentrado em estudar as atividades biológicas dessas biomacromoléculas e seus efeitos na saúde humana. Esses biopolímeros de carboidratos apresentam atividade anticoagulante, antitrombótica, antioxidante e anti-inflamatória, além de terem sido descritos como eficazes na redução dos níveis de colesterol no sangue e no risco de problemas cardiovasculares, bem como no tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes e infecções microbianas (CUNHA *et al.*, 2017).

A estrutura química e conformacional das glucanas tem uma relação estreita com suas funções biológicas. As respostas biológicas dependem do número de unidades monoméricas, grau de polimerização, frequência das ramificações, tipo de conexões e comprimentos das cadeias, o que corresponde à estrutura primária (TADA *et al.*, 2009). Além disso, há vários estudos que descreveram a importância da conformação tridimensional da molécula, como a tripla hélice, em suas funções biológicas (GIESE *et al.*, 2008).

2.5.2.1 α -glucanas

As α -glucanas são homopolissacarídeos que são diferenciados por sua aparência estereoquímica com ligações glicosídicas, formando-se em uma posição axial da conformação de carboidratos (KAGIMURA *et al.*, 2015a).

Os exemplos mais comuns de α -glucanas microbianas incluem dextrana ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) com baixo grau de ramificação com resíduos de glicose α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 3) e α -(1 $\rightarrow$ 4) que é utilizado principalmente em soluções intravenosas e tratamentos terapêuticos no sangue (BASHARI *et al.*, 2013); glicogênio, que representa a maior reserva de energia nas células, é um polissacarídeo altamente ramificado de ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificações ligadas por α -(1 $\rightarrow$ 6) (WU *et al.*, 2011); pululana, apresenta unidades repetidas de maltotriose ligadas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) a outras unidades de maltotriose ao longo da cadeia polimérica, conforme apresenta-se na Figura 8 (SPATAREANU *et al.*, 2014); e amido, é um polissacarídeo vegetal ramificado de unidades de glicose ligadas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6) (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

As ligações α -(1 $\rightarrow$ 2) ou α -(1 $\rightarrow$ 6) formam estruturas mais flexíveis em bactérias, por outro lado as ligações de tipo α -(1 $\rightarrow$ 3) são observados principalmente em fungos filamentosos. As α -glucanas desempenham um papel crucial na ocultação das β -glucanas na

parede celular desses fungos, para evitar a identificação e exclusão pelo sistema imunológico do hospedeiro (GUPTA; PRUTHI P. A.; PRUTHI V., 2019).

Figura 8 – Estrutura química da pululana.

Fonte: Ferreira *et al.* (2015)

2.5.2.2 β -glucanas

As β -glucanas são homopolissacarídeos de monômeros de glicose construídos em posição equatorial a partir de monômeros de glicose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), β -(1 $\rightarrow$ 4), e β -(1 $\rightarrow$ 6) (RAHAR *et al.*, 2011; KAGIMURA *et al.*, 2015a; ZHU; DU; XU, 2016). As β -glucanas são fibras solúveis em água e na maioria dos solventes derivadas das paredes celulares de algas, bactérias, fungos, leveduras e plantas.

A botriosferana (Figura 9) é uma β -glucana que apresenta ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), produzida pelo fungo *B. rhodina* e que tem uma poderosa atividade imunomoduladora (STELUTI *et al.*, 2004).

Essas biomoléculas apresentam grande potencial industrial devido às suas propriedades físicas de espessamento, estabilização, emulsificação e gelificação, e podem ter múltiplas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e química, participando na elaboração de medicamentos para a utilização humana e animal, além da produção de rações (ZHU; DU; XU, 2016).

As β -glucanas encontradas em leveduras e fungos apresentam ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) e ocasionalmente ligações β -(1 $\rightarrow$ 6), mas as ligações β derivados de algumas leveduras geralmente apresentam maior atividade biológica em comparação as ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) (RAHAR *et al.*, 2011).

Por outro lado, as β -glucanas isoladas da cevada e aveia apresentam uma estrutura linear formada por unidades de glicose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) e β -(1 $\rightarrow$ 4), sendo atribuída a

propriedade de redução no aumento pós-prandial dos níveis de glicose e insulina no sangue após uma carga oral de glicose (CAVALLERO *et al.*, 2002). A Tabela 3 mostra as ações de cada tipo de β -glucanas dependentes da sua conformação, massa molecular, solubilidade e o grau de posicionamento de suas ramificações.

Tabela 3 – Relação entre a estrutura e a atividade antioxidante das β -glucanas obtidas de diferentes fontes.

Fonte	Organismo	Estrutura química da β -glucana	Atividade antioxidante
Fungo	<i>Entoloma livido-album</i>	Estrutura de β -(1→4) ramificada na posição O→3 com posição na cadeia lateral composta por três resíduos β -(1→3) glucopiranosil	Atividade de eliminação de radicais hidroxila Atividade de eliminação de radicais superóxido Redução de poder antioxidante férrico
	<i>Russula albonigra</i> (Krombh.) Fr.	Estrutura de β -(1→6) glucana ramificada na posição O→3 com posição na cadeia lateral composta por três resíduos β -(1→3) glucopiranosil	Atividade de eliminação de radicais hidroxila Atividade de eliminação de radicais superóxido Capacidade quelante de íons ferrosos Redução de potência e branqueamento de β -caroteno
	<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.)	β -(1→3) glucanas	Atividades de superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, peroxidação lipídica
	<i>Wolfiporia Extensa</i>	β -(1→3) glucanas β -(1→3) glucana e glucanas derivados (sulfonados, carboximetilados e carboximetilados sulfonados)	Atividades de superóxido dismutase e catalase Atividade de eliminação de radicais livres do DPPH Atividade de eliminação de ânion superóxido Atividade de eliminação de radicais hidroxila Determinação do dano oxidativo do ADN Efeitos na hemólise eritrocitária
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Estrutura β -(1→3) glucana com posição na cadeia ligada em (1-6)- β	Pesos úmidos teciduais foram utilizados para quantificar os ensaios bioquímicos
Cereal	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	β -(1→3, 1→4) glucana tratado com raios γ	Atividade de eliminação de DPPH Reduzindo a energia Inibição da peroxidação lipídica Potencial de quelante de íons ferroso
		β -(1-3,1-4) glucanas	Atividade antioxidante contra o dano oxidativo ao ADN Atividade de eliminação de radicais hidroxila Potencial antioxidante redutor de íons férricos
	<i>Avena sativa</i> (Aveia)	β -(1-3,1-4) glucanas	Atividade de eliminação de radicais hidroxila Redução de energia e atividade quelante de metais
Vegetal	<i>Aconitum kusnezoffii</i> Reichb	β -(1-3,1-4) glucanas	Atividade de eliminação de radicais hidroxila Atividade de eliminação de ânion superóxido Atividade de eliminação de H_2O_2 Efeito quelante no íon ferroso reduzindo a energia

Fonte: Adaptado e modificado de Cunha *et al.* (2017)

Figura 9 – Estrutura química de botriosferana sintetizada por *Botryosphaeria rhodina*.

Fonte: Adaptado e modificado de Cunha *et al.* (2017)

As β -glucanas com menor ramificação e menor polimerização, tais como β -glucanas de plantas com ligação β -(1 $\rightarrow$ 4), são caracterizados como solúveis, enquanto as insolúveis, como as β -glucanas isolados de fungos com ligações de tipo β -(1 $\rightarrow$ 6), apresentam maior polimerização e maior número de ramificações (ANDRADE; ORLANDO, 2018).

2.5.2.2.1 Aplicações industriais das β -glucanas

Em 2018, o mercado global das β -glucanas foi estimado em US\$ 715,6 bilhões, com uma expectativa de expansão para 2024 de US\$ 1.011,3 bilhões (FORECAST, 2019).

As β -glucanas apresentam características tecnológicas e biológicas que geram grande interesse por suas propriedades físico-químicas em aplicações no setor de alimentos e por sua atividade biológica nas indústrias cosmética, farmacêutica e médica. Suas principais aplicações incluem o uso como suplemento alimentar (nutracêutico) ou como ingrediente alimentício (prebiótico), na composição de suprimentos médico-hospitalares e produtos cosméticos (CUNHA *et al.*, 2017).

Dentro da indústria alimentícia, as β -glucanas são a principal fibra presente na cevada e na aveia, por isso é comum utilizá-las como fibras alimentares funcionais (ZHU; DU; XU, 2016). Nessa indústria, as propriedades físico-químicas das β -glucanas têm sido exploradas extensivamente, especialmente como intensificadores de viscosidade, agentes gelificantes, emulsificantes, substitutos de gorduras, emulsionantes e ligantes de óleo, pela sua capacidade de retenção de água, bem como um ingrediente prebiótico em alimentos funcionais (AHMAD *et al.*, 2012).

Para a indústria farmacêutica e médica, foi desenvolvida uma série de ensaios clínicos sobre os efeitos benéficos para a saúde sobre a administração oral de preparações de β -

glucanas (SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014). As β -glucanas da aveia apresentam características de redução do colesterol e triglicérides no plasma, e possivelmente atuam na prevenção e tratamento do diabetes *mellitus*, reduzindo os níveis de glicose (TUNGLAND; MEYER, 2002). No entanto, estudos investigam os possíveis efeitos como probióticos na resposta imune, sendo que essa atividade é observada na imunidade inata e adaptativa, devido à sua ação anticâncer e ação quimiopreventiva (ANDRADE; ORLANDO, 2018).

Atualmente, na indústria cosmética as β -glucanas são utilizadas como ingrediente essencial para o preparo de produtos como cremes faciais, loções, géis, maquiagens e produtos capilares, além daqueles voltados para o tratamento de acne, celulite, dermatite e queimaduras (CUNHA *et al.*, 2017). Pillai, Redmond e Röding (2005) demonstraram a penetração das β -glucanas de aveia na epiderme e derme da pele humana, além de avaliar clinicamente sua eficácia na redução de linhas finas e rugas, suportando o uso da β -glucana no cuidado e manutenção da pele saudável e no tratamento cosmético dos sinais de envelhecimento.

2.5.2.2.2 Biossíntese de β -glucanas

A síntese extracelular de homopolissacarídeos, como as β -glucanas, são realizadas por enzimas específicas segregadas e pode acontecer fora da célula ou dentro da parede celular (DONOT *et al.*, 2012).

Um exemplo, é a escleroglucana, produzida por várias espécies de fungos filamentosos do gênero *Sclerotium*. Esta β -glucana, é um homopolímero neutro solúvel em água composto por uma cadeia linear de glicose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 3) e apresenta ramificações de glicoses do tipo β -(1 $\rightarrow$ 6) em cada terceira subunidade da cadeia (SURVASE *et al.*, 2007).

A biossíntese de escleroglucana de *Sclerotium rolfsii* foi estabelecida a partir de dados transcriptômicos vinculados ao comportamento fisiológico do fungo filamentoso (SCHMID; MEYER; SIEBER, 2011). De acordo com o anterior, a biossíntese da escleroglucana na Figura 10, consiste de:

1. Absorção de glicose na célula por difusão facilitada e fosforilação em glicose-6-fosfato através da hexoquinase;
2. A seguinte conversão em glicose-1-fosfato por fosfoglicomutase que permite o início da formação desta β -glucana;
3. Posteriormente, UTP-glicose-1-fosfato uridil transferase sintetiza a UDP-glicose a partir de glicose-1-fosfato e UTP;

4. A β -(1 $\rightarrow$ 3) glucana sintase polimeriza a cadeia principal com ligações β -(1 $\rightarrow$ 3);
5. Infelizmente, a enzima que catalisa a formação das ramificações β -(1 $\rightarrow$ 6) na transferência de glicose em cada terceira molécula da cadeia linear ainda não foi identificada, mas os autores apontam que pode ser atividade catalítica da enzima glicosiltransferase ou glicosidase.

Figura 10 – Biossíntese de escleroglucano a partir de *Sclerotium rolfii* ATC15205.

Fonte: Adaptado e modificado de Schmid, Meyer e Sieber (2011)

2.6 Lasiodiplodana

A lasiodiplodana (LAS) foi descrita pela primeira vez como um EPS linear sem ramificações que apresenta ligações β -(1 $\rightarrow$ 6) entre monômeros de glicose com uma estrutura de tripla hélice, sintetizada pelo fungo filamentoso *L. theobromae* (VASCONCELOS *et al.*, 2008) e apresenta massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da (MALFATTI *et al.*, 2017). Este biopolímero (Figura 11) é secretado em meio de cultura rico principalmente em glicose ou maltose durante fermentação submersa, sendo que o extrato de levedura pode contribuir a melhorar sua produção (CUNHA *et al.*, 2012).

Figura 11 – Estrutura química da lasiodiplodana obtida por *Lasiodiplodia theobromae*.

Fonte: Adaptado e modificado de Cunha *et al.* (2017)

Apresenta comportamento pseudoplástico e alta viscosidade a 25 °C, as quais aumentam na presença de CaCl_2 a 60 °C (CUNHA *et al.*, 2012). Demonstrou-se que LAS tem funções biológicas diferentes que incluem atividade antioxidante, atividade protetora contra danos no DNA induzidos pela doxorubicina, atividades hipoglicemiantes e transaminases, e atividade anticancerígena em células de câncer de mama MCF-7 (CUNHA *et al.*, 2012; TURMINA *et al.*, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2017; CALEGARY *et al.*, 2017).

Estudos recentes sugerem que a LAS pode ser eficaz na prevenção da neurotoxicidade induzida pela penicilamina, atenuando significativamente a peroxidação lipídica no córtex cerebral de ratos, bem como atenuando os danos causados pelos episódios convulsivos do autismo (MALFATTI *et al.*, 2017). Além disso, Cunha *et al.* (2019) apontam que é possível usar LAS como agente indutor (fitossanitário defensivo) contra a resistência em diferentes culturas. Este novo conhecimento estabeleceu o caminho para contribuir efetivamente no controle de pragas e doenças no setor agrícola.

A bioatividade das β -glucanas está associada às suas propriedades físico-químicas e estruturais, incluindo solubilidade, massa molecular, hidrofilicidade, entre outras, de modo que as modificações químicas além do exposto acima, podem gerar novas atividades biológicas ou melhorá-las (PURWANDARI *et al.*, 2018). A Figura 12 mostra as estruturas quimicamente modificadas (sulfonação, carboximetilação, fosforilação e acetilação) da lasiodiplodana que lhe confere diferentes atividades biológicas:

- A. Sulfonação: gera-se quando o grupo sulfonato ($-\text{SO}_3\text{H}$) é adicionado ao grupo hidroxila do monossacarídeo e, conseqüentemente, apresenta atividade anticoagulante, antimicrobiana contra bactérias e leveduras e incrementa sua capacidade antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

- B. Carboximetilação: o grupo carboxila ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) é adicionado ao grupo hidroxila, gera um aumento da solubilidade em água e melhora sua atividade antioxidante (KAGIMURA *et al.*, 2015b; CALEGARI *et al.*, 2017).
- C. Fosforilação: acontece quando o grupo fosfato ($-\text{PO}_3\text{H}$) é inserido no grupo hidroxila, ocorrendo uma fosforilação, que induz melhores atividades biológicas anti-inflamatórias, antivirais e antiproliferativas quando é comparada com uma molécula não modificada (KAGIMURA *et al.*, 2015a).
- D. Acetilação: o polímero é modificado por acetilação adicionando um grupo acetila ($-\text{COCH}_3$) ao grupo hidroxila, o que gera um aumento na sua atividade antioxidante (LUNA *et al.*, 2018).

Figura 12 – Representação estrutural da lasiodiplodana modificada quimicamente. A) Sulfonação; B) carboximetilação; C) fosforilação; D) acetilação.

Fonte: Adaptado de Kagimura *et al.* (2015a)

Destaque-se que, quando o LAS é liofilizado, o grau de solubilidade diminui consideravelmente, mas sua capacidade de absorção se incrementa. Uma característica distintiva deste EPS, é ser solúvel em água quando é secretado no meio de cultura durante a fermentação submersa e ser facilmente coletado por precipitação com etanol, sendo sua recuperação economicamente viável e simples quando comparada com outros procedimentos extrativos para obter glucanas da parede celular dos fungos ou leveduras (KAGIMURA *et al.*, 2015a).

2.7 Fermentação submersa para produção de lasiodiplodana

Mahapatra e Banerjee (2013) apontam que a produção do EPS a partir de fungos depende do tipo de microrganismo utilizado, das condições físicas durante a fermentação e dos componentes nutricionais do meio. Na Tabela 4 observa-se diferentes configurações e condições físicas e nutricionais do processo fermentativo na produção de LAS.

Tabela 4 – Produção de lasiodiplodana a partir por fermentação submersa

Tipo de fermentação	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	LAS (g/L)	Condições da fermentação	Referência
Frascos Agitados	Glicose 20 g/L	Extrato de levedura 2 g/L	2,46	pH 6, 28 °C, 180 rpm, 120 h	Cunha <i>et al.</i> (2012)
	Glicose 40 g/L	Extrato de levedura 2 g/L	2,05		
	Frutose 40 g/L	Extrato de levedura 2 g/L	1,55		
	Maltose 40 g/L	Extrato de levedura 2 g/L	2,08		
	Sacarose 40 g/L	Extrato de levedura 2 g/L	1,36		
	Sacarose 50 g/L	Sais de Vogel 2 g/L	2,2		
	HFM 40 g/L	-	7,47		
Biorreator com tanque agitado	Glicose 60 g/L	Sais de Vogel 2 g/L	6,32	pH 5,5, 28 °C, 180 rpm, 0,8 vvm, 72 h	Cunha <i>et al.</i> (2012)
	Glicose 20 g/L	Sais de Vogel 2 g/L	9,53	pH 5,5 28 °C, 400 rpm, 0,8 vvm, 72 h	Kagimura <i>et al.</i> (2015c)
	Glicose 20 g/L	Extrato de levedura 2 g/L, K ₂ HPO ₄ 2 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 2 g/L	9,6	pH 5,5 48 °C, 180 rpm, 0,8 vvm, 48 h	Theis <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autoria própria

Cunha *et al.* (2012) avaliaram a produção de LAS em fermentação submersa baseada no efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose e sacarose) além de fontes de nitrogênio orgânicas (peptona e extrato de levedura) e inorgânicas (KNO₃, (NH₄)₂SO₄ e

ureia), demonstrando que glicose e maltose apresentaram as maiores concentrações de LAS, com 2,05 g/L e 2,08 g/L, respectivamente, enquanto a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura (adicionado à glicose), com maior produção de LAS, sendo de 2,46 g/L.

Embora, os estudos subsequentes tenham praticamente mantido as mesmas condições, uma mudança no substrato com uma alta concentração de 50 g/L de sacarose adicionada com sais de Vogel permitiu obter 2,2 g/L de LAS (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

No caso das fermentações em biorreator com tanque agitado com 60 g/L de glicose e 180 rpm foram produzidos 6,32 g/L de LAS nas primeiras 72 h (CUNHA *et al.*, 2012). Kagimura *et al.* (2015a) realizaram um experimento semelhante em biorreator com tanque agitado, com uma baixa concentração de glicose (20 g/L) e a agitação foi aumentada para 400 rpm, como se mostra na Tabela 4, com obtenção de 9,53 g/L de LAS no mesmo período de 72 h, indicando que o fator oxigênio é imprescindível na obtenção desse EPS.

Resultados similares na produção de LAS (9,6 g/L) usando biorreator com tanque agitado foram avaliados por Theis *et al.* (2017), usando extrato de levedura como fonte de nitrogênio e substituindo os sais de Vogel por K_2HPO_4 (2 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/L), gerando a mesma quantidade de LAS com a mesma concentração de carbono (20 g/L) em um menor tempo (48 h). Sabe-se que a produção do EPS a partir de meios sintéticos é geralmente limitada devido às necessidades fisiológicas do microrganismo e ao custo de produção, permitindo explorar novos substratos para a produção de LAS.

Estudos subsequentes de Philippini *et al.* (2018) demonstraram que o hidrolisado de farelo de milho (HFM) pode ser utilizado eficazmente como substituto das fontes de carbono e nitrogênio em meios sintéticos na produção de LAS, atingindo um máximo de 7,47 g/L e um crescimento celular de 10,89 g/L com consumo de 93% dos açúcares após 96 h de fermentação. Sabe-se que a produção do EPS a partir de meios sintéticos é geralmente limitada devido às necessidades fisiológicas do microrganismo e ao custo de produção, permitindo explorar novos substratos para a produção de LAS.

2.7.1 Requerimentos nutricionais

Os microrganismos necessitam de uma fonte de nutrientes para a biossíntese de material celular e seu funcionamento, manutenção e reprodução celular (KAMPEM, 2014). As fontes de carbono e nitrogênio são os principais componentes dos meios nutritivos, que devem garantir o melhor crescimento do microrganismo e a maior eficiência na produção dos EPS.

Tem sido demonstrado que diferentes fontes de carbono induzem a síntese de EPS com composição, estrutura e atividades diferentes (MANZONI; ROLLINI, 2001). Com relação

à fonte de nitrogênio, o extrato de levedura e o farelo de milho são favoráveis para a produção de EPS e crescimento da biomassa micelial em fungos (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; WASSER, 2009).

Os micronutrientes são geralmente mais utilizados para a produção dos EPS como estabilizadores de enzimas, vitaminas, proteínas e nucleotídeos. Alguns exemplos são K_2HPO_4 , KCl, $MgSO_4$, $FeSO_4$, NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MnSO_4$ (BARBOSA *et al.*, 2004).

Durante o crescimento, o problema da transferência de oxigênio para a biomassa celular aumenta com o incremento da viscosidade da cultura, que é frequentemente relacionada com a secreção dos EPS (CUNHA *et al.*, 2012).

Assim, o rendimento e a composição dos EPS produzidos pelos fungos dependem principalmente das condições da fermentação, como temperatura, pH e composição do meio (ERGENE; AVCI, 2017). Embora, nas fermentações submersas, os fatores mais importantes que influenciam são agitação, inóculo e composição do meio (MANZONI; ROLLINI, 2001). É necessário o controle da morfologia dos fungos e do ambiente para aumentar a produtividade dos EPS.

2.7.2 Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento adequado de microrganismos e obtenção de metabólitos secundários como os EPS (BACH *et al.*, 2011). Barbosa *et al.* (2004) apontam que os polissacarídeos podem ser produzidos somente em condições limitantes de nitrogênio e que altos níveis no meio de cultura reprimem a formação de EPS.

O nitrogênio é frequentemente um nutriente limitante durante a fermentação alcoólica em batelada por *Saccharomyces cerevisiae*, que mostra uma taxa máxima de fermentação atingida precocemente durante o processo, pois está intimamente relacionada com a quantidade de nitrogênio assimilável presente no mosto e as adições de sal de amônio que diminuem drasticamente o tempo de fermentação (MANGINOT; ROUSTAN; SABLAYROLLES, 1998).

O extrato de levedura é considerado a melhor opção para o crescimento microbiano, porém tem sido demonstrado que seu custo é muito alto, contribuindo com 30% do custo total do processo (KWON *et al.*, 2000). Atualmente, o alto custo do extrato de levedura está dificultando sua maior aplicação na produção industrial em larga escala de diferentes bioprodutos (AGUSTINI; SANJAYA, 2019).

Para reduzir os custos de produção, o uso de várias fontes de nitrogênio de baixo custo, como pó de licor de milho (XI *et al.*, 2012), hidrolisado de levedura de cerveja (JIANG *et*

al., 2010), e até uma mistura de pó de licor de milho e farinha de amendoim (SHEN *et al.*, 2015) têm sido extensivamente investigados para a produção de bioprodutos de interesse industrial. Os subprodutos das indústrias agrícola e alimentícia, como farelo de soja, arroz, algodão, são relativamente baratos e disponíveis no mercado (SHARMA *et al.*, 2002).

Por esse motivo, é necessário implementar estratégias de suplementação de nitrogênio por meio de opções de biomassas renováveis e nutricionalmente abundantes em aminoácidos e proteínas. Pode-se citar, como exemplo, o farelo de soja e o farelo de arroz. Foi demonstrado que os extratos proteicos derivados de farelo de soja e arroz contêm aminoácidos essenciais, úteis para o crescimento dos microrganismos, além de exibir atividade antioxidante (WATCHARARUJI *et al.*, 2008).

Yoo *et al.* (1997) foram os primeiros a relatar o potencial do hidrolisado de soja com a adição de cinco vitaminas B na produção de ácido lático, enquanto Martiniano *et al.* (2014) demonstraram que o extrato de farelo de arroz poderia ser utilizado como uma promissora fonte de nitrogênio de baixo custo, para a produção de etanol de segunda geração a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA).

2.7.2.1 Farelo de soja

A produção de soja para a safra 2019/2020 no Brasil deve ser de 120,9 milhões de toneladas (CONAB, 2019b). Durante o processo de moagem dos grãos de soja para extração do óleo é obtido o farelo de soja.

O farelo de soja é responsável por aproximadamente 62% dos ingredientes proteicos utilizados em dietas de todos os animais produtores de alimentos e é a principal fonte de proteína utilizada em dietas para suínos em todo o mundo (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004). As características do farelo de soja que o tornam atrativo são o seu conteúdo desejável de nitrogênio (aminoácidos e proteínas), disponibilidade, alta consistência e baixo custo em comparação com outras fontes de proteína de alta qualidade (GRIESHOP; FAHEY, 2001).

Este resíduo é uma importante fonte de nitrogênio que apresenta principalmente aminoácidos, tais como triptofano, treonina e lisina em sua composição (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007). Também estão presentes 51,8 a 52,3% de proteínas, e aminoácidos essenciais (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina), aminoácidos não essenciais (alanina, aspartato, cistina, glutamato, glicina, prolina, serina, tirosina), macrominerais (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, sódio, cloreto) e microminerais (alumínio, bário, boro, cromo, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel, selênio) (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004).

Há estudos que demonstraram que o farelo de soja pode ser usado como fonte de nitrogênio e como um substrato fermentável na produção microbiana de lipases (UL-HAQ *et al.*, 2002), α -galactosidases (SINGHANIA *et al.*, 2009), proteases (Joo; Chang, 2005), ácido láctico (YOO *et al.*, 1997, LI *et al.*, 2006), ácido fumárico (ZHANG; YU; YANG, 2015). Além disso, Chi e Zhao (2003) estudaram o efeito de diferentes concentrações de glicose a partir do hidrolisado do farelo de soja sobre a produção de pululana por *Rhodotorula bacarum*, demonstrando que a produção de EPS a partir de farelo de soja, como fonte de nitrogênio é possível e viável economicamente.

2.7.2.2 Farelo de arroz

A safra 2019/20 apresenta estimativa nacional de 10,5 milhões de toneladas com uma área destinada à rizicultura na ordem de 1,8 milhões de hectares (CONAB, 2019b). Desse total, cerca de 76,6% correspondem ao cultivo irrigado de arroz e os outros 23,4% estão relacionados ao sistema de produção em condição de sequeiro.

O farelo de arroz é um subproduto do processamento dos grãos de arroz, comumente usados para alimentação animal e composto por cerca de 15 a 19,7% de lipídios, 34,1 a 52,3% de carboidratos, 7 a 11,4% de fibras, 6,6 a 9,9% de cinzas e 10 a 15% de proteínas (JIAMYANGYUEN; SRIJESDARUK; HARPER, 2005; TSIGIE *et al.*, 2012).

Também contém aminoácidos essenciais (ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, amônio, histidina, arginina), vitaminas (B1-tiamina, B3-niacina e E-tocoferol), ácidos graxos (ácido tetradecanóico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido α -linolênico, ácido araquídico) e minerais (cálcio, ferro, sódio, zinco, potássio) (FACCIN *et al.*, 2009; FARIA; BASSINELLO; PENTEADO, 2012).

Pesquisas recentes demonstram a possibilidade de utilizar o hidrolisado de farelo de arroz (HFA) como uma fonte rica de nutrientes de baixo custo para obter diferentes bioprodutos, como a produção microbiana de óleo (TSIGIE *et al.*, 2012), polihidroxicanoatos (OH *et al.*, 2015), xilitol (SILVA; ROBERTO, 2001), ácido láctico (LI *et al.*, 2015), butanol (AL-SHORGANI; KALIL; YUSOFF, 2012), etanol (TODHANAKASEM *et al.*, 2012).

Razack, Velayutham e Thangavelu (2013) desenvolveram meios de menor custo a partir do farelo de arroz e otimizaram seus componentes como a fonte de carbono e nitrogênio para produção de EPS a partir de *Bacillus subtilis*.

2.7.3 Fonte de carbono

A biomassa celular é constituída tipicamente por 50% de carbono, em peso seco, indicando sua importância, além de servir como fonte de energia. Consequentemente, uma grande parte deste carbono entra nas vias do metabolismo energético e finalmente é secretado da célula como CO₂ (principal produto do metabolismo respiratório) ou como uma mistura de CO₂ e compostos orgânicos (produtos finais inerentes ao metabolismo fermentativo) (KAMPEN, 2014). Nas fermentações, a fonte de carbono representa o maior custo individual da matéria-prima, no entanto, pode ser a menos dispendiosa se forem utilizados resíduos agrícolas (SADH; DUHAN S.; DUHAN J. S., 2018).

Os processos fermentativos são muito caros em nível industrial devido aos gastos energéticos e aos requerimentos nutricionais dependentes de cada tipo de metabolismo microbiano, principalmente em relação às fontes de carbono e de nitrogênio (KAMPEN, 2014). Esta limitação econômica abre a possibilidade de explorar meios de cultura alternativos mais complexos nutricionalmente e de baixo custo, que substituam os meios convencionais, tais como os hidrolisados lignocelulósicos.

Várias fontes de carbono foram estudadas e *L. theobromae* demonstrou ter a capacidade de metabolizar com maior afinidade açúcares de seis carbonos, tais como glicose, maltose, sacarose, frutose, para a produção de LAS. Os dois primeiros açúcares são considerados as melhores fontes de carbono para a produção do biopolímero (CUNHA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015; KAGIMURA *et al.*, 2015c).

O trabalho de pesquisa desenvolvido por Philippini (2017), foi o primeiro em produção de LAS a partir de diversos hidrolisados de subprodutos agrícolas. Philippini (2017) avaliou o potencial de produção de LAS por *L. theobromae* usando hidrolisados dos farelos de milho e arroz, que apresentaram uma alta concentração de carboidratos e permitiram a produção desse biopolímero a partir de subprodutos de biomassa vegetal. Foi também realizado um estudo para avaliação do potencial de utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) para a produção deste EPS, contudo foi obtido 3,9 g/L de biomassa celular com ausência da formação de LAS, houve também alteração morfológica do fungo na forma de levedura ao utilizar este meio.

2.7.4 Técnicas de caracterização de lasiodiplodana

Conforme o mencionado no item 2.5.1, os EPS são compostos de unidades repetidas de monossacarídeos, que podem se ligar a proteínas (glicoproteínas), lipídios (glicolipídios),

ácidos (por exemplo, ácido glucurônico, ácido galacturônico ou ácido manurônico) e/ou DNA extracelular (MEISEN; WINGENDER; TELGHEDER, 2008).

Os EPS consistem principalmente de um número limitado de diferentes tipos de monossacarídeos ou seus derivados, e mostram uma alta diversidade através de várias combinações de unidades de monossacarídeos dispostas em configurações lineares e/ou ramificadas. As ligações na cadeia mais comuns das sequências de monossacarídeos são as ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) ou β -(1 $\rightarrow$ 3), que exibem rigidez estrutural característica, enquanto outras ligações, como as ligações β -(1 $\rightarrow$ 2) ou β -(1 $\rightarrow$ 6), são consideradas estruturas flexíveis (MISHRA; JHA, 2013).

A diversidade estrutural e as características físico-químicas dos biopolímeros são exibidas por diferentes EPS, sendo que a LAS não é a exceção. Srikanth *et al.* (2015) apontam vários métodos analíticos adotados para a análise de EPS, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), geralmente utilizada para analisar a composição de monossacarídeos ou por métodos avançados de cromatografia por permeação em gel (GPC), enquanto os grupos funcionais são investigados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (NMR). A espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e difração de raios X (XRD), também são utilizados para análises estruturais e qualitativas dos EPS (SRIKANTH *et al.*, 2015).

Atualmente, o grupo de pesquisa de Cunha *et al.* (2019) lideram o estudo das propriedades físicas e químicas da LAS, que incluem parâmetros cristalográficos, morfologia estrutural, viscosidade e solubilidade em água. Também foram os primeiros em reportar uma análise térmica extensa, como um grupo de técnicas para avaliar a relação entre uma propriedade da amostra e a temperatura na qual ela é submetida de maneira controlada. As técnicas incluem TGA (análise termogravimétrica), DTG (análise termogravimétrica derivada), DTA (análise térmica diferencial) e DSC (calorimetria de varredura diferencial), que foram usadas para caracterização térmica de LAS modificado quimicamente e sem modificação.

Com o exposto, este trabalho propõe desenvolver um pré-tratamento sequencial no BCA para obter HCBCA com elevada concentração de glicose (fonte de carbono), e utilizar como estratégia a suplementação com farelos de soja e arroz (fontes de nitrogênio) para a formulação de meios de cultura (otimização da relação carbono/nitrogênio) baseado em matérias-primas renováveis e econômicas que possibilitem o uso do BCA na produção de LAS pelo fungo *L. theobromae*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana (LAS) pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 a partir do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HCBCA), suplementado com extratos de farelos de soja e arroz como fontes de nitrogênio.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes pré-tratamentos (ácido, alcalino e ácido-base) no bagaço de cana-de-açúcar (BCA), considerando baixas cargas de sólidos totais na hidrólise enzimática;
- Obter e caracterizar físico-quimicamente o HCBCA a ser utilizado na preparação dos meios de cultura;
- Verificar a produção do biopolímero LAS, utilizando meios sintéticos elaborados com glicose e suplementados com diferentes fontes de nitrogênio;
- Verificar o efeito da suplementação dos farelos de soja e arroz como fontes alternativas de nitrogênio no HCBCA para a obtenção de LAS;
- Avaliar o potencial biotecnológico do HCBCA suplementado com farelos de soja e arroz na produção de LAS, estudando a relação carbono/nitrogênio na produção de LAS e biomassa celular por Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR 2²).
- Otimizar e verificar a produção de LAS em HCBCA suplementado com farelos de soja e arroz por fermentação submersa, utilizando modelagem matemático com Eureka Nutonian, Inc., Boston, EUA;
- Caracterizar o grau de pureza, massa molecular, solubilidade e propriedades viscosimétricas de LAS produzida em HCBCA;
- Caracterizar a estrutura física e composição química de LAS por diferentes técnicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi efetuado na maior parte no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBIOS) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP). O projeto está relacionado com o aproveitamento de resíduos agroindustriais, inseridos a processos fermentativos na obtenção de biopolímeros. Para uma maior compreensão do tema, o trabalho foi dividido em três etapas principais, conforme apresentado na Figura 13, que descreve todas as atividades desenvolvidas.

Figura 13 – Fluxograma das atividades envolvidas no presente trabalho.

Fonte: Autoria própria

A **1ª ETAPA** consiste do preparo do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) para desenvolver um pré-tratamento sequencial ácido-base que facilite a obtenção de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (HCBCA). Uma análise comparativa do efeito dos pré-tratamento ácido e alcalino no BCA também foi verificada em separado.

O BCA *in natura* e pré-tratado (polpa celulósica, holocelulose e celulignina) foram química e estruturalmente caracterizados, e posteriormente submetidos à hidrólise enzimática individualmente, enquanto os açúcares obtidos foram analisados por métodos turbidimétricos e HPLC.

Na **2ª ETAPA**, foram realizados quatro ensaios por fermentação submersa para otimizar a relação carbono/nitrogênio em frascos a partir de modelagem matemático, que incluem os seguintes ensaio:

Ensaio fermentativo I: foram avaliadas três fontes de nitrogênio (peptona, extrato de farelo de soja e arroz) em meio de cultura contendo glicose por 96 h para a produção de lasiodiplodana (LAS) e biomassa celular;

Ensaio fermentativo II: conforme os resultados do ensaio fermentativo anterior, os extratos de farelo de soja e arroz, foram empregados para substituir as fontes de nitrogênio convencionais. Foi realizado uma cinética em meio de glicose, a cada 24 h por 96 h de fermentação, analisando consumo de açúcares, biomassa celular e produção de LAS;

Ensaio fermentativo III: teve como finalidade estudar o potencial biotecnológico do HCBCA suplementado com extratos de farelo de soja e arroz. A cinética da fermentação foi realizada à cada 24 h por 96 h, analisando consumo de açúcares e proteínas, e produção de biomassa celular e LAS;

Ensaio fermentativo IV: foi efetuado a otimização da relação carbono (HCBCA) e nitrogênio (farelo de soja e arroz) na formação de LAS e biomassa celular por 96 e 120 h, empregando delineamento composto central rotacional (DDCR 2²), usando modelagem matemática com os softwares *Eureqa Formuralize*, *Nutonian, Inc* e *Wolfram Mathematica*;

Ensaio fermentativo V: consistiu na validação das melhores condições para maximizar a produção de LAS, a partir dos modelos matemáticos obtidos, da suplementação dos extratos de farelo de soja e arroz em HCBCA, à cada 24 h por 120 h horas de fermentação.

Finalmente, na **3ª ETAPA**, as amostras de LAS obtidas das melhores condições da relação carbono/nitrogênio com suplementação dos extratos de farelo de soja e arroz no HCBCA, foram caracterizadas de acordo com as propriedades que incluem pureza, solubilidade, viscosidade e massa molecular. Além disso, análises físicas (SEM e XRD) e químicas (FTIR, DSC) foram efetuadas em ambas amostras.

4.1 Etapa 1 – Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

4.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O BCA foi gentilmente cedido pela usina Ipiranga Agroindustrial (Descalvado/SP, Brasil). A amostra de BCA *in natura* foi moída por um moinho de facas rotativo (Marconi MA-680, São Paulo, Brasil) e peneirada em malha à 20 *mesh*, com 7% de umidade (m/m). A amostra do BCA *in natura* moída foi submetida à pré-tratamentos ácido (1% HNO₃), alcalino (1% NaOH) e sequencial ácido-base diluído.

4.1.1.1 Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento com ácido nítrico diluído foi realizado em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL com concentração de 1% HNO₃ (v/v) e razão sólido/líquido 1:10. Todos os frascos foram devidamente fechados com folhas de alumínio. As condições experimentais para autoclavagem foram 121 °C, 1 atm por 30 minutos. Essas condições foram realizadas de acordo com o estudo de Shah *et al.* (2019).

As amostras de celulignina (fração sólida) foram separadas da hemicelulose (fração líquida) por centrifugação à 4000 rpm por 15 min, seguida de lavagem com água corrente para a neutralização do pH e para remover vestígios de ácido nítrico. A celulignina pré-tratada lavada foi seca ao sol, coletada e armazenada a 4 °C.

4.1.1.2 Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento alcalino do BCA foi realizado em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL com solução de 1% NaOH (m/v) e 10% de relação sólido/líquido. Todos os frascos foram devidamente fechados com folhas de alumínio e autoclavados a 121 °C, 1 atm de pressão durante 30 min. Essas condições no pré-tratamento alcalino foram adotadas por Silva *et al.* (2011), que usaram 1% de NaOH a 100 °C por 60 min e 10% de sólidos totais (ST) do BCA.

Após a reação, a lignina despolimerizada (fração líquida) foi separada por centrifugação à 4000 rpm por 15 min, para recuperar a holocelulose (fração sólida), seguida de lavagem com água corrente para a neutralização do pH. A celulignina pré-tratada lavada foi seca ao sol, coletada e armazenada a 4 °C.

4.1.1.3 Pré-tratamento sequencial ácido-base do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento sequencial ácido-base do BCA, consistiu do pré-tratamento do BCA *in natura* com ácido nítrico diluído como foi descrito acima. O BCA pré-tratado

(celulignina) foi lavado com água corrente da torneira até ajustar a pH 6,0 e seco naturalmente ao sol. A celulignina seca foi submetida a pré-tratamento alcalino, empregando as mesmas condições mencionadas acima.

Após pré-tratamento alcalino, o licor deslignificado (fração líquida) foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min e a polpa celulósica (fração sólida) foi lavada com água corrente para remover os vestígios de hidróxido de sódio. O material foi seco ao sol, coletado e armazenado a 4 °C.

4.1.2 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado

O BCA *in natura*, após pré-tratamento com ácido nítrico diluído (celulignina), após pré-tratamento alcalino diluído (holocelulose) e após pré-tratamento sequencial ácido-base (polpa celulósica) foram caracterizados quimicamente, em triplicatas, quanto aos conteúdos de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos seguindo os protocolos NREL/TP-510-42618 e NREL/TP-510-42619 da *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER *et al.*, 2005; SLUITER *et al.*, 2008).

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) do BCA *in natura* e pré-tratado

A análise SEM da morfologia da superfície do BCA *in natura*, celulignina, holocelulose e polpa celulósica foi realizada como descrito por Philippini *et al.* (2017). As amostras foram distribuídas em uma lamínula de vidro de 12 mm revestida com poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, S.P. Brasil). As seções secas foram montadas em tiras de carbono, revestidas por pulverização catódica (JEOL JFC-1600) com uma camada de prata. As amostras preparadas, foram micrografadas em ampliação de 1.000x, usando um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S520, Japão).

4.1.4 Análise comparativa da hidrólise enzimática do BCA *in natura* e pré-tratado

As amostras do BCA *in natura*, celulignina, holocelulose e polpa celulósica foram submetidas à hidrólise enzimática com cargas de 5 e 10% de sólidos totais (ST), para fazer uma análise comparativa da produção de açúcares fermentáveis. Os testes de digestibilidade enzimática foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL.

Para a hidrólise enzimática a 5% de ST, foram adicionados 2 g de biomassa (peso seco) em 40 mL de tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 5,2). No entanto, para a hidrólise enzimática de 10% de ST, foram adicionados 4 g de biomassa (peso seco) em 40 mL de tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 5,2). A enzima celulase comercial Cellic® CTec2

da Novozyme Inc., (Curitiba, Brasil), apresentou atividade enzimática de 110 FPU/mL e foi utilizada com carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa seca na hidrólise de 5 e 10% de ST. A atividade da enzima foi determinada seguindo o método FPU (Unidades de Papel Filtro) de Ghose (1987).

As condições experimentais para a hidrólise enzimática, foram $50 \pm 0,5$ °C, 200 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific, Innova 4000, EUA). As amostras líquidas (hidrolisados enzimáticos) foram coletadas nas 0, 12, 24, 48 e 72 h de incubação e armazenados a 4 °C para análise de açúcares. Os açúcares redutores totais (ART) e a glicose foram quantificados pelo método colorimétrico de Miller (1959) e por HPLC, respectivamente. A conversão de ART durante a hidrólise enzimática foi calculada como rendimento da hidrólise (%) com a Equação 1 (SILVA *et al.*, 2011):

$$ART(\%) = \frac{\text{Açúcares redutores totais (g/L)}}{\text{Carbohidratos totais (celulose + hemicelulose) no BCA (g/L)}} \times 0,98 \times 100 \quad (1)$$

4.2 Etapa 2 – Otimização e verificação da produção de lasiodiplodana

4.2.1 Cultura e manutenção de *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 foi gentilmente cedido pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia (Campinas, SP). O micélio fúngico foi cultivado em placas Petri (100 mm de diâmetro) contendo ágar YPMG (0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 0,3% extrato de malte, 1,0% glicose e 2,0% de ágar) a 28 °C durante 6 dias e armazenados a 4 °C para estoque. A formação de biopigmento vermelho foi utilizado como biomarcador da viabilidade das células fúngicas para produção de lasiodiplodana (LAS).

4.2.2 Preparo dos Sais do Vogel (Meio N)

O preparo dos sais de Vogel para seu uso como controle na fermentação I, foi realizado conforme citado por Vogel (1956). Para a produção de 1 L de meio (50 vezes concentrado), foram adicionados 750 mL de H₂O destilada em temperatura ambiente, dissolvendo sucessivamente os reagentes: 150 g de citrato de sódio, 250 g de KH₂PO₄, 100 g de NH₄NO₃, 10 g de MgSO₄ · 7H₂O, 5 g de CaCl₂, 2,5 mL de solução de biotina e 5 mL de elementos traço, agitando-se em seguida.

Para a preparação da solução de biotina, foram dissolvidos 5 mg de biotina em 50 mL de H₂O destilada. A solução obtida foi armazenada em vidraria e congelada. Para o preparo da solução de elementos traços, foram dissolvidos sucessivamente: 5 g de ácido cítrico,

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 250 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mg de H_3BO_3 , e 50 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em 95 mL de H_2O destilada.

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

4.2.3 Preparo dos extratos de farelo de soja e arroz

Os farelos de soja e arroz foram comprados na Cooperativa de Laticínios Serramar (Lorena, Brasil). As amostras foram autolisadas de acordo com metodologia proposta por Martiniano *et al.* (2014), em uma proporção de 200 g de farelo para 1 L de H_2O destilada à 121 °C, 1 atm de pressão por 15 min. A mistura da reação foi resfriada e depois separada por centrifugação à temperatura ambiente à 4000 rpm durante 30 min. Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para frascos Erlenmeyer estéreis para uso posterior como fontes de nitrogênio nos processos de fermentação.

4.2.4 Preparo do hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar

O BCA *in natura* foi submetido a um pré-tratamento sequencial ácido-base, como foi descrito no item 3.3.1.3. A amostra resultante de polpa celulósica foi hidrolisada com carga enzimática de 15 FPU da enzima Cellic® CTec2 por g de biomassa seca (15 FPU/g). A reação enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de biomassa seca, 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5,5) com condições experimentais de $50 \pm 0,5$ °C, 200 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific, Innova 4000, USA).

O HCBCA, foi coletado às 120 h de reação em frascos de centrifuga de 1 L, e centrifugado à 4000 rpm por 15 min, enquanto a fração sólida foi descartada. A fração líquida foi coletada nos frascos de centrífuga de 1 L, e autoclavada a 110 °C, 0,5 atm por 20 minutos, para precipitar a enzima celulolítica e/ou algum resíduo proteico presente no hidrolisado enzimático, além de permanecer na esterilidade. Após este, foi centrifugado à 4000 rpm por 20 min em esterilidade e homogeneizados em frascos Erlenmeyer, armazenados à 4 °C para análise de ART e glicose, quantificados pelo método de Miller (1959) e por HPLC.

4.2.5 Ensaio fermentativo I – Glicose com diferentes fontes de nitrogênio

O estudo foi conduzido em triplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de glicose (40 g/L) suplementada com peptona (10 g/L), extrato de farelo de soja (10 g/L) e extrato de farelo de arroz (10 g/L), individualmente, visando avaliar o efeito do consumo de diferentes fontes de nitrogênio orgânicas na produção de LAS. Também se usou glicose (40 g/L) suplementado com sais Vogel (20 mL/L), como controle. Como inóculo se usou 2 discos de ágar com o fungo *L. theobromae*. Os frascos foram mantidos em agitador orbital (incubadora New Brunswick Scientific, Innova 4000, USA) à 28 °C, sob agitação de 200 rpm. A análise dos frascos foi realizada às 96 h da fermentação, determinando a produção de LAS e biomassa celular.

4.2.6 Ensaio fermentativo II – Glicose suplementado com farelo de soja e arroz

Foram realizados ensaios fermentativos em triplicata com frascos sacrifício de 125 mL, contendo 50 mL de glicose (40 g/L) suplementado com extrato de farelo de soja (10 g/L) e extrato de farelo de arroz (10 g/L), individualmente, escolhidos como fontes de nitrogênio potenciais para a produção de LAS. Foram inoculados com 2 discos de ágar contendo *L. theobromae*. Os frascos foram acondicionados em agitador orbital (incubadora New Brunswick Scientific, Innova 4000, USA) à 28 °C, sob agitação de 200 rpm. As amostras foram coletadas a cada 24 horas durante 96 horas, para analisar consumo de açúcares, bem como a produção de LAS e biomassa celular.

4.2.7 Ensaio fermentativo III – HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz

Este ensaio fermentativo foi realizado em triplicata com frascos sacrifício de 125 mL, contendo 50 mL de HCBCA (40 g/L) suplementado com extrato de farelo de soja (10 g/L) e extrato de farelo de arroz (10 g/L), para avaliar o potencial biotecnológico do hidrolisado na produção de EPS. Foram inoculados com 2 discos de ágar contendo *L. theobromae*. Os frascos foram condicionados em agitador orbital (incubadora New Brunswick Scientific, Innova 4000, USA) à 28 °C, sob agitação de 200 rpm. As amostras foram coletadas a cada 24 horas durante 96 horas, para analisar consumo de açúcares e proteínas, bem como a produção de LAS e biomassa celular.

4.2.8 Ensaio fermentativo IV – Otimização da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz por DCCR 2²

Para a avaliação do uso HCBCA e subsequente utilização em processos fermentativos foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR 2² com *Design-Expert 7*®, com três repetições no ponto central. Foi avaliado o efeito do HCBCA como fonte de carbono (X₁) e os farelos de arroz e soja como fontes de nitrogênio (X₂). As variáveis de resposta observadas foram produção de LAS e biomassa celular nos tempos de 96 e 120 h.

Para o processo fermentativo, foram utilizados frascos sacrifício de 125 mL contendo 40% do volume de trabalho e pH 5,5. Também, foram adicionados 2 discos de ágar contendo *L. theobromae*, como inóculo. A fermentação foi realizada em incubadora orbital à 28 °C, 200 rpm de agitação.

Os níveis experimentais utilizados para a otimização das condições experimentais (variáveis independentes) são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Níveis utilizados no planejamento de experimentos para a otimização das condições experimentais.

Variável	Código	Níveis				
		-1,414	-1	0	1	1,414
Carbono (g/L)	x_1	40,0	45,86	60,0	74,14	80,0
Nitrogênio (g/L)	x_2	0,5	1,01	2,25	3,49	4

Fonte: Autoria própria

Os frascos foram analisados a cada 24 horas em 96 horas de fermentação para análise das variáveis de resposta em cada suplementação, conforme as diferentes proporções de carbono/nitrogênio, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 – DCCR 2² para avaliação da relação carbono/nitrogênio com três repetições no ponto central.

Ensaio	X ₁	X ₂	Carbono (g/ L)	Nitrogênio (g/L)
1	-1	-1	60,00	2,25
2	1	-1	74,14	3,49
3	-1	1	60,00	0,50
4	1	1	45,86	1,01
5	-1,4142	0	40,00	2,25
6	+1,4142	0	60,00	4,00
7	0	-1,4142	60,00	2,25
8	0	+1,4142	60,00	2,25
9	0	0	74,14	1,01
10	0	0	80,00	2,25
11	0	0	45,86	3,49

Fonte: Autoria própria

4.2.9 Ensaio fermentativo V – Validação dos modelos matemáticos da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz

Baseado nos resultados da otimização por DCCR 2² das duas suplementações, obtiveram-se 4 modelos matemáticos para maximizar a produção de LAS, em relação ao consumo de carbono e nitrogênio (HCBCA com extratos de farelos de soja e arroz). As ferramentas utilizadas para construir os modelos matemáticos foram os *softwares* *Eureqa Formulize* e *Wolfram Mathematica* (GOMES *et al.*, 2019), gerando modelos matemáticos para cada suplementação, nos tempos de 96 h e 120 h.

A validação dos modelos matemáticos com as melhores condições da relação carbono/nitrogênio, foram efetuadas em frascos sacrifícios de 125 mL, com volume de trabalho de 50 mL, utilizando HCBCA e os extratos de farelos de soja e arroz. Este experimento de validação, foi analisado a cada 24 h durante 120 h, analisando consumo de ART e proteínas e produção de LAS e biomassa celular.

Também foram calculados os parâmetros cinéticos para avaliar o perfil fermentativo da produção de LAS, que incluem rendimento de LAS ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de LAS (Q_P), produtividade volumétrica de biomassa fúngica (Q_X), produtividade volumétrica do substrato (Q_S), taxa de consumo de substrato ($Y_{X/S}$) e rendimento específico (Y_C), a partir das Equações 2 a 7:

$$Y_{P/S} = \frac{LAS (g)}{Glicose consumida (g)} \times 100 \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{Máxima concentração de LAS (g/L)}{Tempo da fermentação (h)} \quad (3)$$

$$Q_X = \frac{Máxima concentração de biomassa (g/L)}{Tempo da fermentação (h)} \quad (4)$$

$$Q_S = \frac{Glicose consumida (g/L)}{Tempo da fermentação (h)} \quad (5)$$

$$Y_{X/S} = \frac{Biomassa (g)}{Glicose consumida (g)} \times 100 \quad (6)$$

$$Y_c = \frac{\text{Máxima concentração de LAS}(g)}{\text{Biomassa produzida } (g)} \quad (7)$$

4.3 Etapa 3 – Caracterização física e química de lasiodiplodana

4.3.1 Determinação da pureza de lasiodiplodana

As frações de LAS obtidas após cada fermentação em HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz foram analisadas quanto à sua pureza baseado no método de Philippini (2017). Em triplicata, foram pesados 20 mg de LAS liofilizada e se adicionou 1 mL de 72% H₂SO₄, em banho à 30 °C por 1 h.

Os materiais hidrolisados foram diluídos a um volume final de 20 mL e autoclavados a 121 °C por 1 h. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução padrão de glicose para avaliar possíveis degradações dos açúcares. Os materiais resultantes foram caracterizados quanto às concentrações de açúcares totais pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e HPLC, e proteínas totais por Lowry *et al.* (1951).

4.3.2 Determinação da solubilidade de lasiodiplodana

Foram feitos testes por triplicata da solubilidade em água de LAS obtida da suplementação dos extratos de farelo de soja e arroz. Foram avaliadas usando o protocolo descrito de Theis *et al.* (2019). Amostras de 10 mg foram suspensas em 10 mL de H₂O destilada, e agitadas por 24 h a 25 °C, depois centrifugadas 4,000 rpm por 20 min. O conteúdo total de açúcares do sobrenadante foi quantificado pelo método Fenol-Sulfúrico e diretamente relacionado à quantidade de amostra solúvel. A solubilidade em água foi expressa como uma porcentagem de massa solúvel (% de polissacarídeo solúvel) em 100 mL de água (mg de amostra/100 mL).

4.3.3 Determinação da viscosidade de lasiodiplodana

A viscosidade aparente (µa) das amostras de LAS (2 g/L) foram determinadas usando um viscosímetro Rheocalc T1.2.19 (Brookfield Engineering Labs Inc., EUA) equipado com um fuso SC4-18 que opera em velocidades de corte dentro da faixa de 1–264/s à 25 °C. As medidas foram registradas em intervalos de 5 s, aumentando a velocidade de cisalhamento de 1 para 264/s (CUNHA *et al.*, 2012).

4.3.4 Determinação da massa molecular por GPC de lasiodiplodana

A massa molar das amostras de LAS foram determinadas por cromatografia por permeação em gel (GPC), utilizando uma coluna Superose 12 10/300 GL (GE HEALTHCARE), como eluente NaOH pH 12,0. Um volume de 1 mL de LAS foi aplicado na coluna, com fluxo de 0,6 mL/min.

A coluna foi calibrada com xilose (150,13 Da), rafinose (504 Da), xilohexose (810,8 Da), dextrana T1 (1.000 Da), dextrana T3.5 (3.500 Da), dextrana T6 (6.000 Da), dextrana T10 (10.000 Da), citocromo c (12.384 Da), anidrase carbônica (29.000 Da), albumina (66.000 Da), álcool desidrogenase (150.000 Da) e blue dextrana (2.000.000 Da) (Apêndice A).

A detecção das amostras de LAS eluídas na coluna, foram coletadas na saída da coluna por frações de 1 mL, e analisadas empregando o método Fenol-Sulfúrico. A partir das distribuições obtidas, os dados foram linearizados em Equação 8 do tipo log, no qual M representa a massa molar, e V_e , o volume de eluição.

$$\log M = a + bV_e \quad (8)$$

Para cálculo da massa molar dos biopolímeros, foi necessário levar em consideração os valores de massa molar média (M_n) e massa molar ponderal (M_w). A dispersividade (D) é obtida pela divisão entre os valores de M_n pelos de M_w . Essas propriedades foram obtidas de acordo com áreas divididas do cromatograma (Guerra, 1998).

4.3.5 Análise SEM da lasiodiplodana

A análise de SEM foi usada para examinar as amostras liofilizadas de LAS, quanto à morfologia da superfície. As amostras foram metalizadas com prata, conforme descrito no item 3.3.3. As micrografias foram tiradas em um microscópio eletrônico de varredura com detector de elétrons (Hitachi TM3000, EUA). As imagens foram tiradas com ampliações de 50x, 400x e 1.200x.

4.3.6 Análise XRD da lasiodiplodana

A difração de raios-X foi realizada nas amostras liofilizadas de LAS. Foi empregado um difratômetro de Raios-X (PANanalytical - EMPYREAN) com radiação $\text{MoK}-\alpha$

($\lambda=0,7107\text{\AA}$) e medidas no intervalo angular (2θ) de $8-60^\circ$, com um passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 70 s.

4.3.7 Análise FTIR da lasiodiplodana

As amostras liofilizadas de LAS foram caracterizadas por análise de FTIR utilizando o aparelho Perkin Elmer Spectrum GX (Shelton, USA) em resolução de número de onda variável de 4000 a 400 cm^{-1} . Os materiais foram preparados pela mistura de 1,5 mg de LAS com 250 mg de brometo de potássio em pó (KBr) e submetidos a secagem em dessecador a 50°C sob pressão reduzida antes de serem analisadas (PHILIPPINI, 2017).

4.3.8 Análise DSC da lasiodiplodana

A análise térmica por DSC das amostras de LAS, foram efetuadas no aparelho DSC Q20 (USA). O intervalo da análise foi entre 30°C até 500°C a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, e uma atmosfera de ar sintético com fluxo de $50\text{ mL}/\text{min}$.

4.4 Análises estatística e validação de dados

Os dados apresentados durante todas as etapas deste trabalho foram analisados estatisticamente com o auxílio dos *softwares Graphpad Prism 6* e *Wolfram Mathematica*. O planejamento experimental DCCR 2², do estudo da relação carbono/nitrogênio foi efetuado por *Design-Expert 7*® e analisadas por modelagem matemático com *Eureqa Formulize*.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação de biomassa celular

A biomassa celular do fungo *L. theobromae* foi recuperada em tubos Falcon de 50 mL por centrifugação à 4000 rpm por 15 minutos (centrifuga HITACHI CF16RN himac). A biomassa celular precipitada foi lavada com água destilada à 60°C e centrifugada novamente para eliminar vestígios de meio de cultura e polímero. Após a lavagem, a biomassa foi seca em estufa com recirculação de ar à 60°C por 24 horas. O material seco foi aferido na balança analítica AUW220 Marte Científica para a obtenção do valor da biomassa seca.

4.5.2 Recuperação da lasiodiplodana

Para a recuperação de LAS, o conteúdo dos frascos após fermentação foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos (centrifuga HITACHI CF16RN himac) e o sobrenadante foi

precipitado com 3 volumes de etanol absoluto gelado; o precipitado foi dissolvido em água destilada a 60 °C e precipitado novamente com etanol absoluto gelado. O material obtido foi recuperado e seco por 24 horas a 60 °C na estufa de recirculação de ar e pesado em cadinhos previamente tarados na balança analítica AUW220 Marte Científica para análise gravimétrica.

4.5.3 Determinação de umidade

A verificação da umidade da biomassa vegetal *in natura* e pré-tratada foi realizada em medidor de umidade ID-50 Marte Científica (São Paulo, Brasil).

4.5.4 Determinação de pH

A verificação do pH do HCBCA foi realizada em aparelho pH-metro H1221.

4.5.5 Determinação das concentrações de açúcares totais e inibidores por HPLC

As concentrações de açúcares foram analisadas por HPLC em cromatógrafo Agilent 1200 series (EUA), determinadas com o auxílio de uma coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), o detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01 N a um fluxo de 0,6 ml/min, uma temperatura da coluna de 45 °C e o volume de amostra injetado será de 20 µl. Antes de se efetuar as análises em HPLC, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (WATERS).

Para a determinação das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foi utilizada uma coluna HP-RP18 (200 x 4,6 mm), o detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS (comprimento de onda de 276 nm), o eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% (v/v) de ácido acético, a um fluxo de 0,8 ml/min, uma temperatura da coluna de 25 °C e o volume de amostra injetado foi de 20 µl. Antes de se efetuar as análises em HPLC, as amostras foram filtradas em membranas MINISART 0,22 µm (SARTORIUS).

4.5.6 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais realizadas no presente trabalho foi efetuada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B a partir da correlação da curva de calibração com 1 g/L de ácido tânico, como padrão (Apêndice B) utilizando os reagentes de Folin-Ciocalteau e carbonato de sódio durante 40 min de reação no escuro à leitura de absorbância de 725 nm (SINGLETON; ROSSI, 1965).

4.5.7 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo o reativo DNS (ácido-3,5-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 no espectrofotômetro BECKMAN DU 640B a 540 nm, utilizando água destilada como branco. A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de glicose na concentração de 1 g/L (Apêndice C).

4.5.8 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais nas amostras foi realizada pela metodologia de Lowry *et al.* (1951), com utilização dos reativos A, B e C. Em 1 mL de amostra foram adicionados 5 mL da mistura reativa, permanecendo em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído. Após o tempo de reação de 10 minutos, a absorbância foi lida no espectrofotômetro BECKMAN DU 640B a 660 nm. As determinações das proteínas totais foram realizadas 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 a amostra e leitura de absorbância em espectrofotômetro a 660 nm (Apêndice D).

4.5.9 Determinação de 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 E).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1 – Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

5.1.1 Caracterização química do BCA *in natura* e pré-tratado

A caracterização química do BCA *in natura*, celulignina (pré-tratado com ácido nítrico diluído) e holocelulose (pré-tratado com hidróxido de sódio) e polpa celulósica (pré-tratado com ácido nítrico diluído/hidróxido de sódio) foram avaliadas. A Tabela 7 apresenta o conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos para o BCA *in natura* e todas as amostras de biomassa pré-tratada.

Tabela 7 – Composição química em peso seco do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após pré-tratamento do bagaço com ácido diluído, alcalino diluído e sequencial ácido-base diluído.

Biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	Total (%)
BCA <i>in natura</i>	39,24±1,74	29,66±0,30	23,63±0,98	1,82±0,11	6,8±0,15	101,15±0,87
Celulignina	59,80±0,75	13,29±0,03	25,96±0,71	1,54±0,16	ND	100,58±1,5
Holocelulose	50,16±1,07	32,22±0,53	8,91±0,72	0,89±0,28	ND	94,15±1,76
Polpa celulósica	92,33±2,77	0±0,00	6,94±0,71	1,47±0,02	ND	100,74±2,61

ND: Não Determinado

Fonte: Autoria própria

O BCA *in natura* apresentou teores médios de 39,24% celulose, 29,66% hemicelulose, 23,63% lignina, 1,82% cinza e 6,8% extrativos. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Irfan *et al.* (2011) na composição de amostras do BCA *in natura*, representando de 25-40% de celulose, 35-50% de hemicelulose e 10-30% de teor de lignina. No entanto, Chandel *et al.* (2014) encontraram na análise da composição do BCA, 39,52% de celulose, 25,63% de hemicelulose, 30,36% de lignina total, 1,44% de cinza e 2,90% de extrativos. A composição química do BCA pode mudar de acordo com alguns fatores, tais como variedade das culturas, uso de fertilizantes, química do solo, condições climáticas, localização e crescimento da cultura (CHANDEL *et al.*, 2014).

Após pré-tratamento do BCA com HNO₃ 1% (v/v) por 30 min à 121 °C, observou-se 55,5% de remoção de hemicelulose. A composição química da celulignina apresentou 59,80% celulose, 13,29% hemicelulose, 25,96% lignina e 1,54% de cinza. Verificou-se que a celulose aumentou em 34,39%, enquanto o conteúdo de hemicelulose diminuiu em até 55,19%, uma vez que foi despolimerizada durante o pré-tratamento ácido.

Por outro lado, a deslignificação do BCA pelo pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) gerou a remoção de 62,30% da lignina, o que resultou em baixo conteúdo de lignina de 8,91%. Este pré-tratamento aumentou o conteúdo de celulose até 21,78%, mostrando uma

composição da biomassa de 50,16% celulose, 32,22% hemicelulose, 8,91% lignina e 0,89% cinzas.

A polpa celulósica obtida do pré-tratamento sequencial ácido-base, apresentou um perfil de composição química de 92,33% celulose, 6,94% lignina, 1,47% cinza e uma remoção total de 100% da hemicelulose. A deslignificação da celulignina pelo pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio resultou na remoção média de 70,63% lignina, o que gerou baixos conteúdos de lignina (6,94%) na polpa celulósica. Este pré-tratamento aumentou o conteúdo de celulose em até 57,51%. Os conteúdos de cinzas permaneceram basicamente com os mesmos valores no BCA *in natura* e pré-tratado, devido ao fato de que todas as amostras pertencem ao mesmo lote de BCA.

Philippini *et al.* (2017) utilizaram um pré-tratamento sequencial com ácido sulfúrico diluído, seguido de hidróxido de sódio diluído em BCA, apresentando a polpa celulósica resultante com uma composição química de 77,48% celulose, 6,07% hemicelulose, 15,40% lignina e 0,32% de cinzas. No presente estudo, encontrou-se maior conteúdo de celulose (92,33%) na amostra de polpa celulósica do que Philippini *et al.* (2017) com 77,48% de celulose.

No entanto, Rocha *et al.* (2012) relataram resultados semelhantes, com conteúdo de 90,9% de celulose e 4,3% hemicelulose na polpa celulósica, após pré-tratamento sequencial de explosão a vapor e reação de deslignificação alcalina. No presente estudo, o pré-tratamento sequencial ácido-base removeu completamente a hemicelulose, permitindo assim que a polpa celulósica obtida produzisse uma maior liberação de glicose na reação de hidrólise enzimática.

5.1.1.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico obtido com pré-tratamento ácido

Após pré-tratamento com 1% HNO₃ à 121 °C por 30 min, o HHBCA foi recuperado, mostrando um perfil de açúcares com concentrações de 14,22 g/L de xilose, 2,75 g/L de arabinose e 0,52 g/L de glicose. Verificou-se também o perfil de compostos inibidores que apresentou 3,30 g/L de ácido acético, 0,014 g/L de furfural, 0,045 g/L de 5-hidroximetilfurfural e 0,71 g/L de compostos fenólicos.

Martin *et al.* (2007) demonstraram que o pré-tratamento do BCA com 2% H₂SO₄ à 122 °C por 60 minutos geram 19,1 g/L de xilose, 2,2 g/L de arabinose, 4 g/L de glicose, 0,8 g/L de galactose, 2,7 g/L de ácido acético, 0,36 g/L de furfural, 0,7 g/L de 5-hidroximetilfurfural e 0,24 g/L de compostos fenólicos; enquanto que Rodriguez-Chong *et al.* (2004) relataram

o uso de 6% HNO_3 em bagaço à 122 °C por 9,3 minutos, obtendo 18,6 g/L de xilose, 2,04 g/L de arabinose, 2,87 g/L de glicose, 0,9 g/L de ácido acético e 1,32 g/L de furfural.

Em uma comparação entre os resultados do presente trabalho e os relatados na literatura com pré-tratamentos do BCA com ácido sulfúrico ou ácido nítrico, foi demonstrado que os pré-tratamentos ácidos apresentam resultados semelhantes em termos de obtenção de açúcares. No entanto, dependendo das condições de reação e da concentração de ácido, podem-se gerar compostos inibidores como ácido acético, furfurais e fenólicos, prejudiciais para o crescimento dos microrganismos na fermentação.

As baixas concentrações de compostos inibitórios obtidas no pré-tratamento ácido deste trabalho demonstram que a recuperação de hidrolisado hemicelulósico pode ser viável para processos fermentativos sem afetar o crescimento dos microrganismos e obtenção de bioprodutos.

5.1.2 Análise estrutural por SEM do BCA *in natura* e pré-tratado

A análise estrutural por SEM das biomassas foi realizada para observar as alterações morfológicas da superfície do BCA após pré-tratamentos. A Figura 14 apresenta as morfologias superficiais por SEM (1.000x) do BCA *in natura*, celulignina, holocelulose e polpa celulósica.

A Figura 14A mostra a morfologia do BCA *in natura*, em que é claramente observada uma estrutura lignocelulósica completa, com superfície rugosa sem porosidade e uma fibra compacta de paredes espessas, constituída por faixas paralelas cobertas superficialmente que poderiam ser extrativos. Pereira *et al.* (2011) caracterizaram química e morfológicamente BCA, apontando observações similares do BCA *in natura*, como mostrado no presente trabalho. O BCA *in natura* após moagem apresentou algumas mudanças morfológicas na sua aparência.

O efeito mais evidente do pré-tratamento com ácido nítrico foi a exposição do BCA *in natura* às condições críticas de pré-tratamento (temperatura e pressão altas), levando à eliminação da hemicelulose, alterando morfológicamente a superfície do BCA, separando as fibras da estrutura sólida e gerando uma matriz mais solta que o material sem tratamento (Figura 14B).

Chen, Ye e She (2012) estudaram as características de hidrólise de BCA pré-tratado com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, sendo observado que algumas fibras foram separadas na superfície do BCA (0 e 0,005 M H_2SO_4) e exibiram pequenos orifícios na superfície (pré-tratado com H_2SO_4 a 0,01 M). Portanto, um aspecto importante do pré-

tratamento ácido para a remoção da hemicelulose é a concentração do catalisador ácido, juntamente com as condições de pré-tratamento (temperatura, pressão e tempo de reação). Shah *et al.* (2019) realizaram pré-tratamento do caule de kenaf com 2% de HNO_3 (v/v), à 130 °C por 60 min, resultando na quebra da estrutura cristalina que aumentou o tamanho e número de poros na superfície. Isto indica a remoção de seus componentes amorfos (hemicelulose e extrativos), enquanto a lignina permanece intacta.

Na Figura 14B, observa-se a quebra das fibras na celulignina, mas sem a presença de poros. No entanto, 55,5% de remoção de hemicelulose foi observado, sem quaisquer alterações consideráveis no valor da lignina.

Figura 14 – Análise por SEM mostrando a imagem da superfície do bagaço de cana-de-açúcar A) *in natura*; B) pré-tratado com ácido nítrico; C) pré-tratado com hidróxido de sódio; D) pré-tratado com ácido-base diluído.

Fonte: Autoria própria

O pré-tratamento com hidróxido de sódio conduziu eficientemente a remoção de lignina, mostrando a quebra física das fibras, o que gerou rupturas abruptas (Figura 14C). Alterações semelhantes foram descritas para BCA pré-tratado por álcali assistido por micro-ondas (BINOD *et al.*, 2012), amônia aquosa (CHANDEL *et al.*, 2013), e hidróxido de sódio (REZENDE *et al.*, 2011). Neste trabalho, o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio,

removeu principalmente lignina (62,30%), aumentando, de uma maneira geral, a acessibilidade das enzimas celulases na celulose durante a reação enzimática.

A Figura 14D apresenta a estrutura da polpa celulósica (pré-tratamento sequencial ácido-base), com um elevado grau de degradação das fibras de biomassa. Como foi demonstrado na Tabelas 6, esta biomassa pré-tratada não apresenta hemicelulose e tem um baixo conteúdo de lignina, o que coincide com a imagem superficial da Figura 14D, em que a separação das fibras foi evidente, mostrando as fibras quebradas, possivelmente devido à eliminação total de hemicelulose e parcial de lignina. Resultados estruturais semelhantes foram relatados com pré-tratamentos sequenciais ácido-base no BCA (MARTIN *et al.*, 2007; CHANDEL *et al.*, 2014; PHILIPPINI *et al.*, 2017).

5.1.3 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada

A hidrólise enzimática do BCA pré-tratado (celulignina, holocelulose, polpa celulósica) foi realizada com 5% e 10% sólidos totais (ST) em peso seco. A Tabela 8 apresenta os resultados de açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise enzimática de cada biomassa pré-tratada com 5 e 10% ST.

Tabela 8 – Perfil da hidrólise enzimática com 5% e 10% ST, mostrando os ART (g/L) nas diferentes condições do BCA pré-tratado (ácido diluído, alcalino diluído e sequencial ácido-base).

Biomassa pré-tratada	ST (%)	Tempo de hidrólise (h)				
		0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Celulignina	5%	0 ± 0,00	9,98 ± 0,05	10,22 ± 0,17	14,28 ± 0,10	14,42 ± 0,11
	10%	0 ± 0,00	15,23 ± 0,53	15,75 ± 0,53	23,11 ± 0,06	23,83 ± 0,27
Holocelulose	5%	1,55 ± 0,16	29,86 ± 0,48	30,83 ± 0,65	32,26 ± 0,98	32,82 ± 0,32
	10%	6,76 ± 0,06	45,98 ± 0,65	49,87 ± 0,33	55,95 ± 0,16	56,81 ± 0,65
Polpa celulósica	5%	0 ± 0,00	32,71 ± 0,49	35,26 ± 0,47	37,03 ± 0,54	38,21 ± 0,53
	10%	0,49 ± 0,09	50,68 ± 0,21	63,85 ± 0,33	65,10 ± 0,16	67,89 ± 0,16

Fonte: Autoria própria

A Figura 15, apresenta o perfil da reação de hidrólise enzimática com 5% ST das biomassas pré-tratadas (polpa de celulose, holocelulose e celulignina). Os experimentos de hidrólise enzimática apresentaram em 72 h a maior recuperação de ART (38,21 g/L) e glicose (38,64 g/L) com um rendimento de 81,11% na polpa celulósica; seguido pela biomassa deslignificada, com um rendimento de 78,08% e recuperação de 32,82 g/L de ART e 19,08 g/L de glicose; e finalmente, a celulignina, com o menor rendimento de 38,66% e subsequentemente baixos valores de ART e glicose, com 14,42 g/L e 11,33 g/L, respectivamente (Figura 15A e B).

Figura 15 – Perfil da hidrólise enzimática (5% ST) das biomassas pré-tratadas durante 72 h de reação. A) Açúcares redutores e B) glicose recuperada. ●—Celulignina; ■—Holocelulose; ▲—Polpa celulósica.

Fonte: Autoria própria

Giese *et al.* (2013) realizaram um pré-tratamento sequencial ácido-alcalino diluído do BCA, para estudar a hidrólise enzimática da polpa celulósica, utilizando diferentes preparações de enzimas comerciais. O BCA foi pré-tratado com 100 mg de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de biomassa seca a 121 °C por 20 minutos, subsequentemente a celulignina foi sujeita a um pré-tratamento alcalino com NaOH 1% (m/v) à 100 °C durante 1 hora. Os resultados de sacarificação de 5% ST mostraram 0,20 g de ART/g BCA após 48 h com 600 U/mL de celulase AF28918 e 0,52 g ART/g BCA usando Avicel® nas mesmas condições; enquanto que a polpa celulósica deste trabalho na Figura 15A às 48 h resultou em uma recuperação de 0,37 g/L ART/g BCA pré-tratado.

A polpa celulósica obtida a partir do pré-tratamento sequencial com HNO_3 e NaOH do BCA apresentou maior recuperação de ART em comparação com a holocelulose (pré-tratamento com NaOH) e celulignina (pré-tratamento com HNO_3) na hidrólise enzimática de 10% ST, mostrado na Tabela 8.

A celulignina apresentou menor rendimento (31,95%), ART (23,83 g/L) e glicose (19,04 g/L) às 72 h. A holocelulose apresentou máxima concentração de ART (56,81 g/L) e glicose (34,97 g/L), com um rendimento de 67,58%; enquanto a polpa celulósica, apresentou o maior rendimento (72,03%), com os maiores valores de ART e glicose, 67,89 g/L e 67,79 g/L, respectivamente, após 72 h.

A Figura 16 mostra o perfil de ART e glicose recuperados durante a hidrólise enzimática com 10% ST para cada biomassa pré-tratada. A celulignina mostrou a menor recuperação de ART porque o pré-tratamento ácido removeu apenas a hemicelulose, enquanto a lignina permanece na biomassa, como apresentado na Tabela 7. Isso limita as enzimas celulolíticas

durante a hidrólise enzimática devido à parede celular rígida formada pela lignina e que resulta em uma baixa concentração de açúcares.

Figura 16 – Perfil da hidrólise enzimática (10% ST) das biomassas pré-tratadas durante 72 h de reação. A) Açúcares redutores e B) glicose recuperada. ●–Celulignina; ■–Holocelulose; ▲–Polpa celulósica.

Fonte: Autoria própria

O pré-tratamento com hidróxido de sódio removeu a maior parte da lignina, expondo a superfície da hemicelulose e celulose às enzimas celulolíticas, de modo que a liberação de ART (56,81 g/L) foi maior do que no pré-tratamento ácido anterior, aproximando-se do teor máximo de 67,86 g/L de ART da hidrólise enzimática da polpa celulósica após 72 h.

Houve também um aumento considerável na recuperação de glicose da polpa celulósica após 24 h com 63,85 g/L de glicose (Figura 16B) permanecendo em 67,89 g/L após 72 h, sendo efetivamente recuperado com 94,04% do total da glicose, nas primeiras 24 h de reação.

Philippini *et al.* (2017) realizaram um pré-tratamento sequencial ácido-base nas condições de 2% H_2SO_4 (m/v) à 150 °C, por 30 minutos. Depois, a celulignina foi submetida ao pré-tratamento alcalino NaOH 1% (m/v) à 100 °C durante 30 min. Esse pré-tratamento sequencial eliminou 77% hemicelulose e 58% lignina, gerando uma polpa celulósica com até 80% de conteúdo de celulose, apresentando um máximo de recuperação de ART (31,46 g/L) e glicose (30,77 g/L) após 48 h de hidrólise enzimática, enquanto os resultados do presente trabalho, no mesmo tempo de 48 h, demonstraram aumento duplo na recuperação de ART (65,10 g/L) e glicose (65,21 g/L), respectivamente (Figura 16A e 16B).

Estes dados sugerem que quando o teor de ST da biomassa pré-tratada foi aumentada de 5% a 10% na hidrólise enzimática, o rendimento de reação diminuiu, mas a recuperação de ART e glicose foram maiores. Os melhores rendimentos foram obtidos, com menores cargas de ST, provavelmente porque uma menor quantidade de biomassa fornece um maior

teor de umidade e disponibilidade para as enzimas celulolíticas, dependentes do rompimento das fibras segundo o tipo de pré-tratamento realizado, conforme indicado na Tabela 7.

No entanto, é importante mencionar que existem vários fatores que podem afetar a acessibilidade das enzimas à celulose, como tamanho e volume dos poros, tamanho de partícula, área superficial específica, conteúdo de lignina, hemicelulose e grupo acetila, cristalinidade da celulose e seu grau de polimerização (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

A celulignina, apresentou maior integridade estrutural para analisar a recuperação de ART e glicose em comparação a holocelulose e polpa celulósica. O pré-tratamento sequencial ácido-base elimina efetivamente a hemicelulose e grande parte da lignina, enfraquecendo a biomassa que promove a inchaço da celulose, liberando altas quantidades de açúcares (GIESE *et al.*, 2013; CHANDEL *et al.*, 2014; PHILIPPINI *et al.*, 2017).

Atualmente, não há combinação específica de parâmetros que garantam um bom rendimento do processo de hidrólise enzimática, pois dependem de vários parâmetros do processo como tipo de pré-tratamento, carga enzimática, superfície de contato da biomassa, temperatura, agitação, pH, tempo de reação enzimática, entre outros (MARTIN *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2011; BINOD *et al.*, 2012; CHANDEL *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2019).

5.2 Etapa 2 – Otimização e verificação da produção de lasiodiplodana

5.2.1 Ensaios fermentativo I – Glicose com diferentes fontes de nitrogênio

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer com agitação para a produção de LAS, usando glicose como fonte de carbono (40 g/L), suplementada com diferentes fontes de nitrogênio orgânico (10 g/L) (peptona, extrato de farelo de soja e arroz) e sais de Vogel (20 mL/L) como controle. Os ensaios fermentativos foram realizados visando selecionar fontes de nitrogênio potenciais para a produção de LAS.

Os gráficos foram plotados para avaliar o desempenho da produção de LAS e crescimento do fungo *L. theobromae* em 96 h (Figura 17), considerando que o trabalho de Philippini (2017) demonstrou que nesse tempo houve maior produção de LAS, com a mesma cepa fúngica empregada neste trabalho.

Os resultados demonstraram que na presença de glicose, os extratos de farelo de soja e arroz são viáveis para a substituição das fontes de nitrogênio convencionais, com produção de LAS de 1,48 g/L e 2,30 g/L, respectivamente. Enquanto, a fontes de nitrogênio comercial (peptona) possibilitou 1,55 g/L na produção do EPS.

Entretanto, em relação à produção de biomassa celular, as quatro fontes de nitrogênio permitiram o crescimento do fungo, levando em consideração que o farelo de soja

demonstrou o maior valor de biomassa celular (8,66 g/L), seguido do farelo de arroz (6,76 g/L), e peptona (4,55 g/L).

Figura 17 – Crescimento do fungo *L. theobromae* e produção de LAS em meio de glicose suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. ■ –Biomassa celular; ▒ –LAS: Lasiodiplodana.

Fonte: Autoria própria

Cunha *et al.* (2012) avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (2 g/L) com glicose (20 g/L) para a produção de LAS e crescimento celular por *L. theobromae*. Para os testes fermentativos, foram consideradas fontes de nitrogênio orgânico (extrato de levedura, peptona e ureia) e inorgânicas (KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em fermentação submersa e nas seguintes condições: pH 6, 28 °C, 180 rpm, 48 h. Concluíram que as melhores fontes de nitrogênio foram o extrato de levedura com produção de 2,46 g/L de LAS e 11,26 g/L de biomassa celular, e peptona com valores aproximadamente 2,4 g/L de LAS e 10 g/L de biomassa.

No presente trabalho, a suplementação com peptona teve menor produção de LAS (1,55 g/L) e biomassa celular (4,55 g/L), devido a relação carbono/nitrogênio do meio, que tem o dobro de carbono (40 g/L) e com nitrogênio abundante (10 g/L), o que não favorece ao crescimento do fungo e produção do EPS.

Por outro lado, o controle com sais de Vogel (20 mL/L) resultou em 5,21 g/L de LAS e 3,74 g/L de biomassa celular, resultados semelhantes aos relatados por Philippini (2017), o qual utilizou as mesmas condições de fermentação e cepa fúngica empregadas no presente trabalho, com resultados de LAS (5,1 g/L) e biomassa celular (3,6 g/L).

5.2.2 Ensaios fermentativo II – Glicose suplementado com farelo de soja e arroz

O experimento fermentativo anterior permitiu a seleção de duas fontes potenciais de nitrogênio para a suplementação do HCBCA. No entanto, as cinéticas do crescimento fúngico, consumo de substrato e produção de LAS, foram estudadas em meio sintético de glicose suplementada com extrato de farelo de soja e arroz, analisada a cada 24 h, por 96 h de fermentação, visando avaliar o potencial dos farelos, como fontes de nitrogênio, conforme a Figura 18.

Figura 18 – Cinética de crescimento do fungo *L. theobromae* e produção de LAS em meio sintético de glicose suplementado com A) farelo soja e B) farelo de arroz. ▲ –Consumo de glicose; ● –Biomassa celular; ■ –LAS: Lasiodiplodana.

Fonte: Autoria própria

A Figura 18A apresenta a fermentação suplementada com extrato de farelo de soja, com produção de LAS a partir das 24 horas, com o ponto máximo de LAS (2,03 g/L) e biomassa celular (5,78 g/L) às 72 h, além de consumir nesse tempo a maior parte da fonte de carbono.

Enquanto na Figura 18B, se observa a fermentação suplementada com extrato de farelo de arroz, que apresenta uma tendência similar a fermentação com farelo de soja, com consumo total de glicose às 72 h, obtendo nesse tempo a produção máxima de 2,92 g/L LAS com 6,75 g/L biomassa celular. Em ambas fermentações, a tendência é diminuir a produção do EPS, após 96 h. Este comportamento cinético nos dois experimentos sugere que quando a glicose foi consumida na sua totalidade em 72 h, o fungo induziu a produção de enzimas capazes de clivar as ligações β -(1→6) do EPS para sua reconversão em glicose, o que justificaria o continuo aumento da biomassa celular e a diminuição súbita do EPS em 96 h.

Félix *et al.* (2018) caracterizaram as atividades enzimáticas extracelulares de *L. theobromae* (amilases, gelatinases, caseinases, celulasas, lipases, lacases, xilanases, pectinases e pectina liases), avaliando o efeito da temperatura em sua produção e atividades.

A expressão das enzimas com diferentes atividades hidrolíticas e oxidativas pode ser a principal causa da degradação do EPS.

No entanto, os farelos de soja e arroz são fontes orgânicas de nitrogênio complexas que contêm proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004; FACCIN *et al.*, 2009; FARIA; BASSINELLO; PENTEADO, 2012). Estes fatores contribuem para o crescimento celular do fungo, bem como o desenvolvimento das hifas necessárias para sua reprodução, portanto, têm influência significativa na produção de LAS.

5.2.3 Ensaio fermentativo III – HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz

A fermentação do HCBCA suplementado com extratos de farelo de soja e arroz por *L. theobromae* foi analisada em termos de produção de LAS, biomassa celular, consumo de glicose e proteínas, a cada 24 h, por 96 h, conforme é apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Cinética de crescimento do fungo *L. theobromae* e produção de LAS em HCBCA suplementado com A) farelo de soja e B) farelo de arroz. ▲ –Consumo de glicose; ◆ –Consumo de proteínas; ● –Biomassa celular; ■ –LAS: Lasiodiplodana.

Fonte: Autoria própria

A Figura 19A apresenta a fermentação do HCBCA suplementado com extrato de farelo de soja, em que a produção de LAS começa às 48 h em oposição à fermentação em glicose nas primeiras 24 horas. Esta fermentação resultou em seu máximo de LAS com 2,19 g/L e 5,54 g/L de biomassa celular às 96 h. Além disso, o fungo foi capaz de consumir 58,8% das proteínas iniciais após 24 h, o que foi necessário para a construção dos blocos biossintéticos do microrganismo. O consumo evidente da fonte de carbono foi no tempo de 48 h para 72 h, o que coincide com a produção inicial do EPS, apontando o metabolismo secundário do fungo na produção deste metabólito, permitindo um aumento substancial da biomassa celular.

Por outro lado, a Figura 19B apresenta a fermentação com HCBCA suplementado com extrato de farelo de arroz, cuja produção de LAS também começa no tempo de 48 h, mas é em 72 h que a maior produção de LAS foi alcançada, com 1,31 g/L e 5,05 g/L de biomassa celular. Durante as primeiras 24 h o fungo consumiu 59,49% das proteínas, enquanto o consumo do substrato finalizou às 72 h, muito semelhante a fermentação suplementada com farelo de soja.

Além disso, no tempo de 48 h podemos observar que a fermentação suplementada com farelo de soja (Figura 19A) consumiu 26,68% dos açúcares, enquanto na fermentação suplementada com farelo de arroz foi consumido 52,45% das proteínas, demonstrando que o farelo de arroz tem algum componente nutricional como aminoácidos, proteínas e sais minerais, que permitiu metabolizar melhor os açúcares por *L. theobromae*.

5.2.4 Ensaio fermentativo IV – Otimização da produção de lasiodiplodana utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz por DCCR 2²

Para a otimização das condições experimentais, as variáveis de concentração de carbono e nitrogênio foram codificadas em variáveis adimensionalizadas x_1 e x_2 , respectivamente, considerando os intervalos $-1,414 \leq x_1 \leq 1,414$ e $-1,414 \leq x_2 \leq 1,414$. A adimensionalização foi realizada com base nas Equações 9 e 10 (C = carbono; N = nitrogênio).

$$x_1 = 0,0707C - 4,242 \quad (9)$$

$$x_1 = 0,808N - 1,818 \quad (10)$$

A regressão simbólica foi realizada utilizando o software *Eureqa Formulize*, utilizando os pontos experimentais apresentados na Tabela 9 para a suplementação com extrato de arroz e na Tabela 10 para a suplementação com extrato de soja, onde: P_{96} representa a concentração de LAS (g/L) à 96 h; P_{120} a concentração de LAS à 120 horas; X_{96} a concentração de biomassa à 96 horas; X_{120} a concentração de biomassa à 120 horas; $Y_{P/S,96}$ o rendimento calculado a partir do quociente entre P_{96} e a concentração inicial do HCBCA; $Y_{P/S,120}$ o rendimento calculado a partir do quociente entre P_{120} e a concentração inicial do HCBCA.

Tabela 9 – Resultados obtidos a partir do planejamento experimental para suplementação com farelo de arroz.

x_1	x_2	$P_{96} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$P_{120} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$X_{96} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$X_{120} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$Y_{P/S, 96}$	$Y_{P/S, 120}$
-1	-1	15,06	16,28	11,964	12,178	0,3284	0,3550
1	-1	3,32	6,92	5,688	13,572	0,0448	0,0933
-1	1	17,46	23,86	12,848	14,818	0,3807	0,5203
1	1	11,54	13,27	11,458	13,912	0,1557	0,1790
-1,4142	0	10,3	8,03	12,74	19,434	0,2575	0,2008
1,4142	0	21,54	25,88	14,18	15,9	0,2693	0,3235
0	-1,4142	12,24	13,52	8,562	11,34	0,2040	0,2253
0	1,4142	13,58	11,36	11,89	18,158	0,2263	0,1893
0	0	6,08	11,7	10,684	16,592	0,1013	0,1950
0	0	5,94	11,45	10,334	16,426	0,0990	0,1908
0	0	6,28	11,69	10,274	16,412	0,1047	0,1948

Fonte: Autoria própria**Tabela 10** – Resultados obtidos a partir do planejamento experimental para suplementação com farelo de soja.

x_1	x_2	$P_{96} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$P_{120} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$X_{96} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$X_{120} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$Y_{P/S, 96}$	$Y_{P/S, 120}$
-1	-1	9,42	12,36	8,564	8,554	0,2695	0,1867
1	-1	4,16	3,94	3,938	4,596	0,0531	0,0531
-1	1	6,56	7,09	9,974	12,446	0,1546	0,2175
1	1	13,92	10,94	8,168	9,362	0,1476	0,1102
-1,414	0	5,92	7,56	6,036	7,258	0,1890	0,1509
1,414	0	7,38	5,6	7,908	8,166	0,0700	0,0989
0	-1,414	2,16	3,18	8,458	9,27	0,0530	0,1410
0	1,414	5,26	5,99	8,346	9,69	0,0998	0,1391
0	0	8,54	10,4	7,438	8,056	0,1733	0,1240
0	0	8,75	10,62	7,332	8,31	0,1770	0,1222
0	0	8,32	10,34	7,126	8,198	0,1723	0,1188

Fonte: Autoria própria

Partindo dos resultados do planejamento experimental, foram realizadas as regressões simbólicas para a obtenção das superfícies de resposta, em que são representados pelas Equações 11 e 12 para a suplementação com extrato de arroz e Equações 13 e 14 para a suplementação com extrato de soja:

$$P_{96}(x_1, x_2) = 6,0952 - 12,804x_1 + 1,4550x_1x_2 + 4,9077x_1^2 + 2,6550x_2x_1^2 + 8,3890x_1^3 + 0,8516x_2^6 \quad (11)$$

$$P_{120}(x_1, x_2) = 12,093 + 6,3118x_1 + 2,6171x_1^2 + 3,4825x_2x_1^2 - 11,299x_1x_2^2 \quad (12)$$

$$P_{96}(x_1, x_2) = 8,6438 + 2,3535x_2 + 0,5218x_1 + 3,1546x_1x_2 + 4,2049x_2^2 - x_1^2 - 0,6295x_2^3 - 3,3350x_2^4 \quad (13)$$

$$P_{120}(x_1, x_2) = 10,493 - 0,9177x_1 + 3,0675x_1x_2 + 0,4839x_2^3 - 1,4711x_2^4 - 0,4877x_1^6 \quad (14)$$

Os rendimentos podem ser estimados pelas Equações 15 e 16:

$$Y_{P/S,96}(x_1, x_2) = \frac{P_{96}(x_1, x_2)}{60 + 14,14x_1} \quad (15)$$

$$Y_{P/S,120}(x_1, x_2) = \frac{P_{120}(x_1, x_2)}{60 + 14,14x_1} \quad (16)$$

A significância estatística dos parâmetros estimados para as Equações 11-14 é apresentada na Tabela 11 e a análise estatística do modelo está apresentada na Tabela 12, onde: SQ, é soma quadrática; GL, graus de liberdade; MQ, média quadrática; R^2 , coeficiente de determinação; F, valor de Fisher utilizado para determinar a significância estatística; p valor, relacionado com a probabilidade no teste de significância de Fisher; $R^2_{\max}$, valor máximo possível para R^2 ; R^2_{ajustado} , coeficiente de determinação ajustado. Os subscritos apresentados na Tabela 12 denotam: R, para regressão; r, para resíduos; fa, para a falta de ajuste dos modelos aos dados experimentais; ep, para o erro puro considerando as réplicas no ponto central.

Tabela 11 – Significância estatística dos parâmetros das Equações 11-14.

Equação	Parâmetro	Desvio-padrão	t – estatístico	p – valor
11	6,0952	0,2665	22,9	0,0000
11	-12,804	0,5468	-23,4	0,0000
11	1,4550	0,2445	5,9	0,0040
11	4,9077	0,2183	22,5	0,0000
11	2,6550	0,2445	10,9	0,0004
11	8,3890	0,3458	24,3	0,0000
11	0,8516	0,0555	15,3	0,0001
12	12,093	0,3644	33,18905	0,0000
12	6,3118	0,4337	14,552	0,0000
12	2,6171	0,3489	7,502322	0,0003
12	3,4825	0,4337	8,030094	0,0002
12	-11,299	0,6133	-18,4218	0,0000
13	8,6438	0,0735	116,7686	0,0000
13	2,3535	0,1837	12,81148	0,0002
13	0,5218	0,0581	8,95977	0,0009
13	3,1546	0,0822	38,39566	0,0000
13	4,2049	0,2062	20,85864	0,0000
13	-0,6295	0,1162	-5,41259	0,0056
13	-3,3350	0,1071	-31,4457	0,0000
14	10,493	0,1480	70,92229	0,0000
14	-0,9177	0,1091	-8,41048	0,0004
14	3,0675	0,154316	19,87807	0,0000
14	0,4839	0,069013	7,011723	0,0009
14	-1,4711	0,069732	-21,0963	0,0000
14	-0,4877	0,034129	-14,2889	0,0000

Fonte: Autoria própria

Os resultados apresentados na Tabela 11 indicam que todos os parâmetros estimados são significativos para o nível de confiança de 95%, pois p -valores são menores que 0,05,

enquanto os resultados na Tabela 12 indicam que as regressões para todos os modelos foram significativas para o nível de confiança de 95%, segundo o teste F de Fisher ($p_R < 0,05$) e com falta de ajuste insignificante para o nível de confiança de 95% ($p_{fa} > 0,05$).

Os modelos são capazes de representar mais de 99,8% de variação ($R^2 \geq 0,998$), indicando uma boa qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais.

Tabela 12 – Análise estatística da regressão dos modelos aos dados experimentais.

	Equação			
	11	12	13	14
SQ_R	1691	2504	683,3	800,1
GL_R	7	7	7	7
MQ_R	242,6	500,9	97,61	133,4
F_R	1010	666,1	3615	1404
p_R	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SQ_f	0,957	4,513	0,108	0,476
GL_f	4	4	4	4
MQ_f	0,239	0,752	0,027	0,095
SQ_{fa}	0,9169	0,712	0,0155	0,4326
GL_{fa}	2	2	2	2
MQ_{fa}	0,4585	0,356	0,0078	0,2163
F_{fa}	9,924	17,71	0,164	8,011
p_{fa}	0,092	0,053	0,859	0,110
SQ_{ep}	0,0924	0,0401	0,0925	0,0434
GL_{ep}	2	2	2	2
MQ_{ep}	0,0462	0,0201	0,0475	0,0217
R^2	0,9994	0,9982	0,9998	0,9994
R^2_{max}	1,0000	1,0000	0,9999	0,9999
$R^2_{ajustado}$	0,9922	0,9967	0,9996	0,9987

Fonte: Autoria própria

Os ajustes das superfícies de resposta para a suplementação com extrato de farelo de arroz estão apresentados na Figura 20.

A Figura 20 mostra que as equações obtidas por regressão simbólica (superfícies de resposta) se ajustaram adequadamente aos dados experimentais (pontos pretos). Na Figura 20 observa-se duas regiões nas quais as concentrações de LAS (P_{96} e P_{120}) foram mais elevadas para x_1 próximo de -1 e de x_2 próximo de 1, e x_1 próximo de 1,4142 e de x_2 próximo de 0. Entretanto, com relação à conversão de HCBCA em LAS, observa-se que a melhor condição corresponde àquela de x_1 próximo de -1 e x_2 próximo de 1. Portanto, na otimização foi considerada como variável de resposta a conversão da fonte de carbono em LAS, uma vez que na etapa de produção do HCBCA considera-se o custo econômico envolvido, especialmente na aquisição de enzimas, o qual é significativo para o bioprocessamento em questão.

A otimização das Equações 15 e 16 para a suplementação com extrato de farelo de arroz, foi realizada utilizando a função *NMinimize* do software computacional *Wolfram*

Mathematica®, sendo obtido como ponto ótimo para a Equação 13, $x_1 = -1,0$ e $x_2 = 0,99$ ($Y_{P/S,96} = 0,381$) e para a Equação 14, $x_1 = -0,98$ e $x_2 = 1,02$ ($Y_{P/S,96} = 0,506$). Os valores otimizados para suplementação com extrato de farelo de arroz sugerem a realização da cinética para o ponto otimizado, considerado $x_1 = -1$ e $x_2 = 1$.

Figura 20 – Ajuste das superfícies de resposta aos dados experimentais para suplementação com extrato de farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria

Os ajustes das superfícies de resposta para a suplementação com extrato de farelo de soja estão apresentados na Figura 21.

A Figura 21 mostra que as equações obtidas por regressão simbólica (superfícies de resposta) se ajustaram adequadamente aos dados experimentais (pontos pretos). Na Figura 21 observam-se duas regiões nas quais as concentrações de LAS (P_{96} e P_{120}) foram mais elevadas para x_1 próximo de -1 e de x_2 próximo de -1, e x_1 próximo de 1 e de x_2 próximo de 1. Entretanto, com relação à conversão do HBCBA em LAS, observa-se que a melhor condição corresponde àquela de x_1 próximo de -1 e x_2 próximo de -1. Portanto, na otimização foi considerada como variável de resposta a conversão do substrato em LAS.

A otimização das Equações 15 e 16 para suplementação com extrato de farelo de soja foi realizada utilizando a função *NMinimize* do software computacional *Wolfram*

Mathematica®, sendo obtido como ponto ótimo para a Equação 13 $x_1 = -1,15$ e $x_2 = -0,82$ ($Y_{P/S,96} = 0,216$) e para a Equação 14 $x_1 = -1,19$ e $x_2 = -0,76$ ($Y_{P/S,96} = 0,284$). Os valores otimizados para a suplementação com extrato de farelo de soja sugerem a realização de um experimento de confirmação para $x_1 = -1,2$ e $x_2 = -0,8$, bem como a realização da cinética para este ponto otimizado.

Figura 21 – Ajuste das superfícies de resposta aos dados experimentais para suplementação com extrato de farelo de soja.

Fonte: Autoria própria

5.2.5 Ensaio fermentativo V – Validação dos modelos matemáticos da produção de *lasiodiplodana* utilizando HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz

Na otimização das Equações 15 e 16 para suplementação com extrato de farelo de soja foi utilizado o ponto ótimo para a Equação 15, $x_1 = -1,15$ (*carbono* = 43,7 g/L) e $x_2 = -0,82$ (*nitrogênio* = 1,23 g/L), para o qual os valores obtidos pelas Equações 13 e 15 foram $LAS_{96} = 9,4$ g/L e $Y_{P/S,96} = 0,216$, para a Equação 8 foram $x_1 = -1,19$ (*carbono* = 43,2 g/L) e $x_2 = -0,76$ (*nitrogênio* = 1,305 g/L) e para as Equações 15 e 16 foram $LAS_{120} = 12,3$ g/L e $Y_{P/S,120} = 0,284$.

Como resultado experimental para o ponto sugerido, $x_1 = -1,2$ e $x_2 = -0,8$, foram obtidos os valores experimentais $LAS_{96} = 13,6$ g L⁻¹, $Y_{P/S,96} = 0,34$, $LAS_{120} = 16,2$ g/L e $Y_{P/S,120} = 0,405$.

Os valores obtidos foram superiores ao esperado, indicando que apesar do modelo matemático não ter conseguido obter os valores com precisão, o mesmo foi capaz de indicar uma condição experimental melhor que aquelas utilizadas no planejamento (Figura 21).

A otimização das Equações 15 e 16 para a suplementação com extrato de farelo de arroz foi realizada com o ponto ótimo, para a Equação 15, $x_1 = -1,0$ (*carbono* = 45,7 g/L) e $x_2 = 0,99$ (*nitrogênio* = 3,45 g L⁻¹), para o qual os valores obtidos pelas Equações 11 e 15 foram $LAS_{96} = 17,4$ g/L e $Y_{P/S,96} = 0,381$, para a Equação 16, $x_1 = -0,98$ (*carbono* = 46,2 g/L) e $x_2 = 1,02$ (*nitrogênio* = 3,52 g/L) e para as Equações 12 e 16 foram $LAS_{120} = 23,4$ g/L e $Y_{P/S,120} = 0,506$.

Como resultados para os pontos sugeridos na suplementação com extrato de farelo de arroz, foram obtidos para o ponto em $x_1 = -1,4142$ e $x_2 = 1,4142$, valores de $Y_{P/S}$ e LAS inferiores ao valor ótimo ($Y_{P/S,96} = 0,210$, $LAS_{96} = 8,4$ g/L, $Y_{P/S,120} = 0,279$ e $LAS_{120} = 11,2$ g/L), indicando que o ponto ótimo ocorre em $x_1 = -1$ e $x_2 = 1$ para o qual foram obtidos os valores experimentais de $Y_{P/S,96} = 0,375$, $LAS_{96} = 16,4$ g/L, $Y_{P/S,120} = 0,504$ e $LAS_{120} = 22,0$ g/L (Figura 21).

Baseado nas melhores condições da relação carbono–nitrogênio para cada extrato dos farelos, o crescimento de *L. theobromae* em HCBCA com suplementação dos extratos de farelo de soja e arroz foram plotados, bem como o consumo de açúcares e proteínas, e a produção de LAS e biomassa celular, apresentados na Figura 22.

Figura 22– Validação dos modelos matemáticos para produção de LAS a partir da cinética de crescimento do fungo *L. theobromae* em HCBCA suplementado com A) farelo soja e B) farelo de arroz. ▲ –Consumo de ART; ◆ –Consumo de proteínas; ● –Biomassa celular; ■ –LAS: Lasiodiplodana.

Fonte: Autoria própria

Na Figura 22A, a suplementação com farelo de soja apresenta consumo de 93,47% dos ART às 96 h, enquanto a proteína houve apenas 36,24% de consumo. A produção de LAS foi observada em 48 h. A maior concentração de LAS (16,2 g/L) foi às 120 h com 8,34 g/L

de biomassa celular. No entanto, a Figura 22B apresenta os resultados da suplementação com farelo de arroz, com consumo de 90,9% dos ART às 96 h, enquanto a proteína houve 80,92% de consumo. A produção inicial de LAS, similar à Figura A, foi observada em 48 h. A maior concentração de LAS (22,03 g/L) foi às 120 h com 14,03 g/L de biomassa celular.

Em ambas fermentações, o consumo total dos açúcares foi às 96 h, sendo que as proteínas, em concentrações limitantes como fontes de nitrogênio, induziram a produção do EPS, até as 120 h as proteínas não foram consumidas na sua totalidade, com um resíduo final de 35,3% e 12,66%, para a suplementação com farelo de soja e arroz, respectivamente.

Demonstra-se que o extrato de farelo de arroz é uma melhor fonte de nitrogênio, assimilável por *L. theobromae*, devido ao fato de que o farelo de soja apresenta maior quantidade de minerais, o que possivelmente está relacionado com um efeito direto no crescimento do fungo e produção de LAS.

Também, foram calculados os parâmetros fermentativos da fermentação com HCBCA suplementado com extratos de farelo de soja e arroz por *L. theobromae* na produção de LAS (Tabela 13).

Os resultados de $Y_{P/S}$, Q_P , Q_X , Q_S , $Y_{X/S}$ e Y_C , para a fermentação com suplementação de farelo de soja apresentaram valores inferiores aos obtidos na suplementação com farelo de arroz, às 96 e 120 horas, o que coincide com as maiores concentrações de LAS na suplementação com farelo de arroz.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para produção de LAS por *L. theobromae* em HCBCA suplementado com extrato de farelo de soja e arroz.

Parâmetro cinético	Suplementação com de farelo de soja		Suplementação com farelo de arroz	
	96 h	120 h	96 h	120 h
$Y_{P/S}$ (%g/g)	36,3	42,0	41,2	52,7
Q_P (g/L.h)	0,141	0,135	0,170	0,183
Q_X (g/L.h)	0,074	0,069	0,124	0,116
Q_S (g/L.h)	0,389	0,321	0,414	0,347
$Y_{X/S}$ (%g/g)	19,0	21,6	30,0	33,63
Y_C (g/g)	1,91	1,94	1,37	1,56

Fonte: Autoria própria

5.3 Etapa 3 – Caracterização física e química de lasiodiplodana

5.3.1 Determinação da pureza de lasiodiplodana

A determinação da pureza das frações de LAS (1 g/L) obtidas foi realizada por hidrólise ácida em amostras liofilizadas, para determinar açúcares totais, glicose e proteínas totais presentes no EPS, além de usar glicose como controle para considerar possíveis degradações

dos açúcares durante o processo de hidrólise. A Tabela 14 apresenta a recuperação de açúcares e proteínas após a hidrólise das amostras.

Tabela 14 – Composição química das amostras de LAS, quanto à açúcares e proteínas.

Amostra	Massa (g)	Açúcares totais (g/L)	Glicose (g/L)	Proteínas totais (g/L)
LAS (soja)	0,0204 ± 0,0001	0,8011 ± 0,0162	0,834 ± 0,0525	0,1525 ± 0,0047
LAS (arroz)	0,0202 ± 0,0002	0,9375 ± 0,0151	0,942 ± 0,0525	0,0456 ± 0,0008
Glicose	0,0207 ± 0,0004	1,0709 ± 0,0525	1,0612 ± 0,0472	–

Fonte: Autoria própria

Os resultados apontam que LAS obtida por suplementação de farelo de arroz apresenta maior grau de pureza (94,2%) em relação a LAS proveniente da suplementação com extrato de farelo de soja (83,4% de pureza). As duas amostras de LAS foram precipitadas com etanol 4 °C, no entanto, as duas amostras apresentavam coloração característica do meio de cultura, indicando a presença de açúcares, proteínas e sais, que podem ser adsorvidos pela matriz polimérica, os quais devem ser removidos. As frações de LAS obtidas a partir de hidrolisado de farelo de arroz (HFA) apresentaram 83,62% de pureza, sendo um valor próximo a pureza de LAS obtida com suplementação de farelo de soja (PHILIPPINI, 2017).

Etapas sucessivas de lavagem foram necessárias para remover a coloração, tornando-se a frações de LAS mais purificadas para sua análise. A amostra de LAS de suplementação com farelo de arroz apresentou uma cor mais clara, o que justifica o grau de pureza em relação à LAS obtida por suplementação com farelo de soja.

5.3.2 Determinação da solubilidade da *lasiodiplodana*

As amostras de LAS foram liofilizadas para sua análise. Os resultados demonstram que os EPS em água a 25 °C sob constante agitação por 24 h apresentam baixo grau de solubilidade. A solubilidade do EPS obtido da suplementação com farelo de soja foi 4,53% (4,53 mg/100 mL), enquanto a suplementação com farelo de arroz foi 16,81% (16,81 mg/100 mL).

Theis *et al.* (2019) obtiveram resultados de solubilidade semelhantes (4,02%) com LAS nativa produzida a partir de glicose em relação à LAS obtida com suplementação de soja. No entanto, o EPS gerado por suplementação de farelo de arroz triplicou o grau de solubilidade em comparação à EPS produzido com suplementação de soja.

5.3.3 Determinação da viscosidade da lasiodiplodana

A viscosidade é uma medida de resistência de um líquido às deformações graduais causadas por tensões de cisalhamento. A Figura 23 apresenta a relação entre a viscosidade (cP) e a taxa de cisalhamento (s^{-1}) de soluções de LAS (2 g/L) (após 3 lavagens com etanol 4 °C e água 60 °C) à 25 °C.

Figura 23– Taxa de cisalhamento dependente da viscosidade. A) LAS obtida de HCBCA com suplementação com farelo de soja; B) LAS por suplementação com farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria

Um aumento da taxa de cisalhamento contribuiu na diminuição da viscosidade das soluções de LAS, sugerindo um comportamento pseudoplástico em ambas amostras à 25 °C. Cunha *et al.* (2012) relataram resultados semelhantes, explicando esse comportamento como um alinhamento das cadeias poliméricas quando LAS é submetido a um aumento contínuo da tensão de cisalhamento, resultando em uma diminuição da resistência ao fluxo.

5.3.4 Determinação da massa molecular por GPC de lasiodiplodana

A curva de calibração obtida no Apêndice A, foi plotada com os valores de massa molecular (Log MW) dos padrões descritos no item 3.5.4, versus tempos de retenção (Log MW = $-0,2652x + 7,4252$), com um coeficiente de correlação adequado ($R^2 = 0,9805$), o que permitiu estimar a massa molecular das amostras de LAS a partir do perfil de eluição dos açúcares apresentados na Figura 24.

Para a amostra de LAS obtida da suplementação de farelo de soja, a massa molecular foi calculada em 68.049 Da, enquanto a amostra obtida da suplementação de farelo de arroz foi 76.439 Da.

A determinação da massa molecular foi avaliada considerando as áreas entre os volumes de eluição de 5,6 a 13,6 mL. Após o volume de eluição entre 14,6 e 21,6 mL, ambas amostras de LAS apresentaram mais áreas, as quais podem estar relacionadas com a presença de

glicoproteínas ou oligossacarídeos que estão dentro da matriz polimérica. Na Tabela 14 do item 4.3.1, apresenta-se uma análise da composição quanto aos açúcares totais e proteínas, sendo que LAS a partir da suplementação de soja apresenta uma maior concentração de proteínas, o que justificaria claramente a área maior da Figura 22.

Figura 24– Perfil da massa molecular das amostras de LAS obtidas de HCBCA suplementadas com farelo de soja e arroz.

Fonte: Autoria própria

As duas amostras apresentaram valores semelhantes de massa molecular, mas com baixos valores de massa molecular em comparação ao relatado por Malfatti *et al.* (2016) de 1.400.000 Da para LAS gerado com meio sintético de glicose. Esta característica diferenciada da massa molecular de um mesmo EPS, pode influenciar significativamente a atividade biológica dos polissacarídeos (PURWANDARI *et al.*, 2018).

Alguns EPS, como a pululana apresentam massa molecular que varia entre 15.000 Da e 10.000.000 Da, dependendo da condição da cultura e das cepas utilizadas (KIM *et al.* 2000).

An *et al.* (2019) realizaram um estudo comparativo de diferentes produções de pululana e a relação com sua massa molecular por *Aureobasidium pullulans* CGMCC No.11602, demonstrando que quando tinha uma maior produção de pululana (64,12 g/L) atingiu 288.403 Da, mas quando a produção de pululana diminuía (40,12 g/L) a massa molecular foi maior com 3.715.352 Da.

5.3.5 Análise SEM da lasiodiplodana

As micrografias das frações de LAS, obtidas das suplementações de nitrogênio, foram observadas por SEM, como se apresenta na Figura 25.

Figura 25– Micrografias de LAS obtidas de HCBCA em ampliações de 50x, 400x e 1200x.

Fonte: Autoria própria

As micrografias de SEM das frações de LAS, geradas da suplementação com farelo de soja, apresentam uma estrutura morfológica homogênea, com filmes finos e formações de torção, assim como o relatado por Caleyary *et al.* (2017). Por outro lado, as micrografias de LAS com suplementação de farelo de arroz apresentam uma superfície irregular e fragmentada, o que explicaria porque esta fração de LAS apresenta maior grau de solubilidade em água, em relação à amostra anterior. Entretanto, ambas amostras apresentam moléculas aderidas sobre a superfície da matriz polimérica, que poderiam estar relacionadas com as impurezas das frações de EPS. A fração suplementada com farelo de soja apresentou mais estruturas desse tipo, que está relacionada com menor grau de pureza, como já foi discutido anteriormente.

5.3.6 Análise XRD da lasiodiplodana

As análises de difração de raio-X demonstraram que as duas amostras de LAS, produzidas por *L. theobromae* em meios formulados com HCBCA e diferentes suplementações de nitrogênio apresentaram perfis semelhantes, como pode ser observado na Figura 26.

Figura 26 – Perfil de raio-X de LAS obtida de HCBCA suplementada com farelo de soja e arroz.

Fonte: Autoria própria

O perfil difractográfico das amostras de LAS apresentam uma matriz amorfa, como demonstraram previamente vários trabalhos (CALEGARY *et al.*, 2017; THEIS *et al.*, 2017; LUNA *et al.*, 2018; THEIS *et al.*, 2019). A região angular de difração, aproximadamente entre 7,15 e 17,5° (2θ) de ambas amostras de LAS, demonstraram um pico intenso e amplo, na forma de ombro, e a partir de 17,5° (2θ) não são apresentados mais picos, sendo EPS completamente amorfos. Além disso, perfis de difração de LAS produzida por *L. theobromae* em meio sintético de glicose e hidrolisados de farelo de arroz e milho apresentaram resultados semelhantes a este trabalho (KAGIMURA *et al.*, 2015b; PHILIPPINI, 2017).

5.3.7 Análise FTIR da lasiodiplodana

As amostras de LAS obtidas foram submetidas à análise espectrofotométrica FTIR entre 4000 e 400 cm⁻¹. Os espectros de FTIR das amostras de EPS produzidos por *L. theobromae*

em HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz revelaram uma estrutura semelhante, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Espectros de absorção na região do infravermelho de LAS - ■ soja e ■ arroz.

Fonte: Autoria própria

As bandas largas no espectro das amostras de LAS apresentaram forte intensidade na região de 3.274 cm^{-1} , atribuída à vibração de estiramento dos grupos R-OH. Nas regiões espectrais, próximo à 2900 e 1400 cm^{-1} , existem bandas decorrentes de vibrações de deformação de grupos R-C-H, C-C, R-CH₃, R-CH₂-R, típicas dos polissacarídeos. Esses grupos funcionais, podem apresentar poucas variações, como número de onda e intensidade, dependendo da natureza do polissacarídeo (LUNA *et al.*, 2018).

A banda de 1.650 cm^{-1} presente na região corresponde ao anel de glicose, enquanto as vibrações simétricas de ligações C-O-C, que são características dos carboidratos, têm absorção em 1075 cm^{-1} (KAGIMURA *et al.*, 2015b). Na região de 890 cm^{-1} existe uma banda com baixa intensidade das ligações glicosídicas, atribuída à conformação β de LAS, conforme o descrito anteriormente por estudos de LAS na região infravermelho (VASCONCELOS *et al.*, 2013; KAGIMURA *et al.*, 2015a; CALEGARY *et al.*, 2017; THEIS *et al.*, 2017; LUNA *et al.*, 2018; THEIS *et al.*, 2019).

5.3.8 Análise DSC da lasiodiplodana

A Figura 28 apresenta três estágios diferenciados de calor das frações de LAS, obtidas da formulação do meio de cultura de HCBCA suplementado com farelo de soja e arroz. O

aquecimento variou entre 30 a 500 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min com fluxo de ar sintético de 50 mL/min.

Figura 28 – Curva de DSC de LAS obtido de HCBCA com suplementação de farelo A) soja e B) arroz.

Fonte: Autoria própria

A LAS obtida da suplementação com farelo de soja apresentou a primeira mudança de calor à 90 °C, que pode estar relacionado com a perda de água da amostra. O segundo evento corresponde à 220 °C para a degradação do EPS; e o terceiro evento com a carbonização à 264 °C. Enquanto, LAS proveniente da suplementação com farelo de arroz apresentou perda de água com um pico endotérmico à 74 °C, uma temperatura menor em comparação à amostra anterior. Os seguintes eventos ocorreram à 224 °C e 268 °C, temperaturas que correspondem à possível degradação e carbonização de LAS.

Luna *et al.* (2018) apontam que o perfil de DSC de LAS obtida de meio sintético de glicose apresenta perda de água à 63 °C, degradação à 310 °C e carbonização à 475 °C do EPS. Sendo que LAS obtida da suplementação com farelo de soja precisou de uma maior temperatura para perda de água, enquanto LAS obtida da suplementação com farelo apresentou um valor mais parecido a literatura relatada.

Contudo, as temperaturas para os estágios de degradação e carbonização foram menores aos relatados, demonstrando baixa estabilidade térmica, possivelmente devido a que estes EPS apresentam uma massa molecular menor, o que resultaria em uma menor temperatura para sua degradação e carbonização.

6 CONCLUSÕES

- A análise comparativa do efeito dos pré-tratamentos em BCA demonstrou que o pré-tratamento sequencial ácido-base é eficiente para remoção de hemicelulose e lignina;
- Os ensaios de hidrólise enzimática com 5 e 10% de ST demonstraram que quanto maior é a concentração de ST, maior é a liberação de açúcares com rendimentos de reação menores; caso contrário com baixas concentrações de ST;
- As suplementações com farelo de soja e arroz em meio elaborado com glicose possibilitaram a produção de LAS;
- A cinética fermentativa de *L. theobromae* em meio sintético de glicose e meio formulados com HCBCA suplementados com farelos de soja e arroz demonstrou o potencial biotecnológico dos subprodutos agroindustriais na produção de LAS;
- O planejamento experimental de DCCR 2² para estudar a relação carbono/nitrogênio na produção máxima de LAS permitiu obter modelos matemáticos com níveis de confiança de 95% e *p*-valores menores que 0,05;
- O extrato de farelo de arroz, resultou ser melhor fonte de nitrogênio para a suplementação do HCBCA, sendo mais assimilável que o extrato de farelo de soja na produção de LAS;
- As caracterizações de algumas das propriedades das amostras de LAS apresentaram perfis semelhantes, com grau de pureza altos, baixa solubilidade, comportamento pseudoplástico e baixa massa molecular;
- As análises de SEM, DSC, e GPC das frações de LAS estudadas demonstraram características e propriedades inéditas, o que poderia resultar em novas aplicações;
- As análises de XRD e FTIR demonstraram características e valores semelhantes às reportadas na literatura, evidenciando que os EPS produzidos por *L. theobromae* apresentaram composição similar a LAS estudadas anteriormente.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Faz-se necessária a caracterização química dos extratos de farelo de soja e farelo de arroz utilizados na suplementação do HCBCA, em termos de açúcares, sais minerais, aminoácidos e vitaminas;
- Fazem-se necessárias as determinações das propriedades reológicas das frações LAS obtidas nos meios formulados em HCBCA com os extratos de farelo de soja e farelo de arroz;
- Caracterização detalhada das frações de LAS obtidas dos meios formulados por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Caracterização das propriedades térmicas completa das frações de LAS por técnicas de TGA, DTG e DTA;
- Avaliação das atividades biológicas de LAS, como antioxidantes e antimicrobianos,
- Escalonamento dos processos empregados para validação da produção industrial da LAS em reatores de maior capacidade volumétrica.
- Uma vez que a produção da LAS foi maximizada com o estudo da relação carbono/nitrogênio, em meios formulados de HCBCA com extratos de farelos de soja, espera-se a prospecção de novos meios fermentativos e a partir de biomassas agrícolas;

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, p. 1, 2010.
- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AGUSTINI, R. et al. Characterization of yeast hydrolysate enzymatic (yhe) from yeast fermented in the variation of rice flour. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 012006.
- AHMAD, Asif et al. Beta glucan: a valuable functional ingredient in foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 3, p. 201-212, 2012.
- AHMAD, E.; PANT, K. K. Lignin conversion: a key to the concept of lignocellulosic biomass-based integrated biorefinery. In: BHASKAR, T.; PANDEY, A.; MOHAN, S. V.; LEE, D. J.; KUMAR, S. K. **Waste Biorefinery**. New Delhi, India. Elsevier, 2018. p. 409-444.
- ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 1623-1627, 1971.
- AL-SHORGANI, Najeeb Kaid Nasser; KALIL, Mohd Sahaid; YUSOFF, Wan Mohtar Wan. Biobutanol production from rice bran and de-oiled rice bran by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 5, p. 817-826, 2012.
- ALVES, A. et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- AN, Chao et al. Comparative study of different molecular weight pullulan productions by *Aureobasidium pullulans* CGMCC No. 11602. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 156, 2019.
- ANDRADE, E. F.; ORLANDO, D. R. Beta-Glucans as a therapeutic agent: Literature Review. **Madridge J Food Tech**, v. 3, n. 2, p. 154-158, 2018.
- BACH, B. et al. Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wine. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 1, p. 185-190, 2011.
- BACIC, A.; FINCHER, G. B.; STONE, B. A. (Ed.). **Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides**. USA. Academic Press, 2009.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina**, p. 29-42, 2004.
- BASHARI, M. et al. Separation and characterization of dextran extracted from deteriorated sugarcane. **International journal of biological macromolecules**, v. 59, p. 246-254, 2013.
- BASU, P. **Biomass gasification, pyrolysis and torrefaction: practical design and theory**. USA. Academic Press, 2018.
- BHARATHIRAJA, S. et al. Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. In: FERREIRA, I. C. F.R.; BARROS, L. **Advances in food and nutrition research**. USA. Academic Press, 2017. p.125-148.

- BINOD, P. et al. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 109-116, 2012.
- BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.
- 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.
- CALEGARI, G. C. et al. Sulfonation of (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan) and Its Antioxidant and Antimicrobial Potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 850-863, 2017.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.
- CAVALLERO, A. et al. High (1→3, 1→4)-β-glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 1, p. 59-66, 2002.
- CHANDEL, A. K. et al. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 63, 2014.
- CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.
- CHANDEL, A. K. et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource technology**, v. 264, p. 370-381, 2018.
- CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass: Techniques, Applications and Commercialization**. India. BoD–Books on Demand, 2013.
- CHEN, S. et al. Lasiodiplactone A, a novel lactone from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 15, n. 30, p. 6338-6341, 2017.
- CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v. 93, p. 237-244, 2012.
- CHENG, K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.
- CHI, Z.; ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 206-211, 2003.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, V. 6 - Safra 2019/20, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília-DF, p. 1-62, Ago. 2019a.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, V. 7 - SAFRA 2019/20 - N. 2 - Sétimo levantamento, Brasília-DF, p.1-110, Nov. 2019b.

CUNHA, M. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179-1188, 2012.

CUNHA, M. A. et al. Structure and Biological Functions of D-Glucans and Their Applications. In: ATTA-UR-RAHMAN, F. R. S. **Studies in Natural Products Chemistry**. India. Elsevier, 2017. p. 309-337.

CUNHA, M. A. et al. Structure and Biological Properties of Lasiodiplodan: An Uncommon Fungal Exopolysaccharide of the (1→6)-β-D-Glucan Type. In: EPHRAIM, C.; HANS; M. **Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices**. Switzerland. Springer, Cham, 2019. p. 409-432.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 54, n. 6, p. 1075-1092, 2011.

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, 2007.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.

DUBOIS, Michel 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, 2011.

ELISASHVILI, V. I.; KACHLISHVILI, E. T.; WASSER, S. P. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 45, n. 5, p. 531-535, 2009.

ERGEENE, E.; AVCI, A. Effects of Cultural Conditions on Exopolysaccharide Production by *Bacillus* sp. ZBP4. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 24, n. 3, p. 386-393, 2017.

FACCIN, G. L. et al. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. **Rice Science**, v. 16, n. 3, p. 226-234, 2009.

FAO. The future of food and agriculture – Trends and challenges. **Building Resilience for Peace and Food Security**, Food and Agriculture Organization, Rome, 2017.

FARIA, S. A. S. C.; BASSINELLO, P. Z.; PENTEADO, M. V. C. Nutritional composition of rice bran submitted to different stabilization procedures. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 651-657, 2012.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, U.S. National Fungus Collections, ARS, USA. Retrieved 30 Nov 2019. 2019.

FÉLIX, C. et al. *Lasiodiplodia theobromae* as a Producer of Biotechnologically Relevant Enzymes. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 29, 2018.

FERREIRA, L. M. et al. Pullulan: an advantageous natural polysaccharide excipient to formulate tablets of alendronate-loaded microparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 27-33, 2015.

FORECAST, Market Data. Beta-Glucan Market Segmented by Source (Mushroom, Cereal, Seaweed, Yeast), by Application (Food & Beverages, Pharmaceuticals, Personal Care, Animal Feed), By Type (Soluble, Insoluble) Regional analysis- Global Industry Analysis, Forecast, Trends and Market Size and Forecast to 2024. **Market Data Forecast, Inc.**, Hyderabad, India. 2019.

GARCÍA, M. C. Drug delivery systems based on nonimmunogenic biopolymers. In: ANILKUMAR, P. **Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems**. Canada. Woodhead Publishing, 2018. p. 317-344.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIESE, E. C. et al. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 7, p. 1266-1272, 2013.

GIESE, E. C. et al. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 953-956, 2008.

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

GOMES, F. M. et al. Multiple response optimization: Analysis of genetic programming for symbolic regression and assessment of desirability functions. **Knowledge-Based Systems**, v. 179, p. 21-33, 2019.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

GUPTA, P.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, Vikas. Role of Exopolysaccharides in Biofilm Formation. In: NAVANIETHA, K. R.; RAJESH K. S. **Introduction to Biofilm Engineering**. USA. American Chemical Society, 2019. p. 17-57.

HALDER, P. et al. Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 268-292, 2019.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 2, p. 215-225, 2011.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, Amit K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 262, p. 310-318, 2018.

IRFAN, M. et al. FTIR and SEM analysis of thermo-chemical fractionated sugarcane bagasse. **Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi**, v. 36, n. 4, 2011.

JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W. J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Extraction**, v. 27, n. 1, p. 56, 2005.

JIANG, M. et al. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using spent brewer's yeast hydrolysate as a nitrogen source. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 244-254, 2010.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 353-363, 2013.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015a.

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

KAGIMURA, F. Y. et al. Production of the exopolysaccharide lasiodiplodan in a stirred-tank bioreactor. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 10, n. 1, 2015c.

KAMAL, N. et al. Metabolomics-guided isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta medica**, v. 234, n. 06, p. 565-573, 2017.

KAMPEN, W. H. Nutritional requirements in fermentation processes. In: HENRY, C. V.; CELESTE, M. T. **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook**. USA. William Andrew Publishing, 2014. p. 37-57.

KARR-LILIENTHAL, L. K. et al. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean-producing countries. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6193-6199, 2004.

KELLER, F. A.; HAMILTON, J. E.; NGUYEN, Q. A. Microbial pretreatment of biomass. BRIAN, H. D.; JAMES, W. L.; MARK, F.; JAMES D. M. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. USA. Humana Press, 2003. p. 27-41.

KHANZADA, M. A.; LODHI, A. M.; SHAHZAD, S. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 1023, 2005.

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, 2006.

KIM, I. et al. Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 563-567, 2014.

KIM, J. H. et al. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 12, p. 987-990, 2000.

KITAOKA, N.; NABETA, K.; MATSUURA, H. Isolation and structural elucidation of a new cyclohexenone compound from *Lasiodiplodia theobromae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 8, p. 1890-1892, 2009.

- KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.
- KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; POMBALA, S. Lasiosan, a new exopolysaccharide from *Lasiodiplodia* sp. strain B2 (MTCC 6000): Structural characterization and biological evaluation. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 162-169, 2018.
- KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- KWON, S. et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 209-215, 2000.
- LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.
- LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- LEE, J. W.; JEFFRIES, T. W. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 5884-5890, 2011.
- LI, L. et al. Continuous L-lactic acid production from defatted rice bran hydrolysate using corn stover bagasse immobilized carrier. **RSC Advances**, v. 5, n. 24, p. 18511-18517, 2015.
- LI, P. et al. Biosynthesis of theobroxide and its related compounds, metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 819-823, 2007.
- LI, Z. et al. L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation with corn steep liquor-supplemented acid-hydrolysate of soybean meal. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 1, n. 12, p. 1453-1458, 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUNA, W. N. S. et al. O-Acetylated (1→6)-β-D-Glucan (Lasiodiplodan): Chemical Derivatization, Characterization and Antioxidant Activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 320-332, 2018.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiology insights**, v. 6, p. MBI. S10957, 2013.
- MALFATTI, C. R. et al. Intracerebroventricular administration of the (1→6)-β-d-glucan (lasiodiplodan) in male rats prevents d-penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1289-1294, 2017.
- MANGINOT, C.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 511-517, 1998.
- MANZONI, M.; ROLLINI, M. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 18, p. 1491-1497, 2001.

MARTIN, C. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, n. 7, p. 339-352, 2007

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, 2014.

MEISEN, S.; WINGENDER, J.; TELGHEDER, U. Analysis of microbial extracellular polysaccharides in biofilms by HPLC. Part I: development of the analytical method using two complementary stationary phases. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 3, p. 993, 2008.

MELLO, M. B. et al. Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. **Toxicology**, v. 376, p. 66-74, 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial exopolysaccharides. **The prokaryotes: Applied bacteriology and biotechnology**, p. 179-192, 2013.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MUNIZ, C. R. et al. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, n. 5, p. 419-428, 2011.

NOVAK, V.; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 9, n. 1, p. 67-75, 2009.

OH, Y. H. et al. Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution. **Bioresource technology**, v. 181, p. 283-290, 2015.

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.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PEREIRA, P. H. F. et al. Sugarcane bagasse pulping and bleaching: Thermal and chemical characterization. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 2471-2482, 2011.

PHILIPPINI, R. R. et al. Corn-bran hydrolysate as low-cost media for lasiodiplodan biopolymer by filamentous fungi *Lasiodiplodia theobromae*. **Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology**, p. 134, 2018.

PHILIPPINI, R. R. et al. Pretreatment of Sugarcane Bagasse from Cane Hybrids: Effects on Chemical Composition and 2G Sugars Recovery. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-10, 2017.

PHILIPPINI, R. R. **Produção de exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas**. Tese (Doutorado em ciências). Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PICOS-MUÑOZ, P. A. et al. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 33, n. 1, p. 54-74, 2015.

PILLAI, R.; REDMOND, M.; RÖDING, J. Anti-wrinkle therapy: significant new findings in the non-invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with beta-glucan. **International journal of cosmetic science**, v. 27, n. 5, p. 292-292, 2005.

PU, Y. et al. The new forestry biofuels sector. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy**, v. 2, n. 1, p. 58-73, 2008.

PURWANDARI, U. Metabolites of *Botryodiplodia theobromae* for therapeutic agent and food industry. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 3, 2018.

QUEIROZ, E. A. I. F. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 67, p. 14-24, 2015.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 2, p. 94, 2011.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications—A review. **Bioresource technology**, v. 98, n. 10, p. 2000-2009, 2007.

RAVINDRAN, R. et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

RAZACK, S. A.; 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.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2012.

RODRIGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 2, p. 143-152, 2004.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

SAHA, A. et al. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 3, p. 407, 2008.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J.; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 1, p. 183-193, 2014.

SANTOS, P. H. D. et al. Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 2, 2017.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, 2010.
SCHMID, J.; MEYER, V.; SIEBER, V. Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 937-947, 2011.

SHAH, S. S. M. et al. Preparation of kenaf stem hemicellulosic hydrolysate and its fermentability in microbial production of xylitol by *Escherichia coli* BL21. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4080, 2019.

SHAH, S. S. M. et al. Preparation of kenaf stem hemicellulosic hydrolysate and its fermentability in microbial production of xylitol by *Escherichia coli* BL21. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4080, 2019.

SHAHBAZ, M. et al. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). **Pak. J. Bot**, v. 41, n. 1, p. 359-368, 2009.

SHARMA, A.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 3, p. 215-218, 2002.

SHEN, N. et al. Production of succinic acid from sugarcane molasses supplemented with a mixture of corn steep liquor powder and peanut meal as nitrogen sources by *Actinobacillus succinogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 60, n. 6, p. 544-551, 2015.

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 4, p. 248-252, 2001.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2011.

SILVERSTEIN, R. A. et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource technology**, v. 98, n. 16, p. 3000-3011, 2007.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SLUITER, A. et al. Determination of extractives in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, v. 1617, 2005.

SLUITER, Amie et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, p. 1-16, 2008.

SPATAREANU, A. et al. Synthesis, characterization and solution behaviour of oxidized pullulan. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 63-71, 2014.

SRIKANTH, Rapala et al. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate polymers**, v. 120, p. 102-114, 2015.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 44, n. 6, p. 480-486, 2004.

STEWART, D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. **Industrial crops and products**, v. 27, n. 2, p. 202-207, 2008.

SURVASE, Shrikant A. et al. Scleroglucan: fermentative production, downstream processing and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 107, 2007.

TADA, R. et al. Barley-derived β -D-glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated pathway. **Immunology letters**, v. 123, n. 2, p. 144-148, 2009.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

THEIS, T. V. et al. Exocellular (1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan (lasiodiplodan): Carboxymethylation, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activity. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 19-33, 2017.

THEIS, T. V. et al. Fungal Exocellular (1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucan: Carboxymethylation, Characterization, and Antioxidant Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2337, 2019.

TODHANAKASEM, T. et al. The composition of rice bran hydrolysate and its possibility to use in the ethanol production by *Zymomonas mobilis* Biofilm. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, n. 12, p. 1126-1130, 2012.

TSIGIE, Y. A. et al. Oil production from *Yarrowia lipolytica* Polg using rice bran hydrolysate. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo-and polysaccharides (Dietary Fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 1, n. 3, p. 90-109, 2002.

TÚRMINA, J. 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.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 637-641, 2002.

ULLAH, K. et al. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 682-698, 2015.

UMEOKOLI, B. O. et al. A new depsidone derivative from mangrove sediment derived fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Natural product research**, p. 1-8, 2018.

VALAYIL, J. M.; GURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. Modulating the biosynthesis of a bioactive steroidal saponin, cholestanol glucoside by *Lasiodiplodia theobromae* using abiotic stress factors. **Int. J. Pharmacy Pharma. Sci**, v. 7, p. 114-117, 2015.

VALDIVIA, M. et al. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585-594, 2016.

VALORAL ADVISORS. Impact investing in the global food and agricultural investment space. Investing profitably whilst fostering a sustainable and thriving agriculture, p.1-27, Nov. 2018.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

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.

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.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microb. Genet. Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.

WATCHARARUJI, K. et al. Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6207-6213, 2008

WILLIAMS, A.; LINHARDT, R. J.; KOFFAS, M. A. G. Metabolic engineering of capsular polysaccharides. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 2, n. 3, p. 337-348, 2018.

WU, S. et al. Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel glycogen branching enzyme from *Rhizomucor miehei* and its application in wheat breadmaking. **Food chemistry**, v. 159, p. 85-94, 2014.

XI, Y. L. et al. Effect of biotin and a similar compound on succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a chemically defined medium. **Biochemical engineering journal**, v. 69, p. 87-92, 2012.

XIE, J. H. et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. sup1, p. S60-S84, 2016.

XU, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 2-3, p. 162-167, 2007.

YOO, I. K. et al. Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 2, p. 172-175, 1997.

YU, Y. et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 183, p. 91-101, 2018.

ZHANG, K.; YU, C.; YANG, S. T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 173-179, 2015.

ZHANG, R. et al. Modeling and optimization of dilute nitric acid hydrolysis on corn stover. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 306-314, 2011.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.

ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z. Green and sustainable separation of natural products from agro-industrial waste: Challenges, potentialities, and perspectives on emerging approaches. In: LIN, C. S. K. **Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization**. China. Springer, 2018. p. 229-282.

APÊNDICES

Apêndice A – Curva de calibração de GPC (GUERRA, 1998).

Apêndice B – Curva de calibração de compostos fenólicos totais (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Apêndice C – Curva de calibração de açúcares redutores totais (MILLER, 1959).

Apêndice D – Curva de calibração de proteínas totais (LOWRY *et al.*, 1951).

Apêndice E – Curva de calibração de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956).