

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENGENHARIA QUÍMICA**

JULIANA ESTRUGIAKI DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA PELO FUNGO
Aureobasidium pullulans EM MELAÇO DE CANA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2020

JULIANA ESTRUGIAKI DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA PELO FUNGO
Aureobasidium pullulans EM MELAÇO DE CANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento Acadêmico de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

Professor Orientador: Dr. Eduardo Bittencourt Sydney.



PONTA GROSSA

2020

TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA PELO FUNGO *Aureobasidium pullulans* EM
MELAÇO DE CANA

por
JULIANA ESTRUGIAKI DOS SANTOS

Monografia apresentada no dia 02 de Outubro de 2020 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado com restrições.

Prof. Dr. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
(UTFPR)

Prof. Dr. Sabrina Avila Rodrigues
(UTFPR)

Profa. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

“O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso”

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre me mostraram que a educação é o único caminho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer acima de tudo meus pais, que apesar de todas as dificuldades sempre me deram a melhor educação possível.

Em especial, gostaria de agradecer o professor Eduardo por todas as reuniões para tirar minhas inúmeras dúvidas, pela paciência e vontade de ensinar.

A todos os meus amigos da faculdade, aqui vai meu muito obrigada, pelas risadas, pelas lágrimas, pelos dias que passamos estudando juntos, pelos trabalhos e principalmente pelos conhecimentos trocados.

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

SANTOS, Juliana Estrugiaki dos. **PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO PULULANA PELO FUNGO *Aureobasidium pullulans* EM MELAÇO DE CANA.** 2019. Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

A pululana é um exopolissacarídeo solúvel em água, biodegradável e de baixa toxicidade. É aplicável nos setores alimentício, químico e farmacêutico na formação de fibras impermeáveis ao oxigênio, espessante de adesivos ou agente de encapsulamento, na formulação de comidas com baixo teor calórico, produção de vacinas, entre outros. Esse polissacarídeo é produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans* via processo fermentativo e excretado para o exterior das células. O presente trabalho avaliou de que forma a concentração do melaço de cana, pH e concentração de extrato de levedura no meio de cultivo influenciam na produção de biomassa do referido fungo e da pululana. Com o auxílio de ferramentas estatísticas encontrou-se a condição otimizada de produção com valores de pH igual a 7, concentração de melaço de cana 6% e concentração de extrato de levedura com valor de 5 g.L⁻¹. A biomassa produzida foi igual a 3,195 g.L⁻¹ e produção do EPS igual a 26,938 g.L⁻¹.

Palavras – chave: *Polissacarídeo; fermentação; otimização.*

ABSTRACT

SANTOS, Juliana Estrugiaki dos. **EXOPOLISACARIDE PULULAN PRODUCTION BY THE FUNGUS *Aureobasidium pullulans* IN SUGARCANE MOLASSES.** Undergraduate thesis (Bachelor degree in Chemical Engineering) – Federal Technological University of Paraná – Campus Ponta Grossa.

Pullulan is a water-soluble, biodegradable and low toxic exopolysaccharide. It is applicable in the food, chemical and pharmaceutical sectors in the formation of oxygen-imperious fibers, adhesive thickeners or encapsulating agents, in the formulation of low-calorie foods, vaccine production, among others. This polysaccharide is produced by *Aureobasidium pullulans* fungus via fermentation process and excreted outside the cells. The present work evaluated how the concentration of cane molasses, pH and yeast extract concentration in the culture medium influence the production of biomass and pullulan of the previously mentioned fungus. With the aid of statistical tools, the optimized production condition was found with pH value equal to 7, concentration of cane molasses 6% and concentration of yeast extract with a value of 5 g.L⁻¹. The biomass produced was equal to 3.195 g.L⁻¹ and EPS production equal to 26.938 g.L⁻¹.

Key – words: *Polysaccharide; fermentation; optimization.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônia do fungo <i>A. pullulans</i>	17
Figura 2 - Diferentes tipos de morfologia do <i>A. pullulans</i>	17
Figura 3 - Estrutura química pululana.....	19
Figura 4 - Ilustração do tubo falcon com o peso seco de biomassa dos 7 dias de fermentação e após as 24 horas na estufa de 80°C.....	28
Figura 5 - Extração com álcool etanol do exopolissacarídeo pululana.....	30
Figura 6 - Exopolissacarídeo separado do meio pela inserção do álcool etanol..	31
Figura 7 – Melaço de Cana vendido pelo site mercado livre.....	35
Figura 8 - Extrato de levedura vendido pela loja Synth Acessórios e Equipamentos para Laboratórios.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de pululana pelo fungo <i>Aureobasidium pullulans</i> com diferentes fontes de carbono.....	21
Tabela 2 - Permeabilidade de filmes comestíveis ao oxigênio a 25 °C em diferentes umidades relativas.....	23
Tabela 3 - Concentração de melaço de cana, extrato de levedura e valor de pH aplicados a cada experimento.....	24
Tabela 4 - Resultado de células por mL obtido através de diferentes concentrações de melaço de cana.....	26
Tabela 5 - Resultados em g.L ⁻¹ de peso seco de biomassa após os 7 dias de fermentação.....	29
Tabela 6 - Parâmetros de confiabilidade obtidos através do software estatístico ao testar a exatidão dos resultados de peso seco de biomassa após os 7 dias de fermentação.....	30
Tabela 7 - Apresentação dos resultados obtidos de peso seco de biomassa e peso seco de pululana de cada experimento.....	32
Tabela 8 - Valores de % de melaço de cana, pH e concentração de extrato de levedura dos meios de mínima, média e máxima produção de pulula.....	34
Tabela 9 - Resultado do peso seco da biomassa e da pululana das triplicatas.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação entre a Concentração de peso seco de Biomassa e a pululana produzida.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPS Exopolissacarídeo

Rpm Rotações por minuto

NaOH Hidróxido de sódio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Problema:.....	15
1.2 Objetivo geral.....	15
1.3 Objetivos específicos.....	15
1.4 Justificativa.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Aureobasidium pullulans</i>.....	16
2.2 Exopolissacarídeos.....	18
2.3 Pululana	19
2.3.1 Fatores que afetam a produção da pululana.....	20
2.3.2 Aplicações.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Microrganismo.....	25
3.2 Meios de cultivo.....	25
3.2.1 Manutenção.....	25
3.2.2 Meio de cultivo para produção do exopolissacarídeo.....	25
3.3 Quantificação de biomassa	27
3.4 Quantificação de pululana.....	27
3.5 Otimização	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Biomassa.....	29
4.2 Polissacarídeo	31
5. AVALIAÇÃO COMERCIAL.....	36
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Macromoléculas orgânicas, também chamadas de glicanas ou polissacarídeos podem ser encontradas em todos os seres vivos. Nas plantas o amido e a glicose são exemplos desses polissacarídeos e nos animais destaca-se o glicogênio. O termo exopolissacarídeo é utilizado para aqueles polissacarídeos produzidos por fungos e bactérias e que são excretados para o exterior das células (BARBOSA, et al. 2006).

O primeiro passo da ciência com relação a esse assunto foi com o descobrimento da dextrana, polissacarídeo produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, em 1874 (BARBOSA, et al. 2006). Dentre as aplicações desse composto pode-se citar seu uso para estabilizar e espessar alimentos e também como uma película para proteger sementes (OLIVEIRA, 2013). O estudo sobre os biopolímeros produzidos por microrganismos desperta o interesse das indústrias farmacêuticas, química e de alimentos, visto que possuem propriedades biotecnológicas e características parecidas com os polímeros produzidos quimicamente, podendo ser utilizado como estabilizante, espessante de viscosidade, entre outros (SLIVINSKI, 2014).

A pululana é um dos poucos exopolissacarídeos neutros e solúvel em água, e é produzida pelo fungo denominado *Aureobasidium pullulans*. Filmes impermeáveis a oxigênio, adesivos e fibras são as suas principais aplicações (POLLOCK, et al. 1991). As primeiras observações feitas desse biopolímero datam o ano de 1938 por Bauer, e somente 20 anos depois foi que Bernier realizou seu isolamento e apenas nos anos 60 os cientistas conseguiram determinar a estrutura básica desse composto (OLIVEIRA, 2010).

A escolha do substrato para o processo fermentativo e produção do EPS é de suma importância pois atuará como fonte de energia e de carbono para o microrganismo e como representa grande parte do custo do processo é necessária uma avaliação econômica (SLIVINSKI, 2014). Visando a economia e buscando um rendimento satisfatório para a produção da pululana, a principal fonte de carbono que será empregada no presente estudo será o melaço de cana-de-açúcar.

1.1 Problema: Qual a melhor composição de meio de cultivo a base de melaço de cana para produção do exopolissacarídeo pululana pelo fungo *Aureobasidium pullulans*?

1.2 Objetivo geral

Encontrar a melhor condição de produção do exopolissacarídeo pululana em meio a base de melaço de cana pelo fungo *Aureobasidium pullulans*.

1.3 Objetivos específicos

- Estudar a influência da concentração de melaço, pH e concentração de extrato de levedura na produção do exopolissacarídeo.
- Realizar análises de peso seco de biomassa e de exopolissacarídeo.
- Comparar os dados obtidos.

1.4 Justificativa

Atualmente com a industrialização e a globalização a competitividade se tornou acirrada entre as empresas, com o objetivo de conquistar novos mercados e reduzir o custo de produção as indústrias buscam por matérias primas mais baratas, mas que não alterem a qualidade final do produto. Uma boa opção para a redução dos custos é a reutilização de subprodutos de outros processos.

De acordo com Mezaroba, et al. (2010) o melaço de cana é o subproduto principal do processo de obtenção do açúcar, sendo que 1000 quilogramas processadas de cana de açúcar darão origem a 40 a 60 quilogramas desse subproduto. O Brasil é atualmente o maior produtor de açúcar no mundo, logo há uma produção elevada do melaço de cana tornando-se assim uma fonte de energia de carbono barata e abundante para o processo fermentativo (SLIVINSKI, 2014).

A produção da pululana está concentrada em países desenvolvidos como Estados Unidos e Japão, o Brasil ainda não possui tecnologias para a produção desse EPS (OLIVEIRA, 2010). Tendo em vista esse fator e o alto valor da comercialização do exopolissacarídeo pululana esse trabalho tem como objetivo utilizar um meio de

cultivo mais barato, o melaço de cana, e obter um rendimento considerável desse polissacarídeo para tornar o processo economicamente viável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aureobasidium pullulans*

Todos os organismos que habitam o planeta Terra são divididos em reinos para melhor classificação das espécies e estudo. Dentre esses reinos, podemos citar o Animália, Plantae, Monera, Protista e Reino Fungi. Este último abrange os fungos, organismos eucariontes, heterotróficos, encontrados geralmente em ambientes úmidos e com matéria orgânica. São considerados economicamente relevantes pelo fato de possuírem diversas aplicações, como em processos fermentativos na fabricação de bebidas alcoólicas, leites fermentados, pães, bolos e na culinária.

Eles também são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos. Enfim, os fungos são microrganismos de grande interesse biotecnológico (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2014, p.1).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, porém apenas 69.000 foram descobertos (SILVA; COELHO, 2006). Dentre essas espécies encontra-se o fungo *Aureobasidium pullulans*, pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Dothideales, Família Dothioraceae e Gênero *Aureobasidium* (NATURDATA, 2019).

“Esse fungo pode ser encontrado em todos os nichos ecológicos, como florestas, solos, águas doces e marinhas, tecidos vegetais e também tecidos animais” (SHINGEL, 2014, p.2).

Dentre as principais características do *A. pullulans*, o que chama a atenção é o fato desse fungo, em seus estágios iniciais de crescimento possuir coloração clara que com o passar dos dias escurece, tornando-se arroxeada escura, o que caracteriza o apelido a essa espécie ‘levedura negra’ (KLEIN, 2019), (Figura 1). Frazen, citado por Klein (2016) explica que essa coloração adquirida serve de proteção para a levedura contra luz ultravioleta, irradiações, quebra e ação de radicais livres que podem causar a morte.

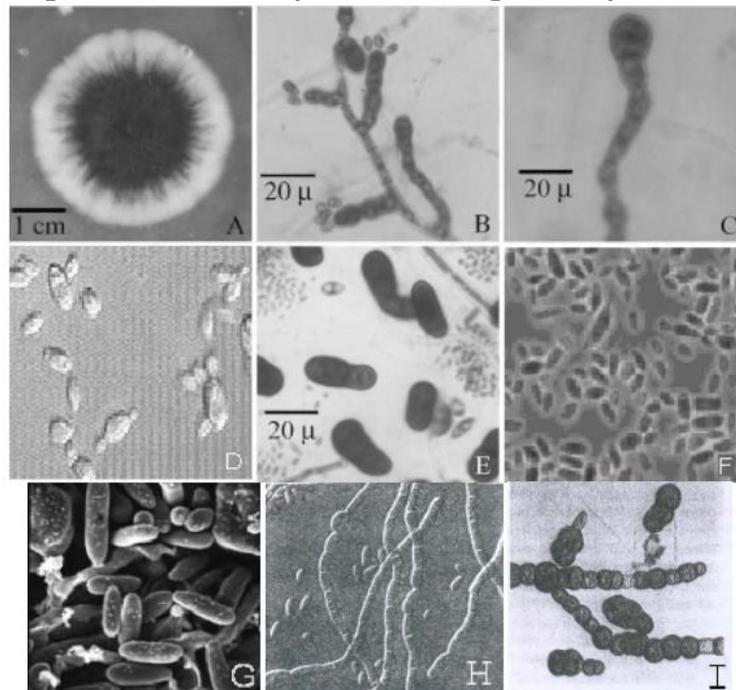
Figura 1: Colônia do fungo *A. pullulans*.



Fonte: Autoria própria.

Ronen citado por Sugumaran e Ponnusami (2017) afirma que o *A. pullulans* possui diversas morfologias celulares diferentes, dentre elas pode-se citar, clamidósporos, blastóporos jovens e swollen blastóporos, micélios e células yeast-like ou leveduriforme. Esse último tipo é o responsável pela produção do exopolissacarídeo pululana através do processo fermentativo. A figura 2 retrata as diferentes morfologias assumidas por esse fungo.

Figura 2: Diferentes tipos de morfologia do *A. pullulans*.



Fonte: OLIVEIRA, J.D. (2010) p.19.

A figura A representa a colônia, a figura B o corpo de frutificação, a figura C trata-se da hifa escura com clamidósporo na extremidade, a D células unicelulares em gemulação, E artroconídio negro, F blastoconídios, G- hifas e blastoconídios, H hifas septadas e blastosporos e a figura I retrata células filamentosas envolvidas por material capsular, possivelmente, polissacarídeo (OLIVEIRA, 2010).

Além de produzir a pululana, o *A. pullulans* também produz uma variedade de enzimas, como: amilases, proteases, lipases, esterases, pectinases, e as hemicelulases, xilanase e manase (OLIVEIRA, 2010).

2.2 Exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos são polímeros de monossacarídeos secretados no meio de cultivo que apresentam diferentes aplicações industriais (BARBOSA et al., 2004), e podem ser produzidos tanto por bactérias como por fungos. São produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, sendo considerados metabólitos secundários (PINHEIRO, 2014).

A dextrana, polissacarídeo produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* foi o EPS mais importante produzido, e a partir dele que iniciou os estudos referentes a esse tema (BARBOSA et al., 2004), sendo que a maior parte das pesquisas focavam nos biopolímeros de origem microbiana, porém, como citado por Silva et al. (2005) o custo de produção ainda é relativamente elevado quando comparado aos polissacarídeos de origem fúngica e necessitam de investimentos intensos de capital e energia.

Os exopolissacarídeos fúngicos podem ser classificados de duas formas: heteropolissacarídeos e homopolissacarídeos. Como os polissacarídeos são cadeias orgânicas de monossacarídeos, um homopolissacarídeo é uma cadeia formada apenas por um monômero, já heteropolissacarídeos são formados por diferentes monômeros (SILVA, et al 2005). Os EPSs produzidos por fungos dependem principalmente da cepa fúngica utilizada, as condições físicas mantidas durante a fermentação, e tipo dos componentes médios aplicados à produção (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Philippini (2017) afirma que os EPSs possuem aplicação industrial principalmente nos setores alimentícios, farmacêutico e químico. Na indústria alimentícia pode-se citar sua utilização para filmes comestíveis e de revestimento

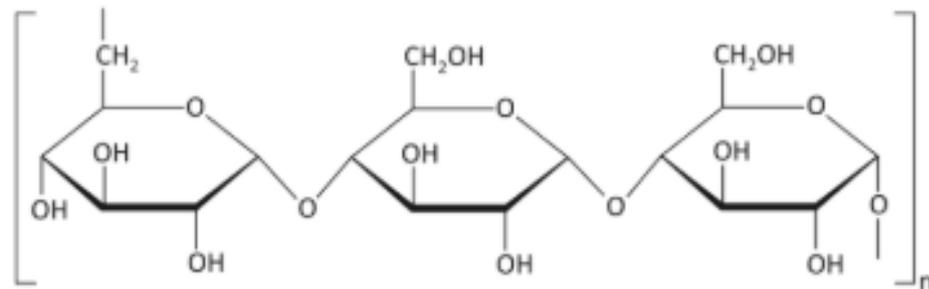
para alimentos, já que alguns são barreiras para a passagem de oxigênio, impedindo assim a oxidação dos alimentos e por consequência aumentando sua validade. Na indústria farmacêutica há estudos referentes a EPSs que possuem ações antioxidantes, antivirais e antitumorais (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

2.3 Pululana

Dentre os principais EPSs pode-se citar a pululana, produzido pelo fungo *A.pullulans*, o qual pode ser utilizado na indústria alimentícia como um espessante e estabilizador de viscosidade e na indústria química para a preparação de plásticos comestíveis (não tóxicos) e biodegradáveis (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

As primeiras observações sobre esse EPS datam a década de 30 por Bauer. No entanto, apenas em 1958, Bernier fez o isolamento deste polissacarídeo, dando início à sua caracterização, e em 1959 através de estudos, Bender, Lehmann e Wallenfels viram tratar-se de uma nova glucana, a qual foi nomeada de “pululana”. E somente nos anos 60 determinou-se sua estrutura básica (OLIVEIRA, 2010).

Figura 3: Estrutura química pululana.



Fonte: Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos, p. 242.

A pululana é definida como um hidro coloide, constituída de subunidades de maltotriose e um pequeno número de unidades de maltotetraoses, unidas por ligações α (1→6), e que se apresenta como um material compatível em misturas com o amido (SUEIRO et al. 2016). As principais características desse EPS são: hidrofílico, biodegradável, biocompatível e com baixa toxicidade (DE CARVALHO et al., 2018). Esse EPS fúngico não possui odor e sabor, e sua massa molar varia de 8.000 a 20.000.000 Da, sendo que essa variação se deve aos meios de cultivo empregados para a fermentação (OLIVEIRA, 2010).

A comercialização desse biopolímero é feita pela empresa Sigma Chemical Co. dos Estados Unidos e por outra empresa localizada no Japão, a Hayashibara Biochemical Co. Seu custo é relativamente elevado já que esse produto possuiu um baixo rendimento, pode sofrer degradação e formação de melanina durante o processo de fermentação e também gera alta viscosidade no meio (OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Leathers (2003) a produção desse biopolímero pela empresa Hayashibara gira em torno de 300 toneladas anuais. Ele também afirma que o preço de atacado desse produto é de 20 dólares o quilograma e a pululana com qualidade farmacêutica é vendida por 25 dólares o quilograma. O autor relata que mesmo sendo produzida com substratos relativamente baratos, o valor comercial da pululana é três vezes maior que o preço de outras gomas microbianas como a xantana e a dextrana que também são produzidas por via fermentativa.

Os principais fatores que podem influenciar na produção de pululana são: fontes de carbono e nitrogênio, o pH inicial e a temperatura do meio de fermentação, e no caso de fermentação em meio sólido há influências do tamanho das partículas e o teor de umidade (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017).

2.3.1 Fatores que afetam a produção da pululana

Em meios onde foi empregada a maltose como fonte de carbono observou-se um crescimento de biomassa elevado, porém baixa produção do EPS. Em um estudo feito por Bender empregou-se 22 g.dL⁻¹ de glicose e 20 g.dL⁻¹ de sacarose constatou-se que após cinco dias de fermentação houve a produção de 1,3g de polímero por 1 g de biomassa (SHINGEL 2003).

A tabela 1 consta dados comparativos entre duas fontes de carbono, a glicose e a sacarose e os rendimentos de fermentação. A eficiência denotada na tabela pela coluna FE é calculada pela razão entre a quantidade de pululana obtida pela quantidade de substrato inicial (SHINGEL, 2003).

Tabela 1: Produção de pululana pelo fungo *Aureobasidium pullulans* com diferentes fontes de carbono.

Substrato Inicial (g/dL)	Pululana (g/dL)	FE^a
Glicose		
30	13,0 – 15,0	0,43 – 0,50
50	20	0,40
50	23,4	0,47
80	~50,0	0,62
100	23,3	0,23
Sacarose		
50	30,0	0,60
50	30,2	0,60
50	30,0	0,60
100	34,4	0,34

Fonte: Adaptado de SHINGEL, 2003, p.5.

Analisando os dados presentes acima percebe-se que a maior eficiência alcançada com a glicose foi a de 0,62, obtendo uma concentração de pululana de $50\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ e utilizando uma concentração inicial desse substrato de $80\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$.

Outro fator que pode alterar a produção do biopolímero pululana é a fonte de nitrogênio utilizada no meio fermentativo. Estudos afirmam que uma concentração limitante de nitrogênio estimula a produção dos EPSs. As principais fontes de nitrogênio empregadas são peptonas, glutamato, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de sódio e de potássio, entre outras (BARBOSA et al., 2004).

Shingel (2003) afirma que o pH ótimo para a produção da pululana situa-se entre 5,5 e 7,5, já o pH ideal para a produção de biomassa é de 4,5. Nota-se uma grande diferença nos valores para o crescimento celular e a produção do polímero sendo assim considerados processos com caráter independente.

Os autores Shi e Zhao (2003) afirmam que a temperatura é um dos fatores mais importantes para a produção da pululana, tendo encontrado valores ótimos de produção para $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analisando resultados de outros experimentos realizados pelos cientistas Roukas e Biliaderis, os quais afirmaram que a produção do EPS diminuiu ao aumentar a temperatura para $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Shi e Zhao concluíram que a temperatura

ótima de produção da pululana é dependente da linhagem do fungo *A. pullulans* utilizada.

Barbosa et al (2004) chamam a atenção ao fato de cada fungo necessitar de um estudo específico sobre condições de aeração, pois esse fator pode afetar tanto positivo como negativamente a produção do EPS.

A agitação é o mecanismo utilizado para melhor distribuir os nutrientes do meio e o oxigênio. Através de revisões de literatura constatou-se que a agitação não interfere na taxa de produção da pululana e sim o nível da pressão de oxigênio dos fermentados (BARBOSA et al., 2004).

2.3.2 Aplicações

Chi, et al. (2009) ressaltam o uso da pululana para filmes e fibras impermeáveis ao oxigênio, espessamento de adesivos ou agentes de encapsulamento, também pode ser aplicado na formulação de comidas com baixo teor calórico, em substâncias anticoagulantes, antitrombóticas e antivirais e em materiais para indústria química.

Os filmes de pululana são impermeáveis ao oxigênio, o que evita a formação de manchas nos alimentos em que foram aplicados, ou seja, garantem a sua aparência e, conseqüentemente, um tempo maior de armazenamento. Também são empregados como fixadores de ingredientes para dar cor e sabor aos alimentos. Além de resistentes, os filmes de pululana permitem a sua impressão sem distorção da imagem, o que os torna apropriados para uso na decoração de alimentos (OLIVEIRA, J. D. 2010. p.25).

A tabela 2 retrata exatamente sobre a permeabilidade ao oxigênio que os filmes feitos, não só de pululana mas de outros compostos possuem, sendo assim é possível comparar a pululana com outras substâncias no critério impermeabilizante ao oxigênio.

Tabela 2: Permeabilidade de filmes comestíveis ao oxigênio a 25 °C em diferentes umidades relativas.

Tipo de Filme	Espessura (mm)	Permeabilidade O₂ mL.mm/(m².d.atm)	Umidade relativa (%)
Pectina	0,055	57,500	87
Pectina	0,055	258,800	96
Quitosana	0,020	91,400	93
Pululana	0,020	3,300	30
Pululana/ goma arábica	-	3,050	36
Glúten de trigo	0,100	190,000	91
Glúten de trigo	0,100	250,000	94,5
Proteínas de peixe	0,030	56,000	86
Proteína de peixe	0,030	169,000	92
Caseinato de sódio	0,083	77,000	77
Glúten - DATEM	0,100	153,000	94,5
Glúten – cera de abelha	0,100	133,000	91
Caseinato de sódio/ Myvacet	0,088	83,00	48
MC/HPM/ácidos graxos	-	46,60	52
MC/cera de abelha (bicamada)	-	4,00	42
Glúten – DATEM/cera de abelha	0,140	< 3,00	56

Fonte: Adaptado de VILLADIEGO, 2005. p. 12.

Através dos dados é possível notar que o filme de pululana é o mais fino entre todos, com 0,020 mm de espessura e possui o menor valor de permeabilidade de oxigênio dentre todos os filmes listados. Analisando agora a umidade relativa entre os dois filmes de pululana, percebe-se que a umidade relativa é um fator importante para a permeabilidade aos gases, pois alterando o seu valor alterou-se a permeabilidade do oxigênio para o mesmo filme.

Dentre os estudos já desenvolvidos com relação a esse polissacarídeo, o Japão é o país que possui destaque com o desenvolvimento de coberturas inodoras e sem sabor para materiais alimentícios (LIMA, 2019). Leather citado por Urgel (2019) em seu livro “Processos fermentativos e enzimáticos” mostra algumas aplicações da pululana principalmente no âmbito farmacêutico, como o fato da pululana ser utilizada como prebiótico, capaz de promover o crescimento seletivo da bactéria

Bifidobacterium spp. no intestino humano. Outra aplicação que se destaca é o uso desse elemento como conjugado não tóxico na produção de vacinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O método utilizado para o delineamento da pesquisa será o método dedutivo.

3.1 Microrganismo

Utilizou-se o microrganismo *Aureobasidium pullulans*, CCT 4154, obtido na Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia.

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 Manutenção

Os meios de crescimento do microrganismo foram realizados em dois estados diferentes, um meio líquido e outro sólido. O meio líquido consiste em água destilada e uma concentração de 20 g.L⁻¹ de extrato de malte e sua manutenção foi realizada a cada trinta dias. Já o meio sólido consiste em água destilada e uma concentração de 20 g.L⁻¹ de extrato de malte e 20 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico e sua manutenção foi realizada a cada duas semanas.

Ambos os meios foram ajustados para pH 6.5 com a base NaOH 0,1 Mol.L⁻¹ e autoclavados por 15 minutos a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1kgf.cm⁻² para assim os microrganismos serem inoculados no fluxo laminar.

Os meios líquidos foram feitos em erlenmeyer de 250 mL com 125 mL água destilada. Os meios sólidos em placas de Petri.

Após feito o repique, transferiu-se ambos os meios para a estufa de 25 °C por um período de aproximadamente três dias e depois os transferiu para o ambiente com temperaturas menores para retardar o crescimento.

3.2.2 Meio de cultivo para produção do exopolissacarídeo

O meio de cultivo utilizado para o estudo da otimização da produção da pululana é composto por melaço de cana de açúcar e extrato de levedura. Para poder encontrar a condição ótima de crescimento de biomassa e produção de polissacarídeo realizou-se 11 experimentos variando as concentrações desses compostos e o pH do meio.

As concentrações de melação de cana, extrato de levedura e valor de pH estão dispostos na tabela 3:

Tabela 3: Concentração de melação de cana, extrato de levedura e valor de pH aplicados a cada experimento.

Experimento	pH	Concentração melação (%)	Extrato de levedura (g.L⁻¹)
1	3	6	2
2	7	2	5
3	3	2	2
4	3	6	5
5	5	4	3,5
6	5	4	3,5
7	5	4	3,5
8	7	6	5
9	3	2	5
10	7	6	2
11	7	2	2

Fonte: Autoria Própria.

A variação nos valores de % de melação de cana dispostos na tabela foram obtidos através de estudo previamente realizado com diferentes % de melação de cana. No estudo foram testados para 0%, 1,5%, 3%, 4,5% e 6% e a concentração de extrato de levedura em todos os experimentos foi de 3,5 g.L⁻¹. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4: Resultado de células por mL obtido através de diferentes concentrações de melação de cana.

Concentração de melação de cana	Crescimentos após 7 dias de fermentação (células por mL)
0%	$-1,09.10^{-3}$
1,5%	$4,69.10^{-4}$
3%	$2,34.10^{-3}$
4,5%	$7,13.10^{-3}$
6%	$5,36.10^{-3}$

Fonte: Autoria própria.

Com esses resultados o software estatístico forneceu os 11 testes que deveriam ser realizados.

Após colocado todos os reagentes em cada Erlenmeyer eles sofreram o processo de autoclavagem na autoclave por um período de 30 minutos a uma

temperatura de 120 °C. O tempo maior deve-se ao fato de o melão de cana possuir muitas impurezas.

Após autoclavados, em cada erlenmeyer inoculou-se 20mL do microrganismo *Aureobasidium pullulans* no fluxo laminar e transferiu para o ambiente escuro, com temperatura entre 22 e 25 °C durante sete dias, sem agitação e fechados com tampão de algodão.

3.3 Quantificação de biomassa

A quantificação de biomassa foi realizada pelo método de peso seco, o qual baseia-se no peso da amostra sem a presença de água. Para realizar essa etapa foi necessário extrair um volume de 20mL do Erlenmeyer, centrifugá-lo por 15 minutos a uma rotação de 5.000 rpm, descartar o sobrenadante e deixar a amostra por 24 horas na estufa de 80 °C e posteriormente pesá-la.

Para poder calcular a quantidade em gramas de células que foram inoculadas no primeiro dia de experimento, primeiramente deixou por 24 horas 11 tubos falcons na estufa de 80 °C, passado esse um dia, tarou-se os 11 tubos falcons.

Após inocular os 20 mL do meio de cultivo em cada Erlenmeyer, com o auxílio de uma pipeta retirou 20 mL de cada e transferiu para seu respectivo tubo falcon, o qual foi centrifugado por 15 minutos a uma rotação de 5.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e foi deixado por 24 horas na estufa de 80 °C para assim toda a água da amostra evaporar e obter apenas o peso seco de biomassa.

Transcorridos os sete dias de fermentação realizou-se os mesmos procedimentos de extração de 20mL de cada Erlenmeyer para seu respectivo tubo falcon, centrifugação, secagem e pesagem.

3.4 Quantificação de pululana

Para mensurar a quantidade de pululana produzida em cada erlenmeyer nesse estudo realizou-se a precipitação desse polissacarídeo com o volume de 1:1 de Álcool Etílico, porém outras concentrações podem ser testadas em outros estudos. Utilizou-se álcool etílico porque, como cita Leathers (2003) os álcoois são os principais solventes orgânicos usados para a precipitação do biopolímero. Após precipitado

realizou-se sua extração manualmente com o auxílio de um bastão de vidro, visto que esse polissacarídeo se separa facilmente do meio. Logo após a extração, armazenou-se os EPS na estufa de 80 °C por 24 horas, para retirar toda a água presente na amostra e posterior pesagem.

3.5 Otimização

Com os resultados dos experimentos coletados, utilizou-se o software estatístico Essential Regression and Experimental Design for Chemists and Engineers o qual auxiliou a encontrar o meio de cultivo com pH, concentração de melão e de levedura que produziu a maior concentração de pululana.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biomassa

A tabela 6 apresenta os resultados de concentração de massa de células no dia 0, após os 7 dias de fermentação e o resultado do crescimento da biomassa. Para obter a quantidade em g.L^{-1} de biomassa da fermentação dos 7 dias, diminui-se o valor da coluna de massa de células do dia 7 (em g.L^{-1}) com os valores da coluna de massa de células do dia 0 (em g.L^{-1}).

Tabela 5: Resultados em g.L^{-1} de peso seco de biomassa após os 7 dias de fermentação.

Experimento	Resultado fermentação (g.L^{-1})	% Crescimento
1	-0,250	-9,191%
2	0,195	12,420%
3	0,005	0,467%
4	0,500	18,116%
5	0,405	31,274%
6	0,380	23,602%
7	0,705	71,939%
8	0,420	27,273%
9	1,530	181,065%
10	0,580	34,627%
11	0,675	51,923%

Fonte: Autoria Própria.

A figura 4, de um dos tubos falcons, ilustra o peso seco de biomassa após os sete dias de fermentação.

Figura 4: Ilustração do tubo falcon com o peso seco de biomassa dos 7 dias de fermentação e após as 24 horas na estufa de 80°C .



Fonte: Autoria própria.

Primeiramente para averiguar a confiabilidade dos dados de crescimento de biomassa em g.L^{-1} utilizou-se o software estatístico Essential Regression and Experimental Design for Chemists and Engineers o qual analisando os resultados forneceu os seguintes parâmetros com seus respectivos valores constados na tabela 7.

Tabela 6: Parâmetros de confiabilidade obtidos através do software estatístico ao testar a exatidão dos resultados de peso seco de biomassa após os 7 dias de fermentação.

 R 	0,959
R²	0,919
R² ajustado	0,797
Erro Padrão	0,202
Pontos	11

Fonte: Software estatístico (Adaptado).

Obteve-se através do software o valor 0,959 (em módulo) correspondente ao coeficiente de correlação de Pearson, o qual corresponde a uma medida de variância compartilhada entre duas variáveis, e essa variação deverá ser distribuída linearmente (FILHO, Dalson B. F; JÚNIOR, José A. S.), no presente trabalho relaciona as variáveis produção de biomassa com a composição do meio.

Como citado no artigo Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson, dos autores Dalson Filho e José Júnior, diferentes pesquisadores interpretam de diferentes formas de magnitude desse coeficiente. Cohen (1988) citado por esses autores, afirma que valores de 0,10 e 0,29 são considerados pequenos, entre 0,30 e 0,49 médio e de 0,5 a 1 grandes. Já os autores Dancey e Reidy (2005) também citados no refiro artigo acima apontam que um valor de $R = 0,10$ até $0,30$ é fraco, $R = 0,40$ até $0,60$ moderado e $R = 0,7$ até 1 forte.

O coeficiente de determinação, definido como o quadrado do coeficiente de correlação de Pearson, como cita Shimikura (2006) é definido com uma medida de proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra. O R^2 obtido por esse experimento foi de 0,919 (91,9%), portanto como obteve-se um valor próximo de 1 o modelo linear se ajusta de forma adequada ao conjunto dos experimentos (RODRIGUES, Lígia H; 2015).

O erro padrão é a medida de variabilidade associada à média amostral (PAES, Angela T; 2008) e correlaciona-se com o desvio padrão através da seguinte fórmula:

$$EP = \frac{DP}{\sqrt{n}}$$

Onde:

EP equivale ao erro padrão;

DP equivale ao desvio padrão;

n = tamanho da amostra;

Com o valor de EP = 0,202 fornecido pelo software foi capaz de calcular o valor do desvio padrão.

$$0,202 = \frac{DP}{\sqrt{11}}$$

Portando, desvio padrão do experimento foi de 0,670 g.L⁻¹.

Independente da classificação verificou-se que o R = 0,959 e R² = 0,919, ambos com valores bem próximo a 1, por esse motivo classificou-se o experimento de biomassa como confiável, e assim progrediu-se para os experimentos referentes ao EPS.

4.2 Polissacarídeo

Após a fermentação dos sete dias, realizou-se a extração do polissacarídeo. A figura 5 ilustra os onze experimentos logo após a adição do álcool etílico, pode-se perceber a pululana na parte superior dos erlenmeyers. A figura 6 ilustra o aspecto do EPS mais de perto

Figura 5: Extração com álcool etanol do exopolissacarídeo pululana.



Fonte: Autoria própria.

Figura 6: Exopolissacarídeo separado do meio pela inserção do álcool etanol.



Fonte: Autoria própria.

A tabela 8 fornece os valores em gramas por litro de exopolissacarídeo produzido em cada experimento.

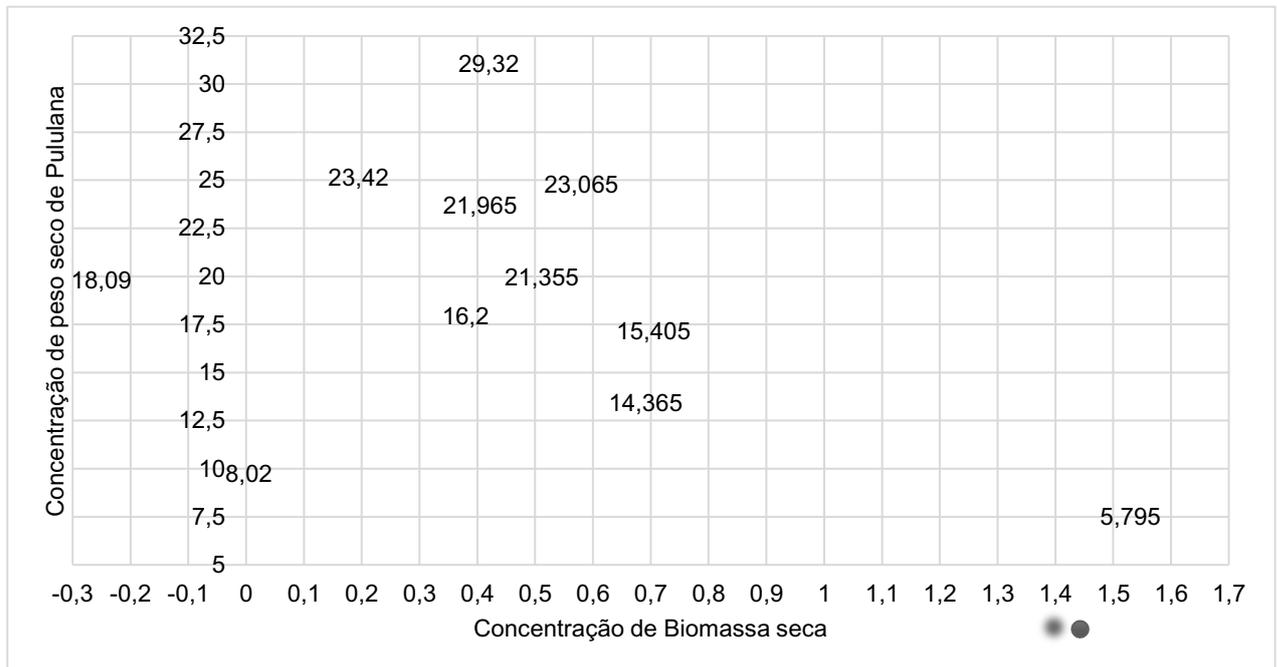
Tabela 7: Apresentação dos resultados obtidos de peso seco de biomassa e peso seco de pululana de cada experimento.

Placa de Petri	pH	% Melaço de cana	Concentração extrato de levedura	Peso seco biomass a g.L ⁻¹	Peso seco pululana (g.L ⁻¹)
1	3	6	2	-0,250	18,090
2	7	2	5	0,195	23,420
3	3	2	2	0,005	8,020
4	3	6	5	0,500	21,355
5	5	4	3,5	0,405	21,965
6	5	4	3,5	0,380	16,200
7	5	4	3,5	0,705	15,405
8	7	6	5	0,420	29,320
9	3	2	5	1,530	5,795
10	7	6	2	0,580	23,065
11	7	2	2	0,675	14,365

Fonte: Autoria Própria.

O gráfico a seguir correlaciona no eixo x peso seco de biomassa e no eixo y o peso seco de pululana produzida por essa concentração de *Aureobasidium pullulans*.

Gráfico 1: Correlação entre a Concentração de peso seco de Biomassa e a pululana produzida.



Fonte: Autoria própria.

Analisando os meios com pH 7 e concentração de melação 2%, percebe-se que o meio no qual a concentração de extrato de levedura é maior (5 g.L^{-1}) ocasionou em um crescimento menor de microrganismos ($0,195 \text{ g.L}^{-1}$), já o meio com concentração de extrato de levedura menor (2 g.L^{-1}), produziu um número maior de microrganismos ($0,675 \text{ g.L}^{-1}$). A mesma alteração ocorreu com os experimentos com pH 7 e melação a 6%, com o extrato de levedura maior (5 g.L^{-1}) obteve-se um crescimento menor ($0,42 \text{ g.L}^{-1}$) já com o extrato de levedura menor (2 g.L^{-1}) o crescimento foi maior ($0,580 \text{ g.L}^{-1}$).

Ao comparar o crescimento de biomassa desses experimentos com a quantidade de pululana produzida, os experimentos com concentração maior de extrato de levedura (5 g.L^{-1}) produziram mais EPS, tanto na dupla de experimentos 2 e 11 quando na dupla 8 e 11. Seguindo a lógica, nos experimentos onde a reprodução dos microrganismos foi mais acentuada deveria resultar em uma produção maior de pululana, porém percebeu-se o contrário, uma possível explicação para esse fenômeno é o fato de quanto mais microrganismos presentes no meio, maior é o consumo dos substratos para mantê-los e conseqüentemente haverá menos substratos no meio de cultivo para produzir o exopolissacarídeo.

Abordando o fator concentração de melaço, nos experimentos 1 e 3, onde o pH manteve-se no valor de 3, e extrato de levedura igual a 2 g.L⁻¹, nota-se que no experimento 1, o qual a concentração de melaço é de 6%, obteve-se um crescimento negativo de microrganismos, erros de medição podem ter alterado esse valor. No experimento 3, com concentração de melaço igual a 2% obteve-se um valor de crescimento 0,005 g.L⁻¹.

Os experimentos 2 e 8, o pH foi de 7, e a concentração de extrato de levedura igual a 5 g.L⁻¹, com a concentração de melaço igual a 2%, obteve-se um crescimento de 0,195 g.L⁻¹. Já com a concentração a 6% o crescimento foi de 0,420 g.L⁻¹.

Através da tabela 8 nota-se que o experimento no qual obteve-se a maior produção de pulula foi o 8, com um resultado de 29,320 g.L⁻¹. Com os resultados obtidos em g.L⁻¹ de polissacarídeo e através do software, obteve-se a condição otimizada, a qual corresponde aos valores do experimento 8 (melaço 6%, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e pH 7).

Tabela 8: Valores de % de melaço de cana, pH e concentração de extrato de levedura dos meios de mínima, média e máxima produção de pulula.

	Concentração melaço de cana (%)	Concentração extrato de levedura (g.L⁻¹)	pH
Mínima produção	2	2	3
Média produção	4	3,5	5
Máxima produção	6	5	7

Fonte: Software estatístico (Adaptado).

Após feita a otimização, realizou-se a triplicata dos valores para obter uma maior exatidão nos resultados. As tabelas 10 e 11 reportam os resultados obtidos para crescimento de biomassa e produção do exopolissacarídeo pululana respectivamente.

pH = 7, melaço de cana a 6%, extrato de levedura 5 g.L⁻¹.

Tabela 9: Resultado do peso seco da biomassa e da pululana das triplicatas.

BIOMASSA	Experimento	Crescimento (g.L⁻¹)	Massa EPS (g.L⁻¹)
pH = 7 melaço 6%	1	2,925	32,000
	2	3,260	27,406
	3	3,375	21,406

Fonte: Autoria Própria.

5. AVALIAÇÃO COMERCIAL

Para poder confirmar que o meio de cultivo empregado seria barato ao usar o melaço de cana, buscou-se trazer os valores dos componentes principais: Melaço de Cana e Extrato de Levedura. Para o melaço, buscou-se o valor no site Mercado Livre, e encontrou-se o valor de R\$ 23,90 para 1 quilograma desse substrato. Para o extrato de levedura, pegou-se como referência o encontrado no site Synth Acessórios e Equipamentos para Laboratórios, o qual possui valor de R\$ 121,80 para 100 gramas.

Figura 7: Melaço de Cana vendido pelo site mercado livre.



Fonte: Mercado Livre.

Figura 8: Extrato de levedura vendido pela loja Synth Acessórios e Equipamentos para Laboratórios.



Fonte: Site Lojas Synth.

Valor aproximado para um meio de cultivo de 1 litro para produzir 26,937 gramas de pululana:

- 6% Melaço de Cana.

Densidade do melaço de cana 1,30 g.mL⁻¹ (MARTINS, Mariane. 2012).

6% do meio = melaço de cana = 60 mL.

60 mL = 78 g.

78 g = R\$ 1,86.

- 5 g.L⁻¹ de Extrato de Levedura.

5 g = R\$ 6,09

Observação = para valores de cálculo não foi considerado o ácido e a base utilizados para ajustar o pH do meio visto que fui utilizado valores ínfimos.

Valor aproximado do meio de produção de pululana = R\$ 7,95.

6. CONCLUSÃO

Portanto, para esse trabalho, conclui-se que uma maior concentração de extrato de levedura resultou em uma menor reprodução fúngica e uma maior produção de EPS, logo para produzir mais pululana é necessário mais extrato de levedura. Logo a concentração de extrato de levedura é inversamente proporcional a produção de biomassa e diretamente proporcional a produção de EPS. Analisando o efeito que o pH tem sobre o meio, o experimento de número 9 com pH 3 produziu a maior concentração de microrganismos, porém suprimiu a produção do EPS. Por fim a concentração de melão de cana é proporcional ao crescimento fúngico e a produção de pululana.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, Jéssica Aline Soares de; ROVIDA, Amanda Flávia da Silva; PAMPFILE, João Alencar. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista uningá review**, [s.l.], v. 21, n. 1, jan. 2015. Issn 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>>. Acesso em: 05 set. 2019.

BARBOSA, A. D. M., et al. Produção e Aplicação de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1558>> . Acesso em: 05 set.2019.

CARVALHO, L.T., et al. Modificação química da pululana para aplicação em sistemas de liberação controlada de princípios ativos. **In. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 23º, 2018, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

CHI, Z. et al. Bioprodutos de *Aureobasidium pullulans*, uma levedura biotecnologicamente importante. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2009, 82, 793–804.

FILHO, Dalson Britto Figueiredo; JÚNIOR, José Alexandre da Silva. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**. Vol. 18, n. 1, 2009. Disponível em: <<https://periodicos.ufpe.br/revistas/politica hoje/article/viewFile/3852/3156>>. Acesso em: 01 agosto 2020.

KLEIN, Mariana M. Mecanismos de ação e influência de nutrientes na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans* à *Geotrichum citri-auranti*. **Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Paulista. Jaboticabal, p. 112. 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/148005/klein_mn_dr_jabo.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 31 ago. 2019.

LEATHERS, T.D. Produção biotecnológica e aplicações da pululana. **Microbiology and Biotechnology**. 2003, vol. 62, 468-473.

LIMA, Urgel de Almeida. Biotecnologia Industrial. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 2009, vol. 3, 2 ed. São Paulo, SP: Blucher, 760p.

LOJA SYNTH. Acessórios e Equipamentos para Laboratórios. **Site de compra de Acessórios e Equipamentos para Laboratórios**. Disponível em: < <https://www.lojasynth.com/reagentes-analiticasmaterias-primas/meios-de-cultura/extrato-de-levedura> >. Acesso em: 11 de outubro de 2020.

MAHAPATRA, S., and BANERJEE, D. Exopolissacarídeos fúngicos: produção, composição e aplicações. **Microbiol. Insights**. 2013; vol. 6,1–16.

MARTINS, Mariane P. S. Caracterização da Produção e Avaliação de Indicadores de Qualidade Tecnológica de Amostras de Melado do Estado de São Paulo. **Tese (Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural)** – Programa de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal de São Carlos, Araras, p.57. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/135/4648.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Acesso em: 16 de outubro de 2020.

MERCADO LIVRE. Empresa do grupo Mercado Livre. **Site de compras e vendas**. Disponível em: < https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1473618641-melaco-melado-de-cana-de-acucar-original-com-1-kg-promoco-_JM#position=1&type=item&tracking_id=bffbcf85-d366-4c8d-a978-3fef093f07c2 > . Acesso em: 11 de outubro de 2020.

MEZAROBA, S.; MENEGUETTI, C. C.; GROFF, A. M. Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema. **IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial**, Campo Mourão, novembro, 2010.

NATURDATA. **Naturdata: Biodiversidade Online**. c2009 – 2018. Página Inicial pesquisa *Aureobasidium pullulans*. Disponível em: < <https://naturdata.com/especie/aureobasidium-pullulans/38082/0/>>. Acesso em: 01 setembro 2019.

OLIVEIRA, J. D. Efeito da fonte e concentração de nitrogênio na produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans*. **Tese (Dissertação de Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 152. 2010. Disponível em: < <http://186.202.79.107/download/producao-de-biopolimero-por-aureobasidium.pdf>> .

OLIVEIRA, Saulo Alves de. Dextrana: revisão sobre uso e possíveis aplicações industriais. 2013. 43 f. **Trabalho de conclusão de curso** (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/120320>>. Acesso em: 10 setembro 2019.

PAES, Ângela Tavares. Por Dentro da Estatística. **Einstein: Educ Contin Saúde**. 2008, 6 (3 Pt 2): 107-8. Disponível em: < <https://www.ufjf.br/ppgsaude/files/2008/07/Artigo-2.pdf> >. Acesso em: 01 de agosto de 2020.

PHILIPPINI, R. R. Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial – Universidade de São Paulo, Lorena São Paulo, p. 135. 2017. Disponível em:< <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-20112017-130445/en.php>>. Acesso em: 10 setembro 2019.

PINHEIRO, Jessika B. Fungos produtores de exopolissacarídeos e suas aplicações funcionais e industriais. **Tese (Trabalho de Conclusão de Curso)** – Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas, Universidade Federal de São João Del-Rei. Sete

Lagoas, p. 33. 2014. Disponível em: < <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/deceb/Pinheiro%202014.pdf>. Acesso em: 13 setembro 2019.

POLLOCK T.J.L., Armentrout R.W. Isolamento de novas cepas de *Aureobasidium pullulans* que produzem pululana de alto peso molecular com pigmentação reduzida. **Appl. Environ. Microbiol.** 1992; vol.58, No. 3, 877–883.

RODRIGUES, Lígia Rodrigues. Regressão Linear Simples. **Aula capítulo 15, estatística básica (Bussab e Moretti, 8ª Edição)**. Disponível em: < <https://www.ime.usp.br/~fmachado/MAE229/AULA10.pdf> >. Acesso em: 01 de agosto de 2020.

SHINGEL, K. I. Conhecimento atual em biossíntese, atividade biológica e modificação química do exopolissacarídeo pululana. **Revista Carbohydrate Research**, Montreal, Quebec, Canadá, vol. 339,447 – 460, outubro 2004.

SILVA, M. L. C. eal. Caracterização Química de Glucanas Fúngicas e Suas Aplicações Biotecnológicas. **Revista Química Nova**, Londrina Paraná, vol. 29, n. 1, 85 – 92, agosto 2005.

SILVA, Ricardo R.; COELHO, Danuza G. Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas. **Tese (Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Curso de Capacitação de monitores e educadores)** – Instituto de Botânica. São Paulo, p. 20. 2006. Disponível em: < http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Gluciane_Coelho.pdf>. Acesso em: 20 out. 2019.

SILVA, Shikamura E. Coeficiente de Determinação. **LEG: Laboratório de Estatística e Geoinformação UFPR**. 30 de Agosto de 2006. Disponível em: < <http://leg.ufpr.br/~silvia/CE003/node76.html> >. Acesso em: 01 de agosto de 2020.

SLIVINSKI, J. Estudo da produção de biopolímero e biomassa pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio à base de melaço de cana-de-açúcar empregando delineamento fatorial. **Tese (Graduação em Química)** – Universidade Tecnológica

Federal do Paraná. Pato Branco, p. 68. 2014. Disponível em: <
http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2172/1/PB_COQUI_2013_2_11.pdf>.

SUEIRO, A.C. et al. Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. **Revista Química Nova**, São Paulo, vol. 39, n.9, abril 2016. Disponível em:
<
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422016000901059&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 10 outubro 2019.

SUGAMARAN, K.R.; PONUSAMI, V. Revisão sobre produção, processamento downstream e caracterização de pululana microbiana. **Revista Carbohydrate Polymers**, Tamildanu, Índia, junho 2017.

VILLADIEGO, A.M.D, et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, vol. 52, núm. 300, 2005. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em:
<https://www.redalyc.org/pdf/3052/305242980005.pdf>.

ZHAO, S.; CHI, Z. Uma nova levedura produtora de pululana e otimização média para sua produção de exopolissacarídeo. **Jornal Acadêmico Oceano**, vol. 2, n. 1, 53 – 57, 2003. University of Qingdao, Qingdao, China.

WENZEL, I.M; ALMEIDA, J.E.M; CARDOSO, E.R. Efeito de diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura no desenvolvimento do fungo entomopatogênico *lecanicillium lecanii* em fermentação líquida. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.127-131, jan./mar., 2005. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/profile/Jose_Almeida16/publication/258210287_Efeito_de_diferentes_concentracoes_de_dextrose_e_extrato_de_levedura_no_desenvolvimento_do_fungo_entomopatogenico_Lecanicillium_lecanii_em_fermentacao_liquida/links/0c9605273f06fe7c73000000.pdf>.