

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

JULIANO SLIVINSKI

**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**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2014

JULIANO SLIVINSKI

**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**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha.

Coorientador: Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

Pato Branco – PR

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **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** foi considerado **APROVADO** de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.10/2013-B**.

Fizeram parte da banca os professores.

Prof^ª. Dra. Letícia Ledo Marciniuk

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais José Estevão Slivinski e Isanir Ema Felsing Slivinski, que em todos os momentos me apoiaram financeira e psicologicamente, proporcionando-me coragem, força e fé, para sempre agir corretamente e a enfrentar novos desafios.

AGRADEDIMENTOS

A conquista do título de Bacharel em Química é única, vem acompanhada de sentimentos próprios daqueles que percorrem tal caminho. Para vencer essa jornada a qual somos impulsionados pela senda científica, buscamos respostas, explicações, que às vezes nos proporcionam mais dúvidas, fato que nos impulsiona a pesquisar e descobrir mais e mais.

Primeiramente agradeço a Deus por conceder-me a vida, saúde, família, amigos, bem como a possibilidade do desenvolvimento pessoal e mental.

A meus pais, pela dedicação, compreensão, carinho, afeto, em todos os momentos, principalmente pelo amor incondicional.

Ao Professor Doutor Mário Antônio Alves da Cunha, pela orientação e auxílio em todos os momentos da realização do trabalho, sobretudo pelo incentivo a pesquisa, que me despertou o grande interesse por essa área, minha sincera gratidão.

Ao Professor Doutor Vanderlei Aparecido de Lima, pela co-orientação, e ajuda na interpretação dos resultados, proporcionando uma visão estatística da química.

A Professora Doutora Letícia Ledo Marciniuk, pela correção e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos, pela confiança e incentivo de que tudo sempre iria dar certo no final, por mais que estivesse complicado.

Aos professores do Departamento de Química da UTFPR – PB pela contribuição na construção do conhecimento durante a vida acadêmica.

A UTFPR – PR, pela infra-estrutura e o apoio financeiro.

Aos técnicos do Laboratório de Qualidade Agroindustrial (LAQUA), principalmente à Roberta Roncatti, pela disponibilização do laboratório, ajuda na realização das análises e pelo companheirismo em todos os momentos.

“A vida é para nós o que concebemos dela. Para o rústico cujo campo lhe é tudo, esse campo é um império. Para o César cujo império lhe ainda é pouco, esse império é um campo. O pobre possui um império; o grande possui um campo. Na verdade, não possuímos mais que as nossas próprias sensações; nelas, pois, que não no que elas vêem, temos que fundamentar a realidade da nossa vida.”

Fernando Pessoa

RESUMO

SLIVINSKI, JULIANO. Estudo da produção de biopolímero e biomassa pelo *fungo L. theobromae* MMPI em meio à base de melação de cana-de-açúcar empregando delineamento fatorial. 2014. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

Exopolissacarídeos são polímeros microbianos produzidos e excretados para o meio de cultivo. Tais biomoléculas possuem propriedades biotecnológicas que despertam o interesse das indústrias química, farmacêutica e de alimentos. A produção de exopolissacarídeos em meios de cultivo de baixo custo constitui uma estratégia economicamente relevante para o sucesso do processo de bioprodução. No presente trabalho foi avaliado o melação de cana-de-açúcar como substrato para a produção biotecnológica do exopolissacarídeo lasiodiplodana. Delineamento fatorial composto central rotacional 2^3 foi empregado como ferramenta estatística para avaliar a influência das variáveis: concentração de melação (1,0; 3,5 e 6,0 °Brix), pH inicial (4,0; 6,0 e 8,0) do meio de cultivo e velocidade de agitação (50, 125 e 200 rpm) sobre a produção, rendimento e produtividade volumétrica em exopolissacarídeo e biomassa celular, não foram verificados efeitos significativos (intervalo de 90 % de confiança) sobre a produção, rendimento e produtividade em biopolímero nos níveis avaliados das variáveis. No entanto, maiores valores de produção (8,880 g L⁻¹), rendimento (0,588 g g⁻¹) e produtividade volumétrica em EPS (0,123 g L⁻¹h⁻¹) foram observados nos níveis do ponto central (3,5 °Brix, pH 6,0 e 125 rpm). Por outro lado, no intervalo de confiança de 90% foram verificados efeitos principais e de interação significativos das variáveis estudadas sobre a produção, rendimento e produtividade volumétrica em biomassa celular. As produções máximas de biomassa (9,845 g L⁻¹) e produtividade volumétrica em biomassa (0,136 g L⁻¹h⁻¹) foram observadas quando empregada concentração de melação de 6,0 °Brix, agitação de 200 rpm e pH de 4,0. Já o rendimento máximo em biomassa celular (8,62 g g⁻¹) foi observado quando empregado concentração de substrato de 1,0 °Brix, pH de 4,0 e agitação de 200 rpm.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, Exopolissacarídeo, Lasiodiplodana, Superfície de Resposta.

ABSTRACTS

SLIVINSKI, JULIANO. Study of production of biopolymer and biomass by fungus *L. theobromae* MMPI with molasses sugar cane using factorial design. 2014. 68 f. Completion of Course Work (B.A in Chemistry), Federal University of Technological Paraná. Pato Branco, 2014.

Exopolysaccharides are microbial polymers produced and excreted into the growth medium. These biomolecules have biotechnological properties that instigate the interest in the chemical, pharmaceutical and food industries. The production of exopolysaccharides in growth medium of low cost is an economic strategy for the success of the bioproduction process. In the present study the molasses sugar cane was evaluated as a substrate for the biotechnological production of exopolysaccharide lasiodiplodan. Factorial design central rotational composed 2^3 was used as a statistical tool to assess the influence of variables: concentration of molasses (1,0; 3,5 e 6,0 °Brix), initial pH (4,0; 6,0 e 8,0) of the growth culture and speed stirrer (50, 125 e 200 rpm) on production, yield and volumetric productivity in exopolysaccharides and cell biomass, no significant effects were observed (range 90% confidence) on levels of the variables evaluated on production, yield and productivity in biopolymers. However, higher production values (8,880 g L⁻¹), yield (0,588 g g⁻¹) and volumetric productivity on EPS (0,123 g L⁻¹ h⁻¹) were observed in the levels of the central point (3,5 ° Brix, pH 6,0 and 125 rpm). Moreover, in the confidence interval of 90% were observed significant main effects and interaction effects of variables on production, yield and volumetric productivity on cell biomass. The higher biomass productions (9,845 g L⁻¹) and volumetric productivity on biomass (0,136 g L⁻¹h⁻¹) was observed when applied molasses sugar cane of 6,0 °Brix, 200 rpm of speed stirrer and pH 4,0. Already the maximum yield of cell biomass (8.62 g g⁻¹) was observed when concentration of substrate were of 1,0 ° Brix, pH 4.0 and stirrer speed at 200 rpm.

Keywords: Exopolysaccharide, Lasiodiplodan, Response surface, Sugar cane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produção de EPS.....	27
Figura 2 - Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.....	27
Figura 3 – Representação cúbica da produção de EPS pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	29
Figura 4 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo para o rendimento em EPS.....	31
Figura 5 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.....	31
Figura 6 – Representação cúbica do rendimento de EPS pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	33
Figura 7 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produtividade volumétrica em EPS.....	35
Figura 8 – Gráfico de igualdade entre os valores preditos e observados.....	35
Figura 9 – Representação cúbica da produtividade de EPS pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	37
Figura 10 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produção de biomassa celular.....	40
Figura 11 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.....	42
Figura 12 – Representação cúbica da produção de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	43
Figura 13 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular do fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração e agitação.....	44
Figura 14 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração e pH.....	45
Figura 15 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular do fungo <i>L. theobromae</i> em função do pH e agitação.....	46
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de rendimento de biomassa celular.....	48
Figura 17 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.....	50
Figura 18 – Representação cúbica do rendimento de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	51
Figura 19 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração de substrato e agitação.....	52
Figura 20 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração e pH.....	53
Figura 21 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função do pH e agitação.....	54
Figura 22 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produtividade volumétrica em biomassa celular.....	56

Figura 23 – Gráfico de igualdade indicando a coerência entre os valores preditos e observados.....	57
Figura 24 – Representação cúbica da produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função das variáveis: concentração, pH e agitação.....	58
Figura 25 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração de substrato e agitação..	59
Figura 26 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função da concentração e pH.....	60
Figura 27 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i> em função do pH e agitação.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial 2^3	23
Tabela 2 – Resultados do delineamento fatorial 2^3 com as variáveis reais e codificadas e as respostas produção (P), rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) em EPS.	25
Tabela 3 – Tabela dos efeitos para a produção de EPS.....	26
Tabela 4 – Tabela de efeitos para o Rendimento de EPS.....	30
Tabela 5 – Tabela de efeitos para a produtividade volumétrica de EPS.....	34
Tabela 6 – Resultados do delineamento fatorial 2^3 com as variáveis reais e codificadas e as respostas produção (P), rendimento ($Y_{X/S}$) e produtividade volumétrica (Q_X) em biomassa celular.....	39
Tabela 7 – Tabela dos efeitos para a produção de biomassa celular do fungo <i>L. theobromae</i>	39
Tabela 8 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta produção de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i>	41
Tabela 9 – Tabela dos efeitos para o rendimento de biomassa celular do fungo <i>L. theobromae</i>	47
Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta rendimento em biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i>	49
Tabela 11 – Tabela dos efeitos para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i>	55
Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) estimado para a resposta produtividade volumétrica em biomassa celular pelo fungo <i>L. theobromae</i>	56

LISTA DE SÍMBOLOS

- ART – açúcares redutores totais;
- DNS – ácido dinitrosalicílico;
- EPS – exopolissacarídeo;
- F cal – F calculado;
- F tab – F tabelado;
- g g^{-1} - grama produto formado por grama de substrato consumido;
- g L^{-1} – gramas por litro;
- $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ – grama por litro de produto formado por hora;
- h - horas
- L.C (-) – limite de confiança inferior;
- L.C (+) – limite de confiança superior;
- L. theobromae* – *Lasiodiplodia theobromae* MMPI;
- min – minutos;
- nm – nanômetros;
- p – p valor;
- P – produtividade;
- Q_P – produtividade volumétrica em EPS;
- Q_X - produtividade volumétrica em biomassa;
- rpm – rotações por minuto;
- t cal – t calculado;
- t tab – t tabelado;
- $Y_{(P/S)}$ – fator de rendimento de substrato em EPS;
- $Y_{(X/S)}$ – fator de rendimento de substrato em biomassa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Material	22
4.2 Procedimento Experimental	22
4.2.1 Clarificação do melaço bruto.....	22
4.2.2 Preparo do inóculo.....	22
4.2.3 Avaliação da influência da concentração do substrato, pH inicial e agitação pelo delineamento fatorial	23
4.3 Métodos analíticos	24
4.3.1 Quantificação do biopolímero produzido e da biomassa fúngica.....	24
4.3.2 Determinação do conteúdo de açúcares redutores totais	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Avaliação da influência do pH inicial, concentração do meio de cultivo e velocidade de agitação sobre produção, rendimento e produtividade em EPS.	25
5.1.1 Avaliação da produção em EPS.....	26
5.1.2 Avaliação do rendimento em EPS.	30
5.1.3 Avaliação para a produtividade volumétrica (Q_p) em EPS.	34
5.2 Avaliação da influência do pH inicial, concentração do meio e velocidade de agitação sobre produção, rendimento e produtividade em biomassa celular.	38
5.2.1 Avaliação da produção de biomassa celular.	39
5.2.2 Avaliação do rendimento em biomassa celular.	47
5.2.3 Avaliação da produtividade volumétrica em biomassa celular.	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros produzidos por micro-organismos são compostos que apresentam propriedades similares ou até superiores aos polímeros químicos, sendo amplamente utilizados pela indústria devido as mais diversas propriedades tecnológicas, como ação estabilizante em sistemas alimentares, capacidade de aumentar a viscosidade de sistemas aquosos, capacidade geleificante, entre outras.

Alguns micro-organismos produzem estes compostos quando se encontram em situações de estresse e outros os produzem como forma de reserva energética. Alguns biopolímeros têm função de proteção celular, impedindo a infecção por outros micro-organismos e se necessário servindo como fonte de carbono alternativa.

Alguns polímeros microbianos são produzidos e excretados para fora da célula e são chamados de exopolissacarídeos (EPS). Os EPS fúngicos têm sido muito estudados, por apresentarem aplicações na área farmacêutica e médica, no desenvolvimento de vacinas, como agentes cicatrizantes e alguns no controle de tumores e de algumas doenças.

Para a produção biotecnológica de EPS a escolha do substrato é muito importante, tanto no aspecto fisiológico atuando como fonte de energia e carbono, como no aspecto econômico, uma vez que representa um percentual grande do custo do processo. Diversos substratos podem ser utilizados no processo de produção, como glicose, frutose, sacarose, entre outros.

Nesse sentido, alguns subprodutos agroindustriais podem ser empregados como matéria prima com um diferencial de menor custo. Dentre os subprodutos com potencial para uso como substrato tem-se o melaço de cana-de-açúcar, o qual é produzido em grandes quantidades no Brasil em função do país ser o maior produtor mundial de açúcar.

No presente projeto de pesquisa foi proposto o estudo do uso do melaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de lasiodiplodana, um exopolissacarídeo biossintetizado pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI com algumas propriedades de interesse (CUNHA et al., 2012; TURMINA et al., 2012). Foram realizados ensaios experimentais para determinação das melhores condições operacionais de cultivo em *shaker* quanto a agitação, concentração de substrato e pH inicial de cultivo, sendo empregada a ferramenta estatística de delineamento fatorial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produção de biopolímero pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em meio à base de melação de cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência do pH, velocidade de agitação e da concentração do melação de cana-de-açúcar na produção de biopolímero e crescimento celular em cultivo submerso descontínuo com *L. theobromae* MMPI.
- Estabelecer as melhores condições de produção de EPS e biomassa em cultivo descontínuo empregando metodologia de delineamento fatorial.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente há um grande interesse industrial na produção de polímeros, pois, eles são utilizados em diversos setores da indústria alimentícia, petrolífera, eletroeletrônica, construção civil, biomédica, automobilística e até mesmo na indústria aeroespacial (OLIVEIRA et al., 2013).

A partir da revolução industrial a produção de materiais poliméricos apresentou crescimento exponencial para atender a demanda da população, isso levou ao aumento da utilização de combustíveis fósseis como o petróleo e conseqüentemente ocasionou o aumento dos problemas ambientais devido à geração de resíduos tóxicos (OKAMOTO; JOHN, 2013).

Em busca de ar puro, água potável e energia renovável, novas soluções ambientais estão sendo incentivadas pelo governo (TOMÉ et al., 2013). Uma das alternativas para reduzir a utilização de energias não renováveis é a síntese de materiais poliméricos a partir de micro-organismos (BRITO et al., 2011). Estes materiais são produzidos através da fermentação por bactérias, fungos e leveduras, e podem ser classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas, possuindo vasta aplicabilidade como viscosificante, geleificante e estabilizante em diversos setores industriais (VENDRUSCOLO et al., 2013). Podem apresentar vantagens quando comparados aos polímeros gerados a partir de fontes não renováveis ou até mesmo em relação aos polímeros naturais obtidos através de plantas (BRITO et al., 2011).

O grande interesse industrial dos biopolímeros é devido às suas propriedades físico-químicas exclusivas, superiores a outros polissacarídeos (OLIVEIRA et al., 2013). Os polissacarídeos de origem microbiana são capazes de formar soluções viscosas e géis, mesmo em concentrações baixas, sua purificação e recuperação podem ser efetuadas de maneira mais simples, são menos susceptíveis a variação de suas propriedades físicas ou químicas, mantendo assim um padrão de qualidade devido ao fato de sua produção ser controlada, possibilitando a obtenção de polissacarídeos com propriedades específicas através da engenharia genética (SILVA et al., 2006).

Segundo Donot et al. (2012), os polímeros produzidos a partir de micro-organismos podem ser classificados em três grupos, de acordo com a localização na célula: polissacarídeos citosólicos que fornecem uma fonte de carbono e energia para as

células, os polissacarídeos que formam a parede celular, incluindo os peptidoglicanos, e os exopolissacarídeos que são liberados para o meio externo sob a forma de cápsulas ou biofilme, formando um material parecido com um limo que se distribui na fase líquida (SILVA et al., 2006).

Os EPS são identificados como compostos de interesse devido a sua variabilidade estrutural que oferece um grande conjunto de propriedades biológicas e físico-químicas (BADEL et al., 2011). Segundo Paulo et al. (2012), estes biopolímeros são metabólitos secundários formados basicamente de monossacarídeos, podendo conter compostos de carbono como acetato, piruvato, fosfato e succinato.

A produção de EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do micro-organismo ou quando este se encontra em condições de estresse. Desempenham diferentes funções que incluem: proteção do micro-organismo contra desidratação, atuação como fonte de carbono e energia, agente de barreira contra infecção por vírus, micróbios e anticorpos e interação com células de animais ou plantas em relações específicas, formando uma massa densa que é difícil de ser metabolizada por outros micro-organismos (RAMOS, 2011).

Essa massa densa pode provocar mudanças nas propriedades físico-químicas do meio de cultivo no decorrer da fermentação, como reologia e viscosidade. No início da fermentação o líquido se comporta como um fluido Newtoniano com baixa viscosidade e ao final da fermentação observa-se a formação de um fluido não-Newtoniano com alta viscosidade (SILVA et al., 2006).

Os EPS são classificados como homopolissacarídeos: compostos por três ou mais moléculas monossacarídicas e heteropolissacarídeos: constituídos de vários monossacarídeos diferentes. Os homopolissacarídeos são conhecidos como glucanas (MINERVINI et al., 2010).

As glucanas são polímeros de glicose estruturados de forma ordenada e classificados quanto ao tipo de ligação na cadeia principal, que pode ser do tipo α ou β (SILVA et al., 2006). As glucanas desempenham papel central na organização molecular da parede celular de fungos filamentosos e leveduras (VASCONCELOS, 2008), funcionando como suporte, pois, são ligadas a quitina, lipídeos, proteínas e carboidratos e ainda podem ser observadas como EPS. A função específica destes compostos na fisiologia não está completamente definida, mas pode ser considerado como função principal o auxílio na manutenção da rigidez da parede celular (SILVA et al., 2006).

Uma das propriedades das glucanas é a atuação como modificadora na resposta biológica, devido ao seu potencial imunomodulador. Outros efeitos benéficos apresentados são a atividade anticarcinogênica, hipocolesterolêmica e antimutagênica.

Em micro-organismos as β -glucanas podem ser obtidas a partir da parede celular, já em cereais como aveia e a cevada, fazem parte da parede do endosperma formando polímeros complexos de proteína-polissacarídeo (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Apesar dos biopolímeros apresentarem alta qualidade, o mercado mundial ainda é dominado por polissacarídeos extraídos a partir de algas e plantas superiores (DONOT et al., 2012), como por exemplo, o alginato que é extraído de algas pardas e a goma arábica obtida de *Acacia spp.* (CUNHA et al., 2009). Porém a produção de polímeros através de micro-organismos tem se destacado, um dos exemplos é a goma xantana produzida a partir da bactéria *Xanthomonas campestre*. com produção estimada de 50 mil ton/ano (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008). Outros exemplos são a goma gelana produzida por bactérias do gênero *Sphingomonas* (BERWANGER et al., 2007), e a goma dextrana obtida através da bactéria *Leuconostoc mesenteróides* (HONORATO et al., 2007).

A produção industrial de biopolímeros ainda é pequena devido ao baixo rendimento da produção (BADEL et al., 2011), que torna muitas vezes o processo caro e exige tecnologia avançada. Nos últimos anos várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com intuito de isolar novas cepas, que poderão desenvolver produtos com propriedades semelhantes ou até melhores que as já encontradas. Segundo Donot et al. (2012) alguns micro-organismos são capazes de produzir mais de 40 g L⁻¹ de EPS em condições de produção simples, podendo assim competir com os polissacarídeos tradicionais.

Além das bactérias, os fungos também são utilizados para a produção de biopolímeros. De acordo com Silva et al. (2006) fungos são organismos heterotróficos decompositores da matéria orgânica, crescem de forma rápida formando filamentos celulares denominados hifas, cujo conjunto destas constitui o tecido do próprio fungo, conhecido como micélio, sendo este responsável pelas funções vegetativas do micro-organismo.

Algumas espécies de fungos causam doenças nas plantas diminuindo a produtividade de árvores e colheitas, como por exemplo, a mancha Marssonina causada pelo fungo patogênico *Marssonia brunnea* (ZHU et al., 2013), entretanto estes micro-

organismos podem produzir substâncias interessantes que possuem aplicações médicas, como é o caso do fungo *Penicillium spp.* produtor da enzima β -lactamase que representa uma classe de fármaco de grande importância (SCHECKHUBER et al., 2013).

Os polissacarídeos produzidos a partir de fungos constituem grande parte da biomassa fúngica, servindo como suporte para as hifas, formando uma capa extracelular que atua como suporte para adesão das enzimas excretadas (FUKUDA et al., 2009).

O micro-organismo utilizado no presente trabalho é um fungo denominado *Lasiodiplodia theobromae* MMPI que foi isolado de Pinha (*Annona squamosa*). Este micro-organismo representa o estado assexuado do *Botryosphaeria rhodina*, é cosmopolita, polífago e oportunista que apresenta reduzida especialização patogênica. É normalmente associado à infecção de espécies de plantas que apresentam deficiência nutricional, estão estressadas ou com ferimentos naturais provocados por insetos, pássaros ou pelo próprio homem (PEREIRA et al., 2006). Atua em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo, causando a podridão seca e a morte de plantas (LIMA et al., 2012).

As características do *L. theobromae* são muito variáveis apresentando diferentes colorações e velocidade de crescimento micelial dependendo do local onde foi isolado. De forma geral, apresentam grande variabilidade, o que reflete em sua morfologia, patogenicidade e fisiologia, apresentando variações na capacidade de utilização de diferentes substratos, produção de metabólitos diferenciados e tolerância a determinadas faixas de temperatura (LIMA et al., 2012).

Visando uma aplicação industrial para a produção destes polímeros, é interessante buscar fontes de carbono que apresentem um custo reduzido, sem alterar o rendimento ou produção. Neste sentido o presente trabalho propõe a utilização de um subproduto industrial barato, o melaço de cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 100 países, apresentando-se como a maior cultura do mundo, sendo utilizada para produção de açúcar e etanol, sendo a maior parte de sua produção voltada para a fabricação do açúcar. A composição da cana-de-açúcar depende muito da variedade de cana, da região onde é cultivada, do grau de maturidade da cana e da variação das condições climáticas (HOI; MARTINCIGH, 2013).

A safra mundial de cana-de-açúcar de 2013 está estimada em mais de 1,7 bilhões de toneladas, e os mais importantes produtores de cana-de-açúcar são Brasil, Índia, China, Tailândia, Estados Unidos e México (DERAL, 2012).

No Brasil a cana tem sido cultivada a mais de 500 anos, devido à boa adaptação da planta ao clima, incentivos do governo e por questões culturais. O Brasil é o maior produtor mundial, com 719,1 milhões de toneladas produzidas em 2010 (HOFSETZ; SILVA, 2012).

No processo de fabricação de açúcar ocorrem duas etapas, na primeira a água é evaporada para a o aumento da concentração do caldo (60 a 70 °Brix), na segunda etapa ocorre o processo de secagem, que consiste em evaporação e resfriamento. Nesta etapa são produzidos pequenos cristais de tamanho uniforme, e após a turbinagem são obtidos dois produtos, o açúcar e o melaço (MEZARROBA et al., 2010).

O melaço, portanto, é um subproduto da fabricação de açúcar, que se apresenta na forma de um líquido viscoso de coloração escura, sendo muito utilizado para o processo de produção de etanol, devido à presença de açúcares fermentescíveis, que atuam como fonte de carbono para o metabolismo microbiano (CAZETTA et al., 2007).

Como o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar, conseqüentemente há produção de grande quantidade de melaço, e diante da imensa quantidade gerada este subproduto torna-se uma fonte barata para produção de produtos de interesse. Utilizando o melaço como fonte de carbono, o micro-organismo pode apresentar diferentes rendimentos quando comparado a outras fontes comerciais como glicose e sacarose, devido a isso é interessante realizar estudo visando qual a melhor condição da condução do processo.

Em um processo fermentativo é de grande importância a utilização do delineamento fatorial, pois, a partir deste, podem ser determinadas as melhores condições da fermentação, considerando fatores como pH, concentração de substrato, tempo de incubação e temperatura, que normalmente interferem na eficiência do processo (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

A otimização de processos utiliza a estatística para analisar quais são os melhores resultados, mas a análise estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o delineamento fatorial em que esses dados devem ser obtidos (MARINHO; CASTRO, 2011).

Planejar experimentos é definir uma sequência de coletas de dados experimentais, dentre os métodos experimentais o delineamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar efeitos de duas ou mais variáveis de influência (CUNICO et al., 2008). Um bom planejamento consiste em projetar experimentos de

maneira que este seja capaz de fornecer exatamente o que procuramos, para isso, deve-se saber o que está sendo procurado (MARINHO; CASTRO, 2011).

Para executar um delineamento fatorial é extremamente importante a observação dos efeitos, das variáveis e de suas interações, pois desta forma poderá ser estabelecida uma relação entre os processos envolvidos (SILVA, et al., 2010). O primeiro passo a ser definido em um delineamento é a especificação de níveis em que cada fator será estudado, pois cada um desses experimentos terá um conjunto de níveis específicos. (MARINHO; CASTRO, 2011).

Para aplicar o delineamento fatorial é necessária a realização de alguns ensaios, havendo k fatores, o planejamento irá requerer a realização de 2^k ensaios. Por exemplo, em um experimento em que são analisados 3 fatores, o planejamento será apresentado na forma 2^3 (MARINHO; CASTRO, 2011).

Segundo Cunico et al. (2008), existem diversas vantagens da utilização de um delineamento fatorial, sendo elas: a redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação, estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos, determinação de confiabilidade dos resultados e seleção de variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios.

De acordo com Kowalski et al. (2013), duas abordagens podem ser empregadas para realizar a otimização, sendo elas: análises univariadas, onde cada variável é estudada separadamente, ou multivariadas, onde as variáveis são estudadas simultaneamente, o que torna possível distinguir as interações entre elas.

Segundo Cunico et al. (2008), geralmente a otimização de variáveis experimentais é realizada por procedimentos que avaliam uma variável por vez (univariado), o que apresenta desvantagens como o tempo gasto para a otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo de estudo, desta maneira essas desvantagens proporcionam uma otimização ineficiente impedindo o estabelecimento de ótimos verdadeiros, que podem ser atingidos quando se empregam os sistemas multivariados.

De acordo com Silva et. al (2010), outro processo que tem sido bastante utilizado é a otimização multivariada, que proporciona a avaliação simultânea do efeito de todas as variáveis selecionadas em um sistema, bem como da interação entre elas. Tal metodologia apresenta como vantagens um menor tempo de execução, consumo de reagentes e um menor número de experimentos quando comparada a análise univariada.

No presente trabalho foi aplicada a análise multivariada através do delineamento fatorial, com intenção de definir quais são as melhores condições para a produção de exopolissacarídeo excretado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI através da utilização de melaço de cana-de-açúcar como substrato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os reagentes utilizados foram disponibilizados pelo laboratório de Bioprocessos da UTFPR-PB, sendo empregados com grau de pureza adequado a cada ensaio.

O micro-organismo (*Lasiodiplodia theobromae* MMPI) utilizado foi obtido da coleção de cultura do Laboratório de Bioprocessos da UTFPR-PB.

4.2 Procedimento Experimental

4.2.1 Clarificação do melaço bruto

Visando melhor aproveitamento do melaço de cana-de-açúcar o mesmo foi submetido ao processo de clarificação. Inicialmente o pH do melaço foi ajustado para 3,0 com adição de H₂SO₄ P.A, e então, submetido a agitação durante 24 h sob refrigeração (4 °C). Posteriormente, realizou-se a centrifugação do melaço acidificado (1500 x g, 30 min), e ajuste do pH do sobrenadante para 5,5 com solução de NaOH 6 mol L⁻¹ e por fim, este foi novamente centrifugado.

4.2.2 Preparo do inóculo

Uma alçada de micélio do fungo foi transferida para placas de Petri contendo meio PDA (ágar-batata-dextrose). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por 96 h.

Após o crescimento do micro-organismo o micélio presente na superfície das placas foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de Meio de Sais de Vogel e glicose 5 g L⁻¹, sendo estes incubados em *shaker* de bancada por 48 h sob agitação de 150 rpm, a temperatura de 28 °C.

A pré-cultura foi centrifugada (1500 x g, 15 min), sendo o sobrenadante descartado, as células foram ressuspensas com adição de solução salina estéril e posteriormente homogeneizadas em mixer para formação uma suspensão celular.

O inóculo padronizado foi obtido com a diluição da suspensão celular com solução salina estéril, até que se obtivesse uma solução com absorbância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

4.2.3 Avaliação da influência da concentração do substrato, pH inicial e agitação pelo delineamento fatorial

Foi avaliada a influência da concentração do substrato (concentração de melão de cana-de-açúcar), pH inicial do meio de cultivo e velocidade de agitação sobre a produção de lasiodiplodana e crescimento celular do ascomiceto *L. theobromae*, através de delineamento fatorial. As variáveis dependentes analisadas foram: produção, rendimento e a produtividade volumétrica em EPS e biomassa celular.

Foi empregado delineamento fatorial completo 2^3 , com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Na Tabela 1 está descrita a matriz do delineamento fatorial utilizados nos ensaios.

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial 2^3

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis Reais		
	pH	Agitação (rpm)	Concentração (°Brix)	pH	Agitação (rpm)	Concentração (°Brix)
1	-1	-1	-1	4,0	50	1,0
2	1	-1	-1	8,0	50	1,0
3	-1	1	-1	4,0	200	1,0
4	1	1	-1	8,0	200	1,0
5	-1	-1	1	4,0	50	6,0
6	1	-1	1	8,0	50	6,0
7	-1	1	1	4,0	200	6,0
8	1	1	1	8,0	200	6,0
9	0	0	0	6,0	125	3,5
10	0	0	0	6,0	125	3,5
11	0	0	0	6,0	125	3,5

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo à base de melão de cana-de-açúcar suplementado com fonte

de nitrogênio e minerais. Como fonte de nitrogênio foi utilizado extrato de levedura na concentração de 2 g L^{-1} e como fonte de minerais os sais: K_2HPO_4 (2 g L^{-1}) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g L^{-1}).

A concentração do melão, o pH inicial do meio de cultivo e a velocidade de agitação em cada ensaio seguiu o delineamento descrito na Tabela 1. Sendo empregados 10 mL de inóculo padronizado, conforme item 4.2.2.

O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado com solução de NaOH (1 mol L^{-1}) ou HCl (1 mol L^{-1}), o tempo de cultivo foi de 72 h e a temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ao final de cada ensaio fermentativo o pH foi verificado e os teores de EPS, biomassa celular e consumo de substrato foram quantificados.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Quantificação do biopolímero produzido e da biomassa fúngica

A biomassa celular foi separada do caldo fermentado por centrifugação ($1350 \times g$, 20 min), lavada com água destilada a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, seca até massa constante a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ e quantificada gravimetricamente. O EPS contido no sobrenadante foi recuperado do caldo por precipitação com 3 volumes de etanol $95 \text{ }^\circ\text{GL}$ (*overnigh* em geladeira) e quantificado por gravimetria após secagem a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante.

4.3.2 Determinação do conteúdo de açúcares redutores totais

A concentração final de substrato foi determinada no caldo fermentado após hidrólise com ácido clorídrico, através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

O método DNS baseia-se na redução em meio alcalino do 3,5-di-nitrosalicato (amarelo forte) e a oxidação do monossacarídeo, formando o 3-amino-5-nitrosalicilato (alaranjado escuro), e a máxima absorção de luz visível no comprimento de onda é na faixa de 540 nm (MALDONADE et al., 2013).

Segundo Maldonade et al. (2013), os monossacarídeos são potencialmente redutores devido à presença da carbonila, mas os dissacarídeos como a sacarose presente no melão de cana-de-açúcar necessitam ser hidrolisados para tornarem-se redutores. Pelo fato do método DNS quantificar apenas açúcares redutores, foi

necessário realizar a hidrólise das amostras. A metodologia utilizada para hidrolisar foi adaptada de MATISSEK et al. (1998), e consistiu na adição de ácido clorídrico 2 mol L^{-1} e aquecimento de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min, após a solução esfriar, foi neutralizada com hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} .

A metodologia descrita por Miller (1959) consiste em construir uma curva padrão de glicose e a partir desta quantificar o teor de ART presente na amostra. Para realizar o ensaio foi utilizado 1 mL de amostra adequadamente diluída e 3,5 mL do reagente DNS, a mistura foi agitada e após completa homogeneização os tubos foram levados a aquecimento de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min para oxidação total dos açúcares, em seguida os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente e 16 mL de água destilada foram adicionados, após a completa homogeneização foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV - VIS a 540 nm.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da influência do pH inicial, concentração do meio de cultivo e velocidade de agitação sobre produção, rendimento e produtividade em EPS

Na tabela 2, são apresentados os resultados da produção, rendimento e produtividade volumétrica em EPS após 72 h de cultivo do fungo *L. theobromae*, de acordo com o delineamento fatorial 2^3 .

Tabela 2 – Resultados do delineamento fatorial 2^3 com as variáveis reais e codificadas e as respostas produção (P), rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) em EPS.

Ensaio	Variáveis codificadas (reais)			Resultado após 72 h de cultivo		
	Concentração (°Brix)	pH	Agitação (rpm)	P (g L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	-1 (1,0)	-1 (4,0)	-1 (50)	0,09	0,015	0,0013
2	1 (6,0)	-1 (4,0)	-1 (50)	0,36	0,036	0,0050
3	-1 (1,0)	1 (8,0)	-1 (50)	0,30	0,039	0,0042
4	1 (6,0)	1 (8,0)	-1 (50)	0,05	0,005	0,0007
5	-1 (1,0)	-1 (4,0)	1 (200)	1,66	0,250	0,0231
6	1 (6,0)	-1 (4,0)	1 (200)	4,43	0,216	0,0615
7	-1 (1,0)	1 (8,0)	1 (200)	1,53	0,214	0,0213
8	1 (6,0)	1 (8,0)	1 (200)	2,95	0,154	0,0409
9	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	7,18	0,482	0,0997
10	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	8,88	0,588	0,1233
11	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	8,19	0,557	0,1137

5.1.1 Avaliação da produção em EPS

A Tabela 3 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação estimados para a produção de EPS pelo micro-organismo *L. theobromae*.

Tabela 3 – Tabela dos efeitos para a produção de EPS.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	p	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	3,238182	1,495331	2,165529	0,096291	0,05037	6,425997
Concentração	0,526250	1,753430	0,300126	0,779032	-3,21180	4,264295
pH	-0,213750	1,753430	-0,121904	0,908854	-3,95180	3,524295
Agitação	1,221250	1,753430	0,696492	0,524474	-2,51680	4,959295
Concentração x pH	-0,233750	1,753430	-0,133310	0,900386	-3,97180	3,504295
Concentração x Agitação	0,521250	1,753430	0,297274	0,781056	-3,21680	4,259295
pH x Agitação	-0,188750	1,753430	-0,107646	0,919460	-3,92680	3,549295

t tab = 2,1318

Conforme pode ser verificado nos dados dispostos na Tabela 3, os valores de t calculado apresentados pelas variáveis se localizaram abaixo do t tabelado (2,1318), e acima de ($p < 0,10$), a um nível de 90% de confiança. Desta maneira, conclui-se que, todas as variáveis e as interações entre elas não mostraram significância estatística na avaliação do processo de produção de EPS.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 1), no qual valores localizados a direita da linha tracejada são considerados significativos, analisados no nível de significância de 10%.

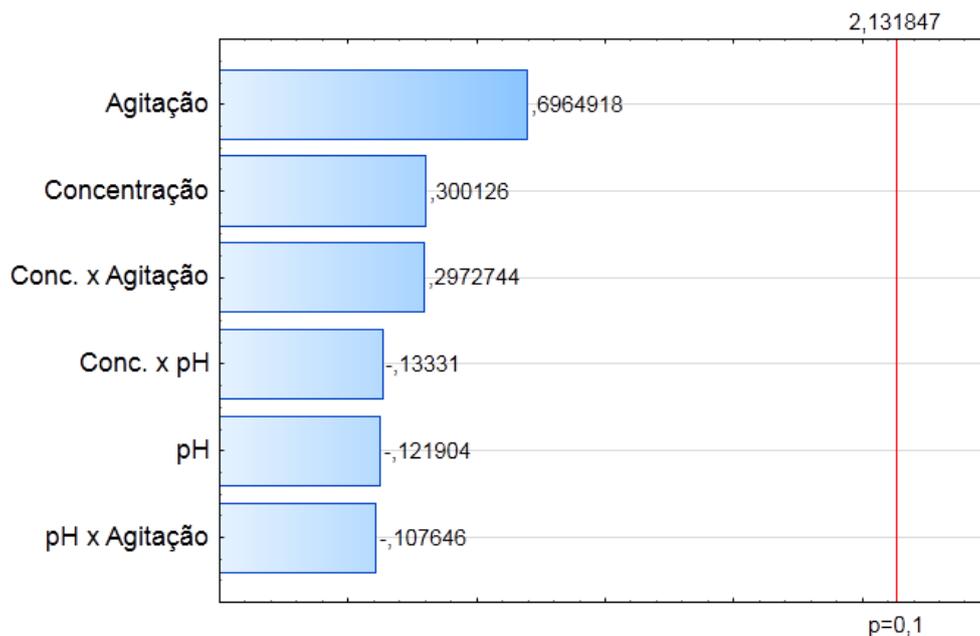


Figura 1 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produção de EPS.

Para melhor representar os dados obtidos, foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 2.

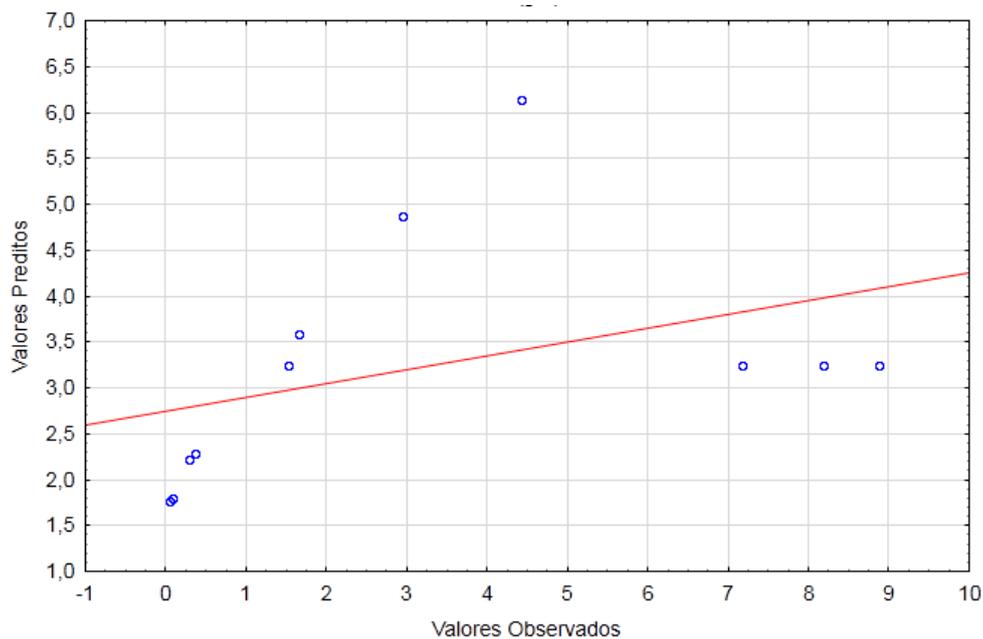


Figura 2 - Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.

Quão mais próximos os valores observados se localizam dos preditos, melhor é considerada a igualdade do ajuste. Neste caso observa-se um desvio entre os valores observados e preditos.

De acordo com os dados apresentados, pode ser verificado que os efeitos principais e de interação entre os parâmetros avaliados não foram significativos sobre a resposta produção final de biopolímero em um intervalo de confiança de 90%. No entanto a partir de uma avaliação mais específica dos ensaios que constituíram o delineamento (ensaios 1 a 11) algumas considerações podem ser abordadas, conforme descrito a seguir.

A menor produção final de EPS ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) foi verificada no ensaio 4 onde foi empregada a menor velocidade de agitação (50 rpm) associada a maior concentração de substrato ($6,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) e pH inicial de cultivo de 8,0. Percebe-se que os menores valores de produção de EPS (ensaios 1, 2, 3 e 4) foram verificados nos ensaios onde foi empregado a menor velocidade de agitação (50 rpm) independentemente da concentração de substrato ou pH inicial de cultivo.

Por outro lado, as maiores concentrações de EPS foram verificadas nos ensaios do ponto central do delineamento (ensaios 9, 10 e 11) onde foi empregado concentração de substrato de $3,5 \text{ }^\circ\text{Brix}$, pH inicial de 6,0 e velocidade de agitação de 125 rpm.

A produção de EPS ($8,88 \text{ g L}^{-1}$) observada no ensaio 10 foi superior a outros biopolímeros, como por exemplo, na produção de glucana por *Rhizobium meliloti*, ($5,13 \text{ g L}^{-1}$), 42,2% inferior ao presente trabalho (VENKATACHALAM et al., 2013), e na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) 15,54% inferior, (ERNANDES; CRUZ, 2009).

Porém quando comparada a produção de goma xantana utilizando melão de cana-de-açúcar ($16,4 \text{ g L}^{-1}$), (FARIA, 2009), soro de queijo ($36,89 \text{ g L}^{-1}$), (MESOMO, 2007), e soro de leite ($21,91 \text{ g L}^{-1}$), (NERY et al., 2008), foi verificado valores inferiores no presente trabalho.

Cunha et al. (2012) em cultivos com o *L. theobromae* MMPI em meio a base de glicose relatou produção de $6,32 \text{ g L}^{-1}$, ou seja 28,8% inferior a observada no presente trabalho com meio a base de melão de cana. A maior produção de EPS em meio com melão de cana-de-açúcar pode estar associada à composição complexa do melão, que encerra em sua composição além dos açúcares sacarose, glicose e frutose outros componentes como diferentes minerais.

Quantidades similares de produção de EPS ($9,54 \text{ g L}^{-1}$) foram relatadas por Kruger et al. (2012) em cultivos em meio a base de melão de cana sem suplementação mineral. Tais resultados indicam que de fato o melão de cana-de-açúcar possui maior

desempenho como substrato para produção de EPS pelo *L. theobromae* MMPI do que a glicose.

Para melhor entendimento da resposta produção de EPS em relação aos diferentes níveis das variáveis estudadas os resultados dos efeitos principais foram organizados em um cubo (Figura 3) para interpretação geométrica dos dados.

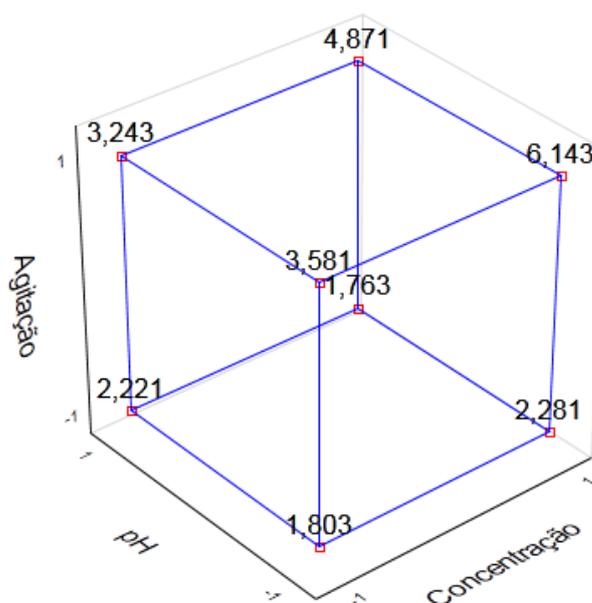


Figura 3 – Representação cúbica da produção de EPS pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

A partir da análise realizada sobre a representação cúbica da produção de EPS (Figura 3), pode ser observado que a produção máxima estimada de EPS (6,143 g L⁻¹) foi obtida quando a variável de entrada agitação (200 rpm) e concentração (6,0 °Brix) estavam posicionadas no nível superior e a variável de entrada pH (4,0) no nível inferior. Já os menores valores estimados de produção de EPS (1,763 g L⁻¹) foram verificados em condições opostas, ou seja, quando foram empregados os menores níveis de agitação (50 rpm) e concentração de substrato (1,0 °Brix) e o maior nível de pH inicial.

Resultados semelhantes foram descritos por Faria (2009), o autor relatou aumento da produção de goma xantana em cultivos com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* quando a concentração de substrato foi elevada. Condição similar foi observado no estudo da produção de biopolímero pelos fungos *Verticillium lecanii* (GALBETTI et al., 2009), e *L. theobromae* (CUNHA et al., 2012; BORGES et al., 2013).

5.1.2 Avaliação do rendimento em EPS

A Tabela 4 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação estimados para o rendimento em EPS pelo micro-organismo *L. theobromae*.

Tabela 4 – Tabela de efeitos para o rendimento de EPS.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	p	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	0,232364	0,095630	2,429830	0,071994	0,028496	0,436231
Concentração	-0,026750	0,224271	-0,119275	0,910808	-0,504862	0,451362
pH	-0,026250	0,224271	-0,117046	0,912465	-0,504362	0,451862
Agitação	0,184750	0,224271	0,823779	0,456347	-0,293362	0,662862
Conc. x pH	-0,020250	0,224271	-0,090292	0,932395	-0,498362	0,457862
Conc. x Agitação	-0,020250	0,224271	-0,090292	0,932395	-0,498362	0,457862
pH x Agitação	-0,022750	0,224271	-0,101440	0,924083	-0,500862	0,455362

t tab= 2,1318

A partir da análise dos efeitos (Tabela 4), verifica-se que os valores de t calculado se localizaram abaixo do t tabelado (2,1318), e acima de ($p < 0,10$), desta maneira, conclui-se que para um nível de 90% de confiança, todas as variáveis e as interações entre elas não mostraram significância estatística em relação ao parâmetro rendimento em EPS.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 4), no qual valores localizados a direita da linha tracejada são considerados significativos, analisados ao nível de significância de 10%.

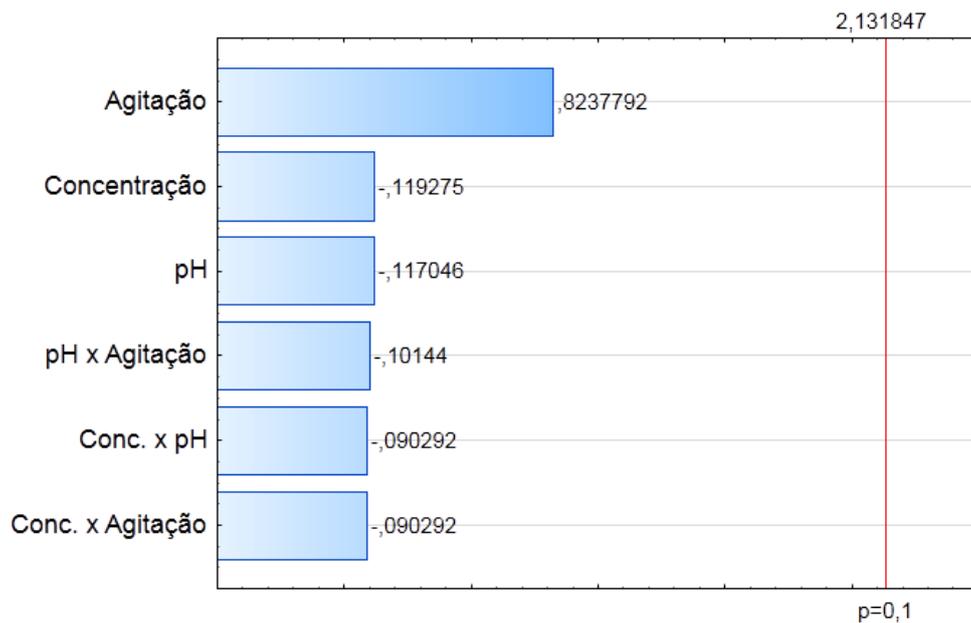


Figura 4 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo para o rendimento em EPS.

Para melhor representar o ajuste do modelo aos dados foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 5.

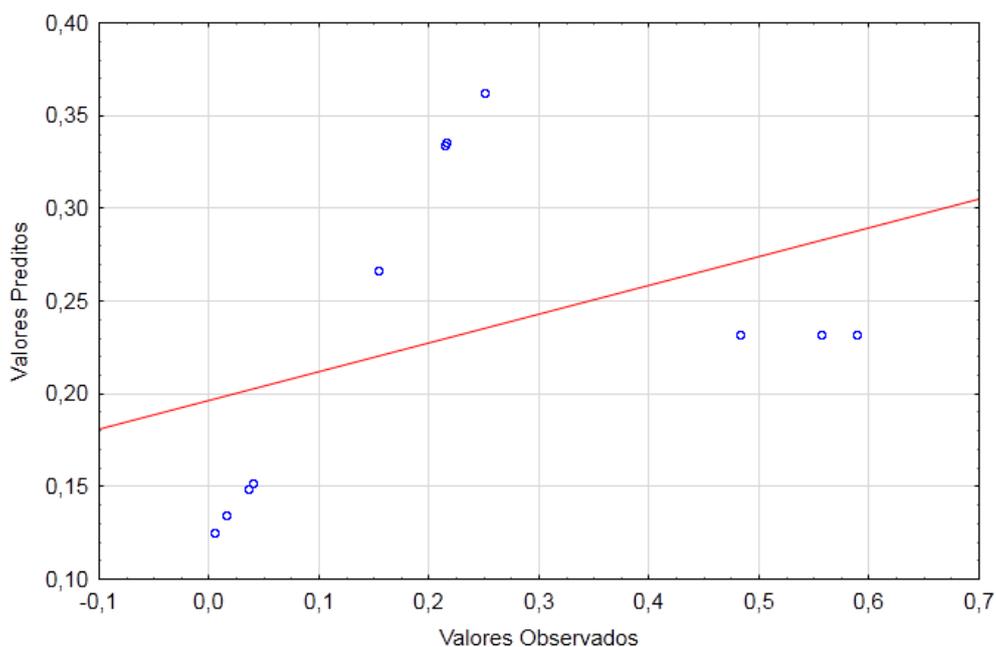


Figura 5 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.

Através do gráfico de igualdade (Figura 5), pode ser observado desvio entre os valores preditos e os observados.

De acordo com os dados apresentados (Tabela 4) e (Figura 4), pode ser observado que os efeitos principais e de interação entre os parâmetros avaliados não foram significativos sobre a resposta de produção final de biopolímero em um intervalo de confiança de 90%.

Entretanto a partir de uma avaliação dos ensaios que constituíram o delineamento (1 a 11) algumas considerações podem ser apresentadas.

Similarmente ao verificado com a produção de EPS, no ensaio 4 (6,0 °Brix, pH 8,0 e 50 rpm) foi verificado o menor rendimento em EPS. Já nos ensaios do ponto central e em especial do ensaio 10 (3,5 °Brix, pH 6,0 e 125 rpm) foram verificados os maiores valores de rendimento. Tais resultados sugerem que maiores concentrações de substratos associada a menores velocidades de agitação e, portanto menor disponibilidade de oxigênio são desfavoráveis tanto para a produção como para o rendimento em EPS.

Possivelmente concentrações próximas de 60 g L⁻¹ (6,0 °Brix) podem ter inibido enzimas envolvidas no processo de síntese de EPS, bem como pode ter promovido uma condição de pressão osmótica fisiologicamente muito elevada.

O rendimento em EPS (0,588 g g⁻¹) observado nos ensaios do delineamento fatorial foi superior aos observados em alguns trabalhos descritos na literatura científica. Segundo Shenbhagaraman et al. (2012) na produção de glucana por *Pleorotus eryngii* o rendimento observado foi de 0,568 g g⁻¹, 3,4% inferior ao presente estudo, bem como na produção de goma pululana por *Aureobasidium pullulans* (0,44 g g⁻¹) 25,17% inferior, (OLIVEIRA, 2010).

Cunha et al (2012), em trabalho com o mesmo microrganismo estudado no presente trabalho verificaram rendimento de 0,36 g g⁻¹ em meio sintético com glicose. Da mesma forma, Kruger et al., (2012) em meio com melaço de cana-de-açúcar descreveram valores de 0,32 g g⁻¹ de EPS. Cabe ressaltar que tais autores empregaram concentrações diferentes de substrato (40 g L⁻¹).

Para melhor visualização da influência das variáveis sobre a resposta produção de biopolímero, os resultados principais foram organizados em um cubo (Figura 6) para interpretação geométrica dos dados.

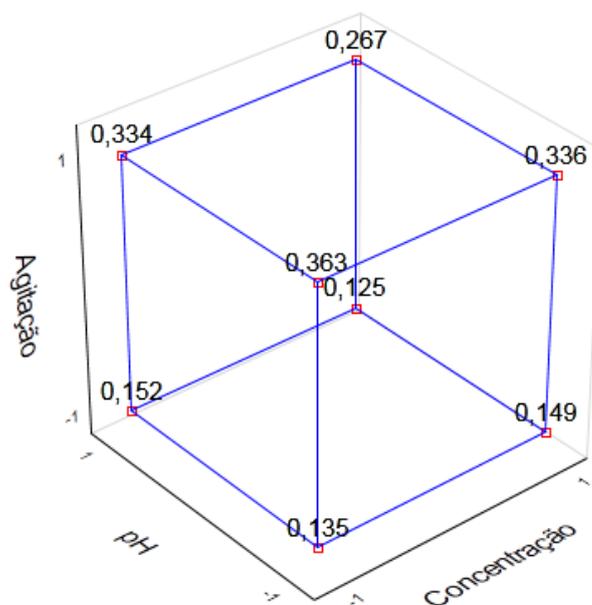


Figura 6 – Representação cúbica do rendimento de EPS pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

Através dos dados apresentados (Figura 6), pode ser observado que o rendimento máximo estimado de EPS ($0,363 \text{ g g}^{-1}$) foi obtido quando a variável de entrada agitação estava localizada no nível superior (200 rpm), e as variáveis concentração ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) e pH (4,0) no nível inferior, já para o rendimento estimado mínimo ($0,125 \text{ g g}^{-1}$) ocorreu o inverso, as variáveis concentração ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) e pH ($8,0 \text{ g L}^{-1}$) se localizavam no nível superior e a variável de entrada agitação (50 rpm) se localizou no nível inferior.

Comparando os ensaios nos quais foram empregadas velocidades de agitação de 50 rpm com os ensaios onde foram verificadas velocidades de 125 rpm, houve considerável aumento na produção de EPS e também aumento de rendimento.

No estudo da produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* quando a variável de entrada agitação foi deslocada do nível inferior (160 rpm) para o nível superior (200 rpm) o rendimento da produção do biopolímero também aumentou (Berwanger, 2005), o que indica que até certo ponto, maior agitação pode proporcionar melhor rendimento da produção de EPS.

Através de uma avaliação pontual da variável pH inicial de cultivo, percebe-se uma tendência de melhores resultados de produção e rendimento em pH próximo do nível inferior (4,0). Segundo Barroso et al. (2010) na produção de EPS por *L. theobromae*, o melhor rendimento observado foi quando utilizou-se pH (5,0), desta

forma pode ser observado que o micro-organismo apresenta melhores rendimentos em pH levemente ácido.

5.1.3 Avaliação para a produtividade volumétrica (Q_p) em EPS

A Tabela 5 apresenta os valores dos efeitos principais e de interação em relação a produtividade volumétrica (Q_p) de EPS.

Tabela 5 – Tabela de efeitos para a produtividade volumétrica de EPS.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	p	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	0,044973	0,020758	2,166490	0,096187	0,000719	0,089226
Concentração	0,014550	0,048683	0,298875	0,779920	-0,089234	0,118334
pH	-0,005950	0,048683	-0,122220	0,908619	-0,109734	0,097834
Agitação	0,033900	0,048683	0,696347	0,524555	-0,069884	0,137684
Conc. x pH	-0,006500	0,048683	-0,133518	0,900232	-0,110284	0,097284
Conc. x Agitação	0,014450	0,048683	0,296820	0,781378	-0,089334	0,118234
pH x Agitação	-0,005250	0,048683	-0,107841	0,919314	-0,109034	0,098534

t tab= 2,1318

A partir da análise dos dados (Tabela 5), pode ser observado que os valores de t calculado se localizaram abaixo do t tabelado (2,1318), e acima de ($p < 0,10$), a um nível de 90% de confiança, desta maneira, conclui-se que, todas as variáveis e as interações entre elas não mostraram significância estatística sobre a produtividade volumétrica de EPS.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 7), no qual valores localizados a direita da linha tracejada são considerados significativos, analisados no nível de significância de 10%.

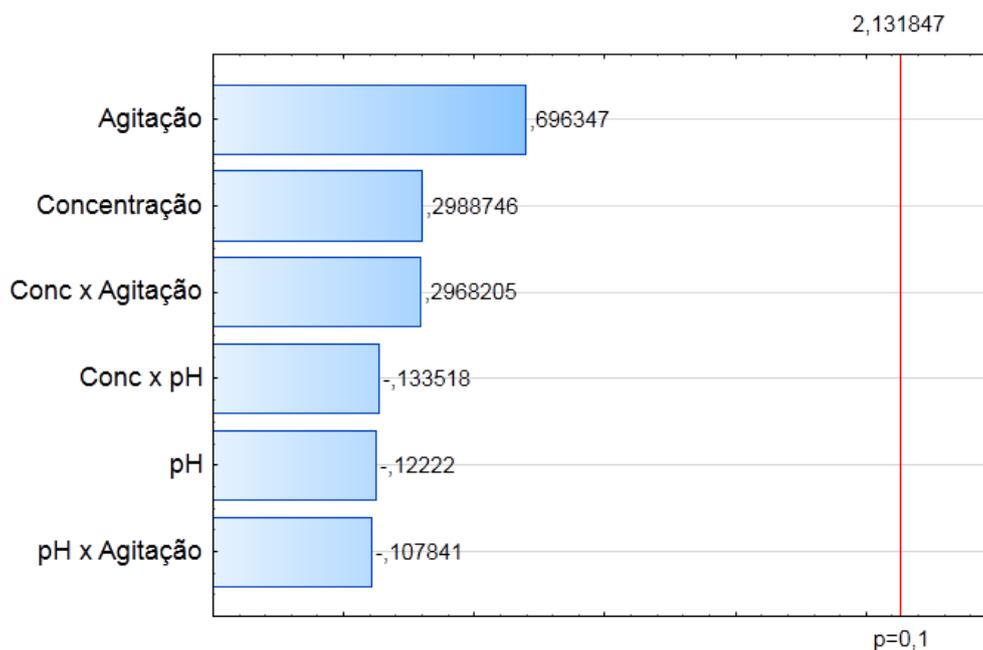


Figura 7 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produtividade volumétrica em EPS.

Para melhor representar o ajuste do modelo aos dados foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 8.

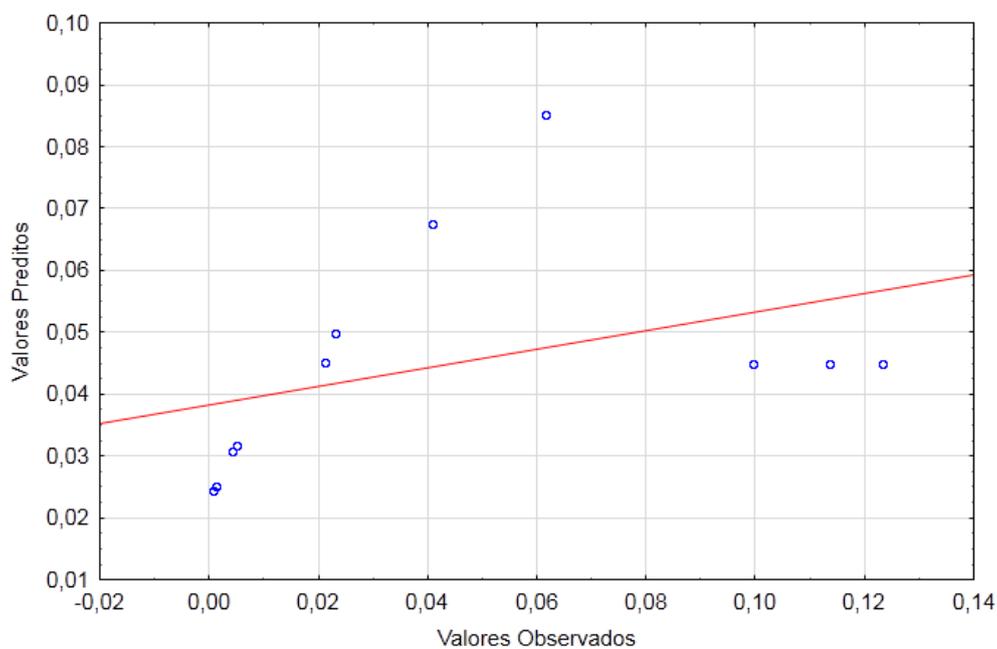


Figura 8 – Gráfico de igualdade entre os valores preditos e observados.

De acordo com o gráfico de igualdade (Figura 8), pode ser observado um desvio entre os valores preditos e os observados, sendo que quanto mais próximos os

valores observados se localizam dos preditos, melhor é considerada a igualdade do ajuste.

De acordo com os dados apresentados (Tabela 5) e (Figura 7), os efeitos principais e de interação entre os parâmetros avaliados não foram significativos sobre a resposta de produção final de biopolímero em um intervalo de confiança de 90%.

Todavia a partir de uma avaliação dos ensaios (1 a 11), algumas considerações podem ser abordadas, conforme descrito a seguir.

Através da avaliação das respostas (Tabela 2), para a produtividade volumétrica em EPS (Q_P), os experimentos 4 e 10 quando comparados forneceram a menor ($0,0007 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e a maior ($0,1233 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) produtividade, respectivamente.

A produtividade de EPS observada no presente trabalho foi superior a outros biopolímeros, como na produção de biopolímero por *Sphingomonas capsulata* ($0,038 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) 69,18% inferior, (BERWANGER, 2005), e na produção de EPS por *Pleorotus ostreatus* ($0,0125 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) 89,86% inferior, (WISBACK et al., 2005).

Porém foi inferior a produção de goma gelana ($0,21 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) 41,3% superior, (MANNA et al., 1996) e xantana ($0,50 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) 75,4% superior, (MESOMO, 2007), entretanto tais dados provavelmente se aplicam a linhagens de micro-organismos muito produtivos, e em condições otimizadas.

Cunha et al. (2012) através do estudo com o mesmo micro-organismo utilizado neste trabalho, mas empregando como fonte de carbono a glicose (60 g L^{-1}) verificaram produtividade 27% inferior ($0,09 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Por outro lado Kruger et al., (2012) verificou valores um pouco superiores de produtividade do biopolímero sintetizado pelo *L. theobromae*, ($0,13 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) utilizando como fonte de carbono o melão de cana-de-açúcar sem suplementação. Da mesma forma, Zanatta et al., (2012) descrevem valores superiores de produtividade ($0,26 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) em meio a base de melão com suplementação mineral.

Os valores superiores de produtividade descritos pelos autores podem estar associado ao fato de que as concentrações de substrato empregado pelos autores possivelmente estavam próximos dos valores ideais, não contribuindo, portanto para possíveis inibições por elevada concentração de substrato.

Para melhor visualização da influência dos fatores sobre a resposta produtividade de biopolímero, os resultados principais foram organizados em um cubo (Figura 9) para interpretação geométrica dos dados.

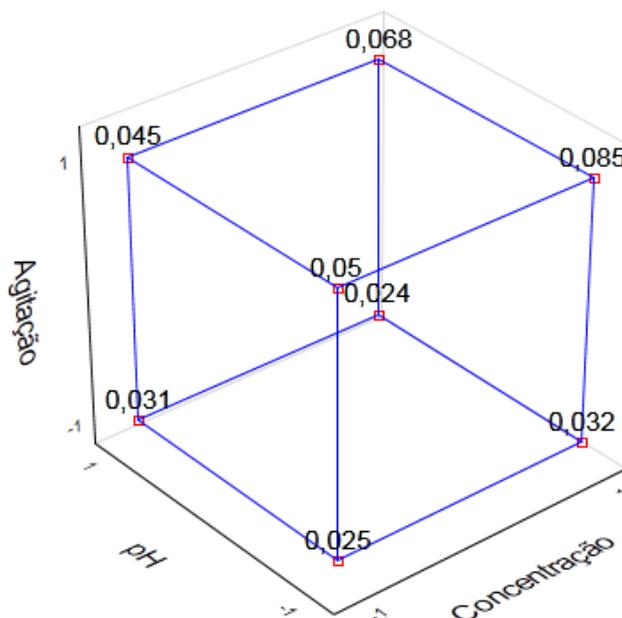


Figura 9 – Representação cúbica da produtividade de EPS pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

A partir dos dados apresentados (Figura 9), pode ser observado que a produtividade volumétrica máxima estimada de EPS ($0,085 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi obtida quando as variáveis agitação (200 rpm) e concentração ($6,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) se localizavam no nível superior e a variável pH ($4,0$) no nível inferior, já para a produção volumétrica estimada mínima estimada ($0,024 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) ocorreu o inverso, as variáveis agitação (50 rpm) e concentração ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) se localizavam no nível inferior e a variável de entrada pH ($8,0$) se localizaram no nível superior.

Em relação à variável concentração, pode-se constatar que quando esta foi deslocada do nível inferior ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) para o nível superior ($6,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) obteve-se tendência de melhor produção do biopolímero em praticamente todos os ensaios.

De forma similar ao observado com a produção de EPS, quando a variável agitação foi deslocada do nível inferior (50 rpm) para o superior (200 rpm) a produtividade volumétrica do biopolímero aumentou consideravelmente. Foram verificados valores mínimos de $0,0013 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ no ensaio 1 ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$, pH $4,0$ e 50 rpm) e máximo de $0,12 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ no ensaio 10 ($3,5 \text{ }^\circ\text{Brix}$, pH $6,0$ e 125 rpm). De acordo com Cunha et al. (2009) na produção de EPS por *L. theobromae* e por Berwanger (2005), na produção de biopolímero por *Sphingomonas capsulata* quando a agitação foi deslocada do nível inferior para o nível superior houve uma melhora significativa na produção do biopolímero.

De acordo com Domingos (2009), a agitação é um parâmetro importante, pois, contribui com uma adequada homogeneidade do caldo, auxiliando a aeração, possibilitando com que os nutrientes cheguem mais facilmente as células, evitando gradientes de pH e auxiliando na transferência de calor.

O pH, embora não tenha apresentado efeito estatisticamente significativo, parece ter importância em relação a produtividade, sendo verificada tendência de melhores resultados em pH um pouco ácido. Segundo BARROSO et al. (2012) para a produção de EPS por *L. theobromae* e Wisback (2005) na produção de biopolímero sintetizado por *Pleurotus ostreatus* as melhores faixas de produtividade volumétrica foram obtidas na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Na produção de inóculo fúngico em cultivo submerso, o pH é um importante parâmetro ambiental que pode ser um agente de crescimento das células, os fungos apresentam melhor crescimento em uma faixa de pH de 4,0 a 7,0, porém a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH (DOMINGOS, 2009).

5.2 Avaliação da influência do pH inicial, concentração do meio e velocidade de agitação sobre produção, rendimento e produtividade em biomassa celular

Na tabela 6, são apresentados os resultados da produção, rendimento e produtividade volumétrica em biomassa celular após 72 h de cultivo do fungo *L. theobromae*, de acordo com o delineamento fatorial 2^3 empregado.

Tabela 6 – Resultados do delineamento fatorial 2^3 com as variáveis reais e codificadas e as respostas produção (P), rendimento ($Y_{X/S}$) e produtividade volumétrica (Q_x) em biomassa celular.

Ensaio	Variáveis codificadas (Reais)			Resultado após 72 h de cultivo		
	Concentração (°Brix)	pH	Agitação (rpm)	P (g L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	Q_x (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	-1 (1,0)	-1 (4,0)	-1 (50)	1,260	2,02	0,0175
2	1 (6,0)	-1 (4,0)	-1 (50)	6,271	6,27	0,0871
3	-1 (1,0)	1 (8,0)	-1 (50)	2,080	2,73	0,0289
4	1 (6,0)	1 (8,0)	-1 (50)	1,915	1,74	0,0266
5	-1 (1,0)	-1 (4,0)	1 (200)	5,726	8,62	0,0795
6	1 (6,0)	-1 (4,0)	1 (200)	9,845	4,80	0,1367
7	-1 (1,0)	1 (8,0)	1 (200)	4,956	6,93	0,0688
8	1 (6,0)	1 (8,0)	1 (200)	9,123	4,77	0,1267
9	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	7,158	4,80	0,0994
10	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	7,355	4,87	0,1021
11	0 (3,5)	0 (6,0)	0 (125)	6,611	4,49	0,0918

5.2.1 Avaliação da produção de biomassa celular

A partir da análise dos dados (Tabela 6) referente ao delineamento fatorial algumas considerações relacionadas à influência dessas variáveis nas respostas (produção, produtividade e rendimento em biomassa celular) foram relevantes.

Através da avaliação das respostas, os experimentos 1 e 6 quando comparados forneceram a menor (1,26 g L⁻¹) e a maior (9,845 g L⁻¹) produção de biomassa celular.

Com intenção de avaliar se a diferença entre os resultados obtidos foi estatisticamente significativa, estes foram submetidos ao tratamento estatístico, com auxílio do software STATISTICA, versão 10.0. A partir da análise realizada pelo programa foi possível avaliar as respostas e o nível de significância.

Os valores dos efeitos principais e de interação estimados para cada uma das respostas em estudo estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Tabela dos efeitos para a produção de biomassa celular do fungo *L. theobromae*.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	p	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	5,663636	0,512079	11,06008	0,000380	4,57196	6,755311
Concentração	1,641500	0,600466	2,73371	0,052243	0,36140	2,921602
pH	-0,628500	0,600466	-1,04669	0,354322	-1,90860	0,651602
Agitação	2,265500	0,600466	3,77290	0,019555	0,98540	3,545602
Concentração x pH	-0,641000	0,600466	-1,06750	0,345889	-1,92110	0,639102
Concentração x Agitação	0,430000	0,600466	0,71611	0,513506	-0,85010	1,710102
pH x Agitação	0,255500	0,600466	0,42550	0,692365	-1,02460	1,535602

t tab= 2,1318

A partir da análise dos dados (Tabela 7), pode ser observado que as variáveis destacadas em negrito, concentração e agitação, apresentaram valores acima de t_{tab} (2,1318) e abaixo de $(p < 0,10)$, dessa maneira os efeitos foram significativos estatisticamente a um nível de 90% de confiança para produção de biomassa celular.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 10), no qual a linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são considerados significativos, analisados ao nível de significância de 10%.

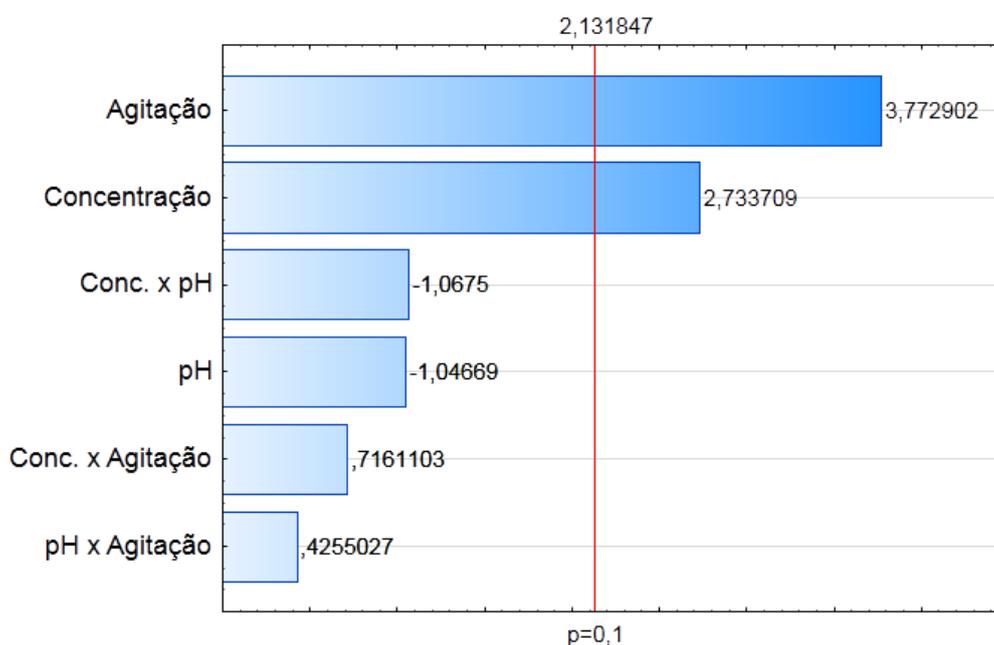


Figura 10 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produção de biomassa celular.

A análise do diagrama de Pareto (Figura 10) proporciona a visualização das duas variáveis independentes (agitação e concentração) que mostraram significância a um nível de 90% de confiança.

Com intuito de realizar a análise por regressão, o modelo de regressão assume que a variável aleatória X é conhecida e a variável aleatória Y é desconhecida, através de métodos estatísticos calculam-se as estimativas do coeficiente angular e do intercepto da curva de regressão resultante, e desta maneira este modelo é utilizado para prever os valores de Y a partir dos valores de X (COSTA et al., 2006).

Partindo desse pressuposto o algoritmo matemático gerou a equação do modelo a partir do tratamento estatístico dos dados através dos efeitos significativos e dos

valores codificados das variáveis. Na equação (1) o X_1 corresponde à concentração de melação de cana-de-açúcar e X_2 representa a agitação.

$$\text{Biomassa (g L}^{-1}\text{)} = 5,66364 + 1,641500 X_1 + 2,26550 X_2 \quad \text{Equação (1)}$$

Com intenção de verificar a qualidade do ajuste do modelo de regressão segundo Amador et al. (2011) e Costa et al. (2006) um dos métodos mais utilizados é a análise de variância (ANOVA), pois este método auxilia na verificação da falta de ajuste do modelo, estima o grau de ajuste e significância do modelo de regressão. A Tabela 8 dispõe os dados a partir da análise de variância (ANOVA).

Tabela 8 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta produção de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae*

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc
Modelo	71,06	2	35,53	24,64
Resíduo	11,53	8	1,44	
Total	82,60	10		
F tab 2,8 (0,10)= 3,113			F calc/F tab= 7,91	
F tab 2,8 (0,05)= 4,459			F calc/F tab= 5,52	

A análise de variância (ANOVA) para a produção de biomassa celular indica que o modelo é estatisticamente significativo, pois, pode ser observado que o valor obtido para F calculado foi 7,91 vezes maior ao F tabelado a 90% de confiança, e 5,52 vezes maior a 95% de confiança. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (Barros Neto et al., 1996), fato este que foi observado neste modelo.

Para confirmar a significância do modelo, uma das formas é através da construção da curva e da obtenção do coeficiente de determinação R^2 , neste experimento o valor do coeficiente de determinação foi de 0,86032 indicando o modelo é adequado.

Para melhor representar o ajuste do modelo aos dados foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 12.

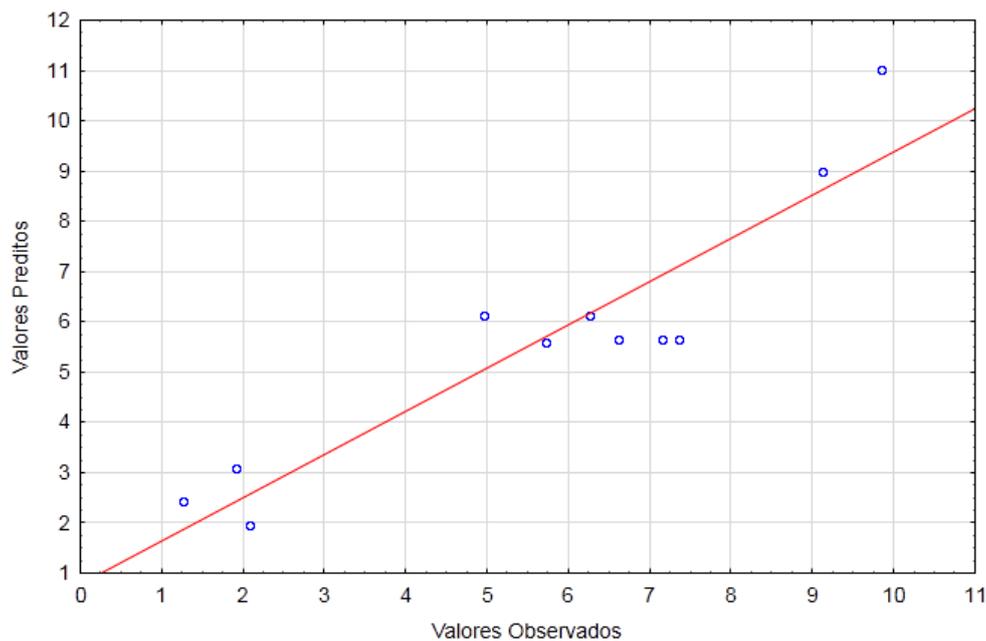


Figura 11 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.

Quão mais próximos os valores observados se localizam dos preditos, melhor é considerada a igualdade do ajuste. Neste caso observa-se apenas um pequeno desvio em relação aos valores preditos.

No estudo desenvolvido por Brito et al. (2003), julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de determinação é próximo de 1, para $0,61 < R^2 < 0,91$, a correlação é forte, semelhante ao observado neste experimento.

Para melhor visualização da influência dos fatores sobre a resposta produtividade de biopolímero, os resultados dos efeitos principais foram organizados em um cubo (Figura 12) para interpretação geométrica dos dados.

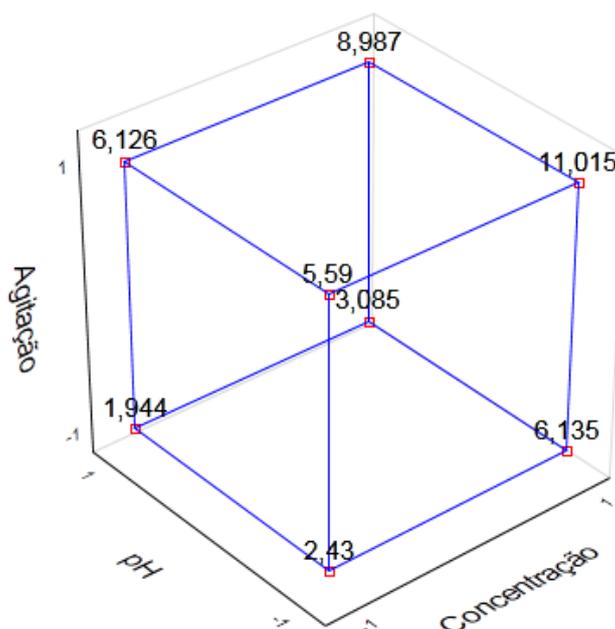


Figura 12 – Representação cúbica da produção de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

A partir da análise dos dados (Figura 12), pode ser observado que a produção máxima estimada de biomassa celular ($11,015 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida quando a variável de entrada agitação (200 rpm) e concentração ($6,0^\circ\text{Brix}$) se localizavam no nível superior e a variável de entrada pH (4,0) no nível inferior. Já os menores valores de produção de biomassa celular ($1,994 \text{ g L}^{-1}$) foram observados quando empregado a menor velocidade de agitação (50 rpm) associada a concentração de substrato de $1,0^\circ\text{Brix}$ e pH de 8,0.

Com intenção de facilitar a visualização dos efeitos, foi construída a superfície de resposta, que é realizada pela combinação de dois fatores independentes em relação à variável dependente. Inicialmente é apresentada (Figura 13) a superfície de resposta para as variáveis concentração e agitação, seguida da (Figura 14) concentração e pH, e posteriormente (Figura 15) agitação e pH, analisando como fator de resposta a produção de biomassa celular produzida pelo *L. theobromae*.

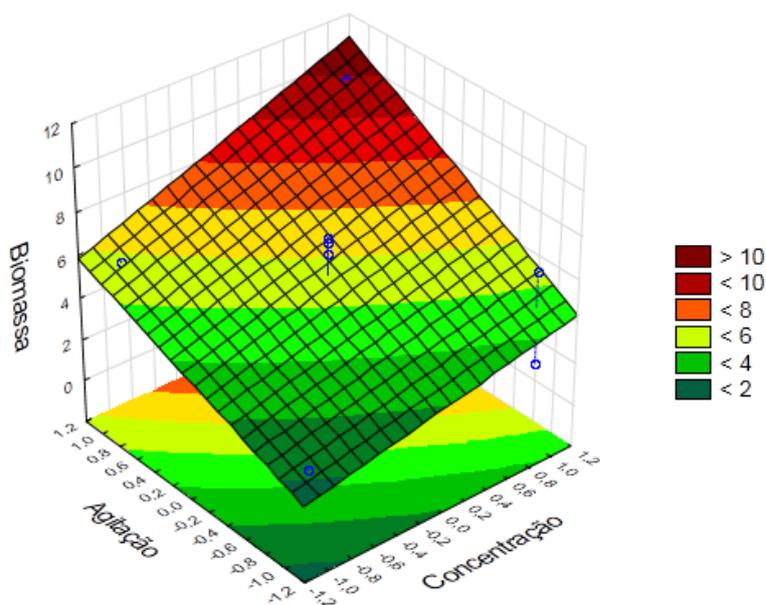


Figura 13 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular do fungo *L. theobromae* em função da concentração e agitação.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 12 e 13, algumas considerações podem ser realizadas.

Avaliando os fatores principais concentração e agitação, pode ser observado que a produção máxima estimada de biomassa, é localizada nos limites superiores nas duas variáveis apresentando uma forte inclinação, a partir disso pode-se afirmar que tanto a variável agitação quanto a concentração influenciam consideravelmente na produção de biomassa, e que os melhores resultados foram quando se utilizou 6,0 °Brix de melão e 200 rpm de agitação.

De acordo com os estudos realizados por Wisback (2003) e por Gern (2005), na produção de biomassa por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 quando a concentração de substrato foi elevada para o nível superior, maiores foram às concentrações de biomassa obtidas, semelhante ao presente estudo.

O melhor resultado encontrado para a produção de biomassa foi para os limites superiores, pois, uma quantidade suficiente de substrato e uma maior agitação proporcionaram o crescimento micelial, devido à maior aeração do meio, bem como a homogeneização do caldo, permitindo com que os nutrientes fossem melhor assimilados pelas células (DOMINGOS, 2009).

Porém de acordo com o estudo realizado por Gondin (2007) na produção de biomassa por *Geobacillus Stearothermophilus* UCP 986, foi obtido melhores resultados

($0,7 \text{ g L}^{-1}$), quando a concentração não estava localizada no nível superior (160 rpm e 20 g L^{-1} de glicose), o que mostra que cada micro-organismo apresenta características próprias, não sendo possível a generalização das respostas para a produção de outros biopolímeros.

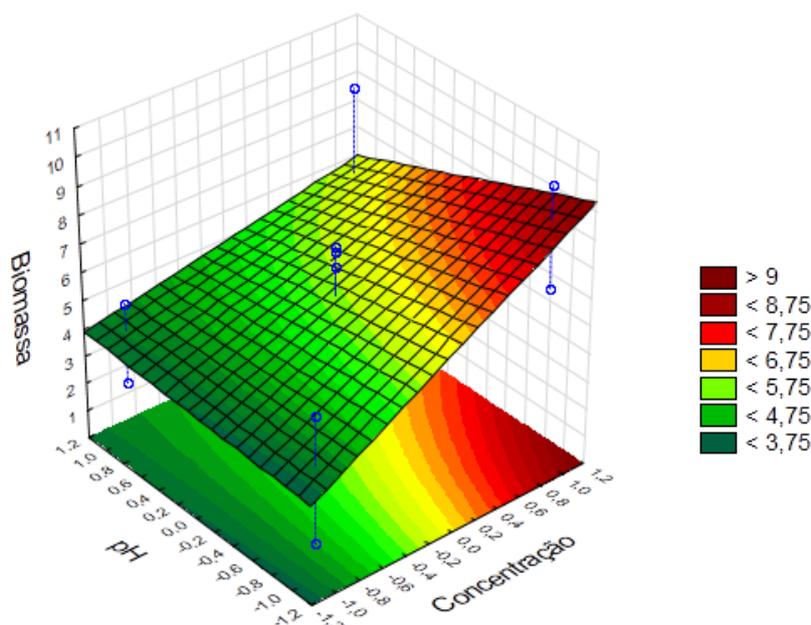


Figura 14 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função da concentração e pH.

Avaliando o pH e concentração, pode ser observado que a tendência para a máxima produção estimada de biomassa, é localizada no limite superior da variável concentração ($6,0^\circ \text{ Brix}$) e no limite inferior da variável pH ($4,0$).

De acordo com os dados descritos nas Figuras 10 e 14, pode ser observado que o fator que mais influencia na produção de biomassa é a concentração, sendo que o pH não mostrou influência significativa a um nível de 90%. Desta maneira fica clara a comparação com a superfície de resposta, que indica qual é a variável mais influente.

Porém, algumas considerações podem ser realizadas a partir dos resultados de pH, pois através da análise da representação cúbica (Figura 12) é possível observar que em todos os experimentos os melhores resultados foram observados quando o pH foi alterado do nível superior ($8,0$) para o nível inferior ($4,0$), similarmente ao observado em relação a produção e produtividade volumétrica em EPS.

De acordo com Furigo (2001) na produção de biomassa pelo fungo *Ganoderma australe* a melhor produção foi obtida quando foi utilizado o pH ($5,0$), bem como no

estudo desenvolvido por Wisback (2003) na produção de biomassa por *Pleorotus ostreatus*, onde a maior produção foi com pH no nível inferior (4,0). A respeito dessas considerações pode-se dizer que os micro-organismos estudados por se tratarem de fungos aeróbicos apresentam melhores crescimentos em pH mais baixos, de acordo com Domingos (2009), fungos podem se desenvolver bem em qualquer faixa de pH, mas a faixa ideal é entre 4,0 e 7,0.

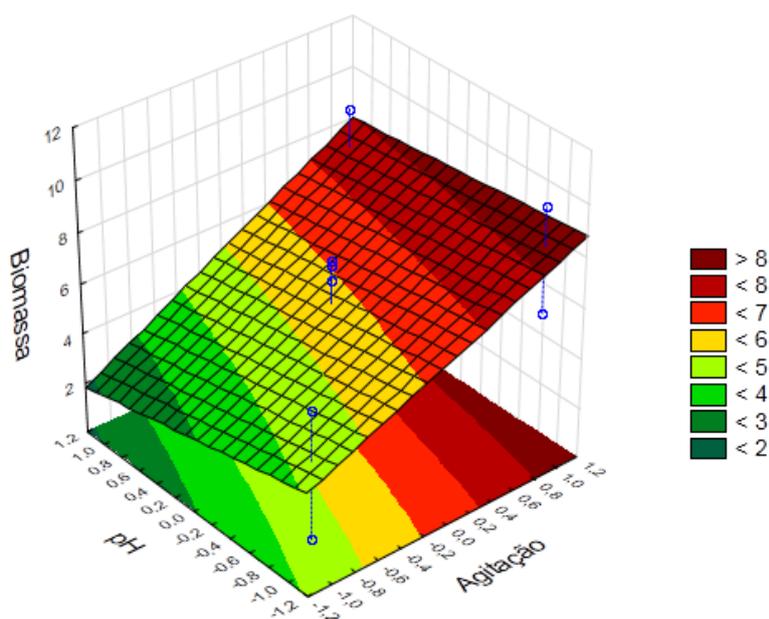


Figura 15 – Superfície de resposta para a produção de biomassa celular do fungo *L. theobromae* em função do pH e agitação.

A partir dos dados demonstrados nas Figuras 12 e 15, pode ser verificado que os fatores pH e agitação apresentaram a tendência para a máxima produção estimada de biomassa no limite superior da variável agitação (200 rpm) e no limite inferior da variável pH (4,0).

De acordo com os dados apresentados pode ser observado que outro fator que influencia na produção de biomassa é a agitação, sendo que o pH não mostrou influência significativa a um nível de 90%.

De acordo com Oliveira (2010) no estudo da produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans*, quando a agitação foi aumentada a produção de biomassa celular também apresentou aumento, fato semelhante ao observado no presente trabalho.

Pelo fato do micro-organismo estudado tratar-se de um fungo aeróbico o fator agitação influenciou fortemente na produção de biomassa celular, pois até determinado ponto, o aumento desta, possibilita uma maior oxigenação do líquido, bem como proporciona maior homogeneidade e dissolução dos nutrientes, fazendo assim com que estes sejam assimilados facilmente pela célula. Porém caso a agitação ultrapasse o limite, pode ocorrer à diminuição da produção celular, devido ao rompimento das células o que ocasiona uma redução da viabilidade celular, portanto deve-se encontrar o ponto ideal para o melhor crescimento.

A agitação proporciona a dissolução do oxigênio no meio de cultura, (CONFORTIN, 2006). O oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons no final da cadeia respiratória, sendo assim permite que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações, e ainda permite a estocagem de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP, desta forma um cultivo com elevado oxigênio dissolvido proporciona um excelente crescimento celular em organismos aeróbios (VENDRUSCOLO, 2007).

5.2.2 Avaliação do rendimento em biomassa celular

Através da avaliação das respostas apresentadas na Tabela 6, os experimentos 4 e 7 quando comparados forneceram o menor ($1,74 \text{ g g}^{-1}$) e o maior ($6,93 \text{ g g}^{-1}$) rendimento de biomassa celular.

A partir da análise realizada pelo programa STATISTICA, versão 10.0, foi possível avaliar as respostas e o nível de significância. A Tabela 9 apresenta os valores dos efeitos de interação estimados para cada uma das respostas em estudo.

Tabela 9 – Tabela dos efeitos para o rendimento de biomassa celular do fungo *L. theobromae*.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	P	L.C (-)	L.C(+)
Média	4,68000	0,369831	12,65444	0,000225	3,89158	5,468422
Concentração	-0,65325	0,867330	-0,75317	0,493249	-2,50226	1,195764
pH	-1,40775	0,867330	-1,62308	0,179893	-3,25676	0,441264
Agitação	3,07625	0,867330	3,54681	0,023867	1,22724	4,925264
Conc. x pH	-0,88225	0,867330	-1,01720	0,366579	-2,73126	0,966764
Conc.x Agitação	-2,28225	0,867330	-2,63135	0,058104	-4,13126	-0,433236
pH x Agitação	0,54625	0,867330	0,62981	0,563005	-1,30276	2,395264

t tab: 2,1318

A partir da análise dos dados (Tabela 9), pode ser observado que as variáveis destacadas em negrito, concentração e a interação entre agitação e concentração, apresentaram valores acima de t_{tab} (2,1318) e abaixo de ($p < 0,10$), dessa maneira, conclui-se que os efeitos foram estatisticamente significativos a um nível de 90% de confiança para o processo de rendimento de biomassa celular do cultivo do fungo *L. theobromae*.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 16), no qual a linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são considerados significativos, analisados ao nível de significância de 10%.

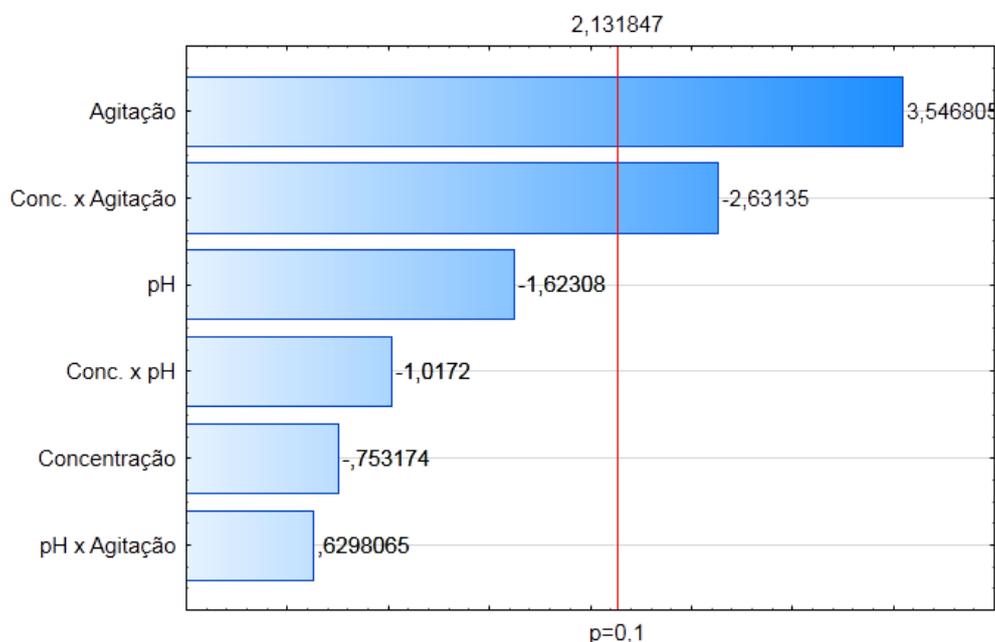


Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de rendimento de biomassa celular.

Os dados apresentados (Figura16) possibilitam facilmente a visualização da variável principal agitação e da interação entre as variáveis concentração e agitação, que mostraram significância a um nível de 90% de confiança.

Com intuito de realizar a análise por regressão, parte-se do pressuposto que o algoritmo matemático gerou a equação do modelo a partir do tratamento estatístico dos dados através dos efeitos significativos e dos valores codificados das variáveis. Na equação (2) o X_1 corresponde à agitação e X_2 representa a interação entre a variável concentração x agitação.

Rendimento em biomassa (g g^{-1}) = $4,68000 + 1,53813 X1 - 1,14112 X2$ Equação (2)

Com intenção de verificar a qualidade do ajuste do modelo de regressão segundo foi realizado a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) para a resposta rendimento em biomassa celular pelo fungo *L. theobromae*.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc
Modelo	36,3144	2	18,1572	24,1369
Resíduo	6,0181	8	0,7522	
Total	42,3325	10		

F tab 2,8 (0,10)= 3,113
F tab 2,8 (0,05)= 4,459

F calc/F tab= 7,753
F calc/F tab= 5,413

A análise de variância para a produção de biomassa celular indica que o modelo é estatisticamente significativo, pois, pode-se observar que o valor obtido para F calculado foi 7,75 vezes maior ao F tabelado a 90% de confiança, e 5,41 vezes maior a 95% de confiança, sendo que para a regressão ser útil para fins preditivos o valor da razão deve ser maior que 4, fato que foi apresentado neste modelo. (Barros Neto et al., 1996).

Para confirmar a significância do modelo, uma das formas é através da construção da curva e da obtenção do coeficiente de determinação, sendo que este deve estar próximo a 1. Neste experimento o valor do coeficiente de determinação foi de 0,85784 indicando que a correlação é forte, e que o modelo é adequado, (BRITO et al., 2003).

Para melhor representar o ajuste do modelo aos dados foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 17.

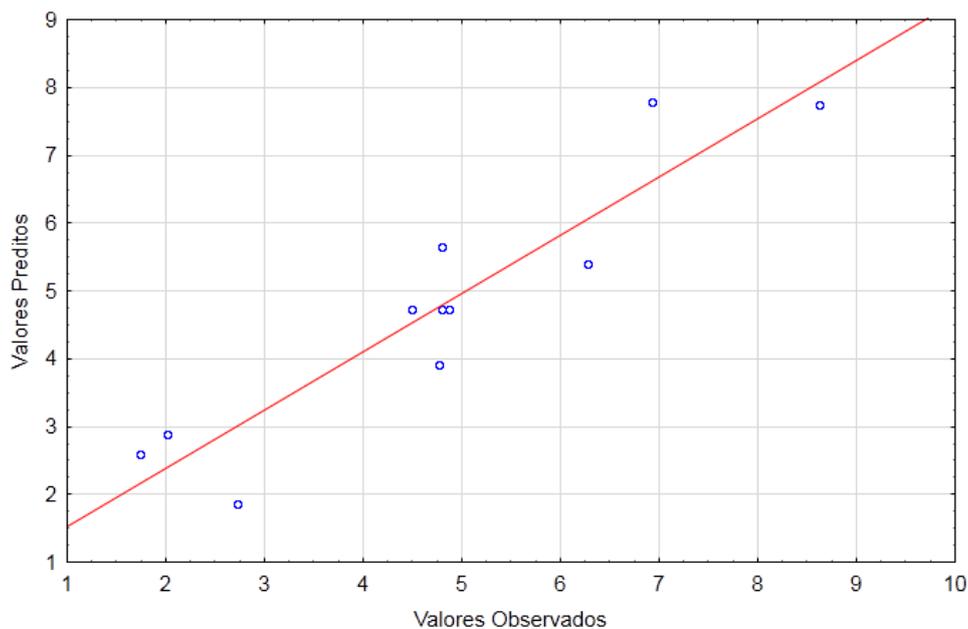


Figura 17 – Gráfico de igualdade indicando os valores preditos x observados.

A partir da análise do gráfico de igualdade (Figura 17), pode ser verificado que os valores observados se localizaram próximos aos preditos, havendo um pequeno desvio, porém pelo fato da correlação apresentada ser forte, esse desvio é aceito, (BRITO et al., 2003).

Para melhor visualização da influência dos fatores sobre a resposta produtividade de biopolímero, os resultados dos efeitos principais foram organizados em um cubo (Figura 18) para interpretação geométrica dos dados.

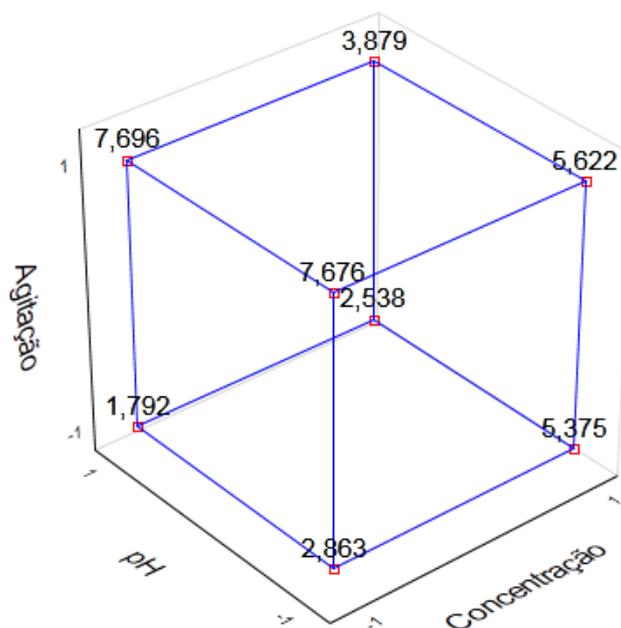


Figura 18 – Representação cúbica do rendimento de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

A partir dos dados apresentados na Figura 18, pode ser observado que o rendimento máximo estimado de biomassa celular ($7,696 \text{ g g}^{-1}$) foi obtido quando a variável de entrada agitação (200 rpm) e pH (8,0) se localizavam no nível superior e a variável de entrada concentração ($1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$) no nível inferior. A menor produção estimada de biomassa celular ($1,792 \text{ g L}^{-1}$) foi verificada nas condições de 50 rpm de agitação, concentração de $1,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$ e pH de 8,0.

Com intenção de facilitar a visualização dos efeitos, foi construída a superfície de resposta, que é realizada pela combinação de dois fatores independentes em relação à variável dependente. Inicialmente é apresentada (Figura 19) a superfície de resposta para as variáveis concentração e agitação, seguida da (Figura 20) concentração e pH, e posteriormente (Figura 21) agitação e pH, analisando como fator de resposta rendimento de biomassa celular produzida pelo *L. theobromae*.

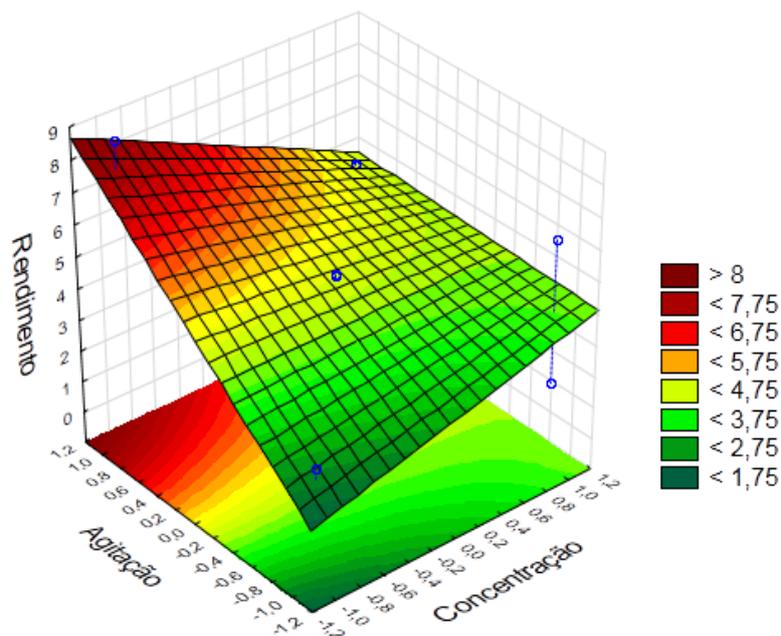


Figura 19 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função da concentração de substrato e agitação.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 18 e 19 para os fatores concentração de substrato e agitação, pode ser observado que a produção máxima estimada de biomassa, é localizada nos limites superior da variável agitação (200 rpm) e no limite inferior da variável concentração (1,0 °Brix).

De acordo com os dados apresentados, pode ser observado que a concentração foi à variável que mais influenciou na produção de biomassa, e a segunda variável mais influente foi à interação entre agitação e concentração.

De acordo com os estudos realizados por Filho (1998), na produção celular de *Candida utilis*, e por Wisback, (2003) na produção de *Pleurotus ostreatus*, os efeitos que maximizam a produtividade volumétrica de biomassa celular estão no nível inferior, em torno de (20 g L⁻¹).

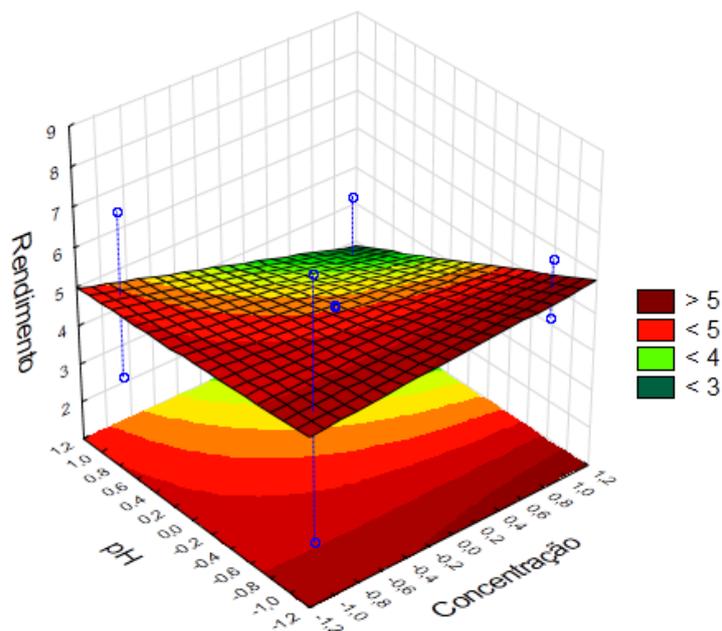


Figura 20 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função da concentração e pH.

A partir dos dados dispostos nas Figuras 18 e 20, para os fatores pH e concentração, pode ser observado que a produção máxima estimada de biomassa, é localizada no limite inferior da variável concentração (1,0 °Brix) e no limite inferior da variável pH (4,0).

Através da análise dos dados pode ser observado que os valores de produção máxima foram aproximados em três pontos, sendo esta diferença melhor visualizada na representação cúbica (Figura 18).

A concentração de substrato e pH apresentam influência aproximadas no rendimento da biomassa, pois de acordo com os dados apresentados, quando ambos são deslocados do nível inferior para o superior o rendimento apresentado é similar. Porém somente a concentração apresentou influência significativa a um nível de 90% de confiança.

Semelhante aos dados obtidos neste trabalho, de acordo com alguns estudos realizados com fungos, os melhores rendimentos de biomassa apresentados foram quando o pH se localizava no nível inferior (4,0), (FURIGO, 2001; WISBACK, 2003).

Porém Barroso (2010), no estudo com o mesmo micro-organismo verificou que o maior rendimento em biomassa (0,41 g g⁻¹) foi quando o pH 7,0 foi utilizado no limite superior.

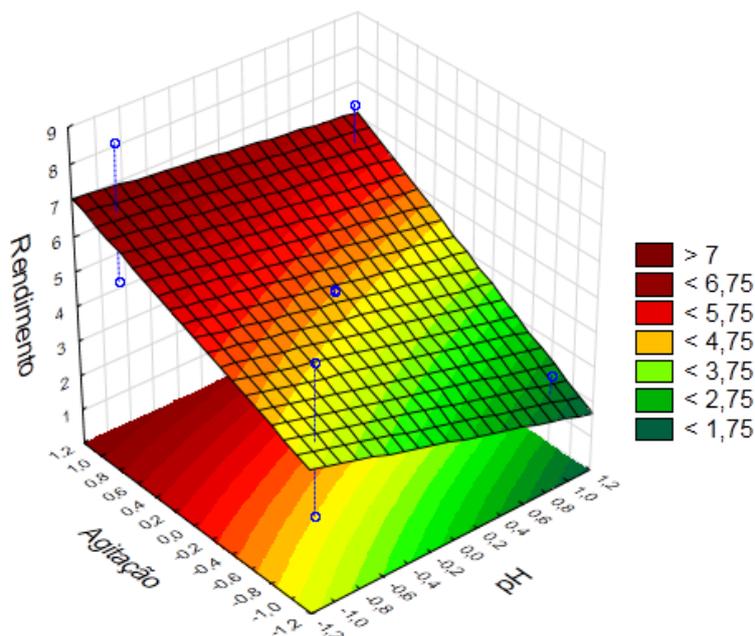


Figura 21 – Superfície de resposta para o rendimento de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função do pH e agitação.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 18 e 21, considerando os fatores pH e agitação, pode ser observado que o rendimento máximo estimado de biomassa, é localizado no limite superior da variável agitação (200 rpm) e no limite inferior da variável pH (4,0).

De acordo com a superfície de resposta, é possível constatar que a variável que possui maior influência no rendimento é a agitação, e isso é comprovado pelo diagrama de Pareto (Figura 16), onde a agitação mostrou influência significativa a um nível de 90%.

Tanto para a produção quanto para o rendimento em biomassa celular, os melhores resultados foram quando a agitação foi utilizada no nível superior (200 rpm). A agitação é um fator crucial no desenvolvimento de micro-organismos aeróbicos, pois proporciona a dissolução do oxigênio no meio de cultura (CONFORTIN, 2006)

5.2.3 Avaliação da produtividade volumétrica em biomassa celular

Através da avaliação das respostas apresentadas na Tabela 14, os experimentos 1 e 6 quando comparados forneceram a menor ($0,0175 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e a maior ($0,1367 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae*.

A partir da análise realizada pelo programa STATISTICA, versão 10.0, foi possível avaliar as respostas e o nível de significância. A Tabela 6 apresenta os valores dos efeitos de interação estimados para cada uma das respostas em estudo.

Tabela 11 – Tabela dos efeitos para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae*.

Variáveis	Efeito	Resíduo	t cal	p	L.C. (-)	L.C. (+)
Média	0,077873	0,007108	10,95572	0,000394	0,062720	0,093026
Concentração	0,045700	0,016670	2,74151	0,051825	0,010163	0,081237
pH	-0,017550	0,016670	-1,05281	0,351821	-0,053087	0,017987
Agitação	0,062800	0,016670	3,76733	0,019650	0,027263	0,098337
Conc. x pH	-0,017900	0,016670	-1,07381	0,343370	-0,053437	0,017637
Conc. x Agitação	0,011850	0,016670	0,71087	0,516417	-0,023687	0,047387
pH x Agitação	0,007200	0,016670	0,43192	0,688061	-0,028337	0,042737

t tab = 2,1318

A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 11, pode ser observado que as variáveis que destacadas em negrito, concentração e agitação, apresentaram valores acima de t tab (2,1318) e abaixo de ($p < 0,10$), dessa maneira os efeitos foram positivos e significativos estatisticamente a um nível de 90% de confiança para o processo de produtividade volumétrica de biomassa celular.

Os efeitos das variáveis e também de suas interações podem ser melhor observados através do diagrama de Pareto (Figura 22), no qual a linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são considerados significativos, analisados ao nível de significância de 10%.

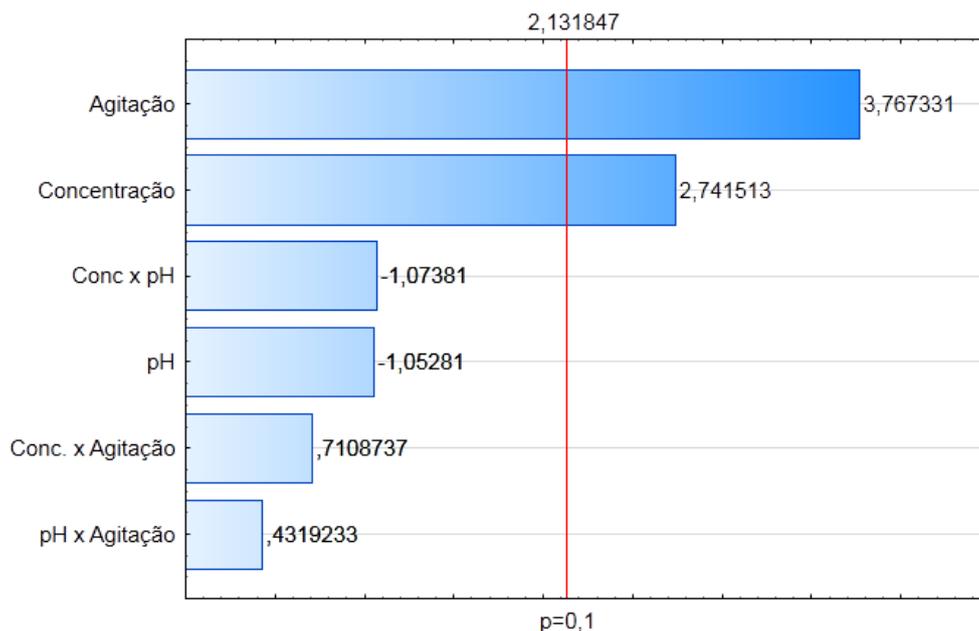


Figura 22 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis do processo de produtividade volumétrica em biomassa celular.

O diagrama de Pareto (Figura 22) possibilita facilmente a visualização das duas variáveis que mostraram significância a um nível de 90% de confiança.

Com intuito de realizar a análise por regressão, parte-se do pressuposto que o algoritmo matemático gerou a equação do modelo a partir do tratamento estatístico dos dados através dos efeitos significativos e dos valores codificados das variáveis. Na equação (3) o X_1 corresponde à concentração e X_2 representa a variável agitação.

$$\text{Prod. vol. em biomassa (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = 0,0778 + 0,02285 X_1 + 0,0314 X_2 \quad \text{Equação (3)}$$

Com intenção de verificar a qualidade do ajuste do modelo de regressão foi realizado o teste de significância do modelo de regressão, a partir da análise de variância, apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) estimado para a resposta produtividade volumétrica em biomassa celular pelo fungo *L. theobromae*.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc
Modelo	0,013706	2	0,00685	24,6621
Resíduo	0,002223	8	0,00028	
Total	0,015929	10		

F tab 2,8 (0,10)= 3,113

F tab 2,8 (0,05)= 4,459

F calc/F tab= 7,922

F calc/F tab= 5,531

A análise de variância para a produtividade volumétrica em biomassa celular indica que o modelo é estatisticamente significativo, pois, pode-se observar que o valor obtido para F calculado foi 7,92 vezes maior ao F tabelado a 90% de confiança, e 5,53 vezes maior a 95% de confiança, sendo que para a regressão ser útil para fins preditivos o valor da razão deve ser maior que 4, fato que foi apresentado neste modelo. (Barros Neto et al., 1996).

Para confirmar a significância do modelo, uma das formas é através da construção da curva e da obtenção do coeficiente de correlação. Neste experimento o valor do coeficiente de determinação foi de 0,86044 indicando que o modelo é adequado.

Para melhor representar o ajuste do modelo aos dados foi construído o gráfico de valores preditos x valores observados apresentado na Figura 23.

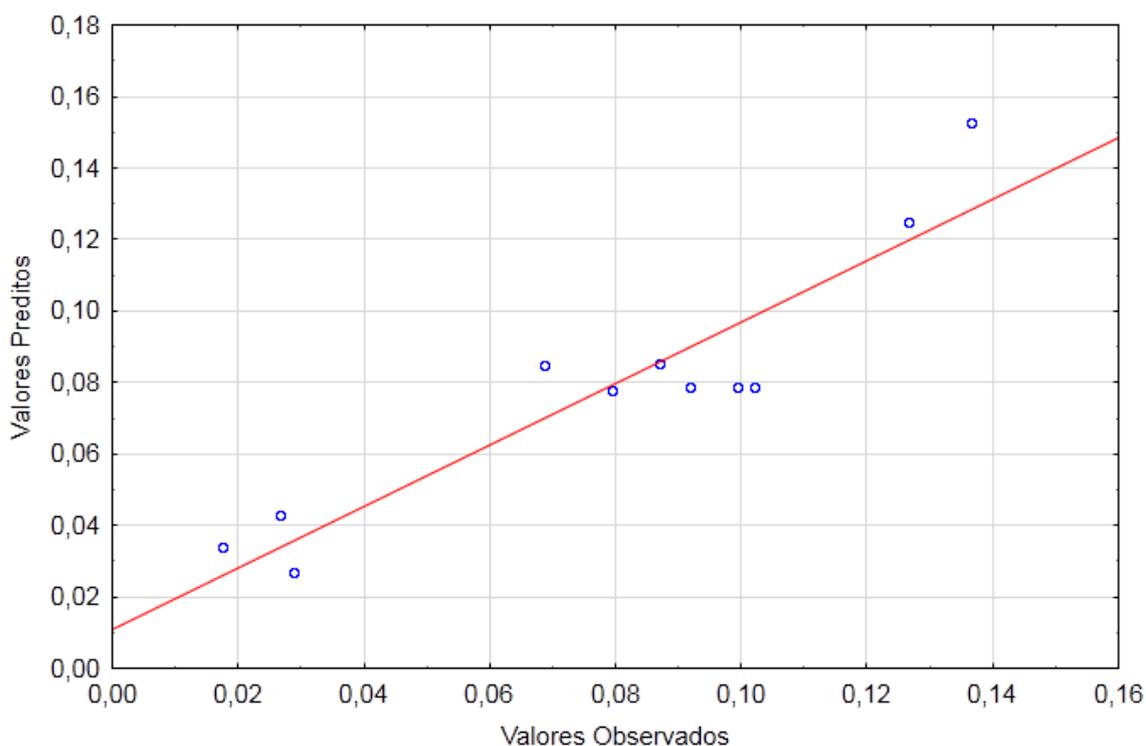


Figura 23 – Gráfico de igualdade indicando a coerência entre os valores preditos e observados.

O gráfico de igualdade permite observar os dados obtidos e os valores preditos pelo modelo, desse modo pode ser verificado que os dados obtidos apresentaram pequena diferença aos dados do modelo, porém o coeficiente de determinação 0,86044 mostra que a correlação apresentada é forte.

Para melhor visualização da influência dos fatores sobre a resposta produtividade de biopolímero, os resultados dos efeitos principais foram organizados em um cubo (Figura 24) para interpretação geométrica dos dados.

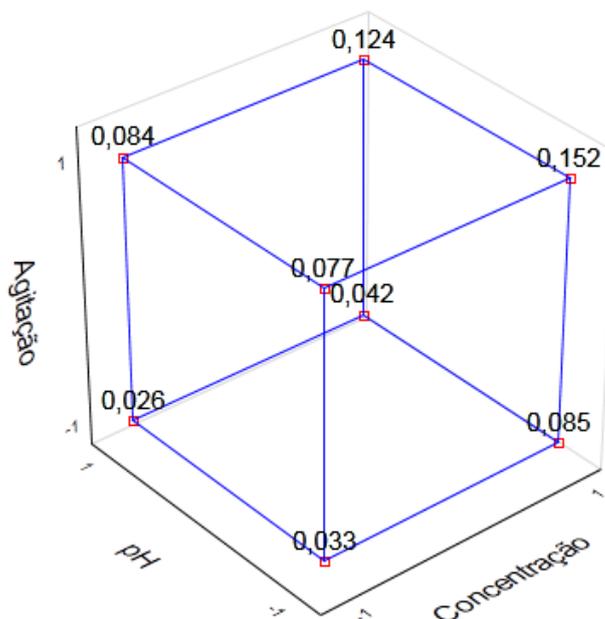


Figura 24 – Representação cúbica da produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função das variáveis: concentração, pH e agitação.

A partir dos dados dispostos nas Figuras 24, pode ser observado que a produção máxima estimada de biomassa celular (0,152 g L⁻¹h⁻¹) foi obtida quando a variável de entrada agitação (200 rpm) e concentração (6,0 °Brix) se localizavam no nível superior e a variável de entrada pH (4,0) no nível inferior, já para a produção mínima estimada (0,026 g L⁻¹h⁻¹) ocorreu o inverso, as variáveis agitação (50 rpm) e concentração (1,0 °Brix) se localizavam no nível inferior e a variável de entrada pH (8,0) se localizaram no nível superior.

Com intenção de facilitar a visualização dos efeitos, foi construída a superfície de resposta, que é realizada pela combinação de dois fatores independentes em relação à variável dependente. Apresenta-se inicialmente (Figura 25) a superfície de resposta para as variáveis concentração e agitação, seguida da (Figura 26) concentração e pH, e posteriormente (Figura 27) agitação e pH, analisando como fator de resposta a produtividade volumétrica de biomassa celular produzida pelo *L. theobromae*.

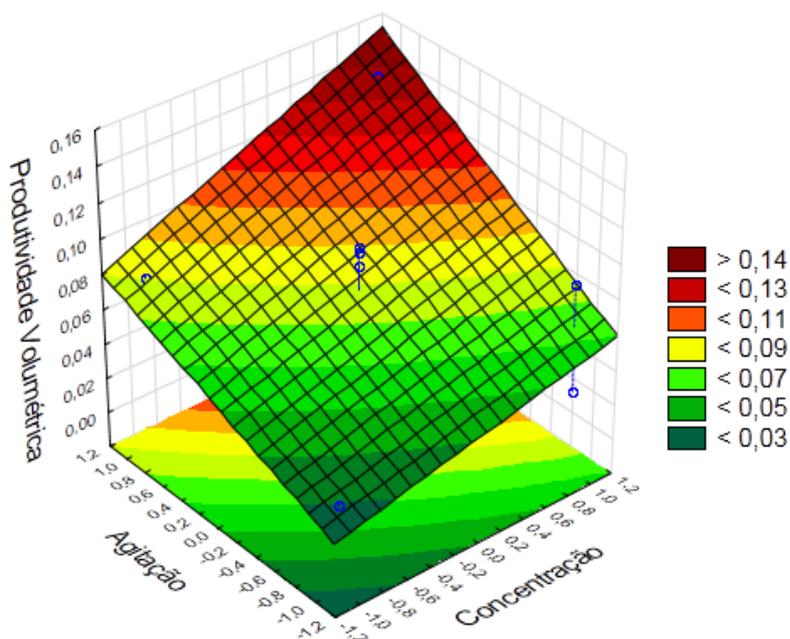


Figura 25 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função da concentração de substrato e agitação.

A partir dos valores apresentados nas Figuras 24 e 25, considerando o conjunto concentração e agitação, pode ser observado que a produtividade volumétrica máxima estimada de biomassa, é localizada nos limites superiores nas duas variáveis apresentando uma forte inclinação, a partir disso pode-se afirmar que tanto a variável agitação quanto a concentração influenciam consideravelmente na produção de biomassa, e que os melhores resultados foram quando se utilizou 6,0 °Brix de melão e 200 rpm de agitação.

As duas variáveis apresentadas acima mostraram forte influência na produtividade volumétrica de biomassa, pois, além desta análise da superfície de resposta, o diagrama de Pareto (Figura 22), confirma que ambas são significativas a um nível de 90% de confiança.

Estudos realizados com fungos mostraram resultados similares aos apresentados neste estudo, pois, quando a concentração de substrato foi elevada para o nível superior, maiores foram às produtividades volumétricas obtidas (Wisback, 2003; Gern 2005).

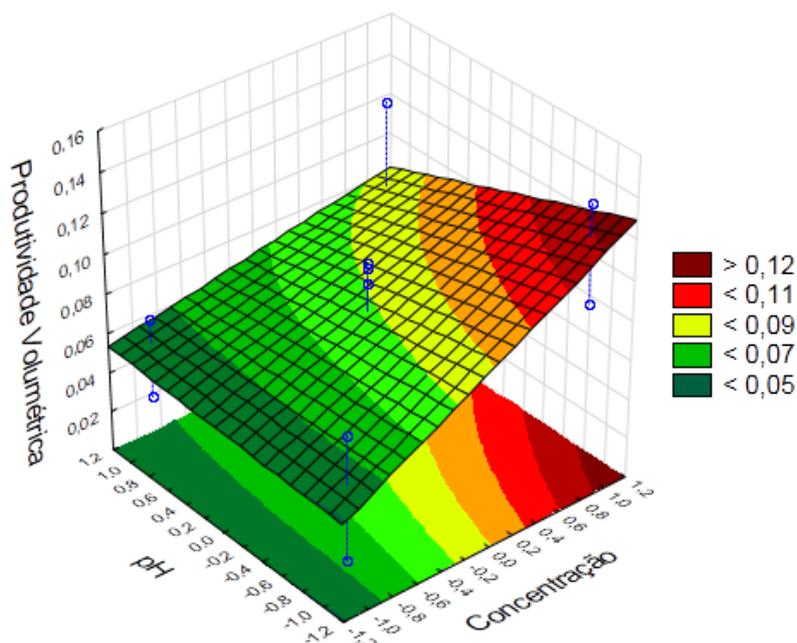


Figura 26 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função da concentração e pH.

A partir da análise das Figuras 24 e 26, considerando o conjunto pH e concentração, pode ser observado que a tendência para a máxima produção estimada de biomassa, é localizada no limite superior da variável concentração (6,0 °Brix) e no limite inferior da variável pH (4,0).

Dentre as duas variáveis estudadas, a que apresenta maior influência na produtividade volumétrica é a concentração, sendo que o pH mostrou pequena influência, isso é confirmado pelo diagrama de Pareto (Figura 22), que mostra que somente a variável concentração é significativa a 90% de confiança.

Porém, podem ser realizadas algumas considerações a partir das respostas apresentadas pelo pH. A partir da representação cúbica (Figura 24) pode ser observado que em todos os ensaios os melhores resultados para produtividade volumétrica foram observados quando este estava localizado no nível inferior (4,0).

Semelhante ao presente trabalho, vários autores que estudaram a produção de fungos verificaram que os melhores resultados para a produção, rendimento e produtividade volumétrica foram quando o pH se encontrava no limite inferior, próximo a 4,0 (FURIGO, 2001; WISBACK, 2003).

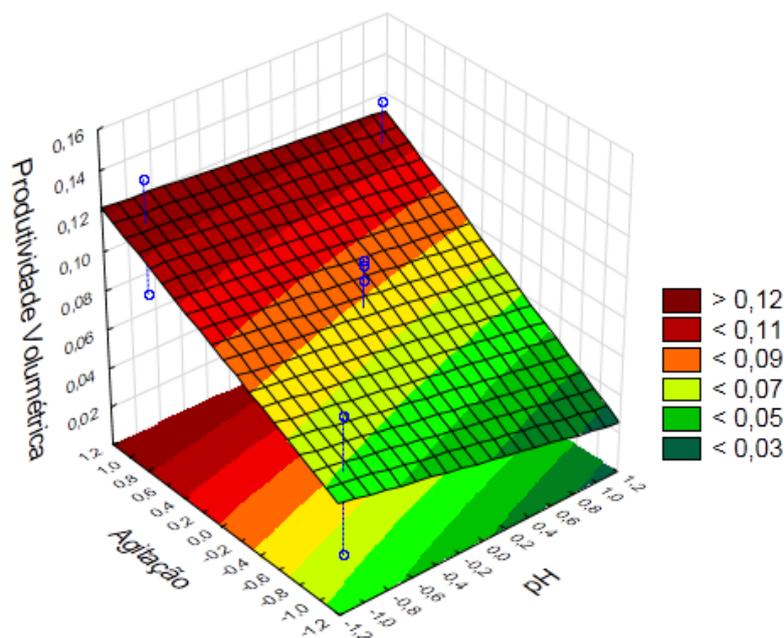


Figura 27 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica de biomassa celular pelo fungo *L. theobromae* em função do pH e agitação.

A partir da análise das Figuras 24 e 27, considerando pH e agitação, pode ser observado que a tendência para a máxima produção estimada de biomassa, é localizada no limite superior da variável agitação (200 rpm) e no limite inferior da variável pH (4,0).

Os dados apresentados nos permitem concluir que o fator principal que apresenta maior influência na produtividade volumétrica de biomassa é a agitação, o que é confirmado pelo diagrama de Pareto (Figura 22), pois a variável agitação é significativa na produtividade volumétrica de biomassa a 90% de confiança.

Análogo ao presente trabalho, vários estudos na produção de micro-organismos, apresentaram os melhores resultados de produtividade volumétrica, quando a agitação foi elevada do nível inferior para o superior (200 rpm), (OLIVEIRA, 2010; GERN, 2005; BERWANGER, 2005).

A agitação é uma variável muito influente devido à capacidade de dissolução do oxigênio no meio, bem como na homogeneização dos nutrientes (CONFORTIN, 2006).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melaço de cana-de-açúcar apresentou potencial como substrato para cultivo submerso de *L. theobromae* MMPI tanto para produção de EPS como para produção de biomassa celular.

Para a produção de EPS pelo *L. theobromae* os efeitos observados não foram significativos ao nível de 90%, no entanto a partir de uma avaliação mais específica dos ensaios, pode ser observado que a produção máxima de EPS foi de 8,88 g L⁻¹, utilizando todas as variáveis independentes no ponto central, pH (6,0), concentração (3,5 °Brix) e agitação (125 rpm).

Em relação ao rendimento de EPS os efeitos também não foram significativos ao nível de 90%, porém o rendimento máximo apresentado foi de 0,588 g g⁻¹, no mesmo ponto definido para a produção de EPS.

A produtividade volumétrica em EPS, também não apresentou efeitos significativos a 90% de confiança e o melhor resultado foi de 0,1233 g L⁻¹h⁻¹, no mesmo experimento para a produção e rendimento.

Para o parâmetro produção de biomassa celular pelo *L. theobromae* os efeitos agitação e concentração foram significativos estatisticamente ao nível de 90% de confiança e foi possível construir a equação do modelo:

$$(\text{Biomassa g L}^{-1}) = 5,66364 + 1,641500 X1 + 2,26550 X2$$

A produção máxima de biomassa foi de 9,123 g L⁻¹, utilizando agitação de 200 rpm, (nível superior), concentração de 6,0 °Brix, (nível superior) e pH 4,0 (nível inferior).

Para o rendimento em biomassa celular, o efeito principal de agitação e a interação entre os efeitos agitação e concentração foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, sendo construído o modelo:

$$(\text{Rendimento em biomassa g g}^{-1}) = 4,68000 + 1,53813 X1 - 1,14112 X2$$

A maior resposta para rendimento em biomassa foi de 8,62 g g⁻¹, utilizando agitação (200 rpm) no nível superior e pH (4,0) e concentração (1,0 °Brix) no nível inferior.

Na produtividade volumétrica em biomassa, os efeitos agitação e concentração foram estatisticamente significativos a 90% de confiança.

$$(\text{Prod. vol. em biomassa (g L}^{-1}\text{h}^{-1}) = 0,0778 + 0,02285 X1 + 0,0314 X2$$

A produtividade volumétrica máxima em biomassa foi de $0,1367 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, utilizando agitação (200 rpm) e concentração (6,0 °Brix) no nível superior e pH (4,0) no nível inferior.

Partindo dos resultados apresentados no trabalho, pode-se observar a importância do delineamento fatorial no cultivo submerso do fungo *L. theobromae*, pois através deste foi possível avaliar se as variáveis independentes influenciaram significativamente na resposta a determinado nível de confiança. O uso de tal metodologia contribuiu para melhor entendimento da fisiologia de crescimento e produção de exopolissacarídeo em meio à base de melão de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- AMADOR, J. P.; LOPES, S. J.; PEREIRA, J. E.; SOUZA, A. M.; TOEBE, M. Análise de pressuposições e adequação dos resíduos em modelo de regressão linear para valores individuais, ponderados e não ponderados, utilizando procedimentos do SAS. **Ciência e Natura** UFSM, v. 22, n. 2, p. 7-22, 2011.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New Perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, Saint Beauzire, v. 29, n. 1, p. 54-66, jan./fev. 2011.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T da.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. da. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42. jan./jun. 2004.
- BARROS, N.; SCAMINIO, B.; BRUNS, I. S. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª Ed. Campinas, SP: **Editora da Unicamp**, 1996, 299p.
- BARROSO, R. R.; CUNHA, M. A. A. C. da.; IVANOV, R. C.; DALPASSO, P. V.; BARBOSA, A. M. Avaliação da influência do pH na produção de biopolímero pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em biorreator de bancada. **XV SICITE**, 2010.
- BERWANGER, Ana L. S. da. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 96 f. Dissertação (Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.
- BERWANGER, A. L. S. da.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de Biopolímero Sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a Partir de Meios Industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, jan./fev. 2007.
- BORGES, J. G.; COSTA, L. A. S. de.; DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de biomassa extracelular obtida por fermentação submersa usando *Lasiodiplodia theobromae* isolado do cacau. **Polímeros, Ciência e Tecnologia**, Bahia, v. 7, 2013.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: Características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, jul./dez. 2008.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Rev. Ele. Mat. e Proc.** Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 127-139, set, 2011.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. C. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, E. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, Londrina, v. 98, n. 15, p. 2824-2828, nov, 2007.
- CONFORTIN, Fernanda G. **Produção de Biomassa fúngica de linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa**. 2006. 95 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.
- COSTA, T. M. et al. Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico. **Revista Analytica**, n. 21, p. 46-51, 2006.
- CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, Fortaleza, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.
- CUNHA, M. A. A. da.; TURMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, F. H.; KHAPER, N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan,

na exocellular (1→6)-β-D- Glucan from *Lasidiplodia Theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179-1188, ago, 2012.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 9, n. 1, jan./jun. 2008.

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL. **Cana-de-açúcar e Sucroalcooleiro – Prognóstico**. Disonei Zampieri, 2012.

DOMINGOS, Marcelo. **Estudo de crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopalpação**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of syntesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, Montpellier, v. 87, n. 2, p. 951-962, jan, 2012.

ERNANDES, F. M. P. G.; CRUZ, C. H. G. Análise dos parâmetros cinéticos para a produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009.

FARIA, Sandra. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**. 2009. 139 f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

FILHO, M.; GERARD, F. G. Production from organic acids with *Candida utilis*. **Rev. Micro**. v. 19, n. 4, p. 446-452, out./dez, 1998.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 117-134, jan./mar. 2009.

FURIGO, Agenor J. **Influência do pH e concentração inicial de glicose na produção de biomassa pelo fungo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat**. 2001. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 1, 2000.

GALBETTI, M. V.; VASCONCELOS, A. F. D.; ARANDA-SELVERIO, G.; DEMORI, V. A.; MARQUES, L. A.; SILVA, M. L. C.; Produção de exopolissacarídeo pelo fungo *Verticillium lecanii*. **26° Cong. Bras. de Microbiologia**. 2011.

GERN, Regina M. M. **Estudo de meios de cultivo para produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleorotus ostreatus* DSM 1833**. 2005. 128 f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GONDIN, A. L.; PAZ, M. C. Influência da temperatura, fonte de carbono e do pH na produção de biossurfactantes e biomassa por *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Tec. & Des. Sustentável**, v. 3, p. 26-31, 2007.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, Campinas, v. 46, p. 564-573, nov, 2012.

- HOI, L. W. S.; MARTINCIGH, B. S. Sugar cane plant fibres: Separation and characterization. **Crops and Products**, Durban, v. 47, p. 1-12, mai, 2013.
- HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 254-258, abr./jun. 2007.
- KOWALSKI, C. H.; AUGUSTO, F.; GODOY, H. T. Extração de bifenilas policloradas de amostras de leite materno: otimização univariada versus planejamento experimental. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 468-473, fev, 2013.
- KRUGER, C.; CUNHA, M. A. A da C.; ZANATTA, M.; RONCATTI, R. Uso do melaço de cana-de-açúcar sem suplementação mineral como proposta de meio de baixo custo para a produção de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI. **XVII SICITE**, 2012.
- LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Ciências Agrárias e Biológicas**, Maranhão, v. 6, n. 1, p. 10, 2012.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 631-650, jul./set. 2008.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, West Bengal, v. 97, n. 2, p. 627-634, set, 2013.
- MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS. **EMBRAPA – Comunicado Técnico 85**, março, 2013.
- MANNA, B.; GAMBHIR, A.; GHOSH, P. Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan, **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 141-145, set, 1996.
- MARINHO, M. R. M.; CASTRO, W. B. Planejamento Fatorial: uma ferramenta poderosa para os pesquisadores. **Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia**, Campina Grande, set, 2011.
- MATISSEK, R.; SCHENEPEL, F. M.; STEINER, G. Analisis de los alimentos: Fundamentos, métodos, aplicaciones. **Editorial Acribia, S. A – Espanã**, 1998.
- MESOMO, Michele C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio a base de soro de queijo**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Integrado do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.
- 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, nov, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426-428, 1959.
- MINERVINI, F.; ANGELIS, M. de.; SURICO, R. F.; CAGNO, R. di.; GÄNZLE, M.; GOBBETTI, M. Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. **International Journal of Food Microbiology**, Alberta, v. 141, n. 1, p. 130-135, jun, 2010.
- NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPIRIDIANO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I.; Biossíntese de Goma Xantana a Partir de Fermentação de Soro de Leite: Rendimento e Viscosidade. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1937-1941, dez, 2008.
- OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, Nagoya, jun, 2013.

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

OLIVEIRA, P. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; BORGES, C. D.; MICHEL, R. C.; LOMBA, R. T. Avaliação Comparativa das Propriedades de Xantanas Produzidas pelo Patovar Pruni e Clairana com Xantana Comercial para Predição de Uso. **Polímeros**, v. 32, n. 3, p. 417-424, 2013.

PAULO, E. M.; BOFFO, E. F.; BRANCO, A.; VALENTE, A. M. M. P.; MELO, I. S.; FERREIRA, A. G.; ROQUE, M. R. A.; ASSIS, S. A. de. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, jun, 2012.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, São Luis, v. 31, n. 6, nov./dez. 2006.

RAMOS, B. F. M.; **Produção de Goma Xantana em Água Produzida da Indústria de Petróleo. Salvador**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Escola politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RAMOS, Larissa C. **Produção de goma xantana utilizando açúcar demerara por diferentes linhagens de *Xanthomonas***. 2012. 60 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Processos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2012.

SCHECKHUBER, C. Q.; VEENHUIS, M.; KLEI, J. V. D. Improving penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by glyoxalase overproduction. **Metabolic Engineering**, Groningen, v. 18, p. 36-43, jul, 2013.

SEO, H. P., SON C. W., CHENG, C. H. JUNG, D. I., KIM, S. K., GROSS, R. A., KAPLAN, D. L., LEE & J. W. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. **Bioresource Technology**. v. 95, n.3, p. 293–299, dez, 2004.

SHENBHAGARAMAN, R.; JAGADISH, L. K.; PREMALATHA, K.; KAVIYARASAN, V. Optimization of extracellular glucan production from *Pleurotus enyngii* and its impact on angiogenesis. **Int. Journal of Biologic Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 957-964, mai, 2012.

SILVA, M, L, C, da.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SILVA, F. S. V. C. B.; SILVA, V. L.; LAVORANTE, A. F.; PAIM, A. P. S. Utilização de planejamento fatorial no preparo de amostras de detergente em pó para a determinação de fósforo por análise em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1199-1203, 2010.

TOMÉ, L. C.; MECERREYES, D.; FREIRE, C. S. R.; REBELO, L. P. N.; MARRUCHO, I. M. Pyrrolidinium-based polymeric ionic liquid materials: New perspectives for CO₂ separation membranes. **Journal of Membrane Science**, Oeiras, v. 428, p. 260-266, fev, 2013.

TURMINA, Janaína A. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2012.

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N. K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R. da.; SILVA, M. L. C. 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**, Presidente Prudente, v. 343, n. 14, p. 2481-2485, set, 2008.

VENDRUSCOLO, Francielo. **Transferência de oxigênio**. 2007. 25 f. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Estágio docência na disciplina de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

VENKATACHALAM, G.; SRINIVASAN, D.; DOBLE, M. Cyclic β -(1,2)-glucan by *Rhizobium meliloti* MTCC3402. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1848-1854, dez, 2013.

WISBACK, Elisabeth. **Estudo do cultivo submerso de *Pleorotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e exopolissacarídeo**. 2003. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina – Centro Tecnológico, Florianópolis, 2003.

WISBACK, E.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleorotus ostreatus* DSM 1833. **Rev. Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 6, n. 2, 2005.

WOJTCZAK, M.; BIERNASIAK, J.; PAPIEWSKA, A. Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar. **Food Control**, Lodz, v. 25, n.1, p. 136-139, mai, 2012.

ZANATTA, M.; CUNHA, M. A. A da C.; KRUGER, C.; Avaliação da produção de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio formulado com melão de cana-de-açúcar suplementado com sais minerais. **XVII SICITE**, 2012.

ZHU, S.; DAI, Y. M.; ZHANG, X. Y.; REN, J. Y.; XIU, M. Y.; HUANG, M. R. Untangling the transcriptome from fungus-infected plant tissues. **Gene**, Nanjing, v. 519, n. 2, p. 238-244, mai, 2013.