UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

JULIANA DAVIES DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLÓGICO DE PULULANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Tese de Doutorado

RIO DE JANEIRO

2014

Juliana Davies de Oliveira

Produção e desenvolvimento biotecnológico de pululana e caracterização físico-química

Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Eliana Flavia Camporese Sérvulo
Flávia Duta Pimenta
Léa Maria de Almeida Lopes

Rio de Janeiro
2014

O48p

Oliveira, Juliana Davies de
Produção e desenvolvimento biotecnológico de pululana e caracterização físico-química / Juliana Davies de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2014.
162 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Co-orientadoras: Flávia Duta Pimenta e Léa Maria de Almeida Lopes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

1. biopolímero. 2. *Aureobasidium pullulans*. 3. pululana. 4. viscosidade. 5. resíduo industrial. I. Sérvulo, Eliana Flávia Camporese, orient. II. Pimenta, Flávia Duta; Lopes, Léa Maria de Almeida, coorient. III. Título.

Produção e desenvolvimento biotecnológico de pululana e caracterização físico-química

Juliana Davies de Oliveira

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Rio de Janeiro, 21 de agosto de 2014.

Aprovada por:

Profa. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo – EQ/UFRJ (Orientadora)

Profa. Dra. Flávia Duta Pimenta – CETIQT/SENAI (Co-orientadora)

Dra. Léa Maria de Almeida Lopes – IMA/UFRJ (Co-orientadora)

Profa. Dra. Cheila Goncalves Mothé – EQ/UFRJ

Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ

Dra. Maria Aparecida de Melo – CENPES/PETROBRAS

Dra. Clarice Maria Buarque de Macedo – INPI

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula – DQOI/UFC

Aos meus pais, Valdemir e Anelise.

À minha irmã, Patrícia.

Ao meu marido, Pierre.

Por todo carinho, compreensão e apoio.

“A riqueza do conhecimento não pode ser usurpada por ladrões, confiscada por reis ou dividida entre irmãos. Quanto mais se gasta mais ela cresce”.

Vijay V. Joshi

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele surgiu de significativas contribuições que obtive durante toda minha trajetória pessoal, profissional e acadêmica, ao lidar com pessoas e instituições que foram importantes para a conclusão de mais uma etapa da vida que se consuma nesta Tese.

Consciente de que seria impossível listar todos os que de alguma forma me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais à forma de ver o mundo e nele atuar, ainda assim, preciso expressar meu agradecimento de forma individual a alguns:

- A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades;
- Aos meus pais, Valdemir e Anelise, por toda força, compreensão, amor, altruísmo, por estar ao meu lado em todos os momentos, que, por uma vida de dedicação, amor e trabalho, sempre possibilitaram as suas filhas a oportunidade de realizar sonhos e conquistas;
- À minha maninha e amiga, Patrícia, e ao meu cunhado, Vinícius, pelos momentos de descontração, inspiração e apoio;
- Ao meu marido, eterno namorado e amigo, Pierre, pelo exemplo de dignidade, bondade e caráter, pelo incentivo, compreensão, paciência e encorajamento, durante todo este período;
- À Profa. Dra. Cheila Gonçalves Mothé (EQ/UFRJ), ao Prof. Dr. Marcos Lopes (IMA/UFRJ) e à Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (DQOI/UFC) que, como membros da banca do exame de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões;
- Ao Dr. Eduardo Mere (IQ/UFRJ), por sempre estar disposto a abrir o laboratório para que eu pudesse centrifugar minhas inúmeras amostras;
- À Dra. Marcia Tereza (INT) por permitir que eu trabalhasse em seu laboratório;
- Ao Dr. Walter Barreiro Cravo Junior e ao Saulo Alves (INT) por intermediarem e tornarem possível o desenvolvimento da etapa final desse trabalho, me ajudando a utilizar o biorreator;
- À minha adorada orientadora Profa. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo (EQ/UFRJ) que foi para mim exemplo de responsabilidade e disciplina, que me mostrou o caminho da ciência; pelo carinho, paciência e orientação ao longo de todos estes anos;

- As minhas queridas co-orientadoras, Profa. Dra. Flávia Duta Pimenta (CETIQT/SENAI) e Dra. Léa Maria Lopes de Almeida (IMA/UFRJ), por acreditarem em mim, pelo conhecimento dividido, por serem exemplos de profissionais e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida;
- À MsC. Márcia Benzi (IMA/UFRJ) pelo apoio e colaboração na utilização do FTIR;
- À Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (DQOI/UFC) pela atenciosa acolhida e pela orientação durante o tempo em que estive em seu laboratório, seu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho;
- À doutoranda Clara Abreu (DQOI/UFC) pela imensa colaboração nas análises dos experimentos, pela atenção, pelas explicações concedidas e por ter me acolhido em sua casa no período em que estive na UFC;
- Aos doutorandos Leonardo Vazquez e Diana Cardoso Pelizzari (LAPA/CCS/UFRJ), pelas análises de citotoxicidade;
- Aos meus queridíssimos alunos de iniciação científica, Hugo, Bia e Amanda, por toda dedicação;
- À Jaqueline Oliveira (CETEM) pelas análises de elementos inorgânicos;
- A minha adorada e última aluna de iniciação científica do doutorado, Carol, pela fiel companhia no final da parte experimental desta tese;
- Aos integrantes do laboratório E-107 da Escola de Química (UFRJ) por tornarem o ambiente de trabalho agradável e divertido, e pela colaboração e paciência no decorrer do desenvolvimento desta tese;
- Aos funcionários da UFRJ, em especial ao Paulinho e Christiano, pelo profissionalismo e cordialidade demonstrados;
- A todos professores da pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (EQ/UFRJ);
- Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite;
- Aos meus estimados amigos, por tornarem minha vida ainda mais alegre e divertida, me dando força para continuar;
- A todas as demais pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que o presente trabalho pudesse ser desenvolvido;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pelo apoio financeiro.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”.

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

OLIVEIRA, Juliana Davies de. **Produção e desenvolvimento biotecnológico de pululana e caracterização físico-química**. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Os biopolímeros de origem microbiana têm sido objeto de intensa pesquisa devido ao seu alto potencial de aplicação em diferentes setores industriais. No entanto, os custos de produção ainda são elevados e não competitivos em comparação com os polímeros convencionais de origem sintética a partir do petróleo. Portanto, o presente trabalho tem como foco o desenvolvimento de polissacarídeo microbiano com base na redução de custos do processamento, com garantia da sua sustentabilidade, pelo emprego de rejeito industrial (levedura residual cervejeira – LRC). Dentre os biopolímeros microbianos de maior interesse comercial têm-se a pululana, polímero produzido pelo fungo dimórfico *Aureobasidium pullulans*, que, além das aplicações comuns aos de origem sintética, tem destaque em aplicações nobres, como, por exemplo, como conjugado não tóxico de vacinas e interferon. O estudo contemplou a seleção da linhagem fúngica; a avaliação de metodologias para redução de pigmento cogerado no transcorrer da fermentação; a definição das concentrações iniciais de açúcar cristal, principal fonte de carbono, e LRC, como fonte de nitrogênio, bem como a relação agitação/aeração mais favorável à produção de biopolímero. Os bioprodutos gerados nas diferentes condições ensaiadas foram caracterizados por análises viscosimétrica e térmica (Termogravimetria), cromatografia de Permeação em Gel e espectroscópica (Infravermelho por Transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C). Dentre as linhagens avaliadas (IOC 3011, IOC 3775 e ATCC 42023), a IOC 3011, da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz) foi a mais interessante no que concerne à produção de biopolímero. De acordo com planejamento fatorial 2^2, para ensaios conduzidos em frascos agitados por 96 h, os valores máximos de produção (12 g/L), rendimento (0,45 g/g), viscosidade do mosto fermentado (0,0214 Pa.s sob taxa de cisalhamento de 10 s^{-1}) e massa molar do biopolímero (1,4 x 10^5 g/mol) foram obtidos para 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC. Para ensaios conduzidos em biorreator, 1 vvm e 300 rpm foram as condições operacionais mais indicadas dentre as combinações

avaliadas, embora não possam ser consideradas as ideais, tendo apresentado produção de 7,8 g/L de biopolímero e rendimento de 0,29 g/g, após 120 h de fermentação. As análises por FTIR e RMN ^{13}C do biopolímero produzido, após recuperação com etanol comercial, mostrou ser sua estrutura similar à da pululana comercial da marca Sigma-Aldrich). O efeito citotóxico *in vitro* do biopolímero para células de neuroblastoma de camundongo (N2A) revelou a sua inocuidade. Os resultados obtidos permitem concluir que a produção de pululana a partir de materiais de baixo custo é um processo sustentável, embora a viabilidade econômica dependa de estudo complementar para otimização das condições operacionais do processo em maior escala.

Palavras-chave: biopolímero, *Aureobasidium pullulans*, pululana, viscosidade, resíduo industrial, caracterização

ABSTRACT

OLIVEIRA, Juliana Davies de. **Biotechnological production and development of pullulan and characterization physical chemistry**. Rio de Janeiro, 2014. Thesis (Doctor of Science) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Biopolymers of microbial origin have been the object of intense research because of their high potential of application in different industrial sectors. However, production costs are still high and uncompetitive in comparison with conventional synthetic polymers from petroleum. Therefore, the present study focuses on the development of microbial polysaccharide based on the reduction of processing costs, with guarantee of their sustainability, by the employment of industrial waste (residual brewing yeast – RBY). Among microbial biopolymers of major commercial interest, there is pullulan, a polymer produced by a dimorphic fungus, *Aureobasidium pullulans*, which, besides the same applications of those from synthetic origin, is highlighted in noble applications, such as non-toxic conjugate vaccine and interferon. The study contemplated the selection of fungal strain; the evaluation of methodologies for the reduction of pigment cogeneration in the course of fermentation; the definition of initial concentrations of crystal sugar, the main carbon source, and RBY, as a nitrogen source, as well as the most favorable agitation/aeration rate to the biopolymer production. The bioproducts analysis, generated in the different test conditions were characterized by viscosimetric and thermal (Thermogravimetry), Gel Permeation Chromatography, spectroscopy (Fourier Transform Infrared and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance). Among the tested strains (IOC 3011, IOC 3775 and ATCC 42023), the IOC 3011 strain, from the Culture Collection of Filamentous Fungi (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz) was the most interesting one regarding the biopolymer production. According to 2^2 factorial design, for trials conducted in shake flasks for 96 h, the maximum values of production (12 g/L), yield (0.45 g/g), broth viscosity (0.0214 Pa.s under shear rate of 10 s^{-1}) and biopolymer molar mass (1.4 x 10^5 g/mol) were obtained from 30 g/L of crystal sugar and 8 g/ of RBY. For experiments conducted in bioreactor, 1 vvm and 300 rpm were the most indicated operating conditions among the combinations evaluated, although they can not be considered ideal, having presented production of 7.8 g/L of biopolymer and yield of 0.29 g/g, after 120 h of fermentation. FTIR and ^{13}C NMR analysis of the

produced biopolymer, after recovery with commercial ethanol, showed its structure to be similar to the commercial pullulan from Sigma-Aldrich. The in vitro cytotoxic effect of the biopolymer on mouse neuroblastoma cells (N2A) revealed its safety. The obtained results allow us to conclude that the production of pullulan from inexpensive materials is a sustainable process, although the economic viability depends on complementary study in order to optimize the operating conditions of the process on a larger scale.

Keywords: biopolymer, *Aureobasidium pullulans*, pullulan, viscosity, industrial waste, characterization

SIGLAS

%T	Transmitância
AR	*Advanced Rheometer*
ATCC	*American Type Culture Colletion*
ATR	Reflexão total atenuada
c*	Concentração crítica
C/N	Relação carbono/nitrogênio
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Da	Dalton
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
EPS	Exopolissacarídeo
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
η	Viscosidade
HPLC	*High pressure liquid chromatography*
IFN	Interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LRC	Levedura residual cervejeira
OD	Oxigênio dissolvido
Pa	Pascal
p/v	Parte por volume
Pa.s	Pascal-segundo
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
q.s.p.	Quantidade suficiente para
STR	*Stirred-tank reactor*
τ	Tensão de cisalhamento
TG	Termogravimetria
T_F	Temperatura final de decomposição
$T_{MÁX}$	Temperatura onde a velocidade de decomposição é máxima
T_{onset}	Temperatura inicial de decomposição
vvm	volume de ar/volume de meio x minuto^{-1}
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em polissacarídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química representativa da pululana, destacando a unidade repetitiva de maltotriose. 23

Figura 2. Aspectos morfológicos de *Aureobasidium pullulans* [A- colônia, B- corpo de frutificação, C- hifa escura com clamidosporo na extremidade, D- células unicelulares em gemulação, E- artroconídio negro, F- blastoconídios, G- hifas e blastoconídios (1860 x), H- hifas septadas e blastosporos e I- pseudohifas].....33

Figura 3. Morfologia colonial de linhagens de *Aureobasidium pullulans* com crescimento de 168 h em agar extrato de malte. [A- hifas verde oliva no centro e hifas brancas, linhagem CU45. B- hifas brancas com pigmento escuro vináceo; linhagem CU6; C- hifas brancas com pigmento amarelo, linhagem CU13. D- hifas brancas com pigmento rosa, linhagem DOUG; E – I- colônias de linhagem CU9, CU 8, CU 38, NRRLY-12974 e CU 15, respectivamente.] 34

Figura 4. Tipos de curvas de escoamento. 51

Figura 5. Orientação das moléculas após aumento da taxa de cisalhamento. 52

Figura 6. Reogramas típicos de fluidos com comportamento reológico dependente do tempo. 53

Figura 7. Determinação gráfica da viscosidade intrínseca. 57

Figura 8. Representação esquemática dos regimes de concentração de uma solução polimérica. 58

Figura 9. Representação esquemática de um sistema considerado como função desconhecida ligando os fatores (variáveis de entrada) às respostas (variáveis de saída). 72

Figura 10. Esquema das etapas experimentais. 80

Figura 11. Esquema da geometria cone-placa (α-ângulo entre o cone e a placa, R-raio do cone). 92

Figura 12. Observações em microscópio óptico do crescimento das linhagens de *A. pullulans* IOC 3011 (A), IOC 3775 (B) e ATCC 42023 (C) em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 2,0 g/L de levedura residual de cervejaria. 98

Figura 13. Observações em microscópico óptico de *A. pullulans* [A- linhagem IOC 3011 (aumento de 100x, com óleo de imersão); B- IOC 3775 (aumento de 40x); C- ATCC 42023 (aumento de 10x). 99

Figura 14. Mostos após fermentação com exposição à luz artificial no período diurno (A) e sem exposição à luz (B). 101

Figura 15. Aspectos macroscópicos dos biopolímeros: (A) biopolímero bruto, (B) biopolímero tratado e (C) pululana comercial referência (Sigma-Aldrich). 103

Figura 16. Cromatogramas para as amostras de biopolímero bruto (A) e tratado (B) [picos: 1- amostra; 2- referência interna (Pululana da Shawa Denko); 3- eluente (etilenoglicol)]. 104

Figura 17. Curvas de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG), em atmosfera de nitrogênio, até 700ºC para biopolímero bruto (A), biopolímero tratado (B) e pululana comercial referência (Sigma-Aldrich) (C). 107

Figura 18. Espectros na região do infravermelho do biopolímero bruto (A); biopolímero tratado (B), ambos recuperados dos mostos em 96 h de fermentação e pululana comercial referência (C) (Sigma-Aldrich). 110

Figura 19. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em rendimento [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)]. 112

Figura 20. Superfície resposta de $Y_{P/S}$: efeito da variação da concentração de substrato e da concentração de fonte de nitrogênio. 114

Figura 21. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em viscosidade. [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)]. 116

Figura 22. Superfície de resposta viscosidade: efeito da variação das concentrações de substrato e LRC. 117

Figura 23. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em massa molar. [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)]. 119

Figura 24. Superfície reposta de massa molar do efeito da variação da concentração de substrato e da fonte de nitrogênio. 120

Figura 25. Curvas de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) até 700ºC, com velocidade de aquecimento de 10ºC/min, em atmosfera de nitrogênio, da amostra de biopolímero obtida na condição definida por Planejamento Experimental [30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria]. 122

Figura 26. Espectro na região do infravermelho do biopolímero obtido na condição definida por Planejamento Experimental [30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria]. 124

Figura 27. Estrutura química da pululana (A) unidades α-D-glicose (1→6), (B) e (C) unidades de α-D-glicose (1→4).....125

Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C em espectrômetro *Fourier transform Bruker Avance* DRX a 125 MHz (A) e de DEPT 135 (B) da amostra de biopolímero recuperado de mosto formulado com 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC, após 96 h de fermentação com *A. pullulans* IOC 3011.....126

Figura 29. Efeito da combinação aeração e agitação na produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans* linhagem IOC 3011 e respectivos fatores de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) para ensaios conduzidos em biorreator após 72 h de fermentação em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC [1- 0vvm/150 rpm; 2- 0 vvm/300 rpm; 3- 0,5 vvm/150 rpm; 4- 0,5 vvm/300 rpm; 5- 1,0 vvm/150 rpm; 6- 1,0 vvm/300 rpm]. 128

Figura 30. Aspectos dos biopolímero obtidos por *Aureobasidium pullulans* linhagem IOC 3011 em biorreator com variação de aeração e agitação em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC [(A) 0 vvm e 150 rpm (B) 0 vvm e 300 rpm (C) 0,5 vvm e 150 rpm (D) 0,5 vvm e 300 rpm (E) 1 vvm e 150 rpm (F) 1 vvm e 300 rpm.] 133

Figura 31. Análise viscosimétrica de mostos obtidos em biorreator em distintas taxas de aeração e velocidades agitação (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C). 134

Figura 32. Comportamento viscosimétrico da pululana comercial de referência e do biopolímero produzido por *A. pullulans* IOC 3011 recuperado e ressolubilizado em água em 3 concentrações 1, 5 e 10% m/v, obtido em taxa de aeração de 1 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm, utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C). 136

Figura 33. Perfil cinético de produção de biopolímero e consumo de substrato por um período de 120 h em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio de produção à base de açúcar cristal (30 g/L) e LRC (8 g/L). 138

Figura 34. Fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) determinados durante a fermentação de açúcar cristal e LRC em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) por *A. pullulans* IOC 3011. 141

Figura 35. Variação do oxigênio dissolvido no meio reacional ao longo de 120 h de fermentação de açúcar cristal e LRC por *A. pullulans* IOC 3011 em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm). 143

Figura 36. Comportamento viscosimétrico dos caldos fermentados pela linhagem *A. pullulans* IOC 3011, em biorreator de bancada (*Advanced Rheometer* 2000, 25ºC). 144

Figura 37. Curvas de Termogravimetria (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG) até 700ºC, com velocidade de aquecimento de 10ºC/min, em atmosfera de nitrogênio, da amostra obtida em biorreator utilizando 1,0 vvm e 300 rpm, para 72 h (A) e 120 h (B) de processo em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm). 147

Figura 38. Espectros na região do infravermelho de amostras de biopolímero recuperado de mosto fermentado em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em 72 h (A) e 120 h (B) de processo. 151

Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C em espectrômetro Fourier transform Bruker Avance DRX a 125 MHz da amostra de biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011. 153

Figura 40. Resultados do exame microscópico óptico (aumento de 40x) da cultura de neuroblastoma de camundongo *in vitro* após 24 h de exposição à: A- água; B- 10% de Triton; C- dispersão aquosa (50 mg/L) do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011; D- dispersão aquosa (50 mg/L) de pululana comercial Sigma-Aldrich. 155

Figura 41. Viabilidade de células no teste MTT de citotoxicidade após tratamento com 10% de Triton; Água; Biopolímero [dispersão aquosa (50 mg/L) do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar

cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011]; Padrão [dispersão aquosa (50 mg/L) de pululana comercial Sigma-Aldrich]. 156

Figura 42. Análise viscosimétrica do mosto obtido do Planejamento Experimental. Concentrações iniciais de açúcar cristal e levedura residual de cervejaria, respectivamente: 30 e 2 g/L (1A e 1B); 70 e 2 g/L (2A e 2B);30 e 8 g/L (3A e 3B); 70 e 8 g/L (4A e 4B);50 e 5 g/L (5A, 5B, 6A, 6B, 7A e 7B) após 96 h de fermentação (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C). 192

Figura 43. Cromatogramas das amostras obtidas do Planejamento Experimental para avaliar as concentrações iniciais ideais das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (levedura residual de cervejaria) após 96 h de fermentação. [Concentrações iniciais de açúcar cristal e LRC, respectivamente: 30 e 8 g/L (13E3); 30 e 8 g/L (13E3R); 70 e 8 g/L (13E4) e 70 e 8 g/L (13E4R)]. 193

Figura 44. Cromatogramas das amostras obtidas do Planejamento Experimental para avaliar as concentrações iniciais ideais das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (levedura residual de cervejaria) após 96 h de fermentação. [Concentrações iniciais de açúcar cristal e LRC, respectivamente: 50 e 5 g/L (13E5); 50 e 5 g/L (13E5R); 50 e 5 g/L (13E6); 50 e 5 g/L (13E6R); 50 e 5 g/L (13E7); 50 e 5 g/L (13E7R)]. 194

Figura 45. Curvas de escoamento dos mostos obtidos em biorreator em distintas taxas de aeração e velocidades agitação (Advanced Rheometer 2000, 25°C). 195

Figura 46. Curvas de escoamento da pululana comercial de referência e do biopolímero produzido por *A. pullulans* IOC 3011 recuperado e ressolubilizado em água em 3 concentrações 1, 5 e 10% m/v, obtido em taxa de aeração de 1 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm, utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C).....195

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biopolímeros encontrados na natureza e suas funções 11
Tabela 2. Polissacarídeos de origem microbiana e suas características 17
Tabela 3. Alguns exemplos de derivados de pululana e respectivas aplicações 31
Tabela 4. Fontes fúngicas de pululana 31
Tabela 5. Produção de pululana para diferentes valores de agitação e aeração 44
Tabela 6. Faixas de absorção para diferentes grupos funcionais 62
Tabela 7. Curva referência e informações obtidas pelas técnicas de Análise Térmica 65
Tabela 8. Evolução de um estudo empírico 69
Tabela 9. Composição do meio basal 79
Tabela 10. Variáveis e níveis empregados no Planejamento Experimental 85
Tabela 11. Matriz referência de planejamento fatorial 2^2 com ponto central 85
Tabela 12. Condições aeração/agitação ensaiadas em biorreator 88
Tabela 13. Metodologias empregadas para cada uma das etapas 91
Tabela 14. Temperatura de degradação das amostras obtidas e da literatura 108
Tabela 15. Resultados experimentais para as respostas em Rendimento ($Y_{P/S}$), Viscosidade e Massa Molar, relativos ao Planejamento Experimental 111
Tabela 16. Resultado da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em $Y_{P/S}$ 113
Tabela 17. Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em Viscosidade 117
Tabela 18. Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em Massa Molar 119
Tabela 19. Atribuições dos 18 carbonos da unidade de repetição da pululana obtida a partir do Planejamento Experimental 127
Tabela 20. Análise de elementos inorgânicos da amostra de biopolímero obtida em biorreator 148

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de polissacarídeos e respectivas fontes 15
Quadro 2. Exopolissacarídeos produzidos por fungos 19
Quadro 3. Produção de pululana por diferentes linhagens de *A. pullulans* e condições fermentativas 47

SUMÁRIO

RESUMO ix
ABSTRACT xi
SIGLAS xiii
LISTA DE FIGURAS xiv
LISTA DE TABELAS xviii
LISTA DE QUADROS xix
Capítulo 1 4
1. INTRODUÇÃO 1
Capítulo 2 6
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 7
Capítulo 3 10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11
3.1. Biopolímeros/Polissacarídeos 11
3.2. Polissacarídeos microbianos 15
3.3. Pululana 22
3.3.1. Mercado e aplicação da pululana 24
3.3.1.1. Indústria alimentícia 25
3.3.1.2. Indústria de plásticos 27
3.3.1.3. Indústria farmacêutica/Medicina 27
3.3.1.4. Indústria de cosméticos 29
3.3.1.5. Indústria do petróleo 29
3.3.1.6. Técnicas analíticas 30
3.3.1.7. Derivados semissintéticos de pululana 30
3.4. Micro-organismos produtores de pululana 30
3.4.1. *Aureobasidium pullulans* 31
3.5. Produção de pululana 35
3.6. Parâmetros que influenciam a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* 36
3.6.1. Morfologia do micro-organismo 36
3.6.2. Fonte de carbono 36
3.6.3. Fonte de nitrogênio 38
3.6.4. pH 41
3.6.5. Temperatura 41
3.6.6. Aeração, agitação e oxigênio dissolvido 42
3.6.7. Microelementos 44
3.6.8. Produção de pululana: Levantamento bibliográfico 45

3.7. Reologia dos biopolímeros 48
3.7.1. Comportamento reológico da pululana 59
3.8. Análise espectroscópica de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 60
3.9. Análise Térmica 63
3.10. Ressonância Magnética Nuclear 65
3.11. Cromatografia de Permeação em Gel 67
3.12. Planejamento de Experimentos 68
3.12.1. Interação entre os fatores 72
3.12.2. Utilização de planejamento experimental na produção de pululana 73
3.13. Citotoxicidade do biopolímero 75
Capítulo 4 77
4. MATERIAIS E MÉTODOS 78
4.1. Micro-organismo 78
4.1.1. Manutenção das linhagens microbianas 78
4.2. Meios de cultivo 78
4.2.1. Meio de crescimento 78
4.2.2. Meios de produção 79
4.3. Etapas Experimentais 80
4.3.1. Seleção das linhagens microbianas 81
4.3.2. Estratégias para redução de pigmento 81
4.3.2.1. Primeira estratégia: privação de luz 82
4.3.2.2. Segunda estratégia: ressolubilização e filtração do biopolímero 82
4.3.3. Definição das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio 83
4.3.4. Produção do biopolímero em biorreator 86
4.3.5. Perfil Cinético da produção de biopolímero em biorreator 88
4.3.6. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do biopolímero produzido 89
4.4. Metodologias analíticas 90
4.4.1. Concentração celular 90
4.4.2. Substrato residual 90
4.4.3. Viscosidade do mosto fermentado em regime isotérmico 90
4.4.4. Viscosimetria das dispersões de biopolímero em diferentes concentrações e em regime isotérmico 92
4.4.5. Recuperação e purificação do biopolímero 92
4.4.6. Rendimento ($Y_{P/S}$) 93
4.4.7. Análise espectroscópica de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 94
4.4.8. Ressonância Magnética Nuclear 94

4.4.9. Estimativa da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel..... 95
4.4.10. Análise Térmica 95
4.4.11. Análise dos elementos inorgânicos 96
Capítulo 5 97
5.1. Seleção da linhagem microbiana 98
5.2. Estratégias para redução de pigmento..... 100
5.2.1. Primeira estratégia: privação de luz 100
5.2.2. Segunda estratégia: ressolubilização e filtração do biopolímero produzido 102
5.3. Definição das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio 111
5.3.1. Variável Resposta: Rendimento 112
5.3.2. Variável Resposta: Viscosidade 115
5.3.3. Variável Resposta: Massa Molar 118
5.3.4. Caracterização do biopolímero..... 121
5.4. Produção do biopolímero em biorreator 128
5.4.1. Perfil cinético da produção de biopolímero..... 137
5.4.1.1. Caracterização do biopolímero obtido em biorreator 145
5.4.2. Avaliação da citotoxicidade do biopolímero produzido 154
5.5. Considerações finais..... 157
Capítulo 6 160
6. CONCLUSÕES..... 161
6.1. Produção e obtenção de biopolímero..... 161
6.2. Caracterização do biopolímero..... 161
6.3. Tratamento *in vitro* 161
7. SUGESTÕES 1622
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 163
Apêndice 1..... 192
Apêndice 2..... 193
Apêndice 3..... 195
Apêndice 4..... 195

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os polímeros – macromoléculas de elevada massa molar – particularmente os de origem sintética (plásticos) têm tido papel fundamental na evolução industrial e no bem estar da humanidade. Estes materiais podem ser encontrados em produtos simples, como também em produtos complexos, que exigem tecnologia de última geração para sua fabricação. Por isso, se difundem pelos mais variados setores, com as mais diversas aplicações.

A diversidade de usos dos polímeros deriva da diferenciação estrutural das macromoléculas sintetizadas por via química ou microbiana, ou oriundas da extração de vegetais e animais, bem como da possibilidade de substituir total ou parcialmente materiais, mantendo ou, muitas vezes, melhorando o desempenho técnico e a qualidade dos novos produtos fabricados. De fato, conforme reportado por Pradella (2006), a cada ano, é notório que os polímeros vêm ganhando mais espaço em novas aplicações, motivando a competitividade no setor produtivo.

A produção mundial de plásticos é estimada em aproximadamente 265 milhões t/ano (ABIPLAST, 2012). Consequentemente, o setor de polímeros, dentre todos os segmentos da indústria química, é o que vem apresentando o maior crescimento mundial, haja visto que de 2000 a 2010, a produção mundial de plásticos aumentou 62% (PRADELLA, 2006; BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008, PANDA; SINGH; MISHRA, 2010). A tendência é de que o consumo *per capita* do plástico, que apresentou crescimento de 5% ao ano nas últimas duas décadas, aumente em todas as regiões do mundo até 2015 (ABIPLAST, 2012).

Se por um lado, o uso de plásticos contribuiu para o desenvolvimento econômico e a melhoria da qualidade de vida, por outro, concorreu para o aumento da poluição ambiental. Isto porque a maioria dos materiais plásticos em uso é produzida por síntese química a partir de derivados de petróleo, o que torna difícil sua decomposição na natureza. Normalmente, a deterioração de embalagens plásticas leva mais de cem anos (ROSATO; ROSATO; ROSATO, 2000). Adicionalmente, a síntese de alguns materiais poliméricos envolve a geração de compostos tóxicos (US CONGRESS, 1993; GAMBETTA, 2006). Portanto, a deposição de plásticos em aterros sanitários ou seu descarte indevido, associado ainda à sua produção, pode

trazer danos irreparáveis para a saúde e comprometer o meio ambiente (THOMPSON *et al.*, 2009; PANDA; SINGH; MISHRA, 2010).

Os problemas ambientais atrelados ao aumento do preço do petróleo têm motivado a busca por soluções ecologicamente corretas, que sejam interessantes do ponto de vista econômico. Neste contexto, despontam os polímeros obtidos a partir de matérias-primas renováveis e, por conseguinte, de fácil degradação. Em particular, os obtidos por via microbiana empregando biomassa vegetal (carboidratos de cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba e óleos vegetais oriundos da extração de soja, girassol, palma ou de outra planta oleaginosa) ou, melhor ainda, rejeitos da agroindústria.

Dentre os polímeros naturais, denominados biopolímeros, os extraídos de plantas (amido, celulose) e algas marinhas (carragenanas, agar-agar) dominam o mercado devido ao seu menor custo, por outro lado, usam grande quantidade de água (CANILHA *et al.*, 2006). Contudo, os biopolímeros de origem microbiana têm despertado interesse, uma vez que, comparativamente, apresentam vantagens como: produção independente de fatores climáticos e da limitação de áreas; possibilidade do uso de diferentes matérias-primas, inclusive regionais; e menor variação da qualidade, ou seja, das propriedades físico-químicas (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; BERWANGER *et al*., 2006; MOREIRA *et al*., 2005).

Os biopolímeros de origem microbiana, além de serem biodegradáveis, apresentam propriedades similares às dos polímeros sintéticos, como massa molar, viscosidade, aplicações. Logo, se adequam a uma diversidade de aplicações, com possibilidade de absorver inovações tecnológicas, uma vez que podem ser modificados (GAMBETTA, 2006; PRADELLA, 2006; BORSCHIVER, ALMEIDA; ROITMAN, 2008; PANDA; SINGH; MISHRA, 2010). Outra vantagem reside na biocompatibilidade desses polímeros com outros materiais poliméricos, como, por exemplo, em implantes, o que possibilita reduzir os problemas de rejeição (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Os biopolímeros obtidos por processos fermentativos, que também podem ser denominados gomas, possuem a capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações (MOREIRA *et al.,*

2005). Em geral, analogamente aos polímeros quimicamente sintetizados, os biopolímeros encontram aplicações nos mais variados setores industriais, basicamente em função das suas características reológicas (SUTHERLAND, 1982). Porém, dependendo da composição química, do tipo de ligações químicas entre os monossacarídeos, dos grupamentos e do grau de substituições, da massa molar e de sua distribuição, os biopolímeros podem apresentar outras propriedades fundamentais que ditem outro uso industrial (SHATWELL *et al*., 1990; PACE, 1991). Em contrapartida, a produção industrial dos polímeros microbianos depende de capital e energia para condução do bioprocesso, além de haver a necessidade de serem definidas as condições ideais, o que requer que haja um rígido controle das condições operacionais. Sem isso, seria impossível a obtenção de biopolímero com características homogêneas, o que acarretaria em ônus (BORGES *et al.*, 2004; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; BERWANGER *et al*., 2006). Para atingir estes alvos, estudos estão sendo realizados visando o desenvolvimento de processos econômicos e de alta produtividade para obtenção de biopolímeros microbianos com potencial aplicação industrial (BORGES *et al.*, 2004). Conforme apresentado por Borschiver, Almeida e Domingues (2008), os artigos publicados e as patentes depositadas sobre biopolímeros entre 2002 e 2007 demonstram o crescimento do interesse neste tema, com maior pico em 2006 quando foram registrados 60 artigos e 29 patentes. É válido ressaltar que o Brasil não possui registro de patentes para a pululana.

Em 2002, a produção de biopolímeros foi de cerca de 60.000 t, com preço de comercialização em torno de US$ 4/kg (BORSCHIVER; ALMEIDA; DOMINGUES*,* 2008). Segundo esses autores, a taxa de crescimento desse mercado é superior a 20% ao ano, permitindo antever um consumo de 1.000.000 t/ano em 2015 e, portanto, um movimento de bilhões de dólares. Esses dados não contemplam a goma xantana, macromolécula que é produzida por fermentação e tem inúmeras aplicações como espessantes, estabilizadores, emulsionantes e agentes de suspensão em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, entre outros (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; PIMENTA, 2006). Em 2011, foram produzidas aproximadamente 60.000 t de goma xantana englobando USA, Inglaterra, França, Dinamarca e Áustria, enquanto só o grupo chinês Fufeng atingiu o montante de 45.000 t (FUFENG-GROUP, 2011).

É do consenso geral, que o preço de venda dos biopolímeros é o obstáculo principal para sua entrada no mercado, apontando-se um preço teto de aproximadamente US$ 2/kg, ou seja, cerca de 50% superior aos preços de comercialização das resinas sintéticas mais comuns (polietileno, polipropileno, politereftalato de etileno). Uma das formas de alcançar a redução de custos é fazer uso de matérias-primas alternativas. A maioria dos processos fermentativos emprega, preferencialmente, glicose e sacarose como fontes de carbono na elaboração dos meios de produção (SUTHERLAND, 1998). Entretanto, o emprego de matérias-primas de baixo custo e, de preferência, subprodutos ou rejeitos agroindustriais, poderia não apenas reduzir os custos de produção, mas também minimizar os problemas ambientais, em decorrência da redução do descarte desses efluentes de maneira imprópria ou, até mesmo, reduzir os custos adicionais para tratamento de modo a adequá-los para descarte (WOICIECHOWSKI, 2001).

Dentre os biopolímeros, a pululana, um homopolissacarídeo neutro linear produzido pelo fungo polimórfico *Aureobasidium pullulans,* é constituída por unidades de maltotriose interconectadas via ligações α-(1→6) (ROUKAS, 1999; LEATHERS, 2003; PRADELLA, 2006). A pululana tem sido aplicada em vários campos, em particular pelas indústrias de alimentos e farmacêuticas (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). Industrialmente, a pululana vem sendo bastante empregada para melhorar a aderência e brilho dos alimentos, sem alteração do seu valor calórico (SUTHERLAND, 1998; PRADELLA, 2006). No entanto, estudos demonstraram a possibilidade do emprego da pululana como pré-biótico, já que este biopolímero é capaz de promover o crescimento seletivo de *Bifidobacterium* spp. no intestino humano (SUTHERLAND, 1998; LEATHERS, 2003). Além disso, os derivados de pululana se mostraram promissores para utilização como conjugados não tóxicos na produção de vacinas, despertando o interesse das indústrias farmacêutica e biomédica (LEATHERS, 2003; SHINGEL, 2004; REKHA; SHARMA, 2007). Também, foi comprovada a função da pululana como potencializador do efeito do interferon, proteína que vem sendo utilizada eficazmente no tratamento de algumas doenças virais, como a hepatite (LEATHERS, 2003). Muitos trabalhos vêm estudando a modificação da pululana para novas aplicações (MOCANU *et al*., 1995; SHINGEL;

PETROV, 2002; KAYA *et al*., 2009, BAE *et al*. 2011; LI *et al*., 2011; DIONÍSIO *et al.,* 2013; PRIYA, REKHA, SHARMA, 2014).

Em face da importância da pululana, e considerando os resultados promissores obtidos na Dissertação de Mestrado, foi dado prosseguimento ao estudo do tema visando contribuir para o futuro desenvolvimento tecnológico de biopolímeros no nosso país, com ênfase no emprego de rejeitos industriais. Sabe-se que esse biopolímero microbiano pode ser produzido a partir de diferentes substratos, embora isto cause variações nas suas características físicas e químicas, especialmente quando são utilizados resíduos agroindustriais na fermentação (ISRAILIDES *et al*., 1994). Algumas dessas características, como a massa molar, são muito importantes para a comercialização da pululana produzida.

Capítulo 2

Justificativa e Objetivo

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os biopolímeros vêm sendo estudados a fim de minimizar o uso dos polímeros sintéticos, cuja produção deriva basicamente do petróleo, uma fonte não renovável. Também, os biopolímeros despontam no mercado pela ampla gama de propriedades intrínsecas, o que permite seu uso intensivo nos mais variados setores industriais. Particularmente, tem-se interesse nos materiais poliméricos de origem microbiana pela possibilidade de obter macromoléculas com novas funcionalidades, o que favoreceria aplicações ainda mais nobres.

Como já mencionado, o principal entrave à produção comercial dos biopolímeros de origem microbiana é o custo. Trabalhos publicados indicam que os componentes utilizados adicionam um custo de aproximadamente 30% ao custo total da pululana (MILLER; CHURCHILL, 1986 *apud* SURUMARAN *et al*., 2013). Dessa forma, é de grande importância encontrar fontes nutricionais de baixo custo e de grande disponibilidade a fim de viabilizar economicamente sua produção comercial.

No Brasil, o açúcar cristal pode ser uma alternativa como fonte de carbono e energia na formulação do mosto. Esta matéria-prima já vem sendo utilizada por diferentes empresas para produção microbiana de produtos de alto valor agregado, como por exemplo, ácido lático e ácido cítrico (PENNA, 2001).

Os rejeitos industriais também podem ser uma opção para emprego como matéria-prima em bioprocessos. Neste caso, além da redução dos custos, evita-se o seu descarte ou, pelo menos, se reduz o volume a ser tratado a fim de atender as normas definidas pela legislação ambiental vigente. No entanto, muitas vezes, o emprego de rejeitos é inviável por requerer um tratamento prévio de modo a adequá-lo para incorporação ao meio reacional, ou demandar etapas adicionais de recuperação/purificação do bioproduto do meio fermentado. Adicionalmente, o uso de rejeitos pode implicar em modificação das propriedades do biopolímero, tornando seu uso impróprio para algumas aplicações (ISRAILIDES *et al.,* 1994). Portanto, é imprescindível estudar as características do biopolímero obtido, principalmente em termos de heterogeneidade e massa molar, quando produzida a partir de meios de elevada complexidade.

No caso em questão, a complexidade metabólica do fungo produtor de pululana permite o emprego de diferentes matérias-primas, o que possibilita o desenvolvimento de bioprocesso eficiente do ponto de vista econômico e ambiental. Comercialmente, a produção de pululana por via fermentativa tem sido realizada no Japão e Estados Unidos. A *Hayashibara International Inc*. (empresa japonesa) produz a pululana utilizando como substrato xarope de milho (FDA, 2002). No Brasil, ainda não existe tecnologia desenvolvida, e os trabalhos experimentais ainda são incipientes. Por isso, é importante desenvolver um processo economicamente viável com a finalidade de capacitar a produção de pululana utilizando matérias-primas abundantes na região de produção, e de baixo custo, inclusive rejeitos, mas que não venham a onerar os custos relativos aos processos de *downstream* (BORGES *et al.*, 2004).

Em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2010) foram avaliadas duas linhagens de *A. pullulans* – IOC 3011 e IOC 3467 – ambas obtidas da Coleção de Cultura do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos/IOC, sob coordenação da Dra. Maria Inez de Moura Sarquis. Para as linhagens, foram testadas algumas fontes de nitrogênio em diferentes concentrações, em meio contendo açúcar cristal como principal fonte de carbono, na concentração inicial de 30 g/L. A produção de pululana foi avaliada empregando $(NH_4)_2SO_4$ (fonte de nitrogênio usualmente adotada para produção de biopolímero por *A. pullulans*), e também pelo emprego de $NaNO_3$, NH_4NO_3, ureia e levedura residual cervejeira (LRC) (LAZARIDOU, 2003; LIN; ZHANG; THIBAULT, 2007). As concentrações foram estabelecidas de modo a obter relações carbono/nitrogênio (C/N) de 5, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 g/g. Nas condições ensaiadas, a utilização da linhagem IOC 3011 em meio constituído de açúcar e LRC, na relação C/N de 100, permitiu alcançar os maiores valores de rendimento e viscosidade. O controle do pH também foi estudado através da adição de tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio, de acordo com Morita e Assumpção (1968), e notou-se que houve incremento dos valores de rendimento e viscosidade, além de redução de pigmentação.

Adicionalmente, a equipe vem, há vários anos, pesquisando sobre a possibilidade de usar a LRC na formulação de mostos para a obtenção de produtos comerciais. O primeiro estudo demonstrou a possibilidade do emprego de levedura residual cervejeira para produção industrial do bioinseticida de *Bacillus sphaericus*.

A partir dos resultados obtidos, uma empresa nacional passou a fazer uso desse rejeito para a produção industrial de boinseticida.

No presente estudo foi dada ênfase à definição das melhores condições de cultivo para maximização da produção de pululana a partir de açúcar cristal e do rejeito da indústria cervejeira (LCR), levando em consideração as características químicas e físicas dos biopolímeros produzidos. E, assim, estabelecer a influência das condições nutricionais/ambientais no rendimento, produtividade, viscosidade e massa molar do biopolímero.

Neste contexto, o **objetivo geral** da Tese foi determinar as propriedades dos biopolímeros produzidos por linhagens de *Aureobasidium pullulans* – provenientes de Coleção de Cultura Internacional – empregando açúcar-cristal, matéria-prima comercialmente disponível e relativamente de baixo custo na região sudeste do Brasil, e resíduo da indústria cervejeira (LRC) – biomassa esgotada do processo fermentativo – em diferentes condições de cultivo, para bioprocesso conduzido em frascos agitados e em biorreator.

Objetivos específicos:

- Selecionar a linhagem microbiana com base na produção do biopolímero, morfologias macro e microscópica da cultura e cogeração de pigmento;
- Definir as concentrações iniciais de carbono e nitrogênio mais indicadas para produção de pululana através de Planejamento Experimental, tendo como variáveis reposta a viscosidade, o rendimento e a massa molar;
- Determinar a influência da razão aeração/agitação na produção de biopolímero em biorreator;
- Realizar a caracterização físico-química dos biopolímeros obtidos em cada uma das etapas;
- Avaliar a citotoxicidade do biopolímero obtido e da pululana comercial padrão.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biopolímeros/Polissacarídeos

Os biopolímeros podem ser definidos como macromoléculas, de elevada massa molar (superior à 10^4 g/mol), constituídas por monômeros ligados covalentemente, que são sintetizadas por organismos vivos (STEINBÜCHEL, 2003; KOLYBARA; TABIL; PANIGRAHI, 2004). A Tabela 1 apresenta biopolímeros encontrados na natureza e respectivas funções (ALLAN *et al*., 1993; STEINBÜCHEL, 2003).

Tabela 1. Biopolímeros encontrados na natureza e suas funções

Polímero	Monômero	Funções
Ácidos Nucléicos (DNA e RNA)	Nucleotídeos	Carrega as informações genéticas
Proteínas	Aminoácidos	Catálise biológica (enzimas), fatores de crescimento, materiais estruturais (lãs, couro, seda, cabelo, tecido conectivo), hormônios (insulina), toxinas, anticorpos
Polissacarídeos (carboidratos)	Monossacarídeos	Material estrutural de plantas e organismos superiores (celulose, quitina), armazenamento de energia (glicogênio, amido), secreções microbianas
Polihidroxialcanoatos	Ácidos graxos	Reserva de energia de micro-organismos
Polifenóis	Fenóis	Materiais estruturais em plantas (lignina), estrutura do solo (húmus, turfa), mecanismo de defesa em plantas (taninos)
Polifosfatos	Fosfatos	Materiais inorgânicos para armazenamento de energia
Polissulfetos	Sulfetos	Materiais inorgânicos para armazenamento de energia

Fonte: ALLAN *et al*. (1993); STEINBÜCHEL (2001).

Quanto à estrutura química, os biopolímeros são classificados em polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas (PRADELLA, 2006). Têm em comum o fato de todos serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis.

Os polissacarídeos se destacam pela complexidade estrutural, visto serem constituidos de dezenas, centenas, ou mesmo, milhares de unidades de um único ou de diferentes tipos de monossacarídeos, unidos entre si através de ligações glicosídicas, constituindo longas cadeias com massa molar superior a 10^6 g/mol (BOBBIO; BOBBIO, 1992a). Estas macromoléculas diferem entre si na composição química, no tipo de ligação glicosídica, no grau de ramificação e no comprimento de suas cadeias laterais (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINÉZ, 1996; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006). Por isso, existe uma grande diversidade estrutural das moléculas sintetizadas pelos micro-organismos, o que permite que apresentem distintas propriedades funcionais. Segundo Chaves (2000), 20 diferentes açúcares foram identificados em polissacarídeos de origem biológica, garantindo uma diversidade de propriedades físicas e químicas e, por conseguinte, uma vasta gama de aplicações.

Quanto à natureza química, os polissacarídeos podem ser classificados em: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (RODRIGUES, 2003). Os homopolissacarídeos são constituídos por apenas um tipo de unidade monomérica, enquanto que os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de monossacarídeos.

Os polissacarídeos ainda podem diferir quanto ao arranjo das moléculas, podendo se apresentar em formas linear ou ramificada (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006). No entanto, a maioria dos polissacarídeos apresenta estrutura ramificada, como é o caso do amido e do glicogênio. Cabe ressaltar que também a estrutura da macromolécula tem influência no seu comportamento em solução aquosa. Por exemplo, grandes variações no grau de ramificação podem afetar a solubilidade dos polímeros (SUTHERLAND, 1998). Tem-se ainda que o aumento no teor de ramificações reduz a cristalinidade, o que resulta em alteração das características mecânicas dos polímeros. Em geral, à medida que aumenta a quantidade de ramificações, a estrutura torna-se mais compacta, ou seja, sua superfície diminui e, consequentemente, diminui sua rigidez e aumenta a sua solubilidade em água (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006).

Também pode haver diferenciação quanto ao tipo de ligação – α e β – entre as unidades de monossacarídeos (BARBOSA *et al*., 2004). O tipo de ligação está diretamente relacionado à flexibilidade da cadeia. Por exemplo, ligações do tipo β conferem maior rigidez estrutural do que as ligações do tipo α (BARBOSA *et al*., 2004; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006). Adicionalmente, a presença de ligações glicosídicas, α ou β, do tipo (1→6) em homopolissacarídeos lineares confere um aumento da solubilidade, devido à grande liberdade de rotação entre as unidades monoméricas, já que a energia necessária para rotação em torno do átomo de carbono nas posições C-5 e C-6 é baixa (WHISTLER, 1973 *apud* LOPES, 1989; SUTHERLAND, 1998; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004).

Ademais, as glucanas extracelulares do tipo β, particularmente glucanas β-(1→3), apresentam atividade antitumoral, o que não se verifica para glucanas do tipo α (SCHIMID *et al*., 2001). Esta atividade está relacionada à conformação em tripla hélice, embora a complexidade da ramificação lateral e massa molar da glucana igualmente influenciem nas suas características.

Os polissacarídeos também podem ser diferenciados quanto à carga iônica, em função da presença de grupamentos como carboxila, fosfato, sulfato e amina. Em função da carga iônica, os polissacarídeos são classificados como: aniônicos, neutros e catiônicos (MARGARITIS; PACE, 1985). Em geral, os polissacarídeos neutros, como é o caso da pululana, apresentam solubilidade relativamente baixa, em decorrência da presença de grande número de ligações hidrogênio que estabilizam as interações inter e intracadeias (RINAUDO, 2001).

No ambiente natural, os polissacarídeos podem estar associados à interação do micro-organismo com o hospedeiro, à proteção da célula microbiana contra dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários. Contudo, as principais funções dos polissacarídeos para micro-organismos e demais seres vivos são: suporte estrutural e reserva energética (NELSON; COX, 2002).

Em termos energéticos, os homopolissacarídeos mais relevantes são o amido e o glicogênio, principais reservas das plantas/algas e animais/micro-organismos (bactérias e fungos), respectivamente. O amido, constituído por cerca de 1.400 unidades de glicose, é composto por dois polissacarídeos: α-amilose (polímero linear

composto por uma cadeia sequencial de monômeros unidos por ligações α-(1→4)) e amilopectina (polímero ramificado por ligações α-(1→4) e ramificações α-(1→6) em intervalos de 24 a 30 unidades).

Como polissacarídeos estruturais, são exemplos a celulose e a quitina. A celulose, macromolécula de maior preponderância na natureza, formada por cadeias lineares de D-glicose (300 a 1500 unidades), unidas por ligações β-(1→4), é a base estrutural das paredes celulares das plantas e de alguns micro-organismos (MORAIS; CAMPANA-FILHO, 1999). A quitina, formada por unidades de acetilglicosamina, está presente no exoesqueleto dos artrópodes e nas paredes celulares dos fungos (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004; CAMPANA-FILHO *et al*., 2007; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de fontes usuais de polissacarídeos. Como pode ser constatado na tabela, os polissacarídeos de interesse industrial podem ser obtidos a partir de diferentes fontes: (i) macroalgas (ex.: agaranas, carragenanas e alginatos); (ii) plantas superiores, compreendendo exsudatos (goma arábica, goma ghati, tragacante, caraia); sementes (guar, alfarroba e tamarindo); frutos (pectinas); tubérculos e cereais (amido e inulina); (iii) animais (ácido hialurônico, heparina, quitina, quitosana); (iv) líquens e fungos (galactomananas e galactoglucomana, nigerana, isoliquenanas, acrocifananas, pululanas, pseudonigeranas, laminarana, pustulana e liquenanas); e (v) bactérias (xantana, gelana, dextrana, alginato, ácido hialurônico) (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

Quadro 1. Exemplos de polissacarídeos e respectivas fontes

Origem	Polissacarídeo	Fonte
Algas	Alginatos	Algas pardas
	Agaranas	Algas vermelhas
	Carragenanas	
Exsudatos de Plantas	Goma Arábica	*Acacia* spp.
	Tragacante	*Astragalus* spp.
Sementes	Guar	*Cyamopis tetragonolobus*
	Alfarroba	*Ceratonia siliqua*
	Tamarindo	*Tamarindus indica*
Frutas	Pectinas	Maçãs, laranjas
Tubérculos, cereais	Amido	Milho, trigo, batatas
	Inulina	Chicória, *Jerusalem artichokes*
Animais	Ácido hialurônico	Humor vítreo de bovinos, cristas de galináceos
	Heparina	Pulmão de bovinos e intestinos de porcinos
	Quitina	Carapaças de crustáceos
	Quitosana	
Fungos	Glucanas	*Pleurotus ostreatus, Agaricus blazei Aureobasidium pullulans*
Bactérias	Xantana	*Xanthomonas* spp.
	Dextrana	*Leuconostoc* spp.
	Gelana	*Sphingmonas elodea*

Fonte: CUNHA; DE PAULA; FEITOSA (2009).

3.2. Polissacarídeos microbianos

As primeiras observações sobre a ocorrência de polimerização foram realizadas em 1813, com caldo de cana-de-açúcar e suco de beterraba. Estes líquidos, se não processados rapidamente, tomavam uma consistência de xarope, o que dificultava as etapas posteriores – filtração e cristalização – para a separação do açúcar (MAUGERI FILHO, 2001). Somente quase 50 anos depois, foi demonstrado por Pasteur ser a polimerização resultante da ação de micro-organismos, responsável pelo aumento da viscosidade nestes produtos (BARBOSA *et al*., 2004).

Os polissacarídeos microbianos podem ser intracelulares, constituintes de parede celular, ou extracelulares; os quais são referendados como exopolissacarídeos (EPS) (RODRIGUES, 2003). Comparativamente, os EPS têm maior interesse comercial por ser sua recuperação facilitada, posto que envolve apenas a sua precipitação direta do meio reacional, sem a necessidade de tratamento de lise (rompimento) da parede celular para extração do bioproduto (MAUGERI FILHO, 2001).

O primeiro EPS microbiano obtido por fermentação foi a dextrana, primeiramente descrita por Scheibler em 1874 (BARBOSA *et al*., 2004). Porém, somente em meados do século XX, Grönwall e outros pesquisadores descreveram o seu uso e o processo fermentativo de fabricação. Pode-se dizer que foi a partir da dextrana que teve início o desenvolvimento de tecnologias para a produção de EPS.

Atualmente, conta-se com várias publicações científicas demonstrando o potencial emprego de diferentes espécies microbianas na produção de EPS, especialmente para procariontes (SUTHERLAND, 2001; MOREIRA *et al*., 2005, SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; BERWANGER *et al*., 2006; MAHAPATRA; BANERJEE; 2013; LI *et al*., 2014; MA *et al*., 2014). A maioria dos EPS produzidos por via microbiana é hidrossolúvel (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Porém, apresentam diferenciadas propriedades estruturais, físicas e químicas, a depender principalmente da espécie/linhagem produtora, da composição do meio e das condições ambientais de cultivo. Por sua vez, as diferentes propriedades dos biopolímeros propiciam aplicações variadas, nos mais distintos segmentos, tais como, indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas, entre outras (BERWANGER *et al*., 2006; CANILHA *et al.*, 2006).

A Tabela 2 apresenta alguns biopolímeros microbianos, micro-organismos produtores e suas respectivas características e funções.

Tabela 2. Polissacarídeos de origem microbiana e suas características

Polissacarídeo	Origem	Monossacarídico	Propriedade	Aplicação
Dextrana	*Leuconostoc mesenteroides**	Glicose	geleificante, espessante, estabilizante	Modificadores de viscosidade, indústria fotográfica, açúcar dietético, recheio de colunas cromatográficas, uso em medicina
Xantana	*Xanthomonas campestris**	Glicose, manose e ácido glucurônico	geleificante, espessante, estabilizante	Molhos e xaropes, pasta de dente, pães, cosméticos, produtos agrícolas, tintas, perfuração de poços de petróleo
Gelana	*Sphingomonas elodea**	Glicose, ácido glucurônico e ramnose	geleificante, espessante	Doces, geleias, gelatinas, bebidas lácteas
Pululana	*Aureobasidium pullulans***	Glicose	filme adesivo	Excipiente em comprimidos, revestimento na indústria alimentícia
Curdlana	*Agrobacterium* spp*; *Alcaligenes faecalis**	Glicose	Espessante, geleificante térmico	Indústria alimentícia

* Bactéria; ** Fungo.
Fonte: PRADELLA (2006); JIANG (2013).

As gomas dextrana, xantana e gelana são praticamente os únicos EPS de origem microbiana comercializados em escala industrial (MAUGERI FILHO, 2001). Dentre estas, a goma xantana, cujo uso em alimentos foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), a partir de julho de 1969, teve relevada importância no mercado de polímeros com emprego em diferentes segmentos industriais (SUTHERLAND, 2001; FDA, 2002).

Como apresentado na Tabela 2, também os fungos são produtores de EPS, embora em menor grau em comparação às bactérias. Para os fungos, os polissacarídeos são constituintes de grande parte do seu arcabouço estrutural. Por exemplo, mais de 75% da parede da hifa corresponde a polissacarídeos, notadamente celulose e quitina. Além disso, alguns polissacarídeos são formados extracelularmente ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas e participando como uma fonte indireta de peróxido de hidrogênio na degradação de lignina (BARBOSA *et al*., 2004). As glucanas também podem contribuir para manter o pH ótimo para as enzimas ligninolíticas, e ainda contribuem impedindo a desidratação das hifas e regulando a concentração de glicose extracelular (CORRADI DA SILVA *et al.,* 2006).

Várias espécies fúngicas foram relatadas pela capacidade de produção de polissacarídeos. Como exemplo, um levantamento feito por Barbosa e colaboradores (2001), a partir de dados de Seviour e colaboradores (1992), e por Corradi da Silva e colaboradores (2006), embora desatualizado, mostra a diversidade de fungos com capacidade de produção de EPS; a maioria consistindo de homopolissacarídeo de glicose com ligações tipo β. A espécie *A. pullulans* é uma das poucas exceções, posto que sintetiza glucana, cujos monômeros estão unidos por ligações do tipo α. Em contraste com os EPS formados por ligações do tipo β, as α-glucanas conferem menor rigidez à estrutura, o que resulta em aumento da flexibilidade e da solubilidade (BARBOSA *et al*., 2004; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006, LEATHERS, 1986 *apud* CHI *et al*., 2009).

O Quadro 2 apresenta um levantamento de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos produzidos por fungos.

Quadro 2. Exopolissacarídeos produzidos por fungos

Fungo	Monossacarídeo (s)	Ligação glicosídica	Referências
Acremonium diospyri	Glicose	β -(1→3), β-(1→6), β(1→4)	SEVIOUR; HENSGEN (1983)
Acremonium persicinum	Glicose	β-ligações	STASINOPOULOS; SEVIOUR; AUE (1989)
Amanita muscaria	Glicose	α-(1→3)	KIHO *et al.* (1994)
Alternaria solani	Glicose galactose, glicosamina	β-(1→3)	GOATLEY (1968)
Aspergillus flavus	Manose, galactose	β-(1→2)	KARDOSOVÁ; ROSÍK (1981)
Aspergillus nidulans	Galactosamina, acetato, galactose	α-(1→3)	LEAL; RUPÉREZ (1978)
Aureobasidium pullulans	Glicose, malato	β-(1→3), β-(1→6)	LEAL-SERRANO *et al.* (1980)
	Glicose	α-(1→4), α-(1→6)	SCHMIDT *et al*. (2001); KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL (2003)
Aureobasidium pullulans ATCC 9348		α-(1→6)	GIBBS; SEVIOUR (1996)
		α-(1→6)	GIBBS; SEVIOUR (1998)
Aureobasidium pullulans aubasidani		β-(1→3), β-(1→6), α-(1→4)	YURLOVA; HOOG (1997)
Aureobasidium pullulans NRRLY-6220		α-(1→6)	BARNETT *et al.* (1999)
Aureobasidium pullulans P56		α-(1→6)	SCHUSTER *et al.* (1993)
Botryosphaeria rhodina	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI (2002)
Botryosphaeria sp	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	BARBOSA *et al*. (2003)
Botrytis cinerea	Glicose	β-(1→3), β-(1→6), β-(1→4)	LEAL *et al.* (1978)
Botrytis cinerea	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	DUBOURDIEU *et al.* (1981)
Claviceps fusiformis	Glicose	β-(1→3), com ramificações	BUCK *et al*. (1968)
Epicoccum purpurascens	Glicose	ligações β	MICHEL *et al.* (1987)
Fusarium solani	Manose, galactose, glicose, pentose	desconhecida	POLYCARPO *et al.* (1997)
Glomerella cingulata	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	GOMAA *et al.* (1992)
Helotium sp	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	DAVIS *et al*. (1965)

Quadro 2. Exopolissacarídeos produzidos por fungos (continuação)

Fungo	**Monossacarídeo (s)**	**Ligação glicosídica**	**Referências**
Laetisaria arvalis	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	AOUADI *et al.* (1991)
Microdochium nivale	Glicose	β-(1→4)	SCHWEIGER-HUFNAGEL *et al.* (2001)
Monilinia fructicola	Glicose	β-(1→3), β-(1→4)	FEATHER; MALEK (1972)
Monilinia fructigena	Manose, galactose	β-(1→4), β(1→2); ligações α	ARCHER *et al.* (1977)
	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	SANTAMARIA *et al.* (1978)
Paecilomyces lilacinus	Glicose, galactose	desconhecida	SARKAR; HENNEBERT; MAYAUDON (1986)
Penicillium erythromellis	Glicose, malonato	β-(1→6)	RUPÉREZ *et al.* (1983)
Pestalotia sp *815*	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	MISAKI *et al.* (1984)
Phanerochaete chrysosporium	Glicose, arabinose	β-(1→3), β-(1→6)	BES *et al.* (1987)
	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	BUCHALA; LEISOLA (1987)
Phoma herbarum	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	SELBMANN; CROGNALE; PETRUCCIOLI (2002)
Phytophthora parasitica	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	BRUNETEAU *et al.* (1995).
Plectonia occidentalis	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	DAVIS *et al.* (1965)
Pleurotus ostreatus	Glicose, manose, galactose	desconhecida	HUSSAIN; PRIETO; MARTINEZ (1996)
Pleurotus tuber-regium	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	CHENGHUA *et al.* (2000)
Poria cocos	Glicose, galactose, manose	β-(1→3), α-(1→3)	JIN *et al*. (2003)
Schizophyllum commune	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	KIKUMOTO *et al.* (1969); MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI (1999)
Sclerotium glucanicum	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	JOHNSON *et al*. (1963)
Sclerotium rolfsii ATCC *201126*	Glicose	β-(1→3), β-(1→6)	FARIÑA *et al.* (1998)
Stereum strigoso-zonatum	Manose, galactose	desconhecida	BENDER (1975)
Tremella mesenterica	Glicose	α-(1→4), α-(1→6)	SERVIOUR *et al.* (1992)
Ulocladium atrum	Manose, arabinose, glicerol	β-(1→3), β-(1→6)	MARTÍNEZ *et al.* (1998)

Fonte: adaptado de Barbosa *et al.* (2001); Corradi da Silva *et al*. (2006).

Segundo o trabalho de revisão publicado por Corradi da Silva e colaboradores (2006), vários dos EPS produzidos por fungos ainda não foram adequadamente explorados, embora muitos apresentem propriedades reológicas de interesse comercial. Segundo estes autores, dentre os polissacarídeos fúngicos, escleroglucana e pululana merecem destaque para aplicação, já sendo produzidos industrialmente em alguns poucos países.

Nota-se que ainda não existe interesse de exploração comercial da maioria dos EPS microbianos descobertos, ainda que sejam aceitos como produtos biotecnológicos. Basicamente, isto é motivado por: patogenicidade do microrganismo produtor; qualidade do produto, em geral, não se mantém em fermentações subsequentes; e não aceitabilidade do produto (CORRADI DA SILVA *et al.,* 2006). Contudo, a principal desmotivação é o custo relativamente elevado de produção para a maioria dos EPS microbianos quando comparados àqueles obtidos a partir da extração de vegetais e de algas marinhas.

No caso dos polímeros já produzidos em escala industrial, a relação custo/benefício se justifica pelas propriedades químicas e físicas únicas ou superiores às dos polissacarídeos tradicionalmente comercializados (SUTHERLAND, 2001; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006). Dentre as propriedades de interesse, pode-se citar: alta viscosidade, elevado poder geleificante, compatibilidade com uma grande variedade de sais em ampla faixa de pH e de temperatura, estabilidade em elevadas concentrações iônicas, alta solubilidade em água, e sinergia com outros polissacarídeos.

O exposto reforça a importância da área de biopolímeros, cujo desenvolvimento tecnológico ainda carece de estudos. Particularmente, em face do interesse em substituir os polímeros não biodegradáveis, com uso intensivo em diferentes áreas, cujo acúmulo tem sido apontado como uma das principais causas de impacto ambiental. Neste contexto, deve ser focado o desenvolvimento de processos econômicos para a produção de EPS (AMASS *et al.*, 1998; BORGES *et al.*, 2004; BERWANGER *et al*., 2006; KHAN; PARK; KWON, 2007; SHARMA; PRASAD; CHOUDHURY, 2013; SUGUMARAN *et al*., 2013).

3.3. Pululana

As primeiras observações da síntese de polímero extracelular pelo fungo *Aureobasidium pullulans* foram feitas em 1938 por Bauer (REKHA; SHARMA, 2007). No entanto, apenas em 1958, Bernier fez o isolamento deste polissacarídeo, o que permitiu a sua caracterização. No ano seguinte, Bender, Lehmann e Wallenfels (1959) demonstraram se tratar de uma nova glucana, a qual foi por eles nomeada “pululana”. Contudo, a estrutura básica da pululana, tal como é conhecida na atualidade, só foi determinada nos anos 60.

Na literatura, o termo “pululana” é utilizado para descrever as moléculas de “polimaltotriose” produzidas por *Aureobasidium pullulans,* bem como os polissacarídeos, estruturalmente semelhantes à pululana, que são produzidos por outros micro-organismos (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008).

A pululana é um homopolissacarídeo neutro linear, com fórmula química geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, e massa molar variando de 5 x 10^3 a 2 x 10^6 g/mol (SLODKI; CADMUS, 1978; SINGH; SAINI, KENNEDY, 2008). Segundo Lee e colaboradores (1999), a pululana é um dos poucos polissacarídeos microbianos neutros solúveis em água que pode ser produzido em grande quantidade por fermentação.

Distintamente da maioria dos exopolissacarídeos produzidos por fungos, o polissacarídeo produzido por *A. pullulans* é uma glucana, com ligações glicosídicas do tipo α. A Figura 1 apresenta a estrutura química da pululana, mostrando as unidades de maltotriose – constituídas por três unidades de glicose ligadas entre si por ligações α-(1→4) – que se encontram interconectadas via ligações α-(1→6). A relação molar das ligações α-(1→4) e α-(1→6) é de 2:1 (GORIN, 1981). A alternância regular das ligações α-(1→4) e α-(1→6) conferem à molécula flexibilidade estrutural e aumento da solubilidade (ANGIOLETTI, 2003 *apud* SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; LEATHERS, 1986 *apud* CHI et *al*., 2009). Isto porque, como previamente mencionado, as ligações do tipo (1→6) em homopolissacarídeos lineares permitem grande liberdade de rotação entre as unidades monoméricas (LOPES, 1989; TYLIANAKIS *et al*., 1999; MOTAWIA *et al*., 2005).

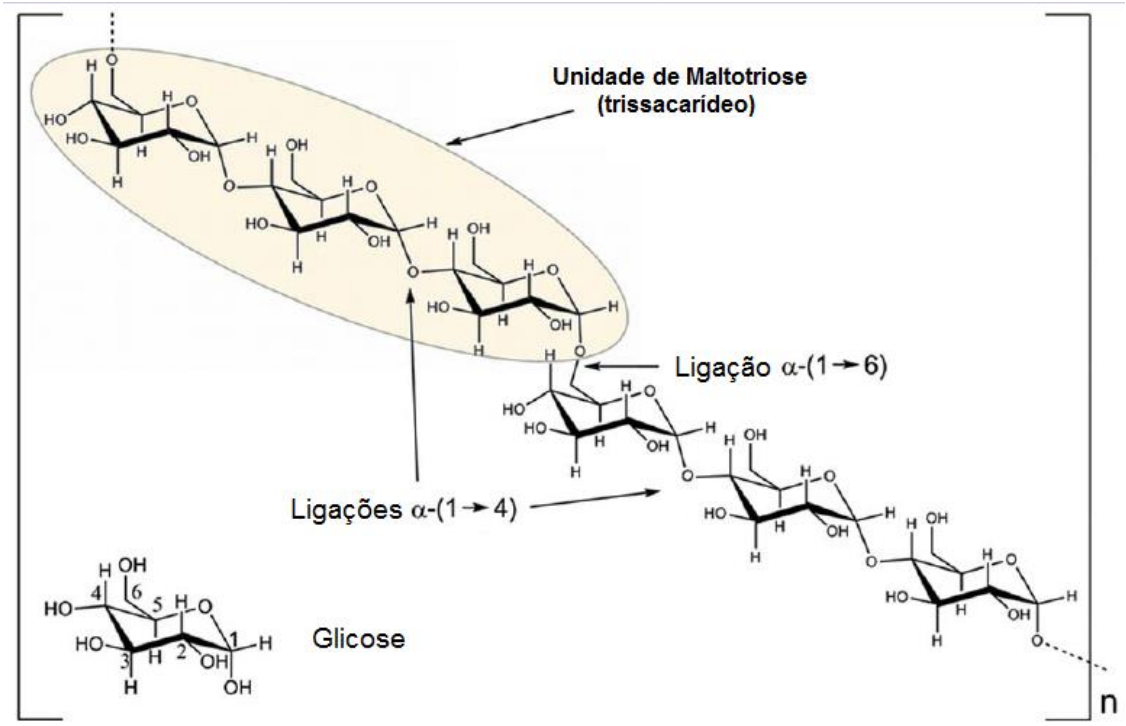


Figura 1. Estrutura química representativa da pululana, destacando a unidade repetitiva de maltotriose.
Fonte: adaptado de FARRIS *et al*. (2014).

Na literatura consultada, não foi encontrada nenhuma publicação descrevendo a biossíntese completa da pululana por *A. pullulans*. Portanto, enquanto todas as etapas envolvidas na biossíntese não forem elucidadas, será difícil incrementar o rendimento e a produtividade de pululana por manipulação genética (DUAN *et al*., 2008; CHI *et al*., 2009).

De acordo com Catley e McDowell (1982), *A. pullulans* incorpora glicose marcada com C^{14} em lipídeo, glicose, isomaltose, panose e isopanose. Os autores sugerem que a pululana resulta da polimerização da panose e da isopanose, ou que a conjugação de ambos leve à formação da maltotriose. No entanto, nenhuma das enzimas envolvidas na biossíntese de pululana foi identificada.

Outros autores indicam ser a síntese da pululana dependente de glicose-UDP, da atividade de glicosiltransferase e de ATP, e que segue o metabolismo dos lipídeos (UEDA; KONO, 1965 *apud* CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011; TAGUCHI *et al*., 1973 *apud* CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011; ONO *et al*., 1977 *apud* CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). A dependência pela glicose-UDP foi corroborada posteriormente por Shingel (2004) e por Duan e colaboradores (2008).

Segundo Leathers (2003), o único ponto considerado realmente certo é que, ao contrário das dextranas bacterianas que são sintetizadas extracelularmente, a pululana é sintetizada intracelularmente e, em seguida, excretada por *A. pullulans*.

3.3.1. Mercado e aplicação da pululana

As primeiras patentes indicando o emprego industrial de pululana surgiram em 1967. Naquela época, eram sugeridas aplicações, tais como, agente floculante na produção de papel e tinta, e substituto biodegradável da fibra de nylon, de poliestireno ou de poli(álcool vinílico) (PRADELLA, 2006).

Comercialmente, a produção de pululana por via fermentativa é feita pelas empresas *Sigma Chemical Co*. (Estados Unidos) e *Hayashibara Biochemical Co*. (Japão) (MAUGERI FILHO, 2001; ALLAN *et al*., 1993; SIMON; CAYE-VAUGEN; BOUCHONNEAU, 1993; CANILHA *et al*., 2006). A produção de pululana pela *Hayashibara* teve início em 1976 (REKHA; SHARMA, 2007) quando, segundo Pradella (2006), foram produzidas 300 t/ano, com preço variável, US$ 20 - 25/kg, de acordo com as especificações do produto final.

Atualmente, o mercado dispõe de três tipos de pululana – grau industrial, grau alimentício e grau farmacêutico – nas formas de pó e de filme. A distinção entre os produtos comercializados se deve ao grau de pureza e à massa molar (PRADELLA, 2006).

A massa molar da pululana influencia sobremodo a aplicação da pululana. Por exemplo, para aplicação farmacêutica, mais especificamente em medicamentos de uso parenteral (injetáveis), uma baixa massa molar é requerida (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Para uso como expansor de plasma, a massa molar deve ser em torno de 60 kDa (PRAJAPATI *et al*., 2013). No caso de ser usada no setor alimentício, a massa molar deverá ser em torno de 10^5 g/mol. De fato, a massa molar da pululana produzida por via microbiana possibilita seu emprego na maioria das aplicações industriais (KIM *et al*., 2000).

A concentração do EPS, massa molar e propriedades físicas, tais como viscosidade e solubilidade, são características da linhagem produtora, mas também podem ser alteradas variando as condições de cultivo, principalmente a depender das fontes de carbono e de nitrogênio empregadas e dos parâmetros ambientais (CUNHA, 2002). Portanto, é possível obter pululana para diversos tipos de aplicações (KHAN; PARK; KWON, 2007; ZHANG *et al*., 2009). Um exemplo, é seu emprego em alimentos e bebidas de baixa caloria, com o propósito de lhes atribuir consistência/textura.

Como a maioria dos biopolímeros microbianos, a aplicação da pululana está relacionada às suas propriedades como ligante, espessante e estabilizante. Destaca-se ainda que as soluções de pululana não são afetadas por variações de pH, calor e salinidade, o que as distinguem dos demais hidrocolóides conhecidos (FDA, 2002; LAZARIDOU *et al*., 2002a; LAZARIDOU *et al*., 2003). Além disso, as pululanas podem ser quimicamente modificadas por reações de cloração, sulfatação, esterificação, eterificação, carboxilação, acetilação, entre outras, a fim de melhorar suas propriedades, direcionando o seu desempenho. Por exemplo, pululanas esterificadas são menos susceptíveis ao ataque enzimático (SUTHERLAND, 1998).

A pululana e seus derivados têm se mostrado efetivos nas mais diversas aplicações (CHI *et al*., 2009; KUMAR *et al.,* 2012). A seguir, alguns exemplos de aplicação da pululana.

3.3.1.1. Indústria alimentícia

O relatório *Generally Recognized as Safe* (GRAS) de apoio à utilização segura de pululana em alimentos foi elaborado pela *Hayashibara International Inc*. E *B. Lee Dexterand Associates* e posteriormente analisado por um painel de peritos qualificados por treinamento e com experiência para avaliar a segurança do material polimérico. O relatório teve como base estudos de toxicologia animal, envolvendo: histórico de vinte anos de consumo no Japão; inexistência de relatos de intoxicação; a semelhança da pululana com outras outras substâncias alimentares GRAS, como por exemplo, a amilopectina; e um grande número de publicações (FDA, 2002).

Na indústria alimentícia, a pululana é principalmente empregada no preparo de molhos para saladas e alimentos pré-cozidos, em face da sua capacidade de formar

filmes, o que garante que o molho fique aderido à superfície dos alimentos (SUTHERLAND, 1998). A capacidade de formar filmes também propicia seu emprego na decoração de doces e produtos de panificação, e no acabamento de chocolates, de gomas de mascar e de balas, entre outros. Normalmente, a pululana é o polissacarídeo mais empregado com tal fim por promover maior aderência e brilho, sem alterar odor, sabor, e poder calórico do alimento (por não ser degradada pela α-amilase, enzima presente em mamíferos).

O emprego da pululana como revestimento de alimentos ainda contribui para a inibição do crescimento microbiano (KANDEMIR *et al*., 2005; GOUNGA *et al*., 2008). Isto porque, ao formar um filme sobre o alimento, atua como barreira ao oxigênio, o que, por sua vez, evita seu escurecimento por oxidação e, por conseguinte, a perda de qualidade do produto. Portanto, filmes de pululana garantem que a aparência do alimento seja mantida por tempo prolongado, conferindo maior estabilidade ao alimento e um tempo maior de prateleira (SEVIOUR *et al*., 1992; DIAB *et el*., 2001; FDA, 2002; KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003; LEATHERS, 2003; CANILHA *et al*., 2006; PRADELLA, 2006; KHAN; PARK; KWON, 2007; CHI *et al*., 2009; CHENG; DEMERCI; CATCHMARK, 2011).

A pululana pode ainda ser usada como aditivo alimentar, como: componente de farinhas; texturizador para presunto, tofu e salsicha; agente potencializador/fixador de aditivos para dar cor e sabor; e como forma de“proteger” o sabor/aroma através da microencapsulação (KHAN; PARK; KWON, 2007).

Também apresenta aplicação como pré-biótico na formulação de alimentos devido a sua capacidade de promover o crescimento seletivo de *Bifidobacterium* spp. no intestino humano (SUTHERLAND, 1998; LEATHERS, 2003).

Leung e colaboradores (2006) patentearam um filme comestível à base de pululana que, associado a óleos essenciais, o torna eficaz como agente antimicrobiano. De acordo com estes autores, o uso desses filmes teve efeito na inativação de micro-organismos produtores de placa dentária, gengivite e mau hálito.

3.3.1.2. Indústria de plásticos

A pululana pode ser comprimida e moldada sem o auxílio de plastificantes, dando origem a filmes transparentes biodegradáveis, de alta impermeabilidade ao oxigênio, termicamente estáveis e com propriedades elásticas (LEATHERS, 2003; CANILHA *et al.*, 2006). Por isso, além da comprovada atoxicidade permitir sua aplicação como revestimento comestível, pode ter emprego em artigos moldados (MAUGERI FILHO, 2001).

A pululana pode substituir polímeros sintéticos, particularmente poliestireno e poli(cloreto de vinila), pela similaridade em transparência, dureza, rugosidade e brilho (SUTHERLAND, 1998; PRADELLA, 2006). A aplicação da pululana e de seus derivados já foi patenteada, principalmente por japoneses, que a comparam ao poliestireno e ao poli(álcool vinílico) (NAKASHIO *et al.,* 1975; SANO; UEMURA; FURUTA, 1976; CADE; SCOTT; XIONGWEI, 2001; NIETO, 2012; SCOTT; CADE; XIONGWEI, 2012).

3.3.1.3. Indústria farmacêutica/Medicina

Existem relatos de uma gama de aplicações da pululana nas áreas biomédica e farmacêutica, por conta da sua efetiva ação anticoagulante, antitrombótica e antiviral, especialmente para derivados sufaltados e fosforilados (ALBAN *et al*., 2002; SHIBATA *et al*., 2001 *apud* CHI *et al*., 2009). Isto se deve principalmente às propriedades: são atóxicas, biodegradáveis e não imunogênicas (ZHANG *et al*., 2009).

Também foi demonstrado o potencial deste biopolímero no desenvolvimento de nanoprodutos como sistemas de liberação controlada de drogas para aumentar a biodisponibilidade de produtos pouco solúveis em água e de pequenas massas molares, bem como de macromoléculas tais como proteínas e peptídeos, entre outros (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2001; ZHANG *et al*., 2009; HUSSAIN *et al*., 2013; MOCANU *et al*., 2014; RAVI *et al*., 2014). Muitas empresas farmacêuticas estão explorando essas tecnologias, uma vez que ingredientes ativos de baixa solubilidade não eram usados por serem de difícil formulação. Adicionalmente, como a pululana não é atacada pelas enzimas digestivas do intestino humano, pode ser utilizada como

transportadora para a entrega oral de droga (TSIJISAKA; MITSUSHASHI, 1993 *apud* PRAJAPATI; JANI; KHANDA, 2013).

Além do emprego no encapsulamento de medicamentos, o seu emprego tem sido eficaz na formulação de conjugados não tóxicos de vacinas, particularmente por ser um dos poucos biopolímeros neutros, cujos derivados se mostram muito eficientes (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Tem-se ainda que a ligação covalente entre vírus e pululana estimula notavelmente a produção de anticorpos das imunoglobulinas G e M e diminui a produção de anticorpos da imunoglobulina E, além de promover a inativação do vírus (YAMAGUCHI *et al*., 1985 *apud* SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; MITSUHASHI; KOYAMA, 1987 *apud* SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; SUNAMOTO *et al*., 1987 *apud* SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008).

Considerando a solubilidade da pululana em água, esta ainda pode ser utilizada como substituinte (expansor) do plasma sanguíneo, similarmente à dextrana (que vem sendo utilizada para essa aplicação desde 1944) (TSUJISAKA; MITSUHASHI, 1993). Observou-se que pululana de elevada massa molar (> 60 kDa) mantém o volume de sangue em circulação e sua pressão osmótica em casos de perda maciça de sangue (aumento da pressão venosa) (TSUJISAKA; MITSUHASHI, 1993; SHINGEL; PETROV, 2002; CHENG *et al*., 2010; PRAJAPATI *et al*., 2013). O efeito terapêutico destas preparações é determinado pela massa molar e características de conformação da substância polimérica. Frações de alta massa molar (> 200 kDa) podem provocar reações tóxicas e impedir a normalização da circulação sanguínea (SHINGEL, 2004). Por outro lado, baixas massas molares são rapidamente excluídas do organismo deixando o paciente com choque hemorrágico secundário (PRAJAPATI *et al*., 2013). Portanto, a massa molar e concentração do polímero são ajustadas de modo a obter uma solução com uma viscosidade correspondente à do sangue, o que equivale a uma concentração entre 6 e 10 g/dL de dextrana com massa molar entre 70 e 40 kDa (SHINGEL, 2004).

Por fim, foi demonstrado por Leathers (2003) que a pululana pode atuar como potencializador do efeito do interferon, proteína que está sendo utilizada eficazmente no tratamento de algumas doenças virais, como a hepatite (SUGINOSHITA *et al*., 2001; REKHA; SHARMA, 2007). O interferon não possui afinidade órgão-específica e seu tempo de meia-vida é curto, por isso é feita a administração de altas doses, que

causam efeitos colaterais nos pacientes durante o tratamento. A conjugação do interferon à pululana, a qual possui capacidade de se associar ao fígado, permitiria reduzir a dose administrada ao paciente, mitigando os efeitos colaterais gerados pelo interferon.

3.3.1.4. Indústria de cosméticos

A pululana também dispõe de propriedades – atóxica, excelente capacidade de formar filme transparente, hidrossolubilidade e absorção de água – fundamentais para garantir a eficácia dos cremes para tratamento dermatológico (SINGEL *et al*., 2008).

3.3.1.5. Indústria do petróleo

Na literatura foram encontradas algumas referências quanto ao uso deste biopolímero para melhorar a recuperação de óleo cru (YUEN, 1974; SCHUSTER *et al*., 1993 *apud* MOUBASHERA; WAHSH, 2014). Isto porque a eficiência da recuperação de óleo no primeiro estágio (recuperação primária) é baixa, correspondendo a somente 10 a 30% do volume total de petróleo disponível, dependendo da natureza do reservatório; já que a elevação do petróleo se dá apenas pela pressão natural existente no reservatório. Para a recuperação do óleo restante das rochas porosas, algumas estratégias são adotadas, principalmente injeção de água ou de gases (recuperação secundária). Porém, esses fluidos tendem a percorrer as regiões mais permeáveis, deixando ainda quantidades substanciais de óleo na formação. Neste caso, o aumento da vida econômica do reservatório pode ser alcançado pelo emprego de produtos (recuperação terciária ou avançada), como por exemplo, polímeros (THOMAS, 2001).

A adição de polímero à água de injeção visa aumentar a viscosidade e reduzir a permeabilidade da fase aquosa, de modo a melhorar a relação de mobilidade entre a fase aquosa e a fase oleosa (SUTHERLAND, 1998; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; BARBOSA *et al.*, 2004; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006). Para este fim, o polímero deve apresentar estabilidade em salinidade elevada, alta solubilidade em água (aumentando substancialmente a sua viscosidade, e conduzindo a uma eficiência de varredura mais uniforme), e alta estabilidade térmica (CANTER, 1982); propriedades apresentadas pela pululana.

Com este fim, alguns polímeros sintéticos têm sido empregados como também biopolímeros, em particular a goma xantana. Este biopolímero tem sido o mais utilizado pela indústria petrolífera por suas qualidades, embora seu preço (R$ 40,00 a 60,00/kg) seja considerável em face da quantidade a ser empregada, o fato de ser aniônica e sua viscosidade aumentar com a presença de íons (NAVARRETE *et al*., 2001 *apud* LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

Muitas vezes, para se obter uma maior gama de aplicação satisfatória, alguns polímeros são usados em combinação com outros. A sinergia entre polímeros é de grande interesse comercial, pois além de possibilitar novas funcionalidades, pode reduzir a quantidade de polímeros usados, reduzindo os custos (KATZBAUER, 1998)

3.3.1.6. Técnicas analíticas

A pululana pode ser usada como referência para calibração de substâncias de massas molares de baixa dispersão em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou, em inglês, HPLC, *high pressure liquid chromatography*) (SUTHERLAND, 1998; CANILHA *et al*., 2006).

3.3.1.7. Derivados semissintéticos de pululana

Na Tabela 3 foram listados exemplos de derivados de pululana e respectivas aplicações. No entanto, para uma maior abrangência das novas pululanas, cabe a leitura das publicações de Cheng, Demirci e Catchmark (2011) e de Kumar e colaboradores (2012).

3.4. Micro-organismos produtores de pululana

A pululana é principalmente produzida pela espécie fúngica *Aureobasidium pullulans*, originalmente denominada *Pullularia pullulans* (LEATHERS, 2003). Porém, a produção de pululana não se restringe a esta única espécie. Outros fungos já foram descritos como produtores de pululana (Tabela 4).

Tabela 3. Alguns exemplos de derivados de pululana e respectivas aplicações

Derivados de Pululana (P)	Aplicações atuais/potenciais	Referências
P carboximetilada	Liberação de fármacos (prolongar ação e reduzir a toxicidade)	MAYER *et al*. (1990); BRUNEEL; SCHACHT (1993)
Gel Carboxymethyl P	Curativo antibacteriano	LI *et al*., 2011
Adenina-, Timina-, pireno- P	Agentes tensioativos/espessantes	MOCANU *et al*. (1995)
NPcaps ® cápsulas	Cápsulas de medicamentos	KIMOTO *et al*. (1997)
P anionicamente modificada	Substituto do plasma sanguíneo	SHINGEL; PETROV (2002)
Cinamatos de P	Modelagem da biogênese da parede celular	KAYA *et al*. (2009)
Gel metacrilato de P	Proliferação celular e formação de aglomerados celulares	BAE *et al*. (2011)
Conjugado P-heparina	Engenharia celular/tecidual	NA *et al*. (2003)

Fonte: CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011; KUMAR *et al*. (2012).

Tabela 4. Fontes fúngicas de pululana

Micro-organismo	Referências
Aureobasidium pullulans	BAUER (1938); COOKE (1959); LEATHERS (2003), SUGUMARAN *et al*. (2013)
Tremella mesenterica	FRASER; JENNINGS (1971)
Cytariaharioti; C. darwinii	WAKSMAN *et al.* (1977); OLIVA *et al*. (1986)
Cryphonectriaparasitica	CORSARO *et al*. (1998); FORABOSCO *et al*. (2006); DELBEN *et al*. (2006)
Teloschistes flavicans	REIS *et al*. (2002)
Rhodotorula bacarum	CHI; ZHAO (2003)
Phaeomoniella chlamydospora; P. aleophilum	SPARAPANO; GRANITI (2000) *apud* FORABOSCO *et al*. (2006)

Fonte: adaptado de SINGH; SAINI; KENNEDY (2008); CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, (2011).

3.4.1. *Aureobasidium pullulans*

A espécie fúngica *Aureobasidium pullulans* foi primeiramente isolada por Arnaud em 1918 (PRASONGSUK *et al*., 2005; FORABOSCO *et al*., 2006). Existem

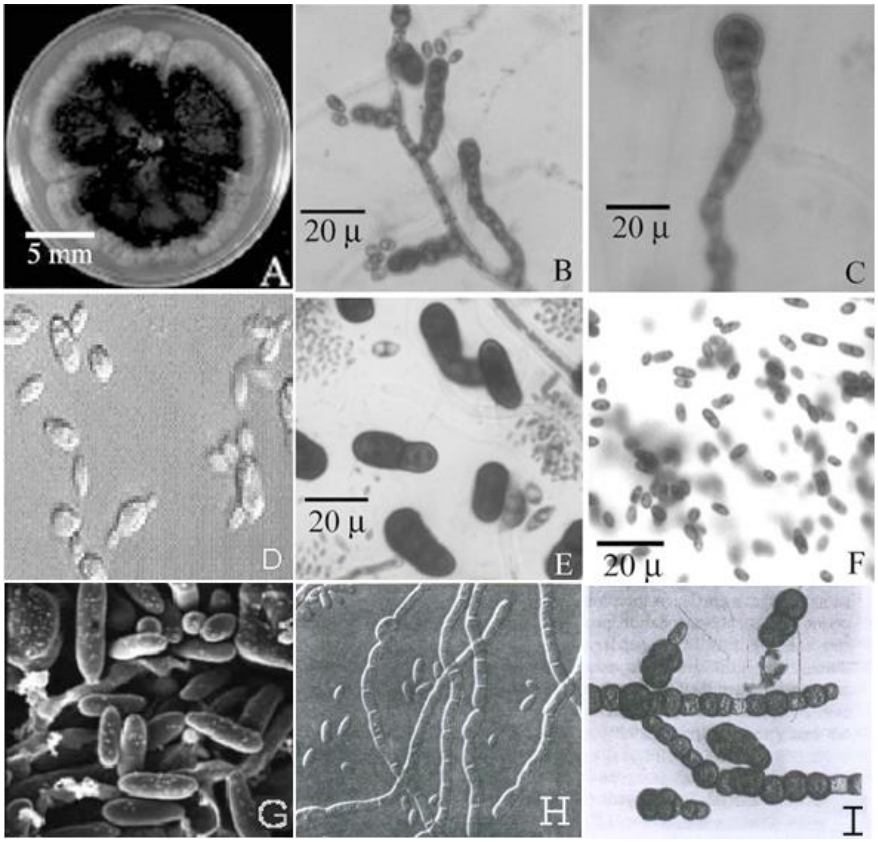
três variantes fisiológicos deste ascomiceto da ordem Dothideales: *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, var. *aubasidani* e var. *melanogenum*. Em geral, as duas primeiras, se diferenciam pelas características moleculares e estruturais dos exopolissacarídeos por elas elaborados, pululana e aubasidana, respectivamente (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; CHI *et al*., 2009). Ambos são homopolissacarídeos, mas a pululana apresenta as unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α-(1→4) e α-(1→6), enquanto que na aubasidana as ligações são β-(1→3), β-(1→6) e α-(1→4) (YURLOVA; HOOG, 1997; SUVOROVA *et al*., 2001; SIBIKINA; IOZEP; PASSET, 2004; CHI *et al*., 2009). *A. pullulans* var. *melanogenum* difere das demais pela aparência verde escuro a preto das colônias jovens, com hifas de paredes espessas escuras, que muitas vezes se desintegram em células separadas. Esta variedade é relatada como um fungo dermáceo, que raramente causa infecções oportunistas (MERSHON-SHIER *et al.*, 2011). Em particular, para esta variedade, não consta referência quanto a sua capacidade de produzir polissacarídeo na literatura consultada, sendo que a maioria dos estudos relacionados à produção de pululana empregam *A. pullulans* var*. pullulans.* Porém vale ressaltar que não são todas as linhagens produtoras de pululana, embora o sejam a maioria delas (UEDA, *et al*, 1963; AUGUSTIN; KUNIAK; HUDECOVA, 1997; LEATHERS *et al*., 1988).

A. pullulans é um fungo ubíquo, podendo ser isolado de solos (inclusive da Antártica), águas, plantas, madeiras, rochas, monumentos e calcário (HAWKES *et al*., 2005; PRASONGSUK *et al*., 2005). Inclusive, existem relatos do seu isolamento de lentes ópticas, cozinhas, banheiros e de áreas em fábricas de papel, além de já ter sido associado a danos em pinturas de interiores (GAUR *et al*., 2010; WEBB et *al*., 2000; HORNER; WORTHAN; MOREY, 2004; SINGH, SAINI E KENNEDY, 2008; CHI *et al*., 2009). De fato, podem ser encontrados onde houver disponibilidade de matéria orgânica uma vez que são seres quimioheterotróficos saprófitos, isto é, obtêm os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento a partir de tecidos de plantas ou animais mortos ou em decomposição (HAWKES *et al*., 2005; PRASONGSUK *et al*., 2005).

É um fungo polimórfico com um ciclo de vida que envolve formas unicelular e filamentosa, e formação de blastosporos e clamidosporos (ROUKAS, 1999;

CAMPBELL *et al*., 2004). Na Figura 2 são ilustradas as diferentes morfologias apresentadas por *A. pullulans.*

Como pode ser visualizado, principalmente pela observação das imagens A, E e F da Figura 2, *A. pullulans* pode apresentar coloração escura, o que é devida à síntese de pigmento (melanina) na parede celular. No entanto, algumas linhagens apresentam pigmentações variadas, como vermelha, amarela, cor-de-rosa e roxa, ou até mesmo, sejam desprovidas de coloração (Figura 3) (HAWKES *et al*., 2005; PRASONGSUK *et al*., 2007; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008).

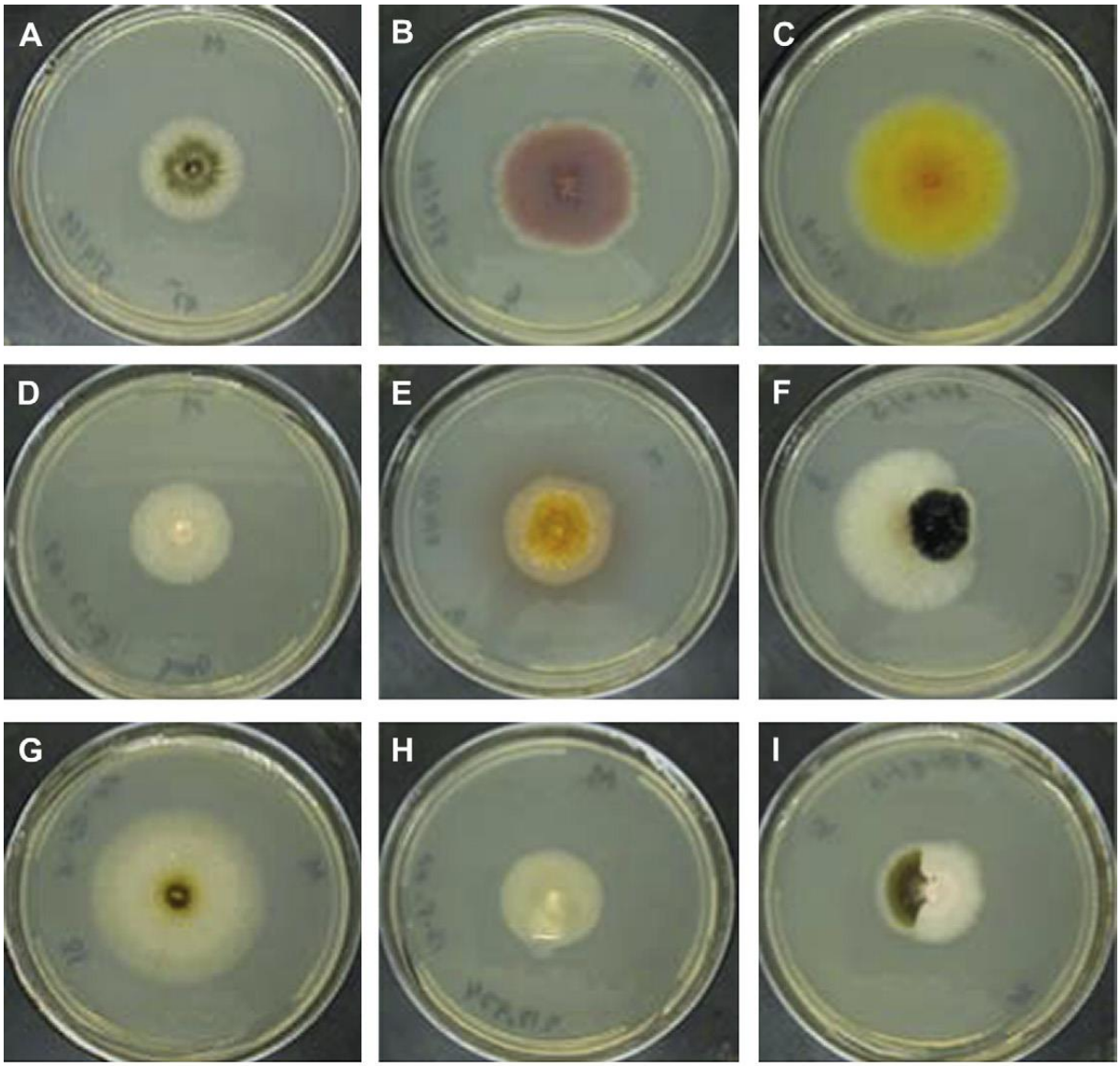


Fontes: SEVIOUR *et al*. (1992); PUNNAPAYAK *et al*. (2003).

Figura 2. Aspectos morfológicos de *Aureobasidium pullulans* [A- colônia, B- corpo de frutificação, C- hifa escura com clamidosporo na extremidade, D- células unicelulares em gemulação, E- artroconídio negro, F- blastoconídios, G- hifas e blastoconídios (1860 x), H- hifas septadas e blastosporos e I- pseudohifas].

Além da pululana, principal produto de valor agregado, este micro-organismo apresenta a capacidade de produzir outros bioprodutos de interesse biotecnológico (SUH; YUN; KIM, 1998; PRASONGSUK *et al.*, 2007; SINGH, SAINI; KENNEDY, 2008;

CHI *et al*., 2009), como: enzimas (amilase, celulase, lipase, protease alcalina, xilanes, β-frutofuranosidase e manase) de grande importância para as indústrias de alimentos, têxteis, de papel, de detergentes, entre outras; proteína unicelular para alimentação humana e animal e fonte proteica para a produção de peptídeos bioativos; biomassa para biocontrole de micro-organismos indesejáveis nas cascas de frutas, em grãos e em hortaliças; e sideróforo para emprego nas áreas médica, de recuperação de metais e biorremediação de ecossistemas poluídos.



Fonte: MANITCHOTPISIT *et al*. (2009).

Figura 3. Morfologia colonial de linhagens de *Aureobasidium pullulans* com crescimento de 168 h em agar extrato de malte. [A- hifas verde oliva no centro e hifas brancas, linhagem CU45. B- hifas brancas com pigmento escuro vináceo; linhagem CU6; C- hifas brancas com pigmento amarelo, linhagem CU13. D- hifas brancas com pigmento rosa, linhagem DOUG; E – I- colônias de linhagem CU9, CU 8, CU 38, NRRLY-12974 e CU 15, respectivamente.]

Linhagens produtoras de pululana possuem ainda a capacidade de biorremediação ambiental, uma vez que são capazes de remover metais pesados devido à sua natureza adesiva (CHENG; DEMIRCI; CATCHAMARK, 2011). Breierova e colaboradores (2002) relataram que *A. pullulans* podem remover íons de metais pesados de soluções aquosas. Radulovic e colaboradores (2008) expuseram que, durante o crescimento de *A. pullulans* CH-1 em ácido hidrolisado de turfa, o teor de Cu, Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, Ni e Cr diminuíram como resultado produção da pululana.

3.5. Produção de pululana

Apesar das inúmeras aplicações anteriormente descritas para a pululana, a sua comercialização ainda é relativamente baixa, sendo o custo de produção ainda o principal entrave. O preço atual da pululana comercial referência (de alta pureza) da marca Sigma-Aldrich, produzida por *Aureobasidium pullulans*, é de, aproximadamente, R$ 150,00/g, enquanto que a goma xantana comercial referência (de alta pureza) da mesma marca, obtida a partir do cultivo da bactéria *Xanthomonas campestris*, custa em torno de R$ 3,00/grama. Segundo Lin, Zhang e Thibault (2007), o alto custo da pululana se deve principalmente ao baixo rendimento do produto, à elevada viscosidade do meio e à degradação do polímero que às vezes ocorre durante o processo fermentativo. Logo, para garantir a comercialização do biopolímero pululana há necessidade de que sejam adotadas estratégias que permitam reduzir o seu custo final (KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003; LEATHERS, 2003; ZHAO; CHI, 2003; SHINGEL, 2004, BAE *et al*. 2011; LI *et al*., 2011).

Outro problema é a coprodução de melanina, frequente durante a produção fúngica da pululana. Além da síntese de melanina resultar em redução de goma produzida, tem-se principalmente, a separação dos componentes sólidos é realizada por centrifugação, entretanto a fase líquida contém pululana e, ainda, o pigmento melanina, o que gera uma coloração escura do mosto. A coprodução da melanina corrobora também com o aumento do custo final da pululana devido à necessidade de métodos para extração deste pigmento (KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003; PRASONGSUK *et al*., 2005).

3.6. Parâmetros que influenciam a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans*

Como anteriormente mencionado, além da pululana não ser o único polissacarídeo produzido por *A. pullulans*, a sua biossíntese está atrelada à linhagem e às condições de cultivo (SEVIOUR *et al*., 1992; CORRADI DA SILVA *et al*., 2006). Existem várias publicações sobre o assunto, demonstrando a influência de diferentes parâmetros – morfologia do fungo; idade da cultura; natureza e concentração e das fontes de carbono (C) e nitrogênio (N); razão C/N; pH; temperatura; aeração e agitação – no rendimento e produtividade do processo e na massa molar da pululana produzida (SIMON *et al*., 1998; YOUSSEF; ROUKAS; BILIADERIS, 1999; KIM *et al.*, 2000; SHINGEL, 2004).

3.6.1. Morfologia do micro-organismo

Conforme descrito anteriormente, *A. pullulans* é um fungo polimórfico, que abrange formas unicelular e filamentosa. Quando seu crescimento se apresenta na forma de micélios (filamentos) e o cultivo é submetido à agitação, pode haver o emaranhamento das hifas, formando esferas (*pellets*) (SANTOS, 2008). Segundo Campbell e colaboradores (2004) é difícil alcançar altos rendimentos do exopolissacarídeo em condições de cultivo que propiciem predominantemente a forma de crescimento micelial do fungo, mesmo que a pululana seja o único ou o principal polissacarídeo sintetizado. De acordo com vários autores, a síntese da pululana depende do desenvolvimento unicelular do micro-organismo (SIMON, CAYE-VAUGIEN; BOUCHONNEAU, 1993; ROUKAS, 1999; CAMPBELL *et al*., 2004).

3.6.2. Fonte de carbono

Aureobasidium pullulans, assim como as outras espécies fúngicas, é capaz de metabolizar uma grande variedade de fontes de carbono, simples e complexas. No entanto, a produção de pululana por esta espécie microbiana parece depender do tipo de fonte de carbono e da concentração usada. Em geral, se a fonte de carbono pode ser metabolizada pelo fungo, ela também pode promover a produção de EPS, mas nem sempre da mesma forma (SEVIOUR *et al*., 1992). Por exemplo, em meios contendo maltose como fonte de carbono, foi observado que o fungo cresce

intensamente, porém, a produção de pululana é relativamente baixa. Entretanto, comparativamente, maiores proporções deste biopolímero são produzidas quando o cultivo ocorre em meios contendo frutose, glicose ou sacarose (SHINGEL, 2004).

Várias são as fontes de carbono já estudadas para a produção de pululana, incluindo: polpa de uva (ISRAILIDES *et al*., 1977); hidrolisado de turfa (BOA; LEDUY, 1984; 1987), vinhoto da produção de bioetanol (LEATHERS; GUPTA, 1994), melaço de beterraba (ISRAILIDES *et al*., 1994; ROUKAS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 1999; GOKSUNGUR; UCAN; GUVENC, 2004), vagem de alfarroba (ROUKAS; BILIADERIS, 1995), óleo de soja (SHABTAI; MUKMENEV, 1995); hidrolisado de amido de batata (SHABTAI; MUKMENEV, 1995; BARNETT *et al.,* 1999; GOKSUNGUR; UZUNOGULLARI; DAGBAGLI, 2011), açúcar mascavo (VIJAYENDRA *et al*., 2001), pó de semente de jaca (SHARMILA *et al*., 2013), amido de mandioca, farelos de trigo e de arroz (RAY; MOORTHY, 2007), xarope de milho e suco de caju (THIRUMAVALAVAN; MANIKKANDAN; DHANASEKAR, 2008), batata doce (SHENGJUN *et al*., 2009), açúcar cristal (OLIVEIRA, 2010); resíduos da extração de óleo de oliva (YOUSSEF; BILIADERIS; ROUKAS, 1998); entre outros. O número de estudos relacionados ao tema, envolvendo diferentes grupos de pesquisadores, ratifica a importância do desenvolvimento de tecnologia para a produção industrial de pululana.

Em escala industrial, a produção de pululana se dá pela fermentação de amido hidrolisado com linhagem de *A. pullulans* não modificada geneticamente. Contudo, o nosso país dispõe de outras matérias-primas, relativamente baratas, de boa disponibilidade, e diretamente fermentáveis. A seguir, uma breve descrição da matéria-prima empregada no presente estudo como principal fonte de carbono.

Açúcar Cristal

A produção de açúcar, um carboidrato natural constituído de cristais de sacarose, a partir do caldo da cana-de-açúcar, é o principal mercado do setor sucroalcooleiro nacional. Em 2009, foram produzidas pouco mais de 31 milhões de toneladas, sendo o consumo interno equivalente a 37% da oferta (MACHADO, 2012). O açúcar em forma cristalina produzido sem refino é muito utilizado na indústria alimentícia para confecção de bebidas, biscoitos e confeitos, dentre outros. O

excedente produzido e não consumido na economia doméstica encontra um mercado global estabelecido e disposto a adquirir a produção brasileira.

Para produção do açúcar, o caldo é primeiramente clarificado, pela adição de leite de cal em forma contínua ou intermitente até o pH atingir 7,2 a 8,2. A seguir, o caldo clarificado é concentrado em evaporadores de múltiplo estágio até adquirir a consistência de xarope. A etapa de evaporação, geralmente, reduz a concentração original de água no caldo de 80% para 40%, resultando na formação de um xarope grosso e amarelado. O xarope segue então para os cozedores, onde recebe outra carga de vapor, estabelecendo-se a fase da concentração, quando o xarope é levado até a supersaturação e começam a se formar os cristais de açúcar que após crescerem em tamanho e aumentado o volume da massa cozida é descarregado nos cristalizadores, onde se completa a cristalização do açúcar (HAMERSKI, 2009; MACHADO, 2012; MACEDO, 2013).

Uma vez completada a cristalização, a massa cozida é então centrifugada, para separar os cristais de açúcar do mel que os envolve. Os cristais obtidos são de açúcar demerara de boa qualidade e o xarope obtido é reciclado para os cristalizadores. O mel final, mel exausto, mel residual ou melaço é portanto o subproduto resultante de massas cozidas que já foi pelo menos reciclada duas vezes. O melaço pode ser utilizado para ração de gado e como matéria-prima para diferentes tipos de processos fermentativos (HAMERSKI, 2009; MACHADO, 2012; MACEDO, 2013).

No Brasil, o açúcar cristal já vem sendo utilizado como matéria-prima por diferentes empresas para produção microbiana de produtos de alto valor agregado, como por exemplo, ácido lático e ácido cítrico (PENNA, 2001).

3.6.3. Fonte de nitrogênio

Outro fator nutricional de importância para a produção efetiva de pululana é a fonte de nitrogênio, uma vez que esta afeta, o crescimento, as atividades metabólicas do micro-organismo, inclusive sua morfologia (THIRUMAVALAVAN; MANIKKADAN; DHANASEKAR, 2009; JIANG; WU; KIM; 2011). Segundo Jiang, Wu e Kim (2011), a biomassa celular unicelular aumenta com o acréscimo do nível de nitrogênio.

A maioria dos trabalhos utiliza como fonte de nitrogênio inorgânico o sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrito de sódio, nitrato de potássio e nitrato de amônio e, como fontes orgânicas, o extrato de levedura, hidrolisado de caseína, peptona, glutamato, L-asparagina e succinato de amônio (AUER; SEVIOUR, 1990; KIM *et al*. 2000; BARBOSA *et al.*, 2004).

Em 2012, Choudhury, Bhattacharyya e Prasad avaliaram o efeito de duas fontes de nitrogênio complexas (extrato de levedura e peptona) na elaboração de pululana com glicose como fonte de carbono e observaram que existe uma significativa influência do extrato de levedura na produção deste biopolímero. Segundo os autores, isso pode estar associado ao fato de que o extrato de levedura é rico em potássio, cálcio, ferro e magnésio, se comparado a outras fontes complexas de nitrogênio, como a peptona. Entretanto, o uso de extrato de levedura pode vir a aumentar o custo do produto final, uma vez que esta fonte tem um alto valor (THIRUMAVALAVAN; MANIKKADAN; DHANASEKAR, 2009; YU *et al*., 2012; XIA; WU; PAN, 2012; WU; CHEN; PAN, 2012; SUGUMARAN *et al*., 2013).

Não só o tipo de fonte de nitrogênio se faz importante, sua concentração também. Em geral, tem sido descrito que os polissacarídeos microbianos são produzidos em condições limitantes de nitrogênio, ou seja, altos teores de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de EPS (SEVIOUR *et al.,* 1992; CHI; ZHAO, 2003). Ainda, segundo Orr, colaboradores (2009), Cheng e colaboradores (2011), o suprimento de nitrogêno, acima do necessário, pode vir a contribuir para o acúmulo de biomassa, mas não de polissacarídeo.

Oliveira (2010) estudou a produção de pululana por duas linhagens de *A. pullulans* (IOC 3467 e IOC 3011) utilizando como principal fonte de carbono e energia o açúcar cristal (30 g/L). Neste trabalho, cinco diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de amônio, ureia e levedura residual cervejeira) em diferentes relações carbono/nitrogênio (C/N 5, 25, 50 e 150) foram avaliadas. Segundo o autor, para a linhagem IOC 3467, a redução da concentração inicial de sulfato de amônia quase não teve influência na biomassa final, enquanto que permitiu o aumento de biopolímero recuperado. Já para a linhagem IOC 3011, a redução de concentração com a mesma fonte de nitrogênio, resultou na redução de biomassa e do biopolímero recuperado. Por outro lado, para ambas linhagens, a redução da

concentração inicial de levedura residual de cervejaria não propiciou aumento de biomassa, mas colaborou com o aumento de biopolímero recuperado. Portanto, a fonte e concentração de nitrogênio têm influência na biomassa e biopolímero finais.

O tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração também têm influência na massa molar da pululana. Wiley e colaboradores, em 1993, utilizando como fonte de carbono sacarose, estabeleceram que, para a linhagem de *A. pullulans* NRRL-Y 6220, uma combinação de 0,1% de peptona e 0,76 mM/L de sulfato de amônio gera maior massa molar (2940 K) dentre as combinações estudadas, entretanto rendimento de apenas 0,005 g/g. Por outro lado, o uso de apenas ureia (50 mM/L) e uma mistura de ureia com sulfato de amônio (10,6 mM/L) resulta em valores de massa molar relativamente altos (porém menores do que o anterior) e rendimentos entre 0,01 e 0,011 g/g.

Existe uma quantidade muito grande de subprodutos e resíduos de agroindústrias que podem ser usados em bioprocessos (YAMADA *et al.*, 2003). Por exemplo, a levedura residual, subproduto das indústrias de etanol, é relativamente barata e de fácil obtenção em diversas regiões do país, o que possibilita seu emprego como fonte nutricional, especialmente de nitrogênio, em bioprocessos industriais (YAMADA *et al.*, 2003).

A cerveja nacional é produzida por fermentação alcoólica utilizando linhagens de *Saccharomyces uvarum*. Neste processo, ao término da fermentação, as células são reaproveitadas para inoculação de novo mosto. Normalmente, a reutilização das células ocorre por três a cinco ciclos, a depender da rentabilidade do processo fermentativo, que é consequência da redução da viabilidade celular e da ocorrência de contaminação (PINHEIRO-ROBERG, 2000). Ainda, ocorre crescimento celular durante o processo fermentativo, o que gera excedentes de células de levedura.

Quando o rendimento não apresenta mais níveis satisfatórios, as células são descartadas e passam a usar como inóculo um novo lote de biomassa recém propagada.

Destaca-se que a cada litro de cerveja produzida, acumulam-se 2,8 litros de biomassa. Assim, considerando uma produção industrial média de 700 mil hectolitros mensais, pode-se dimensionar o problema enfrentado pela indústria para descartar esse rejeito segundo as regras estabelecidas pela legislação.

Essa biomassa, rica em nutrientes, pode ser comercializada como ração animal, como fonte de proteínas e outros nutrientes. Na alimentação humana são utilizadas principalmente na forma de derivados, como complemento nutritivo, aromatizante e para realçar o sabor (YAMADA *et al.*, 2003).

Para tanto, deve ser primeiramente concentrada de modo a facilitar seu transporte. Entretanto, o processo para secagem representa um custo adicional. A saber, para evitar qualquer ônus, a companhia cervejeira deveria comercializar o rejeito à pelo menos R$ 0,50 a tonelada (PINHEIRO-ROBERG, 2000). Por outro lado, nem sempre a procura atende a quantidade de rejeito gerado, o que acarreta em grande acúmulo. Logo, devido ao seu alto valor nutritivo, principalmente em proteínas (30% a 70%) e vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina) e sais minerais, sendo os micro e macro elementos, particularmente selênio e fibra dietética (YAMADA *et al.*, 2003), essa biomassa residual cervejeira é uma matéria-prima que apresenta os requisitos necessários para o cultivo de micro-organismos.

3.6.4. pH

Um outro parâmetro que influencia a produção de pululana é o pH. A sua variação provoca mudanças na morfologia celular, o que, por sua vez, pode alterar o metabolismo (ROUKAS, 1999; YOUSSEF; ROUKAS; BILIADERIS, 1999; CAMPBELL *et al*., 2004; SHINGEL, 2004).

O pH ótimo para a produção de pululana varia entre 5,5 a 7,5, enquanto que para o crescimento celular, a faixa ideal se situa entre 2,0 a 4,5 (VIJAYENDRA; BANSAL; PRASAD, 2001; SHINGEL, 2004). A discrepância nos valores ótimos de pH para a síntese de pululana e o crescimento celular confirma não haver inter-relação entre estes dois processos metabólicos.

3.6.5. Temperatura

A temperatura de fermentação é um dos fatores mais importantes para a produção da pululana, segundo Chi e Zhao (2003). Estes autores mostraram que a forma unicelular da linhagem *A. pullulans* Y68 produziu maior quantidade de pululana na temperatura de 28°C. Em temperaturas superiores a 28°C, o rendimento do

processo fermentativo decaiu rapidamente com o aumento da temperatura. Entretanto, Roukas e Biliaderis (1995) observaram que a produção de pululana por *A. pullulans* P56 foi máxima na temperatura de 20°C. Estes resultados sugerem que a temperatura ótima para a produção da pululana é dependente da linhagem empregada (CHI; ZHAO, 2003).

3.6.6. Aeração, agitação e oxigênio dissolvido

A. pullulans é um micro-organismo aeróbio, portanto, para o seu crescimento e para a produção de pululana são necessárias condições de aerobiose (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; GAIDHANI; MCNEIL; NI, 2005). No entanto, as vazões de ar empregadas na produção do EPS variam significativamente, sendo necessário estabelecer a concentração de oxigênio dissolvido mais apropriada para cada linhagem microbiana. Segundo Barbosa e colaboradores *(*2004), dependendo da linhagem, a aeração pode não afetar a produção microbiana do EPS, ou pode aumentar ou mesmo diminuí-la.

No decorrer da produção de pululana, o processo de mistura e transferência de oxigênio torna-se mais difícil, devido ao aumento da viscosidade do mosto. Isso porque, no final da fase exponencial, o meio de cultura torna-se viscoso e exibe um comportamento não newtoniano (pseudoplástico), o qual limita a difusão do oxigênio e nutriente, o momento de transferência de calor (RHO *et al.*, 1988; MCNEIL; HARVEY, 1993 *apud* GAIDHANI; MCNEIL; NI,2005), o que pode conduzir a zonas de estagnação (RAU *et al*., 1992 apud GAIDHANI; MCNEIL; NI, 2005). Isso permite concluir que o processo de controle influencia profundamente o rendimento de pululana, sua produtividade e qualidade (distribuição de massa molar, especialmente) (BOUVENG *et al*., 1963; CATLEY, 1971; BERMENJO *et al*., 1981; BOA; LEDUY, 1984 *apud* GAIDHANI; MCNEIL; NI, 2005).

A agitação tem como função uma melhor mistura do meio de fermentação, ajudando a manter um gradiente de concentração entre o interior e o exterior das células.Tal gradiente funciona em ambas direções, através de uma melhor difusão que ajuda a manter um fornecimento satisfatório de açúcares e outros nutrientes para as células, enquanto facilita a remoção de gases e outros subprodutos do catabolismo nas células.

A agitação também está diretamente relacionada com a oferta de oxigênio para as células, quer por aumentar a área de contato oxigênio/meio quer por manter por mais tempo o gás no meio reacional. McNeil e Kristiansen (1987) e Moscovici e colaboradores (1996) relataram que a concentração de pululana aumentou com o aumento da velocidade de agitação. Similarmente, Lazaridou e colaboradores (2002) obtiveram um aumento significativo na concentração de polissacarídeo com o aumento da velocidade de agitação, variando de 34 a 49 g/L de EPS, nas agitações de 300 e 700 rpm, respectivamente. Para a máxima produção, o consumo de substrato foi de 98%. Os resultados mostram que a concentração de pululana está diretamente relacionada à disponibilidade de oxigênio.

Por outro lado, quando *Aureobasidium pullulans* foi cultivado em diferentes velocidades de agitação, foi notada uma redução drástica do rendimento de exopolissacarídeo para valores de 750 rpm ou maiores (Lazaridou *et al*., 2002b). Os autores atribuíram tal fato aos elevados níveis de O_2. Segundo eles, a produção de polissacarídeo a 1000 rpm não seria comprometida desde que a pressão parcial de O_2 fosse mantida baixa durante a fase inicial da fermentação.

Em 1996, Gibbs e Sevior avaliaram a influência das taxas de agitação e/ou a saturação de oxigênio na produção de exopolissacarídeo por *Aureobasidium pullulans* ATTC 9348 e observaram que ocorreu uma redução da produção com o aumento das taxas de agitação. Gibbs e Seviour (1996), estudando a produção de pululana pela mesma linhagem em fermentador, demonstraram que altos níveis de oxigênio dissolvido interferem negativamente na produção de pululana.

Gaidhani, McNeil e Ni (2005) avaliaram a produção de pululana por *A. pullulans* IMI 145194 utilizando 4 taxas de aeração (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vvm) e observaram que, quando utilizaram 1,0 vvm, obtiveram maiores valores de pululana (16 g/L), enquanto que as outras taxas produziram valores inferiores a 14 g/L. Por outro lado, a taxa de crescimento também foi inferior nessa condição. Segundo os autores, duas explicações podem ser dadas para tal acontecimento: (i) - as células consumiram mais sacarose no meio no qual houve um aumento nas taxas de fluxo de ar através da respiração aumentada, o que conduziria a uma redução da sacarose disponível para a síntese de pululana, portanto, há diminuição de pululana com o aumento das taxas

de arejamento (SUTHERLAND, 1977; 1982; LEE *et al*., 2001), e (ii) - a limitação de oxigênio é um fator de estímulo para a produção de polissacarídeo (RAU *et al*., 1992), isto pode explicar porque a produção de pululana é mais alta a 1 vvm, em comparação com a que está em 1,5 e 2 vvm.

A Tabela 5 apresenta a produção de pululana para diferentes valores de agitação e aeração.

Tabela 5. Produção de pululana para diferentes valores de agitação e aeração

Linhagem	Ag. (rpm)	Aer. (vvm)	PO_2 (% saturação)	Fonte de C	Fonte de N	Produção (g/L)	Ref.
ATCC 9348	125	0,04	0	Glicose	$(NH_4)_2SO_4$	11,11	Gibbs; Seviour, 1996
	250		12,8			11,27	
	500		79,9			7,43	
	750		87,7			4,57	
	1000		82,3			5,64	
	1250		95,5			5,61	
IMI 145194	120	0,5	-	Sacarose	$(NH_4)_2SO_4$	14	Gaidhani; McNeil; Ni, 2005
		1	-			16	
		1,5	-			14	
		2	-			12	
P56	300	0,04	-	Melaço de beterraba	$(NH_4)_2SO_4$	34	Lazaridou, 2002
	500		-			4	
	700		-			49	

Ag.- Agitação; Aer.- Aeração; PO_2- Pressão de Oxigênio; C- Carbono; N- Nitrogênio; Ref.- Referências

3.6.7. Microelementos

A adição de determinados microelementos ao meio de cultura é fundamental para a biossíntese de macromoléculas essenciais, como enzimas, vitaminas, proteínas, nucleotídeos, entre outras, necessárias para a função das células. De acordo com Barbosa e colaboradores (2004), os microelementos mais utilizados para a produção de EPS por fungos são: K_2HPO_4, KCl, $MgSO_4$, $FeSO_4$, NaCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4 e $MnSO_4$. Esses sais inorgânicos são assimilados em quantidades pequenas pelas células fúngicas, enquanto quantidades elevadas podem causar a inibição do crescimento.

Segundo Hui e Khachatourians (1995), a presença de elementos traços como ferro, zinco, manganês, cobre, cálcio, molibdênio, cobalto, borato, iodo influenciam no crescimento, morfologia e produção do biopolímero por *A. pullulans* ATCC 3096. Enquanto que o rendimento de biomassa é influenciado por íons de ferro.

3.6.8. Produção de pululana: Levantamento bibliográfico

Alguns dados publicados referentes à produção de pululana foram compilados no Quadro 3. Analisando os dados, pode-se inferir que o valor máximo de pululana (66,8 g/L) foi obtido a partir do cultivo da linhagem de *A. pullulans* osmotolerante RBF-4A3 em 50 g/L de glicose em frascos agitados (CHOUDHURY; SALUJA; PRASAD, 2011). No entanto, dependendo da linhagem e das condições operacionais a quantidade de pululana variou de 9,9 a 29,4 g/L em frascos agitados e de 7,2 a 52,5 g/L em biorreator. Em geral, o tempo de produção varia de 72 a 96 h. Ressalta-se a influência do inóculo no tempo de processo, visto que concentrações maiores de células podem repercutir em redução do tempo e, consequentemente, em maiores produtividades.

3.4 1. Cogeração de melanina

A melanina é um polímero multifuncional, de elevada massa molar, produzida por várias espécies de fungos e de bactérias, inclusive plantas e animais (WHEELER, 1986; WHEELER; BELL, 1988; BELL; LANGFELDER *et al*, 2003). A biossíntese microbiana da melanina, se dá a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos, sob a ação das enzimas fenoloxidases, em geral, em meios contendo nitrato como fonte de nitrogênio (VIDAL-CROS *et al.,* 1994; WHEELER; BELL, 1988; LANGFELDER *et al*., 2003).

O crescimento e desenvolvimento fúngico não depende da síntese deste pigmento. Contudo, a melanina pode aumentar a chance de sobrevivência do fungo produtor e competitividade em determinados ambientes (FOGARTY; TOBIN, 1996; JACOBSON, 2000; NOBRE *et al*., 2004). Para a maioria dos micro-organismos produtores de melanina, a síntese foi relacionada ao estresse ambiental. Em princípio, a melanina, que é extremamente resistente a uma ampla variedade de agentes físico-

químicos, confere aos seres que a produzem resistência contra irradiação ultravioleta, ondas de rádio, exposição a metais pesados, dessecação, temperaturas extremas, condições hiperosmóticas, limitação nutricional, choque osmótico, variações de pH, ação de patógenos e do sistema de defesa do hospedeiro (BELL; WHEELER, 1986; TSAI *et al*., 1998; DOERING *et al*., 1999; JACOBSON, 2000; LOGUERCIO-LEITE *et al*., 2006; GONÇALVES; ALEXANDER, 2005 *apud* ZHENG *et al*., 2008). Em fungos, a melanina parece também estar associada à resistência ao ataque microbiano. Em solos, esporos ou hifas hialinas são rapidamente mortos e lisados, enquanto que células melanizadas podem sobreviver vários anos (LINDERMAN; TOUSSOUN, 1966; WHEELER, 1986; LOCKWOOD, 1960; LUTHER; LIPKE, 1980; SUSSMAN, 1968 *apud* BELL; WHEELER, 1986). Por isso, provavelmente, a maior parte da biomassa fúngica em solo se encontra melanizada (HURST; WAGNER, 1969 *apud* BELL; WHEELER, 1986).

Outro papel da melanina, e possivelmente o mais importante, está em proteger as células contra enzimas hidrolíticas. A maioria dos antagonistas que causam lise das células fúngicas também produzem β-(1→3) quitinase e β-(1→6) glucanase (BLOOMFIELD; ALEXANDER, 1967 *apud* BELL; WHEELER, 1986; JACKSON; GAY, 1976 *apud* BELL; WHEELER, 1986; KUO; ALEXANDER, 1967 *apud* BELL; WHEELER, 1986).

Quadro 3. Produção de pululana por diferentes linhagens de *A. pullulans* e condições fermentativas

Linhagem	Pig.	Operação	Ag. (rpm)	Substrato (g/L)	Fonte de N (g/L)	t (h)	T (°C)	pH	$Y_{P/S}$	Massa de BP (g/L)	Referências
A.p.-3	Negra	Frasco Erlenmeyer	150	-	Sulfato de amônio (0,7)	96	28	6,0	-	28,2	Gniewosz; Duszkiewicz-Reinhard (2007).
B-1 (mutante da A.p.-3)	Branca			-	Sulfato de amônio (0,7)				-	27,6	
AP329	-		200	Glicose (50)	-	96	28	6,5	-	12,3	Wu *et al*. (2009)
				Sacarose (50)					-	21,2	
				Hidrolisado de batata-doce (50)					-	29,4	
RBF-3B2	Creme		200	Glicose (50)	-	96	28	6,0	0,29	14,9	Choudhury; Saluja; Prasad (2011)
RBF-4A3 osmotolerante	Creme								0,53	26,4	
RBF-8B1	Creme rosado								0,18	8,9	
RBF-17A2	Creme rosado								0,21	10,6	
RBF-17BR13	Creme rosado								0,19	9,9	
RBF-4A3 osmotolerante	-			Glicose (150)					-	66,8	
CJ001	-		200	Sacarose (50)	Sulfato de amônio (1,0)	96	22	5,0		31.4	Wu *et al*. (2012)
Y68	-	Biorreator (STR) (batelada)	300	Glicose (150)	Sulfato de amônio (0,6)	72	28	7,0	-	52,5	Duan; Chi; Wang (2008)
									-	40,5	
									-	38,8	
									-	25,5	
									-	23,3	
				Xilose (80)					-	15,7	
ATCC 201253	Mutante com pig reduzida	Biorreator (contínuo)	200	Sacarose (150)	Sulfato de amônio (0,9)	-	30	5,0	90,3	7,5	Cheng; Demirci; Catchmark (2011)
Cj001	-	Frasco Erlenmeyer	200	Sacarose (50)	Sulfato de amônio (1,0)	96	22	5,0		31,4	Wu; Chen; Pan (2012)

Pig.- pigmentação; Ag. – agitação; N- nitrogênio; t- tempo; T- temperatura; $Y_{P/S}$- fator de conversão substrato em EPS

Segundo Siehr (1981) *apud* Kachhawa, Bhattacharjee e Singhal (2003), a melanina é sintetizada tanto intra quanto extracelularmente durante as últimas fases da fermentação quando ocorrem alterações na morfologia celular, com formação de clamidosporos. Conforme os mesmos autores, a síntese de melanina depende das condições de cultivo. Por isso, quando o crescimento ocorre em condições nutricionais otimizadas, a pigmentação é reduzida.

Para driblar o problema da pigmentação no decorrer da fermentação, alguns autores sugerem o emprego de linhagens mutantes não pigmentadas, obtidas por indução com agentes mutagênicos como, por exemplo, radiação UV e ácido nitroso (TARBASZ-SZYMANSKA; GALAS, 1993 *apud* KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003). Porém, em geral, a mutagênese compromete o rendimento de pululana (TARABASZ-SZYMANSKA, 1993, YU; WANG; WEI, 2012).

Kachhawa Bhattacharjee e Singhal (2003) avaliaram o emprego de carvão ativado, diferentes solventes orgânicos, puros e em mistura, e a combinação de KCl e solventes para a obtenção pululana livre da melanina. Segundo os autores, dentre as metodologias testadas, o tratamento com etil-metil-cetona foi o mais efetivo na remoção da cor sem comprometer o rendimento.

3.7. Reologia dos biopolímeros

A reologia pode ser definida como o estudo da deformação da matéria ou da mobilidade dos fluidos. É a ciência que avalia as propriedades mecânicas dos vários materiais sob várias condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis (NAVARRO, 1997; DIAZ, VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO *et al.*, 2004).

O estudo reológico dos materiais no estado sólido ou em solução permite obter informações muito importantes a respeito das propriedades de escoamento e da deformação dos materiais. Através do estudo reológico em cisalhamento oscilatório, podem-se avaliar duas componentes – elasticidade e viscosidade – que atuam na

deformação de um material sob a influência de uma tensão mecânica, em geral, concomitantemente (SILVA; RAO, 1992).

Durante o escoamento, as moléculas que estão expostas a diferentes velocidades colidem entre si, gerando uma troca de momento entre as camadas do fluido. Este fenômeno causa uma fricção interna, o que resulta em dificuldade de escoamento do fluido. No caso dos polímeros, a fricção interna e, portanto, a resistência ao escoamento, é muito maior devido ao tamanho das cadeias e ao enovelamento entre elas. A resistência ao escoamento, causada pela fricção interna, é conhecida como viscosidade (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

A seguir, a equação que representa a viscosidade (η), em função da razão entre a tensão de cisalhamento (τ) (força/área cisalhada) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) – Equação 1.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Equação 1

Diferentes sistemas de unidades podem ser usados para expressar a viscosidade, tais como: Sistema Internacional ($N.s.m^{-2}$, Pa.s, $Kg.m^{-1}.s^{-1}$), Sistema Britânico (lb-s/pies^2, slug/pie-s), Sistema Imperial (lbf ft^{-2}) e Sistema CGS (P, $dyn.s.cm^{-2}$) (BERWANDER, 2005).

A viscosidade depende muito da temperatura, sendo, portanto, importante controlá-la durante as determinações experimentais, bem como citá-la juntamente com os dados de viscosidade. Em geral, os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura, ao contrário da maioria dos gases, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (BERWANDER, 2005).

Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido, a viscosidade pode fornecer importantes informações a respeito das mudanças fundamentais na estrutura do fluido durante um determinado processo, como polimerização, emulsificação e homogeneização (DIAZ, VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO *et al*., 2004).

A viscosidade ou resistência ao escoamento pode não depender da tensão aplicada (tensão de cisalhamento) e da taxa de cisalhamento. Alguns fluidos escoam

segundo modelo de Newton e são chamados fluidos newtonianos. Assim, para fluidos newtonianos, a viscosidade independe da taxa de cisalhamento na qual é medida.

Neste caso, a relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) é uma linha reta, e a viscosidade (η) permanece constante para taxas de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) variadas. Na prática, para uma dada temperatura, a viscosidade dos fluidos newtonianos permanece constante, indiferente de qual modelo de viscosímetro ou velocidade de rotação seja usado para sua medição (BERWANDER, 2005).

Quando há interação entre os componentes de um fluido e estas interações dependem e afetam a velocidade de deformação causada por forças externas, então o fluido é chamado não newtoniano. Nesta categoria está compreendida a grande maioria dos compostos poliméricos (GARGALLO *et al.*, 1987).

Nos fluidos não newtonianos, a tensão de cisalhamento é uma função não linear da taxa de cisalhamento e, assim como os newtonianos, depende ainda da temperatura, da pressão, da massa molar, da morfologia das moléculas e do tempo de duração da medida viscosimétrica. Em geral, os fluidos não newtonianos são normalmente divididos em três classes (LENK, 1978): (i) aqueles cujas propriedades são independentes do tempo; (ii) aqueles cujas propriedades são dependentes do tempo; (iii) aqueles que apresentam propriedades intermediárias, entre as de um sólido ideal (elástico) e as de um líquido ideal (newtoniano).

Na primeira classe estão os fluídos cuja viscosidade depende somente do valor de tensão de cisalhamento (τ). Dentro desta classificação de fluidos, tem-se os fluidos não newtonianos que são divididos em três grupos diferentes: fluidos viscoplásticos ou de Bingham, dilatantes e pseudoplásticos (TONELI *et al.*, 2005). A Figura 4 apresenta os tipos de curva de escoamento.

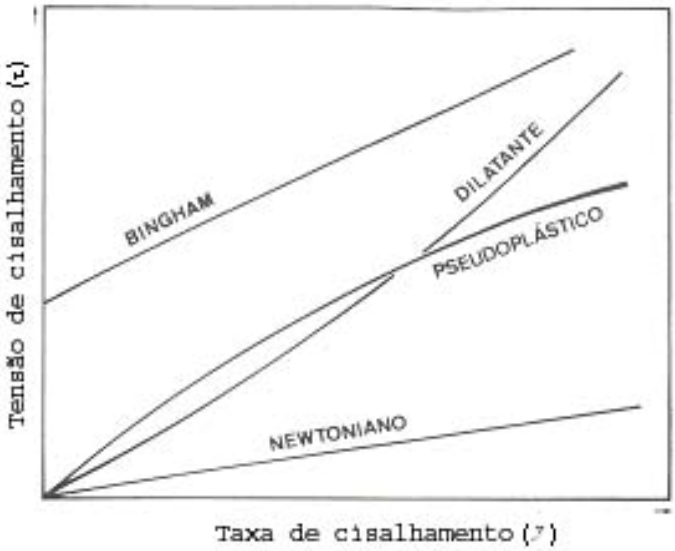


Figura 4. Tipos de curvas de escoamento.
Fonte: SERVE (1962) *apud* LOPES (1989).

O comportamento Bingham é verificado em materiais que necessitam de uma tensão de cisalhamento mínima, chamada também de tensão crítica de escoamento, para começarem a fluir. Depois de superada esta tensão inicial, o líquido escoa, mantendo sua viscosidade constante com o aumento da tensão de cisalhamento. Em soluções de polímeros de alta massa molar, muitas vezes uma tensão de cisalhamento mínima se faz necessária a fim de vencer as interações intermoleculares existentes. Só após o colapso destas ligações ocorre o escoamento do fluido. Exemplos deste tipo de comportamento reológico são encontrados em margarina, polpa de papel, graxas, gorduras, tintas, entre outros (BRETAS, 1987; BOBBIO; BOBBIO, 1992b; TONELI *et al.*, 2005).

Os materiais com comportamento dilatante ou pseudoplástico não necessitam de uma tensão mínima para escoarem, mas a viscosidade destes varia de forma não linear com a taxa de cisalhamento.

O comportamento dilatante caracteriza o aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo observado em suspensões altamente concentradas, em que as partículas constituintes são irregulares e não se orientam facilmente, ou em polímeros fundidos, em que há formação de cristais durante o processo de escoamento. Entre os fluidos dilatantes estão as suspensões de amido de milho em glicol etilênico/água (CHEREMISIONOFF, 1992; LOPES, 1996).

A diminuição da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento, pode ser explicada através da orientação das moléculas na direção do fluxo, da deformação das cadeias flexíveis e da diminuição das interações intermoleculares (Figura 5) tornando menor a resistência ao escoamento (VIDAL-BEZERRA, 2000 *apud* TONELI *et al*., 2005). A maioria dos polímeros sintéticos, no seu estado fundido ou em soluções aquosas, são exemplos de materiais pseudoplásticos (LOPES, 1989).

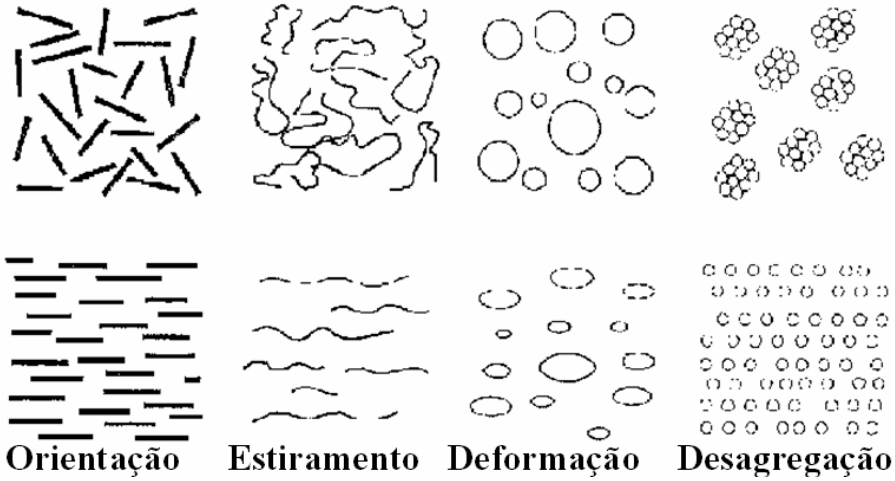


Figura 5. Orientação das moléculas após aumento da taxa de cisalhamento.
Fonte: SCHARAMM (1994)

Os fluidos não newtonianos pertencentes à segunda classe são aqueles cujas propriedades reológicas dependem do tempo, e onde os efeitos descritos e produzidos pela aplicação de uma força externa de deformação perduram parcialmente quando cessa a força aplicada. Isto é, o fluido demora um tempo maior do que aquele em que foi aplicada a força para voltar ao estado inicial de viscosidade aparente.

A dependência do tempo em fluidos não newtonianos é observada com certa frequência. Um indício do comportamento reológico dependente do tempo de um fluido é a observação da chamada curva de histerese (Figura 6). O conceito de histerese está ligado a sistemas não lineares onde o comportamento depende tanto do estado de solicitação atual quanto de sua história passada. Este tipo de fenômeno aparece em várias áreas, tais como magnetismo, elasticidade, plasticidade, sistemas

de *spins*, oscilações em redes cristalinas, entre outros. A sua característica fundamental consiste na existência de curvas, relacionando a solicitação (força, tensão, etc.) com a resposta do sistema (deslocamento, deformação, etc.), que dependem da história passada do sistema e que formam ciclos fechados quando a solicitação varia contínua e periodicamente com amplitude suficientemente grande. Isto é, quando se faz à solicitação variar ciclicamente, o sistema responde de modo que o aspecto do gráfico resposta *versus* solicitação seja uma curva fechada, onde o caminho seguido durante a deformação não coincide com o da recuperação (Figura 6) (ALMEIDA; COSTA, 2000).

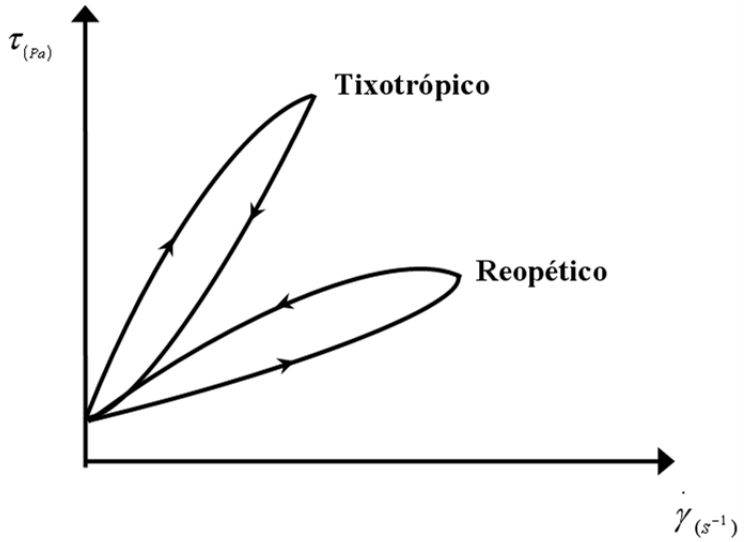


Figura 6. Reogramas típicos de fluidos com comportamento reológico dependente do tempo. Fonte: adaptado de TONELI *et al*. (2005)

Para que seja possível verificar se o fluido apresenta ou não viscosidade aparente dependente do tempo, deve ser realizado um estudo reológico onde o material em análise deve ser submetido a crescentes valores de tensão de cisalhamento até que seja atingido o seu valor máximo (curva crescente). A partir deste ponto, a tensão aplicada ao material é reduzida até o seu valor inicial (curva decrescente). Se as curvas de tensão *versus* taxa de cisalhamento obtidas (crescente e decrescente) forem coincidentes é indicativo de que o material não apresenta comportamento reológico dependente do tempo. Entretanto, se a viscosidade do sistema sujeito a uma força por um tempo t não é a mesma, quando medida no mesmo tempo t, após cessada a ação desta força, as curvas (crescente e decrescente) não seguem o

mesmo caminho, formando uma histerese. Tais fluidos são denominados tixotrópicos e reopéticos (TONELI *et al*., 2005).

Os fluidos tixotrópicos caracterizam-se por apresentar um decréscimo na viscosidade aparente com o tempo de aplicação da tensão. O material é submetido a uma taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}_0$), durante algum tempo (t_0), até que alcance uma viscosidade (η_0). Atingindo o estado de equilíbrio, o material é submetido a uma variação uniforme (crescente→decrescente) da taxa de cisalhamento, atingindo no tempo t_y, uma nova viscosidade de equilíbrio (η_y). Após completar o ciclo de escoamento, o sistema retorna à sua condição original (η_0), mantendo-se a taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}_0$ durante tempo suficiente. O intervalo de tempo $t_y - t_0$ é denominado tempo de recuperação. O comportamento tixotrópico é encontrado em produtos como tinta, *catchup*, pastas de frutas, entre outros (LENK, 1978; TONELI *et al*., 2005).

Os fluídos reopéticos caracterizam-se por apresentar um acréscimo na viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação. Assim como os fluidos tixotrópicos, após o equilíbrio, o fluido tende a retornar ao seu comportamento reológico inicial. Exemplos de fluidos reopéticos são: suspensões de amido e de bentonita. No entanto, esse tipo de comportamento não é muito comum em alimentos (TONELI *et al*., 2005).

A última classe dos fluidos não newtonianos é representada pelos fluidos viscoelásticos. As propriedades apresentadas por estes materiais poderiam ser caracterizadas como intermediárias, entre as de um sólido elástico e as de um líquido viscoso (GRAESSLEY, 1984). Um material é descrito como viscoelástico quando, em suas propriedades mecânicas, parte da energia é armazenada e outra parte é dissipada na forma de calor. Na verdade, todos os corpos reais são viscoelásticos (GRAESSLEY, 1984). Um fluido viscoelástico em equilíbrio, quando submetido a uma tensão cisalhante, responde de dois modos sobrepostos. Primeiro, o material exibe uma deformação elástica que corresponde ao deslocamento das moléculas de sua posição inicial, para uma nova posição de equilíbrio. Isto ocorre após a aplicação da tensão e é chamado de tempo de relaxamento. Durante este tempo, o trabalho exercido sobre o material é armazenado sob a forma de energia e, se a tensão for

removida, o corpo tende a recuperar sua forma original, o que não ocorre por completo devido à manifestação da parte viscosa do material. O escoamento viscoso é, portanto, o segundo modo de resposta à tensão, iniciando-se também logo que esta é aplicada. Se a tensão for mantida, uma velocidade de deformação constante é alcançada e o trabalho realizado para manutenção do escoamento é dissipado como calor. Portanto, o escoamento viscoso é espontaneamente irreversível, podendo continuar mesmo após o alívio da tensão. Exemplos desta classe de fluidos são: polímeros como nylon, algumas soluções poliméricas e geleias (CHEREMISINOFF, 1992).

Os polissacarídeos de origem microbiana variam consideravelmente em suas propriedades físicas, incluídas as características reológicas, que são marcadamente influenciadas pelas condições do processo fermentativo (SUTHERLAND, 1990 *apud* LIMA, 1999). Vários biopolímeros microbianos apresentam comportamento pseudoplástico como, por exemplo, a xantana e a pululana (SUTHERLAND, 1990 *apud* LIMA, 1999).

As análises viscosimétricas de soluções poliméricas são fundamentais para caracterizar de forma molecular os polímeros. A viscosidade de soluções macromoleculares é influenciada por uma série de fatores, tais como: tamanho e configuração da molécula, volume ocupado em solução, massa molar e sua distribuição, concentração em polímero, flexibilidade da cadeia, temperatura e taxa de cisalhamento empregadas para obtenção da medida de viscosidade (FRISCH; SIMHA, 1956; VAN KREVELEN, 1972*;* WEILL, 1984 *apud* LOPES, 1989; MANO, 1985). A seguir, os parâmetros utilizados para expressar a viscosidade de polímeros em solução e respectivas definições (GARGALLO *et al,* 1987):

• **Viscosidade relativa** (η_{rel})**:** É a relação entre a viscosidade da solução e do solvente puro (Equação 2). Para determinar o valor da viscosidade relativa, o tempo de escoamento do solvente, t_0, e da solução, t, devem ser medidos no mesmo viscosímetro. Considerando que a densidade de soluções diluídas é praticamente igual à do solvente puro, a viscosidade relativa pode ser definida como a razão entre o tempo de escoamento da solução e do solvente puro.

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 \qquad \textbf{Equação 2}$$

• **Viscosidade específica** (η_{sp})**:** É a razão entre a diferença dos tempos de escoamento da solução e do solvente puro ($t-t_0$) e o tempo de escoamento do solvente puro, t_0 (Equação 3).

$$\eta_{sp} = \eta rel^{-1} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 \qquad \textbf{Equação 3}$$

• **Viscosidade reduzida (ηr_{ed}):** É a relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução (Equação 4). A unidade da viscosidade reduzida é dada por cm^3/g (CGI) ou m^3/Kg (SI); embora a unidade dL/g também seja bastante difundida na literatura científica.

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/C \qquad \textbf{Equação 4}$$

• **Viscosidade inerente** (η_{IN})**:** Razão entre o logaritmo da viscosidade relativa e a concentração (Equação 5).

$$\eta_{IN} = (\ln \eta_{rel})/C \qquad \textbf{Equação 5}$$

• **Viscosidade intrínseca [η]:** Dentre as expressões apresentadas, a viscosidade intrínseca é a mais significativa. A viscosidade intrínseca está relacionada às dimensões moleculares (volume hidrodinâmico) de cadeias poliméricas isoladas (GARGALLO *et al.,* 1987), e exprime o efeito de uma partícula isolada (sem influências de interações intermoleculares) sobre a viscosidade do solvente (Equação 6).

A viscosidade intrínseca pode ser expressa em cm^3/g (CGI) ou m^3/kg (SI).

$$[\eta] = \lim C \rightarrow 0 \ \eta_{sp}/C \qquad \textbf{Equação 6}$$

A [η] pode ser determinada através de medições de η_{SP} em diferentes concentrações, em regime diluído. A variação da viscosidade reduzida com a concentração, quando C < 1%, é dada por uma reta que obedece à equação de Huggins (Equação7) (TAGER, 1978 *apud* Lopes, 1996):

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + KH\,[\eta]^2\,C \qquad \textbf{Equação 7}$$

onde KH é a constante de Huggins. A determinação gráfica de [η] está representada na Figura 7.

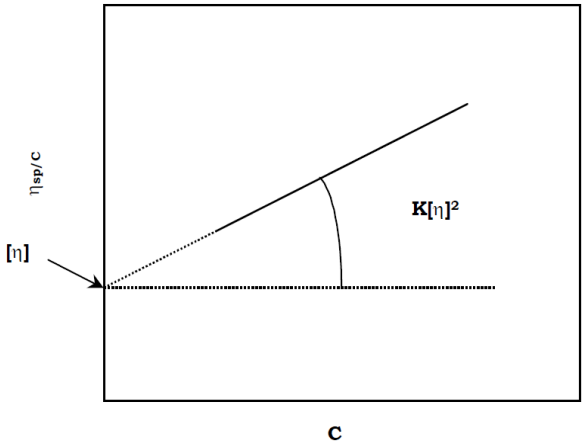


Figura 7. Determinação gráfica da viscosidade intrínseca.
Fonte: TAGER (1978) *apud* Lopes (1996)

A viscosidade intrínseca é dependente da massa molar. Foi comprovado experimentalmente que a viscosidade intrínseca de compostos moleculares, em um dado solvente, aumenta com a massa molar. A relação de Mark-Houwink-Sakurada exprime a dependência entre a viscosidade intrínseca e a massa molar (Equação 8) (TAGER, 1978; LEIGH; CHI, 1998 *apud* Lopes, 1996):

$$[\eta] = K\bar{M}^{\alpha} \qquad \textbf{Equação 8}$$

Onde $\bar{M}$ é a massa molar viscosimétrica média, ***K*** e ***a*** são constantes viscosimétricas que dependem do polímero, do solvente e da temperatura. Estas variáveis são calculadas através de medidas viscosimétricas de diversas frações monodispersas de um determinado polímero.

De modo geral, os valores de viscosidade para polissacarídeos são bastante elevados, quando comparados à maioria dos polímeros sintéticos de mesma massa molar, devido à pouca flexibilidade das cadeias de natureza glicídica. Fatores que aumentam o volume hidrodinâmico das macromoléculas, tais como a restrição da rotação em torno de ligações covalentes e a presença de cargas iônicas não neutralizadas na cadeia polimérica, tendem a aumentar a viscosidade de polímeros em solução (REES, 1972; KOWBLANSKY; ZEMA, 1981 *apud* LOPES, 1989).

O efeito da temperatura sobre a viscosidade relativa de soluções pode ser atribuído a dois aspectos principais: influência da temperatura no movimento browniano das partículas do sistema e na capacidade de agregação intermolecular.

Para alguns polímeros, deve-se ainda considerar a existência de conformações ordenadas e desordenadas, que são promovidas pelas variações na temperatura e que vão contribuir diferentemente no valor da viscosidade do polímero em solução (FRISCH, 1956 *apud* LOPES, 1989).

Quanto ao efeito da concentração, a viscosidade em sistemas polímero-solvente aumenta rapidamente com a composição em polímero, em virtude das interações intermoleculares e da formação de entrelaçamentos. Estudos realizados com gomas hidrossolúveis a baixas taxas de cisalhamento demonstram a perda da linearidade para a interação entre viscosidade específica e concentração do polímero. Ou seja, a concentração na qual ocorre a transição de um regime de concentração diluído para um concentrado ou semi-diluído, é chamada de concentração crítica (c*). É também a partir dessa concentração que as associações entre os grupos hidrófobos deixam de ser intramoleculares e passam a ser do tipo intermoleculares. Se forem colocadas em gráfico a viscosidade reduzida *versus* concentração para polímeros não-associados e associados hidrofobicamente, essa concentração crítica é facilmente observada. Acima do valor c*, os entrelaçamentos intermoleculares são significativos. A Figura 8 esquematiza os chamados regimes de concentração das soluções poliméricas: diluído, semi-concentrado e concentrado. O valor de c* reflete o volume ocupado pelo novelo polimérico isolado, e tende a diminuir com o aumento da massa molar do polímero (MENJIVAR, 1986 *apud* LOPES, 1989; TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1995; CANDAU; REGALADO; SELB, 1998).

Figura 8. Representação esquemática dos regimes de concentração de uma solução polimérica.
Fonte: LOPES (1989); MELLO *et al*. (2006)

3.7.1. Comportamento reológico da pululana

A ocorrência regular de ligações α-(1→6) na pululana interrompe o que seria uma cadeia (LEATHERS, 2003). Devido à alternância das ligações α-(1→4) e α-(1→6) em um único composto, a estrutura da pululana é muitas vezes vista como um intermediário entre as estruturas da amilose e da dextrana. É também por isso que a pululana é muito mais solúvel em água do que a amilose, que tem apenas ligações α-(1→4) (BATAILLE *et al*., 2011). Além da alta solubilidade em água, essa ligação também é responsável pela alta flexibilidade estrutural da pululana. No entanto, a mobilidade da pululana não é uniforme, com regiões de maior mobilidade centradas nas ligações α-(1→6) (DAIS, 1995; DAIS; VLACHOU; TARAVEL, 2001). Essa estrutura peculiar é também refletida na ausência de regiões cristalinas dentro do polímero: a pululana tem uma organização completamente amorfa, como experimentalmente confirmada por estudos recentes (KRISTO; BILIADERIS, 2007; FUENTES-ALVENTOSA *et al*., 2013). A conformação da pululana em meio aquoso é também influenciada pela presença simultânea das ligações α-(1→4) e α-(1→6). A ligação α-(1→6) em C_1-O-CH_2 (C_6) é mais flexível que a ligação entre C_1 e C_4 pertencente aos anéis de glicose. Eventualmente, isto conduz a uma conformação de "novelo" aleatório do esqueleto de pululana em soluções aquosas o que por sua vez produz um arranjo molecular empacotado (NISHINARI; KOHYAMA; WILLIAMS, 1991; FARRIS *et al*., 2012).

Rees (1977) *apud* Lazaridou e colaboradores (2002a) sugere que o comportamento da pululana em solução, tipicamente o de uma hélice randômica flexível, parece estar relacionado à ligação α-(1→6). Isto porque este tipo de ligação apresenta uma liberdade rotacional muito maior do que as outras ligações possíveis de ocorrer em cadeias de glucana (LAZARIDOU *et al*., 2002a; LAZARIDOU *et al*., 2003).

As propriedades reológicas da pululana, em solução, são dependentes da concentração do biopolímero, da linhagem microbiana, bem como da morfologia do micro-organismo (MCNEAL; KRISTIANSEN, 1987). Além disso, considerando a capacidade do micro-organismo produtor de sintetizar e secretar enzimas hidrolíticas no decorrer do processo fermentativo, a reologia da pululana também pode variar com

o tempo de produção, uma vez que pode influir no valor da massa molar do polímero (SLODKI, 1981 *apud* Lopes, 1996).

Em 1974, Leduy, Marsan e Coupal observaram mudanças no comportamento reológico dos meios durante a produção de pululana. Nas primeiras 24 horas, o mosto fermentado tinha um comportamento newtoniano. Porém, ao atingir o início da fase estacionária, se tornou pseudoplástico, tendendo ao comportamento newtoniano no final da fermentação. Ao contrário, um estudo de Li e colaboradores (1995) mostrou que a pululana em solução no mosto apresenta um comportamento pseudoplástico, não newtoniano, nos estágios finais de produção. De acordo com os últimos autores, o comportamento reológico do meio de cultura varia ao longo do processo fermentativo em função do estágio de produção do biopolímero. Assim, o meio de cultura que inicialmente apresenta comportamento newtoniano passa gradativamente a apresentar-se como plástico de Bingham não newtoniano pela evolução da atividade microbiana. Ao atingir o final do estágio exponencial de crescimento, o meio torna-se pseudoplástico. Na verdade, o comportamento reológico do mosto em fermentação pode estar relacionado à variação da massa molar (tamanho) do EPS, à sua concentração ou ao seu estado de agregação, mesmo se tratando de uma molécula neutra.

Neste contexto, fica patente a necessidade de avaliar a produção microbiana de pululana para diferentes linhagens, bem como em diferentes condições de cultivo, e analisar as propriedades reológicas e massa molar caso a caso a fim de estabelecer um processo biológico que permita obter o polímero desejado de forma reprodutível e econômica.

3.8. Análise espectroscópica de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho é uma ferramenta que permite analisar a natureza química, reatividade e arranjo estrutural de grupos funcionais, a presença de proteínas e carboidratos e a eficiência do processo de purificação da amostra quanto à presença de contaminantes, sais e metais (STEVENSON, 1982). Essa técnica baseia-se no fato de que os diversos tipos de ligações químicas e de estruturas

moleculares existentes numa molécula absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, em comprimento de onda característico. Em consequência, ocorre a vibração de cada ligação química numa faixa espectral específica, a qual reflete o ambiente químico de inserção de cada grupo de átomos analisado (CERETTA *et al*., 1999).

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada há mais de 40 anos devido a sua abrangente serventia em diversas áreas como engenharia de materiais, física, química, ciências biológicas e biomédicas. Suas análises permitem observar moléculas orgânicas e inorgânicas na faixa de número de onda de 4.000 a 400 cm^{-1}. Essa técnica produz informações sobre a vibração das unidades atômicas e moleculares. É um método analítico padronizado que pode revelar informações químicas e da orientação das estruturas. A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é aplicada para análises qualitativas e semi-quantitativas (CAMPOS, 2009).

A análise espectrométrica é feita a partir do registro das alterações energéticas que ocorrem em átomos ou em grupos de átomos sob a ação de um feixe de radiação infravermelha (IV). A medida do tipo e da intensidade da luz (radiação) transmitida pela amostra fornece informações das estruturas da molécula que constitui a amostra. As mudanças ocorridas na estrutura das moléculas são acompanhadas por alterações nos modos vibracionais das ligações químicas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Cada grupo funcional absorve luz em frequência característica de radiação na região do IV. Assim, para um gráfico de intensidade de radiação *versus* frequência, o espectro de IV permite caracterizar grupos funcionais de uma referência ou de um material desconhecido. Embora o espectro no infravermelho seja característico de uma molécula como um todo, certos grupos de átomos originam bandas mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de grupos funcionais que permite a obtenção de informações úteis para a identificação de estruturas, através da avaliação do espectro e consulta a tabelas de referência desses grupos funcionais (CANEVAROLO JR., 2004). A Tabela 8 apresenta algumas faixas de absorção para diferentes grupos funcionais.

Segundo Benites e colaboradores (1999), a introdução da técnica de transformada de Fourier na determinação dos espectros de infravermelho proporcionou avanços como maior velocidade na aquisição dos espectros, melhoria na definição dos sinais e exatidão na análise e redução do custo do equipamento. Por isso, é um método simples e barato comparado a outras técnicas espectroscópicas, além da pequena quantidade de amostra requerida para efetuar a análise.

Tabela 6. Faixas de absorção para diferentes grupos funcionais

Número de ondas (cm^{-1})	Grupos Funcionais
3650-2700	O-H
3500-3300	N-H
3200-2800	C-H
3440 - 3300	característica do estiramento e deformação axial de grupos hidroxila (O-H)
3380	OH
2940-2840	estiramento vibracional simétrico e assimétrico de grupos CH2
2850–2980	CH_2
2300-2100	C=C
2300-2200	C=N
2300	indicativo de carbono sp3
1790 - 1740	estiramento vibracional de grupos carboxílicos (deformação axial de C=O de acetato)
1760-1690	C=O
1640	H-O-H
1629	deformação assimétrica do grupamento C=O.
1600-1500	C=C
1250–1460	CH
1162	deformação axial assimétrica C-O-C (ligação glicosídica)
1100-550	C-X
1080	deformação axial simétrica de C-O-C
1162	deformação axial assimétrica C-O-C (ligação glicosídica)
1020	ocorre uma deformação axial de C-O de álcoois primários

Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER (2000); SEO *et al*. (2004); SOARES; GIL; REZENDE (2006); SAKATA; OTSUKA (2009).

3.9. Análise Térmica

A Análise Térmica pode ser definida como um conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física ou química de uma dada substância ou material em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Dentre as inúmeras áreas de aplicação da análise térmica incluem-se: decomposição térmica; determinação de umidade de voláteis e de resíduos; oxidação térmica; cinética de reação de cura e cristalização; diagrama de fases; determinação de calor específico; determinação de transição vítrea, de fusão e de tempo de armazenamento, dentre outros (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A análise térmica é uma técnica que possui algumas vantagens como: a necessidade de pouca quantidade de amostra por análise; a grande variedade de informações obtidas em um único gráfico; a possibilidade de utilizar as amostras sem necessidade de preparo prévio; entre outras. Por isso, esta técnica encontra aplicação em diversas áreas, desde a alimentícia até a engenharia civil (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

As técnicas termoanalíticas mais utilizadas são: Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG); Análise Térmica Diferencial (DTA); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A Tabela 7 apresenta os principais parâmetros medidos, instrumentos utilizados e curva referência esperada dessas principais termoanálises.

A termogravimentria é uma técnica de análise térmica usada para medir variações de massa (perda ou ganho) sofridas pela amostra, resultantes de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação ou decomposição, oxidação), em função da temperatura ou do tempo. Em uma curva de TG são observadas inflexões devido ao processo de degradação térmica do material, o que depende da sua natureza química, ou seja, da estrutura e da extensão das forças de interação. As curvas DTG detalham o processo de degradação (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Os resultados das curvas de variação de massa *versus* temperatura apresentam informações sobre estabilidade térmica e composição da amostra original, estabilidade térmica e composição de algum composto intermediário que pode ter sido formado e, ainda, a composição de resíduos, se houver (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A termogravimetria pode ser conduzida de três formas:

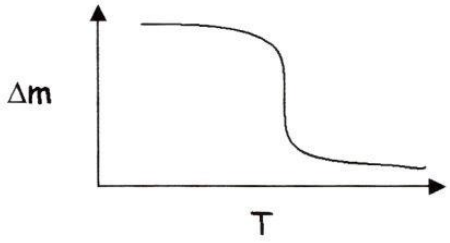
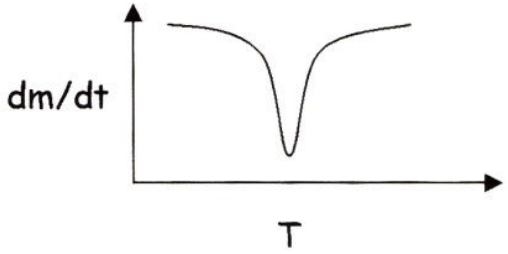
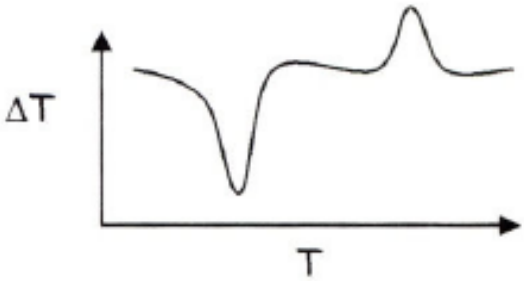
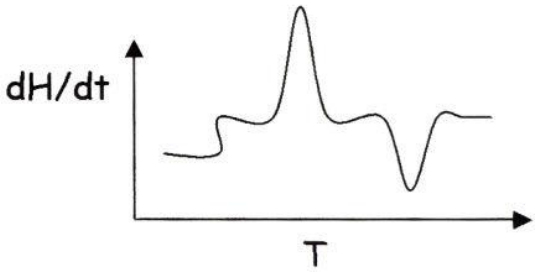
- Termogravimetria isotérmica, na qual a massa da amostra é registrada em função do tempo, a uma temperatura constante;

- Termogravimetria semi-isotérmica, na qual a amostra é aquecida à massa constante, a cada série de aumento de temperatura;

- Termogravimetria dinâmica, na qual a amostra é aquecida em um ambiente onde a variação da temperatura é pré-determinada, preferencialmente a uma velocidade linear.

A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e de outros vários materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

Tabela 7. Curva referência e informações obtidas pelas técnicas de Análise Térmica

Técnica	Parâmetro Medido	Instrumento	Curva Padrão
TG	Variação de massa (Δm)	Termobalança	
DTG	Variação de massa (dm/dt)	Termobalança	
DTA	Variação de temperatura (ΔT)	Célula de DTA	
DSC	Variação de entalpia (dH/dt)	Calorímetro	

Fonte: MOTHÉ; AZEVEDO (2002)

3.10. Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um fenômeno físico utilizado para investigar as propriedades moleculares da matéria através da irradiação do núcleo atômico por ondas de radiofrequência. A condição básica é que, no núcleo observado, possua um próton não emparelhado, ou seja, um número ímpar de prótons. Esta condição é conhecida como número quântico de *spin* nuclear I e para que um núcleo

ou seu isótopo apresente o fenômeno da ressonância, I deve ser maior que zero. Qualquer núcleo que possua um isótopo nesta condição pode apresentar o fenômeno da RMN ex. ^{1}H (hidrogênio), ^{19}F (flúor), ^{31}P (fósforo),^{13}C (carbono), entre outros (BREITMAIER; VOELTER, 1990; BATHISTA; SILVA, 2003; SILVA; SILVA, 2003, SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Um dos pontos fundamentais da RMN para a determinação da estrutura química é o deslocamento químico, que é o fenômeno que caracteriza a dependência da frequência de um núcleo ao seu ambiente químico. O deslocamento químico está relacionado à densidade eletrônica ao redor do núcleo e possui alto valor analítico. O fato de que certos sinais são observados em determinados deslocamentos químicos é uma boa indicação da presença de certos grupos funcionais na molécula, e a informação obtida geralmente permite um reconhecimento direto que a molécula pertence a uma determinada classe de substancias (BREITMAIER; VOELTER, 1990; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; BATHISTA; SILVA, 2003).

O deslocamento químico é relacionado à frequência de ressonância de um núcleo em particular. Sendo a frequência por si proporcional à força do campo magnético. O deslocamento químico é usualmente dado relativo a uma referência e normalizado com respeito a frequência deste padrão. Como resultado, o deslocamento químico em vários aparelhos pode ser comparado, e é característica de um determinado núcleo, num composto especifico, em um solvente em particular (BREITMAIER; VOELTER, 1990; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; BATHISTA; SILVA, 2003). O deslocamento químico de um núcleo (x) é definido como mostra a Equação 9:

$$\delta(x) = \frac{Wx - Wref}{Wref} \times 10^{6}$$

Equação 9

Onde *Wref* é a frequência do padrão. Já que os valores normalizados são muito pequenos eles são multiplicados por 10^{6} e apresentados em parte por milhão (ppm).

3.11. Cromatografia de Permeação em Gel

A técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) é extremamente poderosa para fracionamento de um polímero e sua distribuição de massa molar. Em essência, a técnica consiste na separação molecular com base no tamanho efetivo das moléculas em solução, conseguida através da injeção de uma solução de polímero numa corrente contínua de solvente que passa através de colunas com pérolas porosas, de modo que as moléculas menores penetram mais nas partículas, permanecendo mais tempo na coluna do que as moléculas maiores (SILVA; SILVA, 2003).

Os cromatógrafos de permeação em gel consistem essencialmente de um sistema de bombeamento, injetor, colunas, detectores e registradores. O fluxo de solvente se divide em dois: uma metade vai para uma coluna de referência, e a outra, para a coluna que conterá a amostra. A solução de polímero é injetada na corrente da amostra através de uma válvula. As duas correntes, após passarem pelos dois sistemas de colunas (cada um com três ou quatro colunas em série com pérolas de diferentes tamanhos) são analisadas pelo detector (SILVA; SILVA, 2003).

Essa técnica é utilizada para análises de aditivos e compostos orgânicos, determinação de massa molar, polidispersividade, viscosidade intrínseca e grau de ramificação em polímeros (SILVA; SILVA, 2003).

- Estimativa da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel

Uma das formas de obter a curva de distribuição de massa molar (CDMM) é através da cromatografia de permeação em gel (GAMBETTA, 2006). A avaliação da CDMM do polímero permite inferir as propriedades finais do polímero. É possível afirmar que diferentes CDMMs levam a diferentes propriedades finais do material. Uma vez que seja possível controlar a forma da CDMM do polímero, torna-se também possível controlar as propriedades finais do polímero.

3.12. Planejamento de Experimentos

A essência de um bom planejamento experimental consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer o tipo de informação que procuramos (WU; HAMADA, 2000).

Experimentos são uma série de testes, nos quais alterações propositadas são feitas nas variáveis de entrada do processo ou sistema, de forma que se possa observar e identificar razões para as mudanças ocorridas nas suas respostas de saída. Experimentos são realizados em quase todos os campos de investigação e, em geral, têm o propósito de obter informações sobre um processo ou sistema particular (BARROS NETO *et al.*, 1995; BENÍCIO *et al.,* 2001).

O planejamento experimental representa uma importante ferramenta no mundo da engenharia. Ele é usado na elaboração e estudo de viabilidade de novos produtos no desenvolvimento dos processos de produção e na melhoria do desempenho de processos já existentes. Objetiva-se na maioria dos casos, desenvolver um processo consistente, ou seja, um processo pouco afetado pelas condições ambientais (PIMENTA, 2006).

Usando projetos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos; melhorando ou otimizando sistemas, processos e produtos. Esses métodos são ferramentas poderosas, com os quais vários objetivos específicos podem ser alcançados. Pode-se fabricar produtos com melhores características, diminuir o tempo de processo, reduzir os custos totais e variabilidade do processo, e aperfeiçoar o seu rendimento (MONTGOMERY, 1997, CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES, 2010).

Os processos ou sistemas, por sua vez, podem ser compreendidos como a combinação de máquinas, métodos, pessoas e outros recursos que transformam algumas entradas, em uma saída, que pode ter uma ou mais respostas observáveis.

Imaginemos um eixo que descreva o progresso de uma investigação experimental. Caminhar ao longo desse eixo corresponderia a ir descendo as linhas

da Tabela 8. Na primeira linha, deve o pesquisador realizar uma triagem e descartar as variáveis não-significativas. O uso de planejamentos fatoriais fracionários torna-se bastante econômico para fazer isso e podem ser usados para estudar vinte ou mais fatores experimentais ao mesmo tempo.

Tabela 8. Evolução de um estudo empírico

Objetivo	Técnica
Triagem das variáveis	Projetos fracionários
Avaliação da influência de variáveis	Projetos fatoriais completos
Construção de modelos empíricos	Modelagem por modelos mínimos quadrados
Otimização de parâmetros	Metodologia de superfície resposta
Construção de modelos mecanísticos	Dedução a partir de princípios gerais

Fonte: BARROS NETO *et al*. (1995); CHRISMAN (2005)

O planejamento fatorial 2^K é um método simples e eficiente que pode ser aplicado desde a etapa de separação das variáveis importantes (*screening*) até a etapa de finalização da cinética do processo, construção de modelos matemáticos, entre outros (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores). Ele permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim uma análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais (CALADO; MONTGOMERY, 2003, RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Planejamentos fatoriais são úteis para medir os efeitos (ou influências) de uma ou mais variáveis na resposta de um processo. É a única maneira de prever interação entre fatores. O usual é realizar um planejamento com dois níveis, no máximo três. O uso de mais variáveis aumentaria sobremaneira o número de pontos experimentais, fato esse que se quer evitar quando se propõe um planejamento (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2001; CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Após ter relacionado as variáveis importantes, o próximo passo seria avaliar quantitativamente sua influência sobre a resposta de interesse, bem como suas possíveis interações. Para fazer isso, o pesquisador pode empregar planejamentos fatoriais completos. Ultrapassando esta etapa e desejando obter uma descrição mais detalhada, isto é, obter modelos mais sofisticados, pode-se empregar a modelagem por mínimos quadrados.

Tendo-se como objetivo principal a otimização do sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, pode-se empregar a técnica de metodologia de superfície resposta (RSM).

Estudos têm demonstrado que a concepção da metodologia de planejamento experimental e a metodologia de superfície resposta (RSM), têm facilitado o desenvolvimento de processos e tem sido utilizada de forma significativa a nível industrial (NAWANI; KAPADNIS, 2005).

A metodologia de superfície resposta é um sistema de modelagem empírico que avalia a relação entre um grupo de variáveis que podem ser controladas e a resposta observada. Atualmente tem sido aplicada na indústria alimentícia e na otimização de processos fermentativos (CAZETTA *et al.*, 2005).

A otimização de processos fermentativos foi por muito tempo utilizada para melhoria do rendimento e produtividade de vários bioprocessos. Fermentações foram otimizadas para implementação da variação de um componente por vez. Esta aproximação assume que as variáveis de processo não interagem e que a resposta do processo é função de um parâmetro simples, que é variado. Estudos têm demonstrado a importância da utilização em processos fermentativos do planejamento de experimentos e da metodologia de superfície resposta, na otimização de parâmetros de processo (ABDEL-FATTAH, 2002; ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002; TANYILDIZI, ÖZER; ELIBOL, 2005). Através desta metodologia, fatores e interações que afetam a resposta desejada e podem ser controlados experimentalmente, são testados de acordo com suas eficiências para otimização de parâmetros de processos importantes na fermentação, com um número limitado de experimentos (LAKSHMAN

et al., 2004; ABDEL-FATTAH *et al*., 2005; CAZETTA *et al.*, 2005; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Para realizar um planejamento experimental, construir modelos não basta. É preciso também avaliar se eles são adequados à situação que se pretende descrever. Só então é cabível extrair conclusões desses modelos.

Sendo assim, para que se possa aplicar a metodologia de experimento em qualquer processo, alguns requisitos básicos são necessários:

- Identificar o problema do processo que se deseja estudar;
- Definir as variáveis que podem afetar este processo;
- Identificar quais destas variáveis podem ser controladas; escolher quais destas variáveis serão utilizadas nos experimentos, caso não seja viável a utilização de todas;
- Selecionar uma ou mais variáveis resposta do processo que serão utilizadas para análise dos experimentos;
- Determinar a faixa de observação em que cada uma das variáveis selecionadas será analisada;
- Escolher o tipo de projeto experimental que será usado e que melhor se adeque à situação.

Entretanto, para que todos esses requisitos sejam atendidos é necessário que se tenha um bom conhecimento do processo em estudo. Geralmente, este conhecimento é uma combinação entre a experiência prática e teórica (MONTGOMERY, 1997; RODRIGUES, 2010).

A interpretação estatística de dados obtidos de um planejamento experimental pode ser executada seguindo vários critérios estatísticos e de significância, dentre os quais destacamos: o Test p, o Teste *t*, a análise de variância e o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais, via coeficiente de correlação.

No planejamento experimental, o Teste p consiste em uma ferramenta que dá a probabilidade de se descartar os efeitos principais e de interação da variável em estudo, para um dado nível de confiança. A escolha do nível de confiança se dá como

função do nível de acurácia desejada. O valor mais comum para o nível de confiança é de 95%.

O Teste *t* de Sdudent, ou Teste *t* serve para avaliar se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero, para um dado nível de confiança.

O coeficiente de correlação mede a aproximação entre os pontos experimentais e uma curva qualquer. Quando este valor se aproxima de 1, tem-se um bom ajuste dos pontos à curva, significando que esta pode descrever continuamente o fenômeno estabelecido pelos pontos, no nível de confiança desejado (BENÍCIO *et al*., 2001).

3.12.1. Interação entre os fatores

Um dos problemas mais comuns que o experimentador pode enfrentar é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Este problema pode ser encarado como um caso particular da situação mostrada na Figura 9 em que um certo número de fatores, F_1, F_2,...F_k, atuando sobre o sistema em estudo, produz as respostas R_1, R_2,...R_j.

O sistema é considerado como uma função (desconhecida, em princípio) que atua sobre as variáveis de entrada (os fatores) e produz como saída as respostas observadas. O objetivo do experimentador é descobrir essa função, ou pelo menos obter uma aproximação satisfatória para ela.

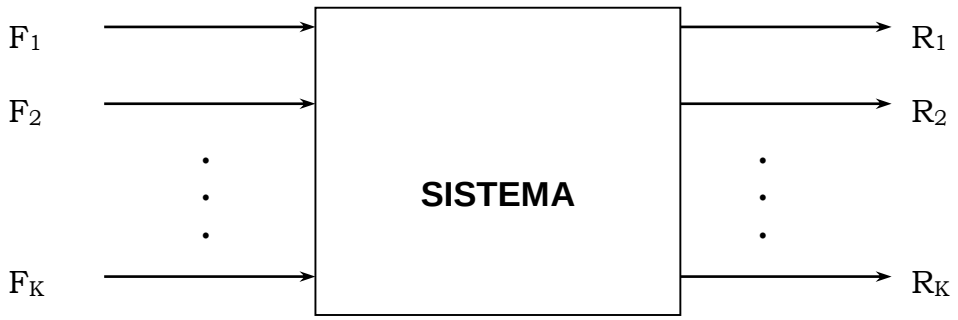


Figura 9. Representação esquemática de um sistema considerado como função desconhecida ligando os fatores (variáveis de entrada) às respostas (variáveis de saída).

Para que se possa entender como é feita a escolha de um projeto experimental, a princípio deve-se definir o que é um fator. Um fator é qualquer variável de processo

controlável ou não, cuja variação pode ou não influenciar a resposta final do processo, seja sozinha ou interagindo com uma ou mais variáveis do mesmo processo (MONTGOMERY, 1997; RODRIGUES, 2010).

As variáveis podem assumir valores, ou seja, níveis de mínimo (em geral representado pelo sinal -), de máximo (em geral representado pelo sinal +) e médio (em geral representado pelo numeral zero). Os fatores envolvidos em um experimento podem ser qualitativos ou quantitativos. Quando se trabalha com fatores quantitativos os níveis são chamados de versões (BARROS NETO *et al*., 1995; CHRISMAN, 2005).

Em geral, para processos fermentativos, os fatores quantitativos são aqueles cujos níveis podem ser associados a pontos em uma escala numérica, tais como, pressão, tempo, temperatura, agitação, e aeração. Por outro lado, fatores qualitativos são aqueles cujos níveis podem ser organizados em ordem de magnitude, tais como, operadores, bateladas, lotes de matéria-prima, equipamentos iguais utilizados em um processo, diferentes cepas de microrganismos empregadas, entre outros.

3.12.2. Utilização de planejamento experimental na produção de pululana

Várias pesquisas têm sido conduzidas utilizando a metodologia de planejamento de experimentos, para otimização de componentes e fatores ambientais do meio de produção.

Lin, Zhang e Thibault (2007) avaliaram o efeito de seis fatores (linhagem, fonte de carbono, concentração e fonte de nitrogênio, aeração e pH inicial) na produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* em frascos agitados utilizando planejamento fatorial e, simultaneamente, otimizaram a massa molar e a concentração de pululana. A análise do efeito dos fatores revelou que a variável linhagem teve a maior influência sobre a concentração de pululana, enquanto que o efeito da fonte de nitrogênio teve mais relevância na sua massa molar. No entanto, a concentração de nitrogênio não mostrou influência significativa sobre ambos. A otimização desses fatores permitiu, após 120 h de fermentação, a obtenção de 22,6 g/L de pululana e massa molar de 2 x 10^6 g/mol utilizando a linhagem ATCC 42023, sacarose como fonte de nitrogênio, 0,005 mol/L de NH_4^+, e pH inicial igual a 5,5.

Jiang (2010) utilizou metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de fermentação na obtenção de pululana por *Aureobasidium pullulans* SK1002 em frascos agitados. Utilizou como variáveis temperatura, tempo e pH inicial e, como variável resposta, a produção de pululana. A partir da avaliação estatística, pode-se observar que a produção de pululana foi significativamente afetada pelas três variáveis (temperatura, tempo de fermentação e pH inicial). As condições ótimas de cultivo que estimularam a produção máxima de pululana foram: temperatura, 28°C, tempo de fermentação (120 h) e pH inicial (5,5). Sob essas condições otimizadas, o rendimento pululana máxima prevista foi de 30,28 g/L.

Em 2012, Yu e colaboradores, utilizando metodologia de superfície resposta, estudaram o aumento da massa molar e da produção de pululana a partir de *A. pullulans*. Utilizaram como variáveis seis nutrientes: extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4, NaCl, $MgSO_4$ $7H_2O$ e $CaCl_2$. Os autores observaram que o NaCl e K_2HPO_4 têm influência significativa sobre a massa molar de pululana, enquanto que o extrato de levedura e $(NH_4)_2SO_4$ afetaram significativamente o rendimento de pululana. Para atingir uma massa molar mais elevada e mais eficiente de produção de pululana, uma metodologia superfície de resposta foi utilizada para prever uma combinação ótima de nutrientes. Utilizando 50 g/L de glicose, 1,0 g/L de extrato de levedura, 0,3 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de K_2HPO_4 e 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ resultou na obtenção de massa molar $5,74 \times 10^6$ g/mol, enquanto que 50 g/L de glicose, 3,0 g/L de extrato de levedura, 0,6 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 g/L de K_2HPO_4, 1,0 g/L de NaCl e 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, promoveu a obtenção de 25,65 g/L de pululana e rendimento de 0,51 g/g, ambos após 60 h de fermentação.

Mais recentemente, Sharmila e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da concentração inicial de semente de jaca moída, K_2HPO_4, extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$ e $ZnSO_4.7H_2O$ empregando o método Plackett–Burman. A análise estatística dos resultados experimentais demonstrou que os valores ideais foram: 2% (m/v) de semente de jaca moída, 0,55% (m/v) de K_2HPO_4, 0,30% (m/v) de extrato de levedura e 0.006% (m/v) de $ZnSO_4.7H_2O$, obtendo a concentração máxima de pululana de 18,76 g/L.

No mesmo ano, Sugumaran e colaboradores, utilizando o planejamento experimental Plackett–Burman e metodologia de superfície resposta, estudaram o efeito das variáveis K_2HPO_4, KH_2PO_4, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 5H_2O$, extrato de levedura e teor de umidade na composição do meio sólido contendo sementes de jaca como substrato para produção de pululana. Observaram que a produção de pululana, 34,22 g/L após 96 h de fermentação, foi significativamente afetada pelas variáveis médias de KH_2PO_4 (4,16 g/L), $ZnSO_4$ $5H_2O$ (0,052 g/L), NaCl (1,69 g/L) e teor de umidade (47,9% m/m). Dois anos antes, Goksungur, Uzunogulları e Dagbagl, utilizando metodologia de superfície resposta, avaliou o efeito do tempo de incubação, da concentração inicial de substrato (amido de batata hidrolisado) e do pH inicial do meio na produção de pululana. O máximo de pululana (19,2 g/L) foi obtido após 111,8 h de fermentação, tendo como concentração inicial de substrato igual 79,4 g/L e pH inicial 7,26. Esta otimização permitiu um aumento de 20% na concentração final de pululana.

3.13. Citotoxicidade do biopolímero

Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica de um novo material.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO *et al*, 2003). O emprego de cultura de células em pesquisas para estudo de biocompatibilidade de materiais tem avançado bastante nos últimos anos. Experimentos celulares laboratoriais possibilitam reproduzir condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo podendo, dessa forma, observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento (QUEIROZ, 1997). Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de

mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular. Estudos com estes métodos demonstraram que os testes om culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO *et al*, 2003).

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

Neste estudo foram testadas três linhagens de *Aureobasidium pullulans*, compreendendo duas linhagens pertencentes à Coleção de Cultura nacional e uma proveniente de Banco Internacional.

As linhagens IOC 3011 e IOC 3775 foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Inez de Moura Sarquis, responsável pelo Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos/IOC.

A linhagem DSMZ 3042, originalmente ATCC 42023, foi adquirida na Coleção de Cultura alemã *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ). Segundo alguns autores, o cultivo desta linhagem normalmente não leva à cogeração do pigmento melanina (WEST; REED-HAMER, 1993; SHABTAI; MUKMCNEV, 1995**)**.

4.1.1. Manutenção das linhagens microbianas

As linhagens fúngicas foram mantidas sob refrigeração à 4ºC (cultura estoque), através de repiques mensais em tubos de ensaio contendo meio Agar Dextrose-Batata inclinado, consistindo de (g/L): extrato de batata 4,0, dextrose 20,0 e agar-agar 15,0. Após ajuste do pH em 6,0 com NaOH 1M, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após esterilização o pH do meio foi novamente checado.

4.2. Meios de cultivo

4.2.1. Meio de crescimento

O meio de cultura utilizado para ativação e preparo do inóculo foi o caldo Sabouraud, consistindo de (g/L): glicose 40,0 e peptona 10,0. Após ajuste do pH para 6,0, e distribuição de 100 mL do meio em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, foi realizada a esterilização a 121°C por 15 minutos.

4.2.1.1. Preparo do inóculo

As culturas foram ativadas através do repique de uma alçada da cultura estoque para 100 mL do meio de crescimento (item 4.2.1) em frasco Erlenmeyer de 500 mL de capacidade. Após 48 h de incubação em agitador rotatório (*Controlled Enviromental Incubator Shaker*, *New Brunswick Scientific Co*, EUA), a 150 rpm e 28 ± 1°C, alíquotas dos cultivos foram visualizadas a fresco com azul de metileno e observadas por microscopia óptica a fim de avaliar a viabilidade celular. Em cada fase, também foi avaliada a pureza dos cultivos, por análises microscópicas de preparações coradas pela técnica de coloração diferencial de Gram (PELCZAR, 1993; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004).

O volume de cultivo necessário para inoculação do meio de produção foi calculado a partir do resultado da quantificação celular por câmera de Neubauer (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004) de modo a estabelecer concentração inicial de 5,0 x 10^5 células/mL no meio.

4.2.2. Meios de produção

Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico a fim de definir os componentes mínimos necessários para a síntese de pululana por *A. pullulans* (VIJAYENDRA; BANSAL; PRASAD, 2001; CHI; ZHAO, 2003; SEO *et al*., 2004). A Tabela 9 apresenta a composição do meio basal empregado.

Tabela 9. Composição do meio basal

Componentes	Quantidade
Fosfato de potássio	5,0 g
Sulfato de magnésio	0,2 g
Cloreto de sódio	1,0 g
Tampão* q.s.p.	1 L

*6,8 g/L fosfato de potássio; 0,4 g/L hidróxido de sódio (pH 6,0) (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1968)

Para a formulação do meio de produção, o meio basal (Tabela 9) foi acrescido de matéria-prima nacional e de rejeito industrial visando a redução dos custos de produção. Como principal fonte de carbono e energia foi empregado açúcar cristal (marca União) em substituição à glicose, carboidrato comumente utilizado na formulação de meios para cultivo deste micro-organismo (DUAN; CHI; WANG, 2008; WU *et al*., 2009; CHOUDHURY; SALUJA; PRASAD, 2011).

Como fonte de nitrogênio foi utilizado, sem tratamento prévio, um dos rejeitos da indústria cervejeira – a biomassa microbiana (levedura) esgotada – doravante referida como levedura residual de cervejaria (LRC), considerando os bons resultados obtidos em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2010).

As concentrações das fontes de carbono e nitrogênio foram definidas a partir de planejamento experimental, em ensaios de bancada, descrito mais adiante (item 4.3.3). Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

4.3. Etapas Experimentais

A Figura 10 apresenta o esquema adotado para a realização deste trabalho, cujo detalhamento encontra-se a seguir (itens 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4).

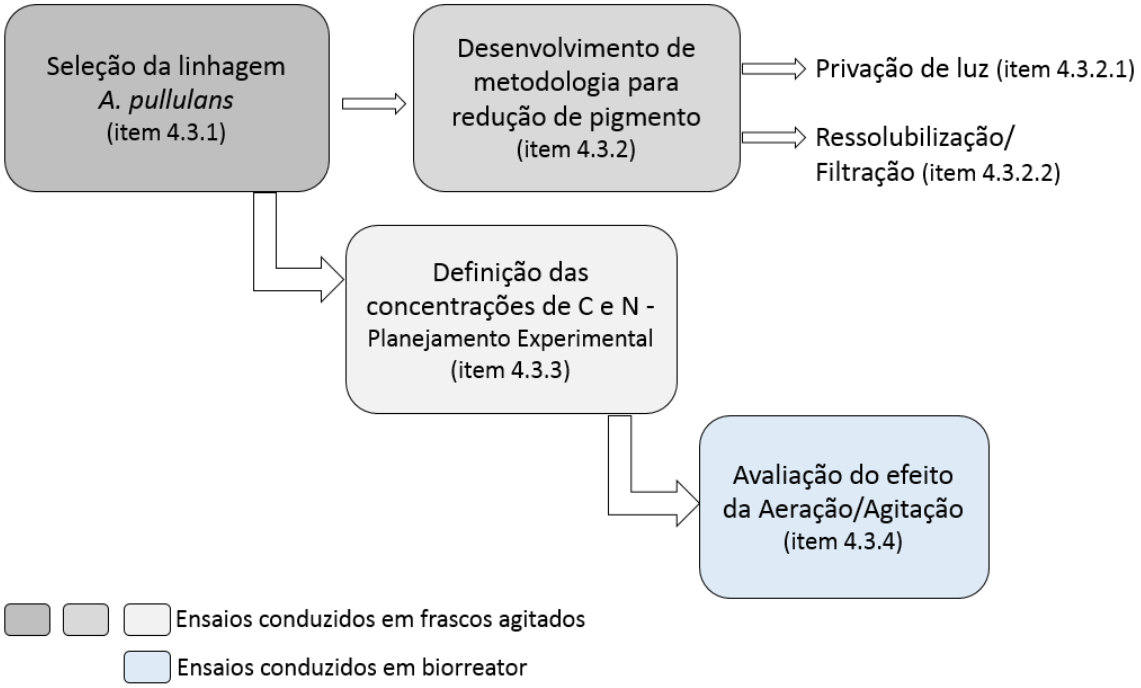


Figura 10. Esquema das etapas experimentais.

4.3.1. Seleção das linhagens microbianas

Foram realizados cultivos das três linhagens microbianas (item 4.1) no meio de produção (item 4.2.2) de modo a avaliar o potencial de síntese de biopolímero a partir de açúcar cristal e levedura residual cervejeira. Conforme anteriormente mencionado, a produção de pululana está vinculada à forma unicelular do fungo. Por isso, foi dada a devida atenção à morfologia macroscópica das culturas durante o processo fermentativo.

Para a seleção da linhagem também foi considerada a cogeração de melanina, uma vez que isto acarreta em custos posteriores para o tratamento do polímero com vistas à remoção do pigmento.

Nesta etapa, o processo fermentativo foi conduzido em frascos Erlenmeyers contendo o meio de produção, consistindo do meio basal acrescido de 30 g/L de açúcar cristal e 2 g/L de LRC, conforme dados anteriormente obtidos (OLIVEIRA, 2010). Decorridas 96 h de incubação a 28 ± 1°C, a 150 rpm, os cultivos foram avaliados macro e microscopicamente, e realizada a quantificação do polímero produzido.

4.3.2. Estratégias para redução de pigmento

Esta etapa se fez necessária em face da ocorrência de síntese de pigmento pela linhagem selecionada quando cultivada em meio contendo como principal fonte de carbono o açúcar cristal, e LRC, como fonte de nitrogênio.

A cogeração de melanina é um dos principais problemas na produção de pululana, que pode ser dependente da linhagem empregada e/ou das condições de cultivo (PRASONGSUK; SULLIVAN; KUHIRUN, 2005). Isto restringe a aplicação do biopolímero no setor alimentício e, principalmente, nas aplicações mais nobres, como em vacinas.

Alguns tratamentos para descoloração do biopolímero recuperado foram testados por Kachhawa, Bhattacharjee e Singhal (2003). Foram testados carvão ativado, diferentes solventes orgânicos (puros e em mistura) e uma combinação de KCl e solventes, sendo, segundo os autores, o tratamento com acetil metil cetona o

mais efetivo na remoção da cor, sem comprometer o rendimento. Entretanto, o emprego de solventes pode ocasionar a degradação de pululana.

Em vista do exposto, no presente estudo, foram avaliadas duas estratégias para redução da pigmentação do biopolímero produzido, contemplando o processo de produção e um método físico de separação, conforme detalhado a seguir.

4.3.2.1. Primeira estratégia: privação de luz

A síntese do biopolímero na ausência de luz se respalda em trabalho realizado por Lingappa e colaboradores (1963) citado por Gaad (1982). Segundo eles, a luz estimula a produção de melanina por *A. pullulans*.

Nesta etapa, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer sob agitação a 150 rpm, por 96 h. Dos quatro cultivos concomitantemente realizados, dois frascos foram recobertos com papel de alumínio de forma a evitar a exposição à luz (natural e artificial), enquanto que os outros cultivos não foram privados da incidência luminosa. Todos foram inoculados com igual concentração inicial de micro-organismos (5×10^5 células/mL).

4.3.2.2. Segunda estratégia: ressolubilização e filtração do biopolímero

A melanina pode estar associada ao biopolímero de duas formas: física e/ou química. A associação física ocorre pelo aprisionamento da melanina nos agregados (entrelaçamentos não organizados) de natureza glicídica ou deles com proteínas. Já a forma química se dá por associação da melanina, que é uma proteína, ao biopolímero (polissacarídeo) por ligações hidrogênio, formando assim um complexo polieletrolítico (LOPES, 1989; RINAUDO; MILAS; TINLAND, 1990 *apud* LOPES, 1996).

Portanto, a ressolubilização em água teve como objetivo permitir a hidratação da macromolécula glicídica, provocando a sua “abertura”, de modo a propiciar o desprendimento da melanina a ela associada de forma física. Isto se baseia na maior afinidade do biopolímero pela água, promovendo a liberação da melanina e uma melhor solvatação do polissacarídeo (WHISTLER, 1973 *apud* LOPES, 1989).

Para tanto, nesta etapa, o biopolímero extraído do mosto fermentado por precipitação com álcool etílico foi seco com jato de ar quente (biopolímero bruto) e, a seguir, ressolubilizado em água destilada, estabelecendo uma concentração de 3 g/L. Após 12 h sob agitação mecânica à temperatura ambiente (sala aclimatizada a 25°C), a solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,47 µm de porosidade e, em seguida, seca em liofilizador (biopolímero tratado).

Para fins comparativos, tanto o biopolímero bruto quanto o tratado foram submetidos à análise térmica, viscosimétrica e espectroscópica. Simultaneamente, essas análises foram realizadas com pululana comercial referência da marca Sigma-Aldrich.

4.3.3. Definição das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio

De modo a reduzir os custos operacionais para a produção de exopolissacarídeo pela cultura selecionada (item 4.3.1), e assim garantir a viabilidade econômica do processo, este estudo visou a definição dos parâmetros nutricionais de maior relevância. Para tanto, um planejamento experimental e análise estatística foram adotados como ferramenta.

A manipulação das condições de fermentação permite controlar, além da quantidade de biopolímero produzido, também a composição e as propriedades do mesmo (SUTHERLAND, 1990 *apud* LIMA, 1999; BREEDVELD *et al*., 1993, LIN; ZHANG; THIBAULT, 2007).

Nesta etapa, as fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio de produção que constou do meio basal (Tabela 9 – item 4.2.2) acrescido de diferentes concentrações das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (LRC), objetos deste estudo. Os experimentos foram realizados por 96 h, com agitação de 150 rpm, à 28 ± 1°C e concentração inicial de células de 5,0 x 10^5 células/mL.

4.4.3.1. Planejamento experimental e análise estatística

Com o intuito de avaliar a tendência das concentrações de carbono e de nitrogênio na produção de pululana, foi realizado um projeto de experimentos do tipo delineamento fatorial completo (BOX, 1978; BARROS NETO *et al*., 1995; MONTGOMERY, 1997; CALADO; MONTGOMERY, 2003). Quando há interesse em analisar mais de um parâmetro em um processo, deve-se realizar um experimento fatorial. Esta estratégia experimental consiste em variar todas as variáveis ao mesmo tempo, o que possibilita, além de identificar a influência de cada parâmetro sobre o sistema, também considerar qualquer possível interação dele com outros parâmetros (BARROS NETO *et al.*, 1995; RODRIGUES, 2010).

Foi realizado um planejamento fatorial completo (2^K), onde K é o número de variáveis e 2 o número de níveis, resultando numa condição de $2^2 = 4$, com ponto central. Cada um dos experimentos foi realizado em duplicata, além de seis repetições no ponto central, totalizando quatorze experimentos, contabilizadas as réplicas. A inclusão do ponto central teve como intuito viabilizar o cálculo do erro experimental e, consequentemente, a verificação de falta de ajuste para o modelo escolhido, com o menor número de ensaios. Segundo Benício e colaboradores (2001), duas repetições para o ponto central seriam suficientes para o cálculo de erro experimental. Neste caso, a escolha de mais repetições teve como intuito obter uma estimativa mais precisa do erro.

Estabeleceu-se como nível superior, representado pelo sinal +1, para as variáveis concentração inicial de açúcar cristal (X_1) e concentração inicial de LRC (X_2): 70 e 8 g/L, respectivamente. Os níveis inferiores, representados por -1, foram: 30 e 2 g/L, respectivamente. Os valores utilizados foram definidos com base em informações da literatura (GOKSUNGUR *et al*., 2005; CHOUDDHURY, SALUJA; PRASAD, 2011; WU; CHEN; PAN, 2012; WU *et al*., 2009; 2012) e trabalho anteriormente realizado (OLIVEIRA, 2010). A Tabela 10 apresenta um resumo das variáveis e dos níveis empregados para o desenvolvimento do Planejamento Experimental.

Tabela 10. Variáveis e níveis empregados no Planejamento Experimental

Variáveis	Níveis (g/L)		
	Superior (+)	Central (0)	Inferior (-)
X_1	70	50	30
X_2	8	5	2

X_1 – Concentração Inicial de açúcar cristal (g/L);
X_2 – Concentração Inicial de Levedura Residual Cervejeira (g/L)

Os experimentos foram desenvolvidos a partir de uma sequência aleatória, de modo a garantir a distribuição equânime das condições estudadas. A matriz do Planejamento está representada na Tabela 11.

Tabela 11. Matriz referência de planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Experimentos	X_1 Concentração Inicial de Açúcar Cristal	X_2 Concentração Inicial de LRC
1a; 1b	-	-
2a; 2b	+	-
3a; 3b	-	+
4a; 4b	+	+
5a; 5b; 5c; 5d; 5e; 5f	0	0

(+) nível superior; (0) nível central; (-) nível inferior

Como resposta para análise da importância das variáveis na produção de pululana e da interação entre as variáveis, ao final do processo, foram feitas determinações de: fator de conversão ($Y_{P/S}$), viscosidade absoluta do mosto fermentado e massa molar. Esses dados analíticos também foram empregados na elaboração do modelo empírico e, uma vez determinadas as variáveis do processo, o biopolímero recuperado do mosto fermentado nas condições ideais foi caracterizado com base em aspectos físico-químicos e reológicos.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado para cada variável resposta empregando o *software* STATISTICA (*data analysis software system*), versão 5.5, produzido pela *StatSoft*, Inc. (2004), sendo determinadas as superfícies resposta e os valores dos efeitos de cada um dos parâmetros estudados e suas interações.

Baseados no delineamento, os dados experimentais do planejamento experimental foram ajustados de acordo com a equação empírica de 1ª ordem (Equação 10).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \qquad \textbf{Equação 10}$$

Onde:

Y – Fator de conversão de substrato em biopolímero ($Y_{P/S}$ – rendimento); Viscosidade e Massa Molar;

β_0 – constante;

β_1 – coeficiente do termo linear X_1;

β_2 – coeficiente do termo linear X_2;

β_{12} – coeficiente de interação entre as duas variáveis independentes;

X_1 – Variável 1;

X_2 – Variável 2.

Todos os termos do modelo foram analisados de acordo com o teste p e F. O teste *t* (*Student*) foi usado para determinar o significado estatístico dos coeficientes de regressão dos parâmetros enquanto o teste F (Fisher), para análise de variância (ANOVA – *Analysis of Variance*), foi executado nos dados experimentais para avaliar o significado estatístico do modelo. Os valores p foram usados como uma ferramenta para conferir o significado de cada interação entre as variáveis, que, em troca, podem indicar os padrões das interações entre as variáveis. Em geral, a maior magnitude dos valores do Teste t e a menor magnitude dos valores do valor p indica, a alta significância do coeficiente correspondente (MYERS; MONTGOMERY, 2002; TANYILDIZI; ÖZER; ELIBOL, 2005).

4.3.4. Produção do biopolímero em biorreator

Esta etapa teve como propósito avaliar o efeito da combinação aeração e agitação, ou seja, disponibilidade de oxigênio, na biossíntese de pululana e na sua

qualidade. A disponibilidade de oxigênio é um fator importante para a produção da pululana, por ser o micro-organismo produtor aeróbio. Além disso, a síntese de biopolímeros é um processo altamente dependente de energia, o que impõe a necessidade de um suprimento adequado de oxigênio para que o metabolismo celular ocorra a satisfatoriamente. Por sua vez, a agitação auxilia a transferência de massa no sistema de fermentação, misturando os constituintes do meio reacional e, assim garantindo a homogeneidade do sistema. No entanto, altas velocidades de agitação podem ser prejudiciais ao micro-organismo, uma vez que podem ocasionar o seu cisalhamento e, por sua vez, afetar a produção de polímeros (SHARMA; PRASAD; CHOUDHURY, 2013).

Os ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada, marca *New Brunswick*, modelo *BioFlo* & *Celligen* 310 *Fermentor*/*Bioreactor*, de 3 L de capacidade útil, contendo 1,2 L do meio de produção, constituído de açúcar cristal e LRC, nas concentrações definidas pelo planejamento experimental (4.4.3.1). A esterilização do meio e do vaso de vidro foi realizada em separado, à temperatura de 121ºC por 15 e 30 min., respectivamente.

O biorreator é equipado com sistemas de agitação, composto por 2 turbinas, e de aeração, com filtro membrana de 0,45 µm de porosidade. Dispõe ainda de eletrodos de pH e temperatura, que permitem o monitoramento *on line* e seu controle no decorrer do processo. Não houve necessidade de controle do pH, uma vez que se manteve inalterado ao longo do período total de ensaio, no valor ajustado inicialmente de 6,0. A temperatura foi controlada à 28 ± 1ºC automaticamente por circulação de água.

Foram estudadas diferentes combinações de velocidade de agitação (150 e 300 rpm) e taxa de aeração (nula, 0,5 e 1,0 volume de ar/volume de meio x min^{-1} (vvm)), conforme apresentado na Tabela 12. Esses valores foram definidos com base em dados da literatura, e nas características do biorreator.

Tabela 12. Condições aeração/agitação ensaiadas em biorreator

Ensaio	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)
1	0	150
2	0	300
3	0,5	150
4	0,5	300
5	1,0	150
6	1,0	300

Como inóculo foi utilizado um pré-cultivo conforme descrito anteriormente (item 4.2.1.1). Para a inoculação, realizada em fluxo laminar previamente higienizado com álcool 70% e esterilizado por luz ultravioleta por 15 min., foi tomado um volume do pré-cultivo de modo a estabelecer no meio uma concentração inicial de 5,0 x 10^5 células/mL. O processo fermentativo teve tempo total de 72 horas.

Terminado o processo, nos mostos fermentados foram estimados: concentração de substrato residual e viscosidade absoluta.

Seguiu-se a recuperação dos biopolímeros produzidos a partir dos mostos fermentados, de acordo com o item 4.4.5, sem a etapa adicional de ressolubilização e filtração do material. Os biopolímeros foram então analisados por TGA e FTIR.

4.3.5. Perfil Cinético da produção de biopolímero em biorreator

Na condição ideal de aeração e agitação, foi realizada nova fermentação, com amostragens diárias para medições de substrato residual, pH, viscosidade e concentração de biopolímero. O tempo total de processo foi de 120 h, definido com base nos resultados obtidos em frascos agitados, considerando a produtividade máxima e o escurecimento do meio fermentado (OLIVEIRA, 2010).

Ao final do processo, o biopolímero foi recuperado e tratado para caracterização por TGA, FTIR e RMN ^{13}C.

4.3.6. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do biopolímero produzido

Neste trabalho foi avaliada a resposta citotóxica *in vitro* de culturas celulares provenientes de neuroblastoma de camundongo (células cerebrais ainda não neurais – N2A). Para a realização dos ensaios foi utilizado o teste do MTT (brometo de 3-[4,5–dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). Este teste é amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas e mede a atividade mitocondrial das células vivas capazes de metabolizar sais de tetrazólio. O MTT é um sal de tetrazólio amarelo que é convertido, no interior da mitocôndria, a azul de formazana por ação de desidrogenases presentes em células vivas. Esse ensaio tem como princípio que a quantidade de formazan presente no meio é diretamente proporcional ao número de células vivas (RACUSEN *et al*., 1999).

Foram formados diferentes grupos de células: o grupo controle de viabilidade celular, formado por células não expostas às soluções de biopolímeros, apenas à água; o grupo de controle de morte, tendo sido tratadas com 10% de Triton (detergente) e, os outros dois, tratados com soluções do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm), recuperado do mosto fermentado, após seu tratamento de purificação, e soluções da pululana comercial referência (Sigma-Aldrich). A concentração das soluções de biopolímeros (obtido e padrão) utilizada foi de 50 mg/L. Os ensaios foram realizados pelos MsC. Leonardo Vazquez e Diana Cardoso Pelizzari, no laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses, do Instituto de Bioquímica Médica, localizado no CCS/UFRJ.

Após 24h, foram adicionados às células 20 µl de MTT (5 mg/ml em soro fetal bovino), inclusive nos controles, e incubadas por 3h à 37ºC. O meio foi removido cuidadosamente a fim de preservar as células e, posteriormente, adicionado 150 µL do solvente do MTT (4 mM HCl, 0,1% Nondet P-40 em isopropanol). Os testes foram realizados em triplicata. Após 15 minutos de incubação, foi realizada a medida da absorbância em 590 nm. A absorbância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

4.4. Metodologias analíticas

Na Tabela 13 encontram-se as metodologias empregadas para cada uma das etapas descritas no item 4.3. As etapas estão descritas individualmente nos itens 4.4.1 ao 4.4.10.

4.4.1. Concentração celular

A contagem de células para a padronização do inóculo foi realizada em microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer (VIEIRA *et al*., 1979; KLINGEBERG; VORLOP; ANTRAKINIAN, 1990; SIMON; CAYE-VAUGEN; BOUCHONNEAU, 1993). Com este fim, amostras do mosto fermentado foram adequadamente diluídas para permitir uma contagem total entre 200 e 300 células no volume de 1 mm^3 correspondente aos 25 quadrantes centrais da câmara (SIMON, CAYE-VAUGEN; BOUCHONNEAU, 1993).

4.4.2. Substrato residual

A concentração de sacarose foi determinada através do método colorimétrico Somogyi (1945) em alíquotas do mosto fermentado, previamente hidrolisadas com HCl 2 N a 65-70ºC/10 minutos, livre de células.

4.4.3. Viscosidade do mosto fermentado em regime isotérmico

Durante a produção do biopolímero, o meio desenvolve características não newtonianas e pode apresentar um comportamento de fluido pseudoplástico, no qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Essa mudança no comportamento reológico do meio pode ser ocasionada pela produção de exopolissacarídeos pelos micro-organismos (KUMAR; MODY; JHA, 2007). Assim, a reologia pode ser usada como parâmetro para monitorar a produção e qualidade do exopolissacarídeo.

Tabela 13. Metodologias empregadas para cada uma das etapas

Etapa experimental		Análises
Seleção da linhagem de *A. pullulans* (Item 4.3.1)		Avaliação do crescimento micro e macroscópico do cultivo
Desenvolvimento de metodologia para redução da coprodução de melanina (Item 4.3.2)	Privação de luz (Item 4.3.2.1)	Avaliação da pigmentação do mosto
	Ressolubilização/Filtração (Item 4.3.2.2)	Recuperação do biopolímero; Ressolubilização e Filtração; Avaliação visual da pigmentação do biopolímero recuperado; Massa Molar; FTIR; TGA
Definição das concentrações iniciais de C e N – Planejamento Experimental (Item 4.3.3)	Primeira etapa (seleção)	Substrato residual; viscosidade do mosto; recuperação do biopolímero; rendimento; massa molar; análise estatística (planejamento experimental)
	Condição Selecionada (Concentração Inicial de açúcar cristal e LRC)	Recuperação do biopolímero; TGA; FTIR; RMN^{13}C
Avaliação do efeito Aeração/Agitação em biorreator (Item 4.3.4)	Primeira etapa (seleção)	Substrato residual; viscosidade do mosto; recuperação do biopolímero; rendimento; Avaliação visual da pigmentação do biopolímero recuperado; TGA; FTIR; viscosidade do biopolímero recuperado em diferentes concentrações
	Perfil Cinético da produção em biorreator Período de 120 h	Substrato residual; viscosidade do mosto; recuperação do biopolímero; rendimento; cinética do oxigênio dissolvido, TGA; FTIR; RMN ^{13}C; avaliação da citotoxicidade do biopolímero

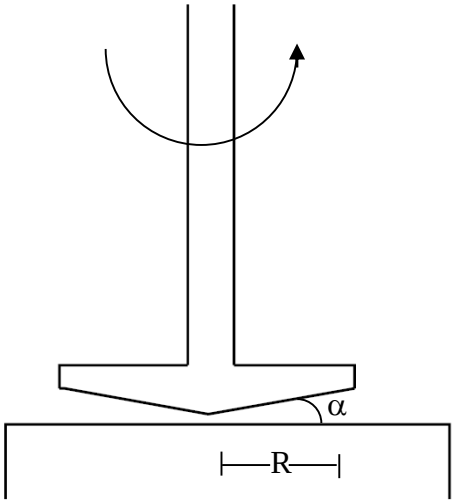


Figura 11. Esquema da geometria cone-placa (α-ângulo entre o cone e a placa, R- raio do cone).
Fonte: LOPES (1996); STEFFE (1996)

A determinação da viscosidade do caldo fermentado centrifugado, ou seja, livre de células, foi realizada no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano/IMA-UFRJ, empregando reômetro *Advanced Rheometer* (AR) 2000, com geometria cone-placa (Figura 11), diâmetro 60 mm e ângulo de 1°.

4.4.4. Viscosimetria das dispersões de biopolímero em diferentes concentrações e em regime isotérmico

As amostras (biopolímeros obtidos em biorreator e pululana comercial padrão) foram dispersas em água destilada de forma a apresentar concentrações brutas de 1, 5 e 10% m/v. A determinação da viscosidade dos biopolímeros em dispersão aquosa foi realizada nas mesmas condições do ensaio anterior (item 4.4.3), no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano/IMA-UFRJ.

4.4.5. Recuperação e purificação do biopolímero

Os biopolímeros produzidos foram recuperados por tratamento do meio fermentado livre de células com etanol. Para tanto, o meio fermentado foi primeiramente aquecido a 100ºC, para inativação das células, e, em seguida, centrifugado (*Beckman Couter Avanti* J-30I) a 12.000 rpm, a 4ºC por 15 minutos, para remoção das células.

Para precipitação do biopolímero, o mosto fermentado livre de células foi lentamente vertido em álcool comercial (97,8%), na proporção 1:4. A seguir, foi lavado com soluções alcoólicas, em concentrações crescentes de etanol, de 70%, 80%, 90% (v/v) até etanol absoluto. Esse procedimento foi repetido por três vezes consecutivas. O biopolímero obtido foi colocado em filtro sinterizado grau 3 de porosidade para secagem por volatilização do álcool com jato de ar quente.

4.4.6. Rendimento ($Y_{P/S}$)

A partir dos dados obtidos do biopolímero e substrato residual, foi possível calcular os fatores de conversão de sacarose em biopolímero ($Y_{P/S}$), dado pela Equação 11:

$$Y_{PS} = \frac{P_f - P_0}{S_f - S_0}$$

Equação 11

onde S e P representam as concentrações da fonte de carbono e de produto (biopolímero), respectivamente. Os subíndices f e 0 representam os valores finais e iniciais das respectivas variáveis.

- Caracterização dos biopolímeros

Vários métodos podem ser empregados para caracterizar as propriedades e a estrutura dos biopolímeros (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998). Estudos espectroscópicos podem ser usados para caracterizar a composição dos polímeros como, por exemplo, infravermelho com transformada de Fourier, Raman, ressonância de *spin* de elétrons, ressonância magnética nuclear (RMN ^{1}H e RMN^{13}C) e espectroscopia de ultravioleta/visível. A caracterização de massas molares pode ser obtida pelo emprego das mais variadas técnicas, como por exemplo, viscosimetria e cromatografia de permeação em gel (GPC).

Para a determinação da curva de distribuição de massas molares, a cromatografia por permeação em gel (GPC) é o método mais empregado, usando padrões para montagem da curva de calibração.

Neste trabalho, os biopolímeros precipitados foram submetidos à caracterização físico-química. Para isso, foram realizadas análises de espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância nuclear magnética (RMN ^{13}C), cromatografia de permeação em Gel (GPC) e análise térmica (TGA) e viscosimétrica em regime isotérmico do mosto e de dispersões em água destilada.

4.4.7. Análise espectroscópica de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta análise foi realizada em espectroscópio de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), modelo *Excalibur* 3100 FT-IR (Varian), utilizando acessório de reflexão total atenuada (ATR), no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano/IMA-UFRJ pela MSc. Márcia Benzi.

Como referência, foi realizado também o espectro de pululana comercial referência (Sigma-Aldrich, código P4516), comercialmente disponível, a qual também é produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*. Para cada amostra de biopolímero foram feitas 100 varreduras com resolução de 4 cm^{-1}.

4.4.8. Ressonância Magnética Nuclear

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C) das amostras de biopolímeros foram obtidos em um espectrômetro *Fourier transform Bruker Avance* DRX 500 em solução de D_2O (1,8%) a 70ºC. DSS (4,4-*Dimethyl*-4-*silapentane*-1-*sulfonic acid*, em português, sal sódico de ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanossulfônico) foi utilizado como referência interna (0,0 ppm para ^{13}C). Espectros de^{13}C HSQC foram obtidos utilizando um programa de pulso fornecido pelo aparelho. As análises foram realizadas pela Doutoranda Clara, no laboratório chefiado pela Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

4.4.9. Estimativa da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel

O volume de eluição (V_e) foi determinado por cromatografia de permeação em gel em cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-6A, coluna Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, com fase móvel de $NaNO_3$ 0,1 mol/L, fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra foi de 50 μL. As amostras foram preparadas na concentração de 0,1% (m/v), filtradas em membrana Millipore com 0,45 μm de porosidade e adicionado etilenoglicol como referência interna. A curva de calibração para a determinação da massa molar foi construída utilizando-se soluções padrões de pululana (Shodex P-82, da Shawa Denko) com massas molares no intervalo de 5,9 x 10^3 a 7,8 x 10^5 g/mol. A análise dos cromatogramas dos padrões de pululana permitiu estabelecer uma relação linear entre o log M_{pk} (logarítimo da massa molar dos padrões) e os respectivos valores de volume de eluição (V_{el}), definidos pelos picos de cada padrão. Deste modo, com estes pares de valores, foi possível construir a curva de calibração, através da qual, obteve-se a equação da reta apresentada na Equação 12:

$$\log M_{pk} = 14{,}35 - 0{,}948\ V_{el} \qquad (R^2 = 0{,}994) \qquad \textbf{Equação 12}$$

Esta análise foi realizada pela Doutoranda Clara, no laboratório de responsabilidade da Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

4.4.10. Análise Térmica

As técnicas de Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG) foram utilizadas para estudar a estabilidade térmica e teor de umidade e inorgânicos das amostras dos biopolímeros obtido a partir das linhagens de *A. pullulans* e da pululana comercial padrão. Para isso, foi utilizado o TGA Q500 (TA *Instruments*, USA) V6.7 em atmosfera inerte (N_2) com vazão de nitrogênio de 40 mL/min na balança e 60 mL/min na amostra, corridas na faixa de temperatura entre 30 a 700°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano/IMA – UFRJ pela Dra. Léa Lopes.

4.4.11. Análise dos elementos inorgânicos

O rejeito industrial (LRC) e a amostra de biopolímero obtida após condições selecionadas foram analisados para avaliação dos elementos inorgânicos presentes, utilizando espectrômetro por fluorescência de raio-X – (WDS), modelo AXIOS (Panalytical). As cinzas das amostras foram obtidas em equipamento Leco TGA-701, com primeira rampa com taxa de aquecimento de 10°C/min de 25-107°C e segunda rampa com 40°C/min de 107-1000°C. O ensaio é finalizado após 3 pesagens sequenciais idênticas. As cinzas foram preparadas em prensa automática X-PRESS (molde de 20 mm, P = 25ton e t = 30s), utilizando como aglomerante ácido bórico na proporção 1:0,5 (2g da amostra para 1g de ácido bórico). Os resultados semi-quantitativos foram expressos em %, calculados como óxidos normalizados a 100%. As análises foram realizadas no CETEM por Jaqueline Veloso de Oliveira.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção da linhagem microbiana

A Figura 12 apresenta as imagens dos cultivos das três linhagens de *A. pullulans* no meio de produção à base de açúcar cristal e levedura residual de cervejaria (LRC) para 96 h de fermentação. É nítida a diferenciação das culturas testadas quanto ao aspecto macroscópico e à síntese de pigmento escuro.

Figura 12. Observações em microscópio óptico do crescimento das linhagens de *A. pullulans* IOC 3011 (A), IOC 3775 (B) e ATCC 42023 (C) em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 2,0 g/L de levedura residual de cervejaria.

Em relação à morfologia celular, nota-se que o crescimento das linhagens IOC 3775 e ATCC 42023 levou à formação de *pellets* (Figuras 12 B e C), o que é indicativo de crescimento micelial do micro-organismo sob agitação. No entanto, para a cultura IOC 3011, o crescimento foi característico de células leveduriformes (unicelular).

O crescimento distinto das linhagens fúngicas foi confirmado por análise microscópica das amostras dos meios fermentados (Figura 13). A linhagem IOC 3011 foi a única a apresentar desenvolvimento unicelular quando cultivada em meio à base de açúcar cristal e LRC. As demais formaram *pellets* com hifas fortemente compactadas, e pouco “cabeludos” (*hairy pellets*), com raras hifas dispersas (WHITAKER; LONG, 1973 *apud* SANTOS, 2008). No entanto, houve diferenciação quanto ao número e ao diâmetro, conforme pode ser constatado visualizando as imagens B e C da Figura 13.

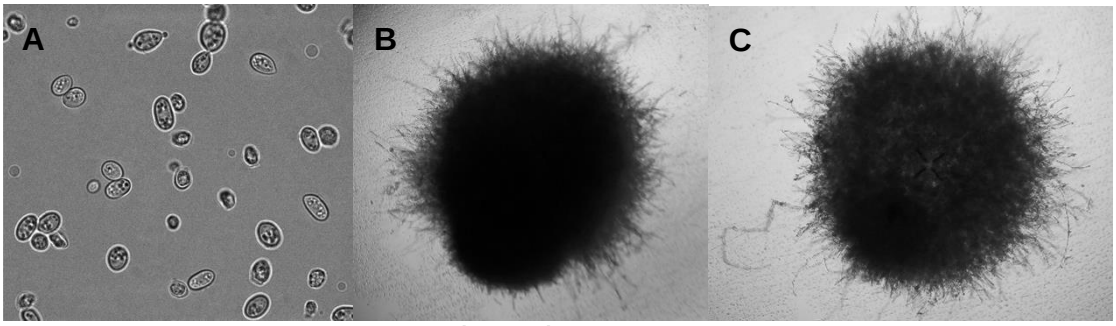


Figura 13. Observações em microscópico óptico de *A. pullulans* [A- linhagem IOC 3011 (aumento de 100x, com óleo de imersão); B- IOC 3775 (aumento de 40x); C- ATCC 42023 (aumento de 10x).

Para fungos polimórficos, como anteriormente mencionado, tem-se que as condições de cultivo influenciam sobremodo o tipo de crescimento, filamentoso ou unicelular (SIMON; CAYE-VAGIEN; BOUCHONNEAU, 1993; ROUKAS, 1999; CAMPBELL *et al*., 2004). Por sua vez, a morfologia está diretamente atrelada à síntese da pululana, uma vez que a produção do biopolímero é intensificada quando o micro-organismo está na forma unicelular (CAMPBELL *et al.*, 2004). Também foi demonstrado por Simon, Caye-Vaugien e Bouchonneau (1993), que não há formação de pululana quando a percentagem de hifas é igual ou superior a 3%.

Particularmente para a linhagem *A. pullulans* ATCC 42023, a formação de *pellets* pode ser devida à composição do meio, visto que em outros estudos, a cultura se apresentou na forma unicelular (LEE *et al*., 2001; WEST, 2011). Provavelmente, um ou mais constituintes da LRC podem ter induzido a filamentação.

O crescimento filamentoso da linhagem IOC 3775 também pode ser associado às condições de cultivo, uma vez que o seu cultivo em meio Sabouraud apresentou apenas células individualizadas.

Corroborando a literatura, nos mostos fermentados com as linhagens IOC 3775 e ATCC 42023, ou seja, onde foi constatado crescimento filamentoso, não foi detectada a presença de biopolímero. Já para a linhagem IOC 3011, foi possível recuperar 12 g/L de biopolímero em massa seca, após tratamento do mosto fermentado, livre de células, com etanol.

Apesar da linhagem IOC 3011 ter sido a única capaz de sintetizar biopolímero em meio constituído de açúcar cristal e LRC, a produção foi acompanhada da cogeração de pigmento (Figura 12 A). Nota-se que o escurecimento do meio já foi visualizado com 48 h de cultivo.

A síntese de melanina interfere na coloração do meio de produção, que varia de verde escuro até negro (KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003), o que implica em aumento do custo de produção em consequência da necessidade de maior número de etapas *downstream* para a obtenção de pululana nos padrões comerciais, a depender do tipo de aplicação.

Com base na literatura científica, e nos resultados obtidos, fica claro ser de fundamental importância a seleção da linhagem quando da busca por meios formulados com matérias-primas não convencionais. No presente estudo, a única opção foi dar continuidade ao trabalho com a linhagem *A. pullulans* IOC 3011.

Alguns autores sugerem o emprego de linhagens mutagênicas não pigmentadas, mas que, em geral, levam ao comprometimento da produtividade de pululana (TARABASZ-SZYMANSKA; GALAS, 1993; YU *et al*., 2012). Assim, antes de dar início ao estudo da formulação do meio para melhoria do rendimento ou produtividade do processo, com redução dos custos de produção, foram avaliadas algumas estratégias para redução da cogeração do pigmento ou para sua separação durante a etapa de recuperação do biopolímero.

5.2. Estratégias para redução de pigmento

5.2.1. Primeira estratégia: privação de luz

A realização desse teste foi instigada uma vez que relatos da literatura vinculam a produção de pigmentação à presença de luz, alguns sugerindo que as melaninas são fatores de proteção de fungos (BELL; WHEELER, 1986; GONÇALVES; ALEXANDER, 2005 *apud* ZHENG *et al*., 2008).

A Figura 14 apresenta os cultivos microbianos após fermentação da linhagem IOC 3011, com e sem incidência de luz. Como pode observado, os cultivos nas duas condições testadas apresentaram intensa pigmentação. Então, pode-se concluir que,

para esta linhagem, a produção de melanina independe da exposição à radiação luminosa, embora esse pigmento seja reconhecidamente um fator de proteção contra a luz UV (LINGAPPA *et al*., 1963 *apud* GAAD, 1982). Ao contrário, Gaad (1982) observou que a presença de luz, além de estar associada à pigmentação do fungo *Microdochium bolleyi*, também favorecia seu crescimento.

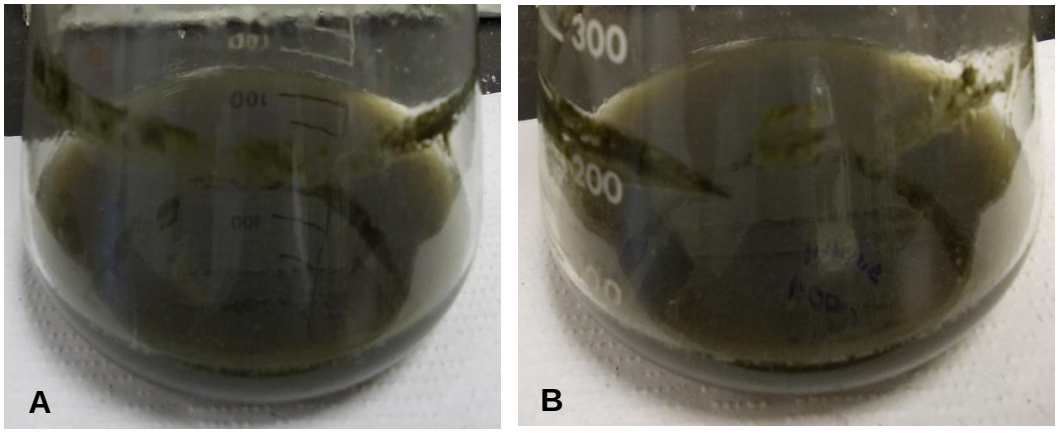


Figura 14. Mostos após fermentação com exposição à luz artificial no período diurno (A) e sem exposição à luz (B).

Trabalhos realizados com a levedura *Cryptococcus neoformans* também associaram a produção de melanina à presença de luz. De fato, os autores citam que a melanina é produzida pela enzima lacase que, por sua vez, é estimulada com a presença de radição ultravioleta (PETER, WILLIAMSON; SHOSUKE, 1998; BUENO; PEREIRA; LATERCIA, 2008).

Chang (2009) estudou o efeito da cor da luz – branca, azul (470 nm) e vermelha (640 nm) – e diferentes intensidades na produção de exopolissacarídeo por *A. pullulans* em biorreator CSTR (*continuous stirred tank reactor*, em português, reator tanque agitado contínuo). Houve consumo de substrato em todas as condições luminosas ensaiadas. Porém a cor e a intensidade da luz tiveram efeito diferenciado tanto na pigmentação quanto no rendimento de biopolímero; em alguns casos ocasionando uma redução expressiva da síntese do EPS. A luz azul e intensidades de 0,01 e 0,02 fótons favoreceram a síntese de EPS (aprox. 0,4 g/g) e de melanina (aprox. 0,7 g/g), enquanto que na ausência de luz, os rendimentos foram de 0,35 g/g e 0,54 g/L, respectivamente. Segundo os autores, a luz vermelha estimulou apenas a produção de melanina, e a luz branca inibiu a síntese de EPS.

Segundo Gadd (1980) citado por Zheng e colaboradores (2008), a produção de melanina não depende da incidência de luz, mas sim da concentração de nitrogênio. A indução da produção de melanina pela limitação deste elemento provavelmente pode ter sido a causa da pigmentação do cultivo (Figura 14), uma vez que a concentração de nitrogênio no meio de produção avaliado era de aproximadamente 0,13 g/L de nitrogênio (2 g/L de LRC).

Entretanto, cabe ressaltar que, segundo várias publicações, a condição limitante de nitrogênio é a ideal para a produção de pululana (SEVIOUR *et al.,* 1992; CHI; ZHAO, 2003; NAMPOOTHIRI *et al*., 2003). Tal fato foi confirmado em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2010) para linhagens *A. pullulans* IOC 3467 e IOC 3011, no qual a elevação da concentração inicial da fonte de nitrogênio (LRC) privilegiou o aumento de biomassa em detrimento da síntese do biopolímero.

Uma vez que a pigmentação da cultura não foi inibida pela privação de luz durante o processo fermentativo, foi avaliada uma segunda estratégia, consistindo de um tratamento *downstream*.

5.2.2. Segunda estratégia: ressolubilização e filtração do biopolímero produzido

A Figura 15 (A e B) apresenta os aspectos macroscópicos das amostras de biopolímero antes (biopolímero bruto) e após tratamento (ressolubilização da biopolímero bruto, seguida de filtração), respectivamente, e da pululana comercial referência (Figura 15 C). Pode-se observar semelhança nas texturas das três amostras, embora a pigmentação na tratada tenha sido bem reduzida, mas não tão clara se comparada à pululana comercial padrão. No entanto, cabe mencionar que a pululana comercial testada é de alta pureza, não sendo informado emprego de tratamento posterior à produção. Uma possibilidade é o emprego de agentes clarificantes.

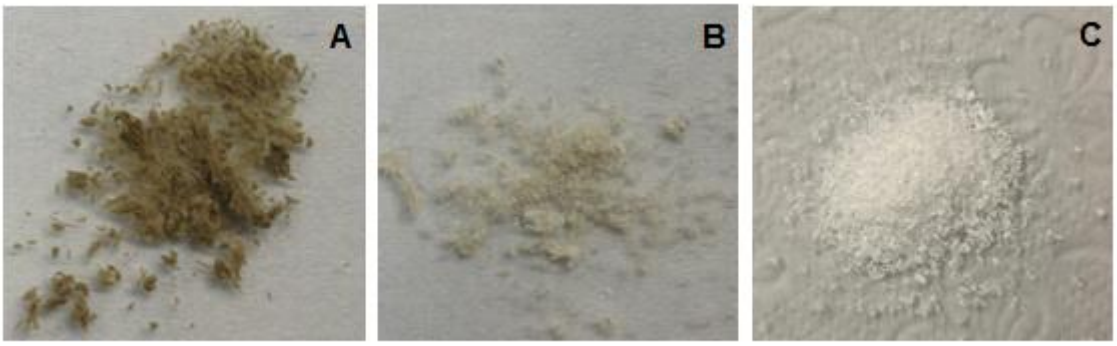


Figura 15. Aspectos macroscópicos dos biopolímeros: (A) biopolímero bruto, (B) biopolímero tratado e (C) pululana comercial referência (Sigma-Aldrich).

A fim de determinar se havia interferência do tratamento realizado na qualidade dos biopolímeros, as três amostras (biopolímero bruto, tratado e pululana comercial) foram analisadas quanto à massa molar e termicamente para avaliar o seu grau de impurezas. As amostras também foram analisadas por FTIR para definir a natureza química dos biopolímeros. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

- **Massa molar**

A Figura 16 (A e B) contém os cromatogramas de permeação em gel para as amostras de biopolímero bruto e tratado, respectivamente. Nos gráficos constam os valores correspondentes aos picos do produto analisado, de eluente e da referência interna. Os volumes de pico, isto é, os volumes referentes aos picos dos produtos (aprox. 9,5 mL) e da referência interna (aprox. 12,5) foram aplicados na Equação 12 (item 4.3.10) para cálculo da massa molar. Foram obtidas massas molares de 2,23 x 10^5 e 1,98 x 10^5 g/mol para os biopolímeros bruto e tratado, respectivamente. Portanto, o tratamento de ressolubilização e filtração foi eficiente para o clareamento do biopolímero, sem comprometer sua massa molar.

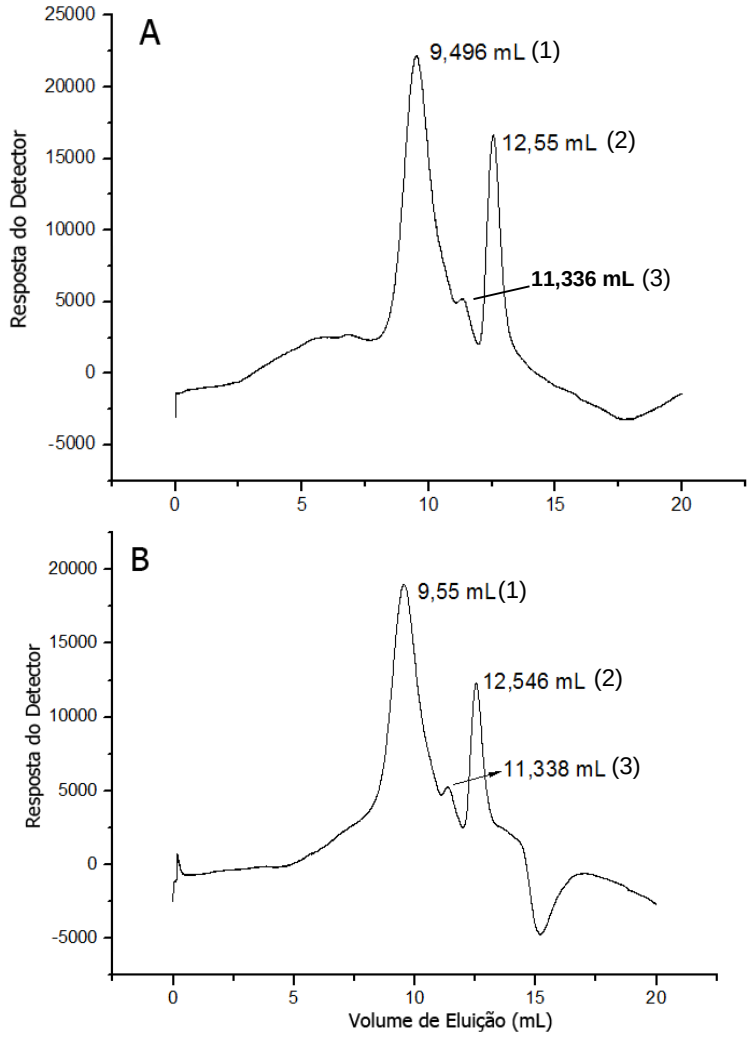


Figura 16. Cromatogramas para as amostras de biopolímero bruto (A) e tratado (B) [picos: 1- amostra; 2- referência interna (Pululana da Shawa Denko); 3- eluente (etilenoglicol)].

Outros estudos apresentam massas molares variando de 5,8 x 10^3 a 1,0 x10^7 g/mol, dependendo das linhagens empregadas e das condições de cultivo (SLODKI; CADMUS, 1978; POLLOCK, THORNE; ARMENTROUT, 1992; WILEY *et al*., 1993; LEE *et al*., 2001; SEO *et al*., 2004, YU *et al*., 2012; SUGUMARAN *et al*., 2013). Portanto, pode-se inferir que os biopolímeros produzidos neste trabalho se mostram adequados para aplicação em diferentes segmentos industriais, compatíveis com o valor da massa molar.

❖ Análise Térmica

A estabilidade térmica das amostras é mostrada na Figura 17 (A, B e C), que apresenta os perfis de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) dos biopolímeros bruto, tratado e da pululana comercial padrão, respectivamente. Pode-se observar que as três amostras exibiram dois estágios, o primeiro sugerindo a eliminação de água e o segundo a decomposição do material orgânico, sendo ambos estágios bastante similares entre as amostras.

A análise do DTG (Figura 17) mostra perfis similares para as três amostras, embora a pululana comercial tenha apresentado pico de DTG mais estreito, o que pode refletir uma maior homogeneidade da estrutura do material. A observação de picos de DTG mais largos pode estar relacionada à presença de oligossacarídeos ou biopolímero de baixa massa molar nas amostras de pululana bruta e tratada. Esta análise também permitiu a determinação das temperaturas onde ocorrem velocidades máximas de decomposição ($T_{MÁX}$) que foram de 298; 306 e 317°C para os biopolímeros bruto (Figura 17 A) e tratado (Figura 17 B), e para a pululana comercial (Figura 17 C), respectivamente. Pode-se observar que houve um ligeiro aumento da $T_{MÁX}$ após o tratamento com filtração, o que pode estar associado à remoção de impurezas orgânicas, em particular, do pigmento, melhorando assim a estabilidade térmica do biopolímero.

Teramoto e Shibata (2006) estudaram algumas propriedades térmicas para pululana pura e seus derivados acetilados, em diferentes graus. A temperatura máxima de decomposição para a pululana não acetilada foi de 295ºC, enquanto que as amostras acetiladas apresentaram $T_{MÁX}$ variando de 306 a 363°C. Isso mostra que, através de modificação química adequada, a temperatura de decomposição térmica da pululana pode ser aumentada, caso isso seja de interesse para a aplicação.

Em 2008, Prasad e colaboradores analisaram termicamente blendas de hidroxipropil metilcelulose/pululana em diferentes proporções (100/0; 70/30; 50/50 e 30/70) e obtiveram, respectivamente, $T_{MÁX}$ iguais a 352, 355, 347 e 344°C, enquanto que a da pululana pura foi de 322°C. Novamente, percebe-se a possibilidade de melhorar a estabilidade térmica da pululana a partir de sua manipulação.

Analisando ainda a Figura 17, tem-se que, ao atingir 700°C, a quantidade de matéria inorgânica correspondeu a 31,55% para o biopolímero bruto (Figura 17 A), enquanto que para o biopolímero tratado o valor foi de 29,76% (Figura 17 B). Portanto, a etapa de filtração realizada no biopolímero bruto, apesar de efetiva na remoção de matéria orgânica, praticamente não contribuiu na redução do material inorgânico.

A presença de material inorgânico nas amostras de biopolímero pode ser oriundo do meio de produção, cuja composição inclui componentes inorgânicos como fosfato de potássio (5 g/L), sulfato de magnésio (0,2 g/L), cloreto de sódio (1 g/L) e 2,0 g/L de LRC, matéria prima rica em sais minerais, como por exemplo, selênio (YAMADA *et al*., 2003). É válido observar que a pululana comercial referência (Figura 17 C) também apresentou material inorgânico remanescente, entretanto, em menor quantidade (8,3%). A maior pureza ratifica o emprego de algum processo *downstream*, já que os meios empregados para a produção de pululana são constituídos de sais minerais.

Sugumaran e colaboradores (2014) também determinaram a temperatura de decomposição da pululana obtida a partir de fermentação em estado sólido. Os dados por eles apresentados no trabalho mostram uma grande quantidade de resíduo, de aproximadamente 40%, em 600°C. Analogamente a presença de resíduo (aprox. 20%), em 500°C, em amostra de pululana comercial foi observada por Prasad e colaboradores (2008).

A Tabela 14 apresenta os dados referentes às temperaturas de degradação do estágio principal, compreendendo a temperatura inicial (T_{ONSET}) e final. Os valores são consistentes com os dados da literatura (REKHA; SHARMA, 2007; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; OGUZHAN; YANGILAR, 2013; SUGUMARAN *et al*., 2014). Segundo esses autores, a pululana se decompõe em altas temperaturas, entre 250 e 280°C, sem a formação de gases tóxicos. Do ponto de vista de aplicação, portanto a pululana desponta em função da sua termoestabilidade.

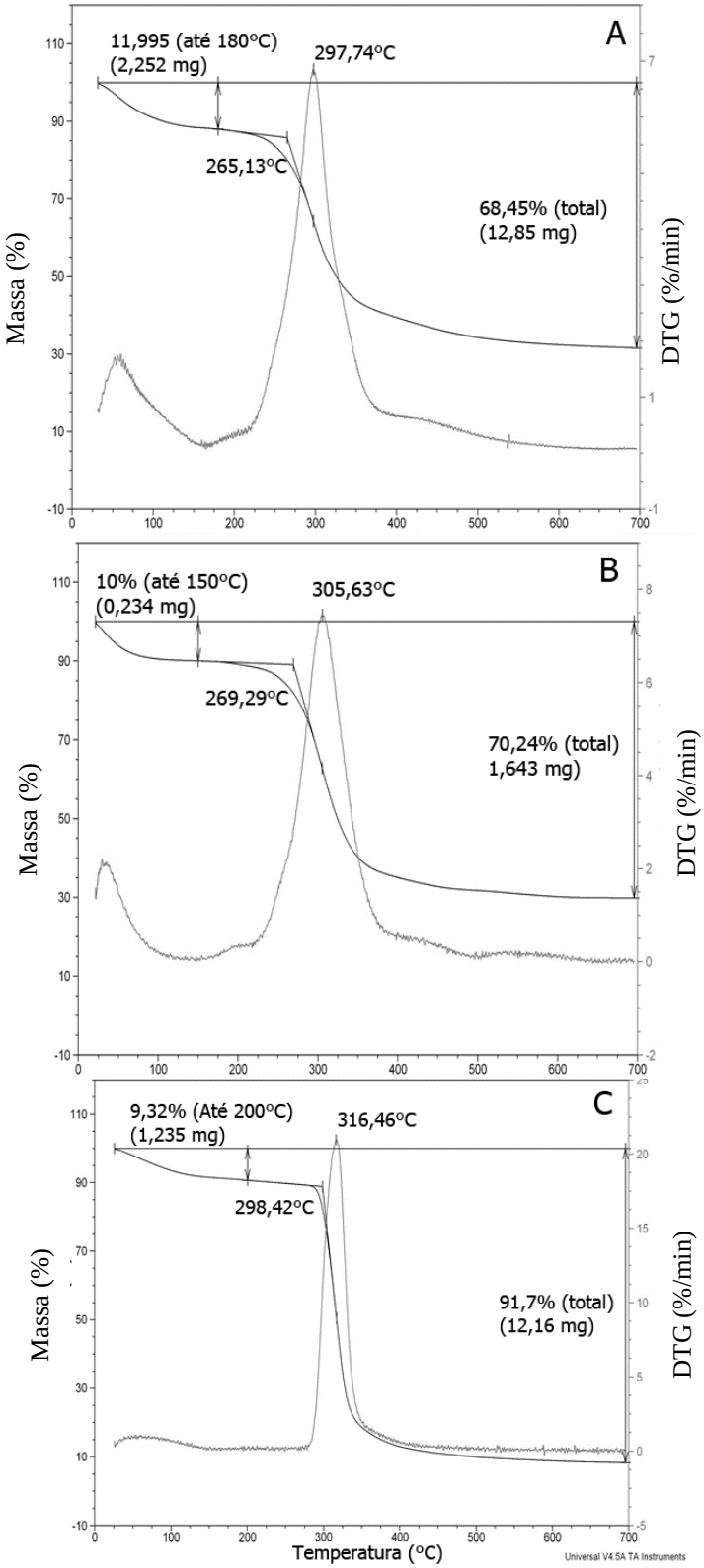


Figura 17. Curvas de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG), em atmosfera de nitrogênio, até 700ºC para biopolímero bruto (A), biopolímero tratado (B) e pululana comercial referência (Sigma-Aldrich) (C).

Tabela 14. Temperatura de degradação das amostras obtidas e da literatura

Amostras	Temperatura de degradação	
	Inicial (°C)	Final (°C)
Biopolímero Bruto	265,1	343,1
Biopolímero Tratado	269,3	345,0
Pululana Comercial Padrão[*1]	298,4	335,5
Pululana Comercial [*2]	209,0	-

[*1] Sigma Aldrich; [*2] Prasad *et al*. (2008)

É possível observar que houve um pequeno aumento da temperatura inicial de decomposição entre os biopolímeros tratado e bruto, o que sugere que a estabilidade não foi afetada pelo tratamento. Entretanto, a temperatura inicial de degradação do biopolímero tratado em relação à pululana comercial referência estudada foi 29°C menor, o que indica ser a comercial termicamente mais estável.

De acordo com dados estimados por outros autores (PRASAD *et al*., 2008; SUGUMARAN *et al*., 2014), pode-se afirmar que os biopolímeros obtidos nesse trabalho, tanto o bruto quanto o tratado, são termicamente estáveis. Também a modificação química da pululana por acetilação resultou em pequenos decréscimos da T_{ONSET} na faixa de 153 a 193°C, como consequência da quantidade de radicais acetilas na molécula (TERAMOTO; SHIBATA, 2006). Em 2008, Prasad e colaboradores analisaram termicamente blendas de hidroxipropil metilcelulase/pululana em diferentes proporções (100/0; 70/30; 50/50, 30/70 e pululana pura) e obtiveram, respectivamente, T_{ONSET} em 178, 225, 213, 191 e 209°C. Provavelmente, a variação da estabilidade das pululanas está associado ao tamanho das moléculas (massa molar), à presença de contaminantes, ao estado de agregação das moléculas, entre outros fatores (LOPES, 1996).

- **FTIR**

Os espectros das três amostras de pululana na região do IV são apresentados na Figura 18 e tiveram como finalidade comparar a natureza química dos biopolímeros das amostras.

Analisando a figura, nota-se que as amostras de biopolímero bruto (Figura 18 A) e tratado (Figura 18 B) apresentam várias bandas em comum entre si e em relação à pululana comercial referência (Figura 18 C). As bandas presentes na região de 2940-2840 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento vibracional simétrico e assimétrico de grupos CH_2 e ao estiramento vibracional de CH. Em 1020 cm^{-1}, ocorre uma deformação axial de C-O de álcoois primários. Também é possível observar uma absorção na região 1080 cm^{-1}, que corresponde à deformação axial simétrica de C-O-C, e ainda numa ligação glicosídica, e em 1162 cm^{-1} que corresponde à deformação axial assimétrica C-O-C. A banda de absorção em 1640 cm^{-1} corresponde à banda de água (H-O-H). A banda na região de 1790 - 1740 cm^{-1} está associada ao estiramento vibracional de grupos carboxílicos (deformação axial de C=O de acetato), enquanto que em 1629 cm^{-1} tem-se a deformação assimétrica do grupamento C=O. Na faixa espectral 3440 - 3300 cm^{-1} ocorre uma banda larga de absorção, característica do estiramento e deformação axial de grupos hidroxila (O-H), participantes das interações tipo ligações hidrogênio.

Seo e colaboradores (2004) observaram uma forte absorção em 3380 cm^{-1}, o que, segundo eles, indica que as pululanas apresentam algumas unidades repetidas de OH, como ocorre em açúcares. Os autores observaram ainda que todas as amostras de pululana por eles analisadas apresentaram uma forte absorção em 2300 cm^{-1} indicativo de carbono sp^3. Fato este que também pode ser observado na Figura 18.

Segundo Freixo e colaboradores (2002), as ligações existentes entre o grupamento O-H são muito fortes, o que leva a uma menor vibração das moléculas e resulta em uma banda larga quando as amostras são analisadas no infravermelho. As mesmas bandas foram também observadas por Bumbu e colaboradores (2002), Sugumaran e colaboradores (2013).

A partir dos dados obtidos para a análise de FTIR pode-se inferir que os espectros das pululanas recuperadas (bruta e tratada) são bem semelhantes ao espectro da pululana comercial, bem como os da literatura. Assim sendo, pode-se indicar que a natureza química do biopolímero produzido neste estudo a partir de fontes renováveis e de baixo custo corresponde a da pululana.

Por fim, ainda com base nos resultados obtidos, tem-se que o emprego de tratamento adicional (ressolubilização e filtração) foi o que permitiu a obtenção de um biopolímero mais claro.

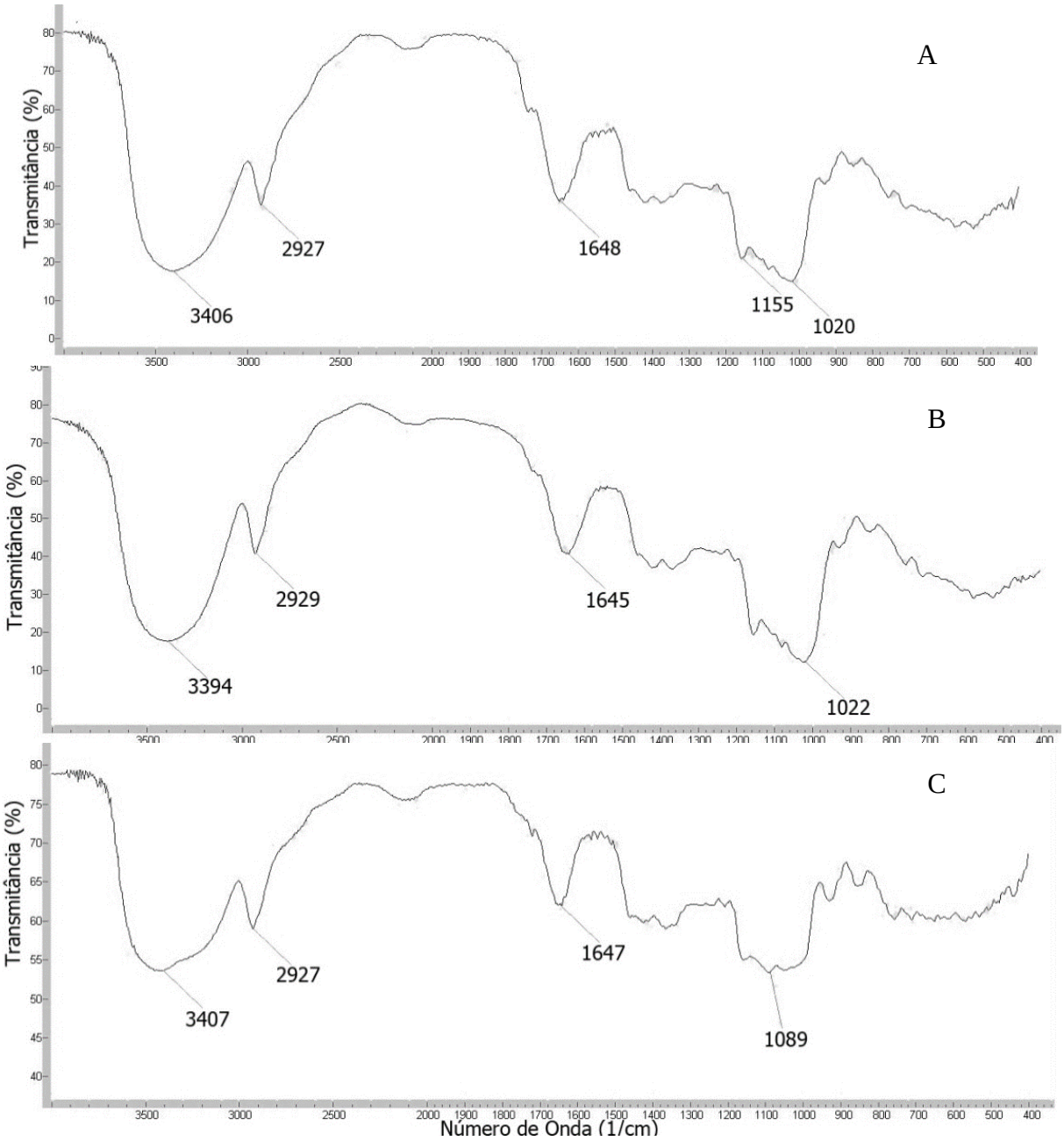


Figura 18. Espectros na região do infravermelho do biopolímero bruto (A); biopolímero tratado (B), ambos recuperados dos mostos em 96 h de fermentação e pululana comercial referência (C) (Sigma-Aldrich).

5.3. Definição das concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio

Conforme descrito no item 4.3.3, o presente projeto de planejamento teve como objetivo estudar a influência das concentrações iniciais da fonte de carbono (açúcar cristal) e da fonte de nitrogênio (LRC) na viscosidade do mosto, no rendimento de biopolímero e na sua massa molar. Os resultados dos experimentos para esse planejamento experimental são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados experimentais para as respostas em Rendimento ($Y_{P/S}$), Viscosidade e Massa Molar, relativos ao Planejamento Experimental

Experimentos	Variáveis		Respostas		
	X_1 Concentração Inicial de açúcar cristal	X_2 Concentração Inicial de LRC	$Y_{P/S}$ (g/g)	Viscosidade (Pa.s)	Massa Molar (g/mol)
1a	30 (-)	2 (-)	0	0,00228	ND
1b			0	0,00213	ND
2a	70 (+)	2 (-)	0	0,00275	ND
2b			0	0,00241	ND
3a	30 (-)	8 (+)	0,43	0,0167	$1,17 \times 10^5$
3b			0,41	0,0177	$1,33 \times 10^5$
4a	70 (+)	8 (+)	0,23	0,0141	$1,9 \times 10^5$
4b			0,29	0,0137	$1,18 \times 10^5$
5a	50 (0)	5 (0)	0,42	0,0182	$1,43 \times 10^5$
5b			0,38	0,0183	$1,56 \times 10^5$
5c			0,47	0,0184	$1,17 \times 10^5$
5d			0,55	0,0184	$0,98 \times 10^5$
5e			0,34	0,0189	$2,49 \times 10^4$
5f			0,40	0,0186	$2,0 \times 10^4$

LRC – Levedura Residual de Cervejaria; Y – Fator de conversão; P – Produto; S – Substrato Convertido; ND – Não Detectado; a, b, c, d, e, f – réplicas dos experimentos

As análises viscosimétricas realizadas para as diferentes amostras nas condições experimentais do planejamento encontram-se no Apêndice 1. Esses gráficos foram construídos com os dados de viscosidade determinados para taxas de cisalhamento variando de 0,1 e 500 s^{-1}. Na Tabela 15 foram inseridos apenas os valores viscosimétricos para taxa de cisalhamento de 10 s^{-1}, com o propósito de permitir uma análise mais acurada. Esta taxa de cisalhamento foi selecionada por ser considerada de baixo cisalhamento, onde a influência do escoamento é menor sobre a conformação da molécula. Um valor ainda mais baixo seria mais adequado,

entretanto, a geometria utilizada nesse trabalho (cone-placa) não teve sensibilidade para obtenção de viscosidade a taxas de cisalhamento muito baixas.

No caso da massa molar, os valores apresentados na Tabela 15 foram calculados (Equação 12) a partir dos volumes de pico delineados nos cromatogramas de permeação em gel, apensados no Apêndice 2.

5.3.1. Variável Resposta: Rendimento

O rendimento, comumente referido como Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{P/S}$), foi determinado a partir do substrato consumido. Logo, os valores de $Y_{P/S}$ representam a atividade microbiana na biossíntese de biopolímero. A escolha desta variável resposta teve como base avaliar a eficácia do processo fermentativo.

A partir dos valores de $Y_{P/S}$ foi construído o gráfico de Pareto (Figura 19). O ponto no qual as estimativas de efeito são estaticamente significativas ao nível de 95% de confiança ($p<0,05$) é indicado pela linha pontilhada. A análise do gráfico permite definir que a única variável de influência na produção de pululana, pela linhagem selecionada a partir de açúcar cristal e LRC, foi a concentração da fonte de nitrogênio, isto é, LRC. Neste caso, o sinal positivo significa que o aumento da resposta ($Y_{P/S}$) ocorre quando esta variável passa do nível -1 para o +1. Portanto, o rendimento é maior quando empregada a maior concentração de LRC (8 g/L).

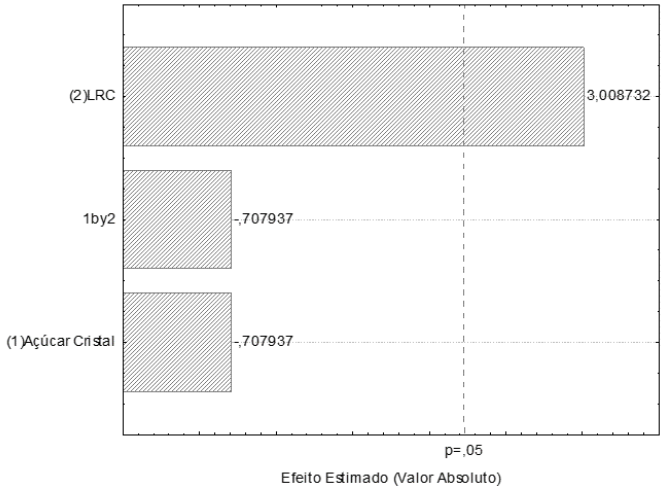


Figura 19. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em rendimento [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p<0,05$)].

Ainda analisando o gráfico de Pareto (Figura 19) pode-se verificar que a variável X_1 (concentração de açúcar cristal), assim como a interação entre as duas variáveis (X_1 e X_2), não foram estatisticamente significativas.

O coeficiente de regressão e os valores dos testes *t* e p estimados para os termos lineares e interações dos parâmetros são apresentados na Tabela 16, para um nível de confiança de 95%, α=0,05.

Tabela 16. Resultado da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em $Y_{P/S}$

Fator	Coeficiente de regressão	Desvio-padrão	Teste t(10)	Valor p
β_0	-0,070000	0,293378	-0,238600	0,816234
β_1	0,001333	0,005491	0,242820	0,813053
β_2	0,090000	0,050712	1,774718	0,106335
β_{12}	-0,000667	0,000942	-0,707937	0,495154

De acordo com os dados apresentados na Tabela 16 pode-se verificar que os coeficientes para o efeito linear da concentração de LRC e açúcar cristal não foram altamente significativos ($p < 0,05$), dentro do nível de confiança pré-estabelecido. Os valores p para todos os coeficientes de regressão foram menores do que 0,05. Isto significa que pelo menos uma das condições na equação de regressão tem uma correlação significante com a variável resposta.

Os dados da Tabela 16 permitem representar a resposta Fator de conversão substrato em produto (biopolímero) em função das variáveis concentração de açúcar cristal (X_1) e de LRC (X_2). A Equação 10 pode ser reescrita conforme mostrado abaixo:

$$Y_{P/S} = -0,07 + (0,001333\ X_1) + (0,09\ X_2) + (-0,000667\ X_1X_2) \qquad \textbf{Equação 13}$$

A Figura 20 apresenta o gráfico de superfície resposta de $Y_{P/S}$ para a combinação de efeitos da concentração de açúcar cristal com a concentração de LRC. As superfícies resposta 3D são representações gráficas da equação de regressão. A principal meta da análise da superfície resposta é procurar de forma eficiente pelos valores ótimos das variáveis, tal que a resposta seja maximizada. Cada curva de

contorno representa um infinito número de combinação de duas variáveis testes com outras duas mantidas no seu respectivo nível zero. O valor máximo predito é indicado pela superfície limitada na menor elipse da curva de contorno. São obtidas curvas de contornos elípticos quando há uma interação perfeita entre as variáveis independentes (TANYILDIZI; ÖZER; ELIBOL, 2005).

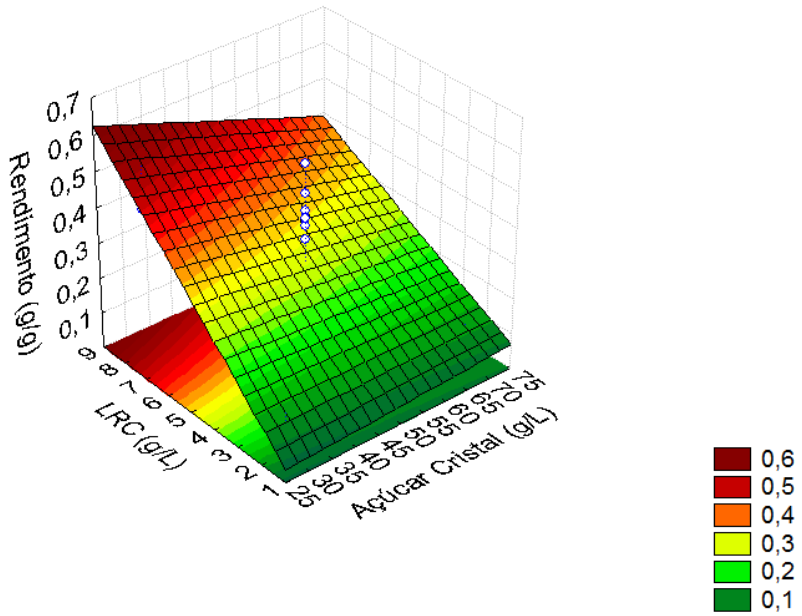


Figura 20. Superfície resposta de $Y_{P/S}$: efeito da variação da concentração de substrato e da concentração de fonte de nitrogênio.

De acordo com o gráfico (Figura 20), pode-se observar que a máxima estimativa de rendimento foi obtida para altos valores de LRC e baixos de açúcar cristal. Assim sendo, o ponto de máxima estimativa de rendimento de aproximadamente 0,45 g/g foi obtido utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC. Sendo assim, o emprego de maiores valores de LRC e de menores valores de açúcar cristal são mais adequados do ponto de vista econômico.

O resultado obtido nesse trabalho para máximo rendimento ($Y_{P/S}$) 0,41 g/g foi superior aos obtidos na literatura. Em 2001, Lee e colaboradores obtiveram rendimento de 0,24 g/g, para a produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 em frascos agitados. Para tanto, utilizaram como fonte de carbono e de nitrogênio, glicose (50 g/L) e extrato de levedura (2,5 g/L), respectivamente.

Urkut, Dagbagli e Goksungur (2007) obtiveram rendimento de 0,43 g/g utilizando células imobilizadas de *A. pullulans* em gel de alginato de cálcio, quando utilizaram 50 g/L de sacarose e 0,4 g/L de extrato de levedura.

Yu e colaboradores (2012) estudaram a otimização de seis componentes do meio – extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4, NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CaCl_2$ – em frascos agitados e obtiveram rendimento máximo de 0,51 g/g, após 60 h de fermentação com *A. pullulans* SZU1001, nas condições de produção de 50 g/L glicose, 3,0 g/L extrato de levedura, 0,6 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 g/L K_2HPO_4, 1,0 g/L NaCl e 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Em 2013, Sugumaran e colaboradores avaliaram estatisticamente a produção de alta massa molar da pululana em meio de fermentação em estado sólido, tendo como substrato a semente de jaca (20 g) e utilizando *A. pullulans* NCIM 1048. Nas condições otimizadas (KH_2PO_4 – 4,16 g/L, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,052 g/L, NaCl – 1,69 g/L, umidade – 47,9%), o rendimento foi de 0,034 g/g.

A avaliação estatística da variável resposta produção (dados não apresentados) apresentou uma tendência similar à apresentada pela variável resposta rendimento, mostrando que a LRC é a única variável significativa no nível de confiança estabelecido ($p<0,05$). O ponto de máxima estimativa de produção de biopolímero de aprox. 13,9 g/L foi obtido utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC.

5.3.2. Variável Resposta: Viscosidade

Os biopolímeros produzidos por micro-organismos são utilizados em diversos produtos devido à sua capacidade de alterar a viscosidade da água e sistemas aquosos, promovendo uma alta viscosidade, quando utilizadas em baixas concentrações (PAUL *et. al*., 1986). A viscosidade está diretamente relacionada ao tipo de aplicação e sua viabilidade comercial. Ademais, o aumento da viscosidade do mosto tem efeito adverso na transferência de massa – nutrientes, incluso oxigênio, e metabólitos – do meio reacional para as células microbianas. Isto acarreta em ações para o suprimento adequado de oxigênio e homogeneização do meio que, por sua vez, levam ao aumento de custo de produção.

Nessa etapa do trabalho, foram considerados os dados referentes às análises viscosimétricas dos mostos fermentados nas diferentes condições nutricionais com base no planejamento experimental.

A Figura 21 mostra o gráfico de Pareto, no qual é possível constatar as variáveis, e suas interações, com efeitos positivos na variável resposta viscosidade.

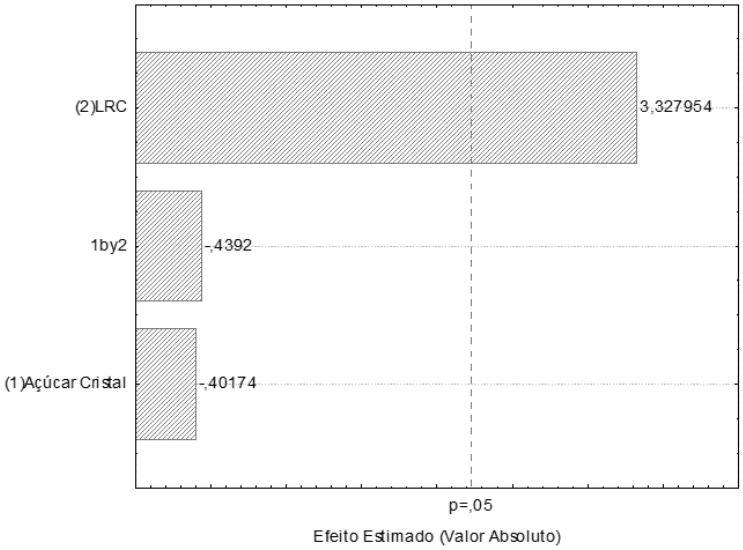


Figura 21. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em viscosidade. [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)].

A análise da Figura 21 indica que a LRC foi a única variável significativa no nível de confiança estabelecido (p<0,05), similarmente ao observado para a variável resposta rendimento.

O coeficiente de regressão e os valores dos testes *t* e p estimados para termos lineares e interações dos parâmetros para a resposta em viscosidade (Pa.s) a uma velocidade de cisalhamento de 10 s^{-1} são apresentados na Tabela 17, para um nível de confiança de 95%, α =0,05.

Tabela 17. Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em Viscosidade

Fator	Coeficiente de regressão	Desvio-padrão	Teste t(10)	Valor p
β_0	0,000587	0,010188	0,057570	0,955225
β_1	0,000032	0,000191	0,169917	0,868464
β_2	0,002895	0,001761	1,643758	0,131254
β_{12}	-0,000014	0,000033	-0,439200	0,669855

Considerando os dados da Tabela 17, a Equação 10 pode ser reescrita, para o parâmetro viscosidade, conforme apresentado a seguir:

$$\text{Viscosidade} = 0{,}000587 + (0{,}000032\ X_1) + (0{,}002895\ X_2) + (-0{,}000014\ X_1X_2)$$

Equação 14

A Figura 22 apresenta o gráfico 3D de superfície resposta para viscosidade dos mostos. É possível observar que a estimativa máxima de viscosidade foi obtida para altos valores de LRC e baixos de açúcar cristal, o mesmo encontrado para a variável resposta rendimento. O ponto de máxima estimativa de viscosidade de 0,0214 Pa.s foi obtido utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC.

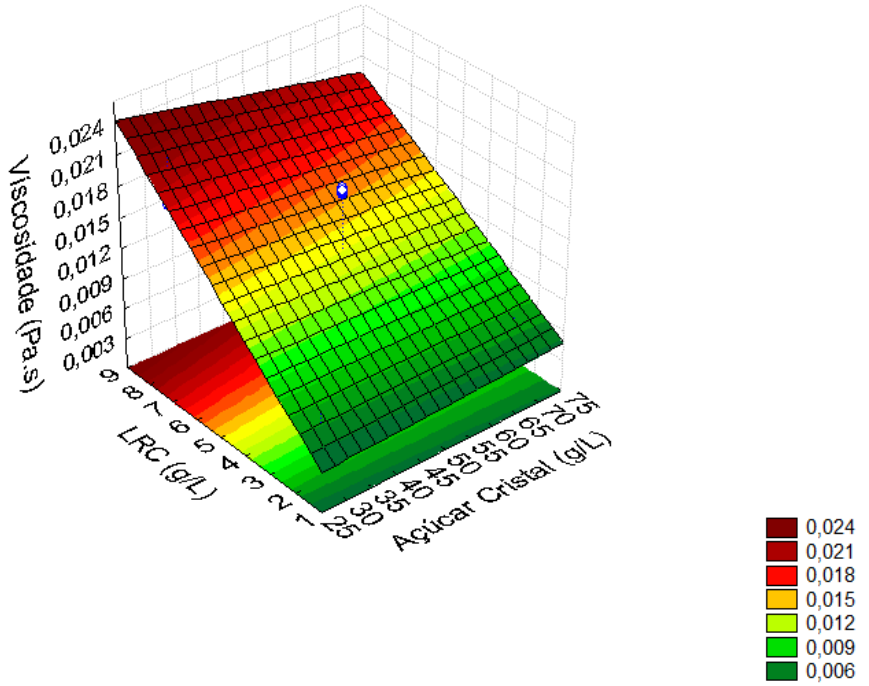


Figura 22. Superfície de resposta viscosidade: efeito da variação das concentrações de substrato e LRC.

Na literatura disponível, o único estudo encontrado para avaliação da viscosidade diretamente do mosto fermentado foi realizado por Roukas e Mantzouridou (2001). Entretanto, os dados por eles apresentados não são passíveis de serem utilizados para uma análise comparativa, visto que a produção foi conduzida em biorreator. Portanto, em condições diferentes que não possibilitam uma análise precisa. No caso de ensaios realizados em frascos agitados, os dados reportados correspondem a análises viscosimétricas de suspensões aquosas de pululana recuperada ou em DMSO (KONG; ZIEGLER, 2001; VIJAYENDRA *et al*., 2001; LAZARIDOU *et al*., 2002).

5.3.3. Variável Resposta: Massa Molar

A massa molar da pululana tem significante influência em sua utilização, sendo altos (maior que 10^5 g/mol) valores requeridos para o seu uso comercial (ISRAILIDES et al., 1994; CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). Alguns autores estabeleceram que a massa molar está diretamente relacionada à composição do meio de produção, por isso, principalmente trabalhos mais recentes têm dado ênfase à otimização do meio (LEE; YOO, 1993; LIN; ZHANG; THIBAULT, 2007; GOSUNGUR; UZUNOGULLARI; DAGBAGLI, 2011; YU *et al*., 2012). Nesse contexto, algumas publicações têm demonstrado a possibilidade do uso de materiais alternativos.

Em face do exposto, a massa molar foi considerada como outra variável resposta para avaliação estatística do efeito das concentrações de açúcar cristal e LRC. Novamente, o gráfico de Pareto (Figura 23) indica que apenas o constituinte LRC foi estatisticamente significativo no nível de confiança de 95% para a qualidade do biopolímero. No entanto, o açúcar cristal, bem como a interação entre os dois termos, não foram estatisticamente significativos.

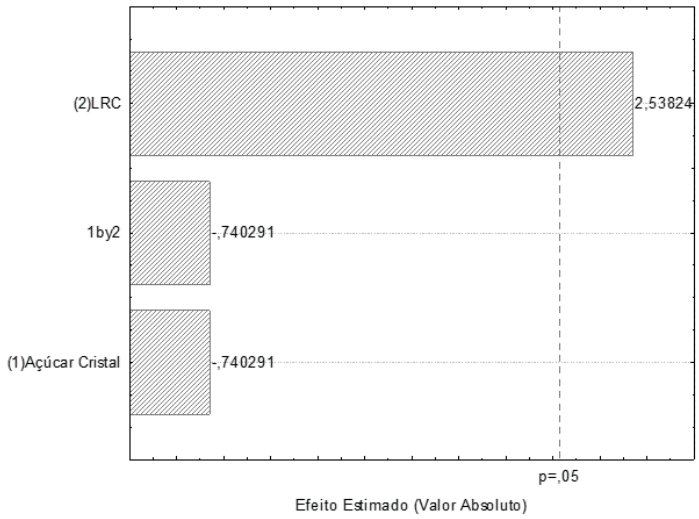


Figura 23. Gráfico de Pareto das diferentes variáveis testadas no Planejamento Experimental, para a resposta em massa molar. [Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do Teste t, fornecidos pelo programa e obtidos na janela dos efeitos principais; valores à direita da linha pontilhada são estaticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05)].

O coeficiente de regressão e os valores dos testes *t* e p estimados para termos lineares, quadrático e interações dos parâmetros para a resposta em massa molar são apresentados na Tabela 18, para um nível de confiança de 95%, α =0,05.

Tabela 18. Resultados da análise de regressão do Planejamento Experimental e os respectivos valores dos testes *t* e p para a resposta em Massa Molar

Fator	Coeficiente de regressão	Desvio-padrão	Teste t(10)	Valor p
β_0	-36424,6	98787,43	-0,368717	0,720025
β_1	469,5	1848,96	0,253918	0,804704
β_2	27834,3	17076,03	1,630024	0,134151
β_{12}	-234,7	317,09	-0,740291	0,476145

Considerando os dados da Tabela 18, a Equação 10 pode ser reescrita segundo apresentado abaixo:

$$\text{Massa Molar} = -36424{,}6 + (469{,}5\ X_1) + (27834{,}3\ X_2) + (-234{,}7\ X_1X_2)$$

Equação 15

A Figura 24 apresenta o gráfico de superfície resposta para massa molar para a mistura de açúcar cristal e LRC. Nas concentrações de 8 g/L de LRC e 30 g/L de açúcar cristal foi calculado a partir da Equação 15 o valor máximo de estimativa de $1{,}4 \times 10^5$ g/mol.

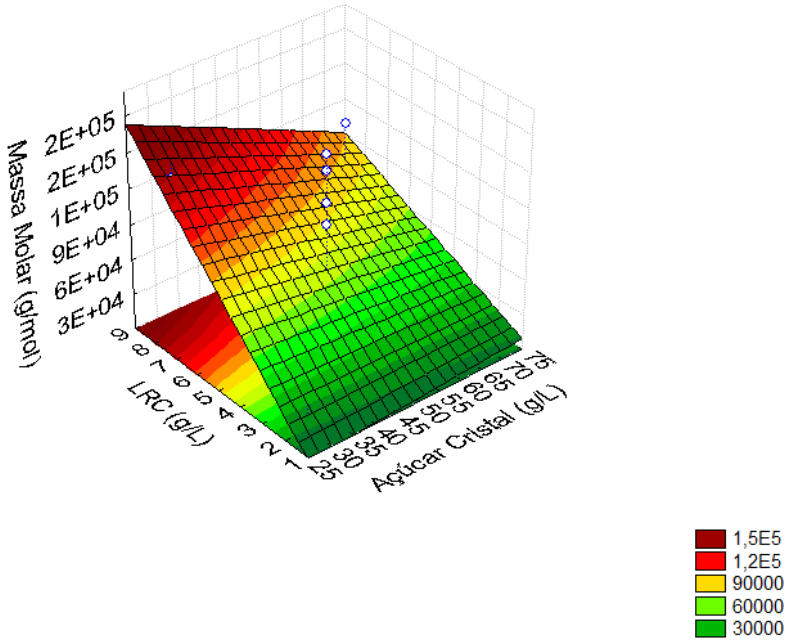


Figura 24. Superfície reposta de massa molar do efeito da variação da concentração de substrato e da fonte de nitrogênio.

Segundo a literatura, a massa molar de uma mesma pululana comercial variou de 1 × 10^6 a 5,6 × 10^6 g/mol (LAZARIDOU *et al*., 2002a; LAZARIDOU *et al*., 2002b). Esses mesmos autores reportam valores de 2,07 × 10^5 e de 4,06 × 10^5 g/mol para biopolímeros produzidos por *A. pullulans* quando cultivado em meio constituído de melaço de beterraba. Mais recentemente, em 2011, Jiang, Wu e Kim reportaram massas molares de 1,2 x 10^5 e 2,7 x 10^5 g/mol para o cultivo de *A. pullulans* AP329 em meio contendo 50 g/L de glicose e, 0,2 g/L de $NaNO_2$ e 0,25 g/L de $(Na_4)_2SO_4$, respectivamente.

Yu e colaboradores (2012) obtiveram massa molar máxima de 5,74 × 10^6 g/mol, pela fermentação em batelada simples utilizando *A. pullulans* SZU 1001 na condição nutricional por eles otimizada (50 g/L glicose, 1.0 g/L extrato de levedura, 0,3 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L K_2HPO_4e 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Sugumaran e colaboradores (2013) avaliaram estatisticamente a produção de pululana por fermentação em estado sólido por *A. pullulans* NCIM 1048, em meio contendo como matéria prima semente de jaca (20 g/L). Nas condições por eles otimizadas (KH_2PO_4– 4,16 g/L, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,052 g/L, NaCl – 1,69 g/L, umidade – 47,9%), o valor da massa molar foi de 1,73 × 10^6 g/mol.

Em comparação com os dados da literatura acima reportados, pode-se concluir que a combinação açúcar cristal e LRC propiciam a produção de biopolímero de massa molar dentro dos limites normalmente obtidos para diferentes condições nutricionais.

Mesmo considerando que o planejamento experimental realizado apontou a tendência de melhorar a produção e a qualidade do biopolímero com aumento da concentração de LRC no mosto, não foi realizado um segundo planejamento experimental, por ser inviável tecnicamente. Maiores concentrações de LRC, por conta da quantidade de sólidos, trariam transtornos durante a etapa de fermentação, como o entupimento de mangueiras; bem como de recuperação do biopolímero, impedindo que o processo fosse realizado em larga escala. Ainda que com isso, fosse empregada menor quantidade de açúcar cristal, o que levaria à redução do custo do processo.

5.3.4. Caracterização do biopolímero

O biopolímero obtido por *A. pullulans* IOC 3011 a partir de açúcar cristal e LRC, na condição apontada como ideal pelo planejamento experimental, foi analisado por análises termogravimétrica (TGA), espectroscópicas por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e por ressonância magnética nuclear (RMN). A caracterização termogravimétrica permite avaliar a degradação e estabilidade em função da temperatura, propriedades importantes do ponto de vista científico e industrial (LIU *et al.,* 2013). A espectroscopia FTIR é utilizada como ferramenta na elucidação da estrutura molecular (LEITE *et al*., 2013), enquanto a ênfase da RMN está na caracterização das propriedades dinâmicas e estruturais, delineando a pureza e a homogeneidade do material.

- **Análise Térmica**

A Figura 25 apresenta as curvas de TG/DTG para a amostra de biopolímero obtido na condição nutricional anteriormente definida (item 5.3), isto é, 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC. A curva TG mostra perda de massa em duas etapas

principais. A primeira perda, de cerca 10%, resulta do processo de desidratação, ocorrendo da temperatura ambiente até cerca de 160ºC. A presença de água se deve a absorção por grupos polares da estrutura, como grupamentos – OH. Segue-se, uma perda de massa acentuada (60%), o que se atribui à decomposição do biopolímero. Tal evento tem início em torno de 260°C e término em aproximadamente 330°C. O teor de cinzas de cerca de 30% foi determinado à temperatura de 700°C.

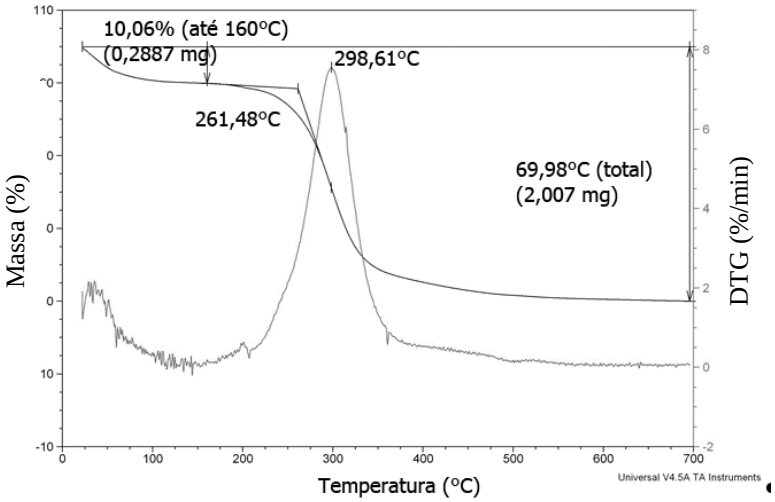


Figura 25. Curvas de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) até 700ºC, com velocidade de aquecimento de 10ºC/min, em atmosfera de nitrogênio, da amostra de biopolímero obtida na condição definida por Planejamento Experimental [30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria].

Fernandes e colaboradores (2014), analisando termicamente uma amostra de pululana pura, observaram perda de massa (percentual não reportado) associada à desidratação da amostra, em torno de 100°C, e a presença de aproximadamente 10% de resíduo de natureza inorgânica, em 830°C.

O comportamento térmico de amostra de pululana pura, também foi determinado por Bumbu e colaboradores (2002). O estágio principal de decomposição do biopolímero, com 44,4% de perda de massa, ocorreu no intervalo entre 230 e 330°C; temperaturas inicial e final de decomposição, respectivamente.

O gráfico de DTG (Figura 25) revela um pico intenso, correspondente à velocidade máxima de degradação, na temperatura de cerca de 300ºC. Análises de DTG realizadas por Fernandes e colaboradores (2014) para pululana pura e pululana-NH_2 revelaram perfis de degradação muito similares. Os valores máximos de degradação foram evidenciados nas temperaturas de 286°C e 296ºC, respectivamente. Segundo esses autores, a variação da temperatura pode ser devido à baixa taxa de transferência de calor da cadeia da pululana pela presença de carga inorgânica. Portanto, é possível modificar o comportamento térmico da pululana por alteração da sua estrutura. Em consequência, ampliam-se as possibilidades de seu emprego.

O polímero obtido neste trabalho se mostrou termicamente estável até 260ºC (Figura 25); portanto, mais estável do que a pululana pura testada pelos autores citados previamente. Também, comparativamente, a temperatura correspondente à velocidade máxima de decomposição da pululana obtida foi ligeiramente maior. As diferenças podem ser atribuídas à presença de agregados de natureza glicídica ou peptídica ao biopolímero, de forma intra ou intermolecular, ou ao tamanho das macromoléculas (massa molar), que decorrem das condições de obtenção (LIN; ZHANG; THIBAULT, 2007; GOSUNGUR; UZUNOGULLARI; DAGBAGLI, 2011; YU *et al*., 2012).

- **FTIR**

Na Figura 26 é observado o espectro de infravermelho com Transformada de Fourier da amostra do biopolímero recuperado do mosto fermentado, sem tratamento, na condição nutricional ideal, segundo o planejamento experimental realizado. A região estudada compreendeu as bandas entre 400 e 4000 cm^{-1}, onde foram reveladas as presenças de diferentes grupos funcionais: CH, CH_2, C-O-C, C-O, H-O-H, OH e C=O. Os mesmos grupos foram observados por Sakata e Otsuka (2009), ao analisarem filme de pululana.

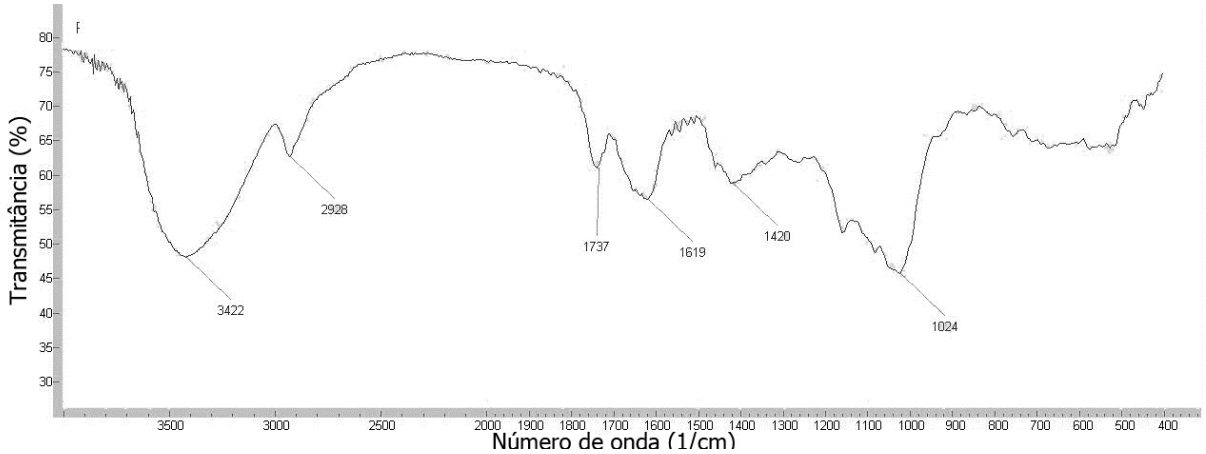


Figura 26. Espectro na região do infravermelho do biopolímero obtido na condição definida por Planejamento Experimental [30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria].

As bandas bem definidas na região de 1250 - 1460 cm^{-1} e 2940-2840 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento vibracional simétrico e assimétrico de grupos CH e ao estiramento vibracional de CH_2. Nota-se, também, uma absorção na região 1080 cm^{-1}, que corresponde à deformação axial simétrica de C-O-C e à ligação glicosídica, e outra em 1162 cm^{-1} correspondente à deformação axial assimétrica C-O-C de ligações glicosídicas. A banda na região de 1790 - 1740 cm^{-1} está associada ao estiramento vibracional de grupos carboxílicos (deformação axial de C=O de acetato), enquanto em 1629 cm^{-1} está representada a deformação assimétrica do grupamento C=O. Esses resultados indicam que uma pequena quantidade de grupos carboxílicos pode ter sido formada a partir da oxidação de grupos alcoólicos. Na faixa espectral 3440 - 3300 cm^{-1} ocorre uma banda relativamente larga de absorção, característica do estiramento e deformação axial de grupos hidroxila (O-H), participantes das interações de ligações de hidrogênio. Em 1020 cm^{-1}, ocorre uma deformação axial de C-O, característica de álcoois primários (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; KACURÁKOVÁ *et al*., 2000, SAKATA; OTSUKA, 2009; FERNANDES *et al*., 2004).

- **RMN**

No espectro de RMN ^{13}C do biopolímero recuperado (Figura 28A) estão delineados 18 sinais intensos característicos dos carbonos C-1 a C-6 de três unidades de repetição do polissacarídeo. Estes sinais foram atribuídos por comparação com dados de RMN ^{13}C de pululanas publicados (GLINEL *et al*., 2000; SUGUMARAN *et al*., 2013).

A pululana (Figura 27) apresenta uma unidade de repetição constituída de três unidades de α-D-glicose: unidade A que representa α-D-glicose (1→6), e unidades B e C de α-D-glicose (1→4).

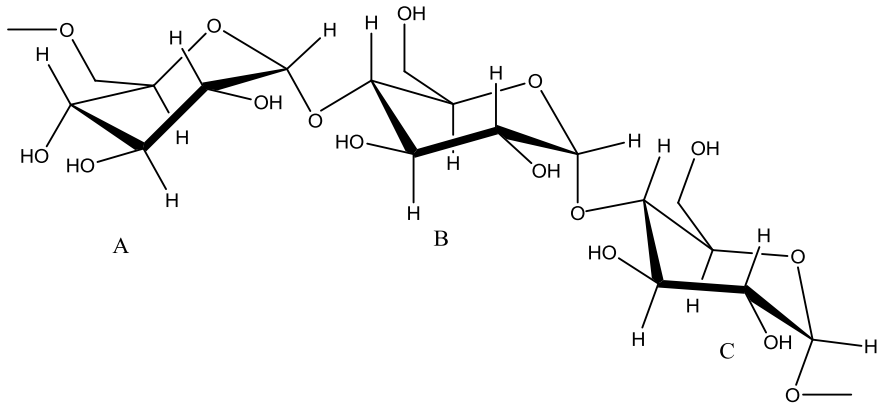


Figura 27. Estrutura química da pululana (A) unidades α-D-glicose (1→6), (B) e (C) unidades de α-D-glicose (1→4)
Fonte: adaptado de Glinel *et al*. (2000).

Na região de carbono anomérico (90 a 110 ppm) observam-se três sinais (100,9; 100,4 e 98,6 ppm) que foram atribuídos aos carbonos C-1 das unidades A (α-D-glicose (1→6)), B (α-D-glicose (1→4) vizinho a unidade (α-D-glicose (1→6)) e C ((α-D-glicose (1→4) vizinha a outra unidade (α-D-glicose (1→4). Singh, Saini e Kennedy (2009) ao analisar por RMN ^{13}C o biopolímero obtido por *Aureobasidium pullulans* FB-1 e o de referência da Sigma-Aldrich, determinaram para o carbono anomérico, sinais em 99,00 e 98,76 ppm, respectivamente. Similarmente, Sugumaran e colaboradores (2013) detectaram sinal para o carbono anomérico em 99,73 ppm pela análise de RMN ^{13}C de pululana produzida a partir de pó de semente de jaca.

Na figura ainda encontra-se o registro do subespectro com sequência de pulsos DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer,* em português, aprimoramento sem distorção da transferência de polarização) empregado para determinar a multiplicidade de picos de carbono (Figura 28 B). No espectro de DEPT 135 os carbonos CH_2 são observados na anti-fase aos sinais dos carbonos CH e CH_3.

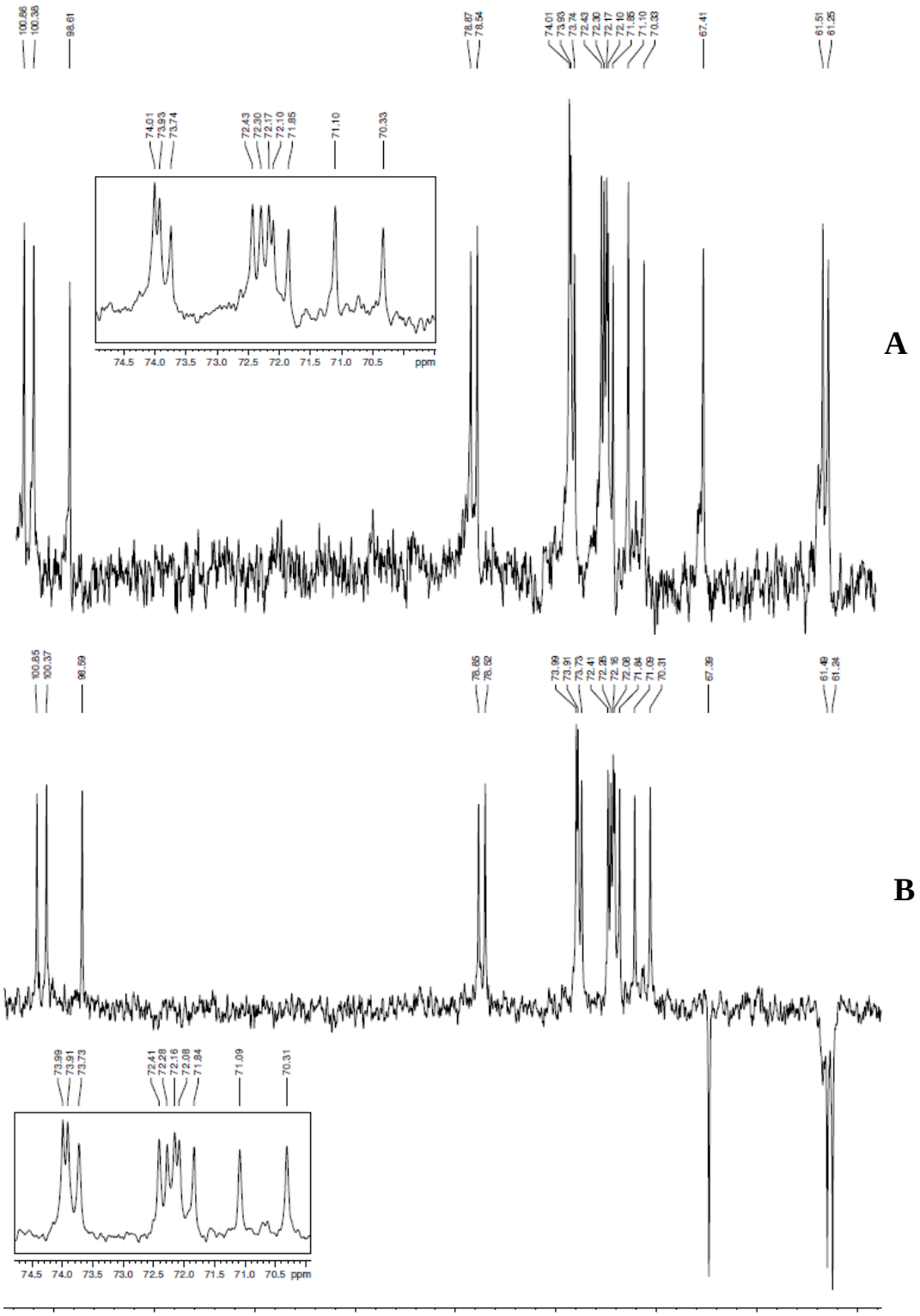


Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C em espectrômetro *Fourier transform Bruker Avance* DRX a 125 MHz (A) e de DEPT 135 (B) da amostra de biopolímero recuperado de mosto formulado com 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC, após 96 h de fermentação com *A. pullulans* IOC 3011.

No espectro do polissacarídeo (Figura 28 A) evidencia-se ainda três sinais intensos em 67,4, 61,5 e 61,2 ppm. Levando em consideração que o C-6 da unidade A está participando de uma ligação glicosídica o deslocamento deste sofrerá uma variação para região de maior deslocamento químico, portanto o sinal em 67,4 ppm foi atribuído ao C-6 da unidade A e, comparando com os dados da literatura atribui-se os sinais em 61,5 e 61,2 ppm aos C-6 das unidades B e C respectivamente.

Os sinais na região de 78 a 79 ppm são devidos aos C-4 envolvidos na ligação glicosídica das unidades B e C. A unidade B está ligada por α-D-glicose (1→6) e possui maior deslocamento químico que o C-4 da unidade C. O C-4 da unidade A não está envolvido na ligação glicosídica e é observado em 70,3 ppm.

Youssef, Roukas e Biliaderis (1999) avaliaram, por RMN ^{13}C, a pululana obtida após 168 h de fermentação por *A. pullulans* P 56. Segundo o espectro obtido por eles, a região de carbono anomérico mostra três sinais correspondentes às ligações α-(1→4) (101,1, 100,6 ppm) e α-(1→6) (98,8 ppm). Ainda segundo os autores, os desdobramentos do C-4 (79,0, 78,7 ppm) e do C-6 (61,7, 61,4 ppm) referem-se à ligação das unidades de glicose.

A Tabela 19 apresenta as atribuições dos 18 carbonos da unidade de repetição da pululana isolada neste trabalho baseada nas análises acima e nos dados publicados por Youssef, Roukas e Biliaderis (1999), Glinel e colaboradores (2000), Singh, Saini e Kennedy (2009), e Sugumaran e colaboradores (2013).

Tabela 19. Atribuições dos 18 carbonos da unidade de repetição da pululana obtida a partir do Planejamento Experimental

Unidade	Atribuições dos Carbonos (ppm)					
	C-1	**C-2**	**C-3**	**C-4**	**C-5**	**C-6**
A	100,9	72,4	73,8	70,3	72,2	67,4
B	100,4	72,3	73,9	78,9	72,1	61,5
C	98,6	71,2	74,0	78,5	71,1	61,2

Os dados de RMN ^{13}C confirmaram a homogeneidade das preparações de pululana.

5.4. Produção do biopolímero em biorreator

Buscou-se avaliar o efeito da combinação agitação e aeração na produção do biopolímero por *A. pullulans* IOC 3011, uma vez que o mosto no decorrer do processo fermentativo sofre alterações reológicas que dificultam a dissolução de oxigênio. Isso repercute diretamente na biossíntese da macromolécula, conforme já levantado em Materiais e Métodos.

A Figura 29 apresenta os valores de produção do biopolímero e do fator de conversão $Y_{P/S}$, considerados os dados de substrato consumido, obtidos para diferentes condições agitação/aeração em fermentações de 72 h conduzidas em biorreator com mosto constituído de 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC.

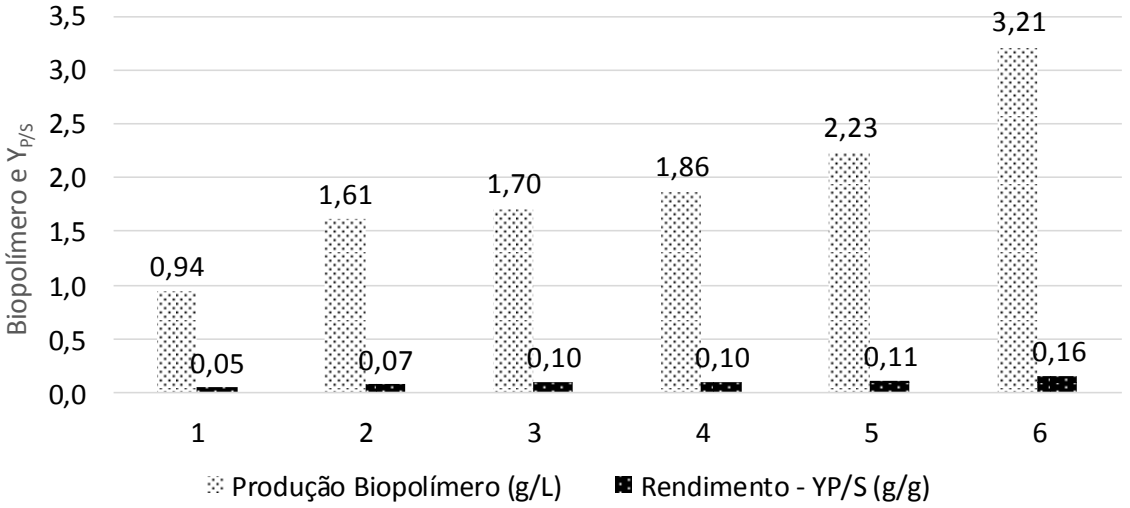


Figura 29. Efeito da combinação aeração e agitação na produção de biopolímero por *Aureobasidium pullulans* linhagem IOC 3011 e respectivos fatores de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) para ensaios conduzidos em biorreator após 72 h de fermentação em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC [1- 0vvm/150 rpm; 2- 0 vvm/300 rpm; 3- 0,5 vvm/150 rpm; 4- 0,5 vvm/300 rpm; 5- 1,0 vvm/150 rpm; 6- 1,0 vvm/300 rpm].

Em linhas gerais, houve um aumento da produção microbiana de biopolímero à medida que houve aumento do suprimento de oxigênio no meio (Figura 29). De acordo com Roukas e Mantzouridou (2001) a aeração pode ser benéfica ao crescimento celular e à produção do polímero por favorecer a transferência de massa (substrato e oxigênio) do meio reacional para o micro-organismo (*A. pullulans* P56). No entanto, conforme apontado por esses mesmos autores, quando as células são expostas a altas concentrações de oxigênio (> 2,0 vvm), pode haver modificação

morfológica do micro-organismo, comprometendo o processo fermentativo. Portanto, considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se inferir que não foi atingida uma concentração de oxigênio inibitória para a biossíntese de polímero por *A. pullulans* IOC 3011.

Conforme apresentado na Figura 29, para valores fixos de taxa de aeração, o aumento da velocidade de agitação favoreceu a síntese do biopolímero (ensaios 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6). Isto também foi verdadeiro no caso do rendimento, à exceção dos ensaios 3 e 4, isto é, na taxa de aeração intermediária (0,5 vvm). Nesta condição, o aumento da velocidade de agitação de 150 para 300 rpm propiciou um aumento da produção, resultando em iguais valores de $Y_{P/S}$ (0,1 g/g). Cabe mencionar que em todas as condições ensaiadas, o consumo de substrato foi semelhante, ao redor de 65%.

Analisando ainda a figura, percebe-se que a pior *performance* da linhagem fúngica ocorreu na maior limitação de oxigênio (ensaio 1 – ausência de aeração e 150 rpm). Porém, nota-se que, mesmo sem injeção de ar, não houve interrupção da síntese. Provavelmente, o oxigênio derivou do espaço livre no biorreator (*headspace*). Tanto é que ao aumentar a velocidade de agitação para 300 rpm (ensaio 2), houve um incremento da produção do biopolímero.

Em trabalho realizado por Roukas e Liakopoulou-Kyriakides (1999), também houve síntese de pululana (12 g/L) quando do cultivo de *A. pullulans* P56 sem suprimento de ar. No entanto, quando o processo foi realizado com taxa de aeração de 0,5 e 1,0 vvm, a produção de pululana foi de 14 e 23 g/L, respectivamente. Isto mostra a dependência de energia para síntese do biopolímero e, portanto, do oxigênio como aceptor final de elétrons. Embora a literatura mostre que maiores taxas de aeração podem levar ao aumento da produção de pululana, esta pode diminuir com a elevação do teor de oxigênio dissolvido devido ao aumento da força de cisalhamento (WECKER; ONKEN, 1991).

No presente estudo, a maior produção (3,21 g/L) e o maior rendimento (0,16 g/g) foram obtidos quando utilizados os valores máximos de aeração e agitação (1 vvm e 300 rpm, respectivamente). Novamente, confirmando a importância de

favorecer a homogeneidade do sistema, principalmente no caso de haver variação das propriedades reológicas.

Gibbs e Seviour (1996) estudaram a influência da velocidade de agitação (125, 250, 500, 750, 1000 e 1250 rpm), para uma aeração fixa de 0,04 vvm, na produção de exopolissacarídeo por *A. pullulans* ATCC 9348 em processo em batelada, em meio contendo 30 g/L de glicose e 0,6 g/L de $(NH_4)_2SO_4$. Os valores de biopolímero produzido e rendimentos foram 11,1; 11,3; 7,4; 4,6; 5,6; e 5,6 g/L e 0,38; 0,37; 0,26, 0,15; 0,19; e 0,19 g/g, respectivamente. A partir desses dados, os autores concluíram que a produção é afetada pelo nível da pressão de oxigênio no fermentador. Segundo eles, esses resultados indicam que: (i) velocidades de agitação ≥ 750 rpm reduzem a produção do exopolissacarídeo, embora estimulem o crescimento microbiano; (ii) velocidades de agitação de 125 e 250 rpm são favoráveis à produção devido à baixa disponibilidade de oxigênio; e (iii) altas velocidades de agitação podem ser aplicadas desde que as células sejam mantidas em baixa de pressão de oxigênio.

Por outro lado, Sharma, Prasad e Choudhury (2013) evidenciaram que quanto menor a velocidade de agitação, menores eram as produções de pululana; sendo o valor mínimo 34,4 g/L determinado em 100 rpm. Neste caso, os ensaios foram realizados com *A. pullulans* RBF4A3 em frascos agitados contendo meio composto de glicose e peptona, para diferentes níveis de agitação (100, 200, 300 e 350 rpm). A maior produção foi obtida para 300 rpm, que proporcionou produção de 88,13 g/L após 96 h de fermentação. Segundo os autores, a baixa produção em baixas velocidades de agitação deve-se à baixa transferência de massa no sistema.

Em trabalho mais recente, o efeito de diferentes velocidades de agitação (200 a 1000 rpm) e 1 vvm de taxa de aeração, foi avaliado na produção de pululana por linhagem *A. pullulans* B-1 em biorreator contendo 60 g/L de sacarose e 0,72 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ (GNIEWOSZ; KRAŚNIEWSKA; SYNOWIEC, 2013). Os autores registraram concentrações máximas de produto (aprox. 25 g/L), bem como de biomassa em 800 rpm após 96 h de fermentação.

Em relação ao efeito da taxa de aeração na produção de pululana, tem-se o trabalho de Roukas e Mantzouridou (2001), realizado com 30 g/L de sacarose e 0,6

g/L de $(NH_4)_2SO_4$, em biorreator, com agitação de 200 rpm, nas taxas de aeração de 1,0; 2,0 e 3,0 vvm. O valor máximo de 30 g/L do biopolímero foi obtido quando utilizada a taxa de aeração intermediária, decorridas 144 h. De acordo com os autores, a aeração promoveu a homogeneização do meio durante a fermentação. Ainda segundo eles a produção de pululana, bem como a de biomassa, decresce quando empregada a maior taxa, por favorecer o crescimento filamentoso em detrimento do unicelular, forma que privilegia a síntese polimérica (CAMPBELL *et al*., 2004).

Gaidhani, McNeil e Ni (2005) exploraram a maneira pela qual *A. pullulans* se comporta em sistema homogêneo e de baixo cisalhamento, para diferentes taxas de aeração (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vvm), comparando dois tipos de biorreator, oscilatório (*oscillatory baffled fermenter,* OBF), e de mistura perfeita (*continuous stirred tank reactor*, CSTR). A maior produção de 16,17 g/L de pululana foi alcançada no reator oscilatório, empregando vazão de aeração de 1,0 vvm. No entanto, em maiores taxas de aeração houve redução da biossíntese de pululana, embora tenham favorecido o crescimento celular. Segundo os autores, isso pode estar associado a alguns fatores, tais como: (i) teor elevado de oxigênio induziria o metabolismo para síntese de material celular, em detrimento da síntese de pululana (SUTHERLAND, 1977; SUTHERLAND, 1982; LEE *et al*., 2001) e (ii) em limitação de oxigênio haveria estímulo da produção do polissacarídeo (RAU *et al*., 1992), o poderia explicar o porquê da quantidade de pululana ser superior a 1,0 vvm, se comparada às taxas de aeração de 1,5 e 2,0 vvm.

Cheng, Demirci e Catchmark, em 2011, estudaram a produção de pululana por *A. pullulans* ATCC 201253 em biorreator, utilizando 75 g/L de sacarose. Neste estudo, primeiramente para avaliação do efeito da velocidade de agitação, os autores reportaram produções de 14,9 e 22,6 g/L, correspondendo a rendimento de 0,21 e de 0,31 g/g, para, respectivamente, 200 e 500 rpm. Seguiram-se ensaios com velocidade de agitação em 200 rpm, com variação da taxa de aeração (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vvm), quando foram obtidas quantidades de pululana de 16,6; 22; 25,8; e 20,1 g/L, correspondendo ao rendimento de 0,29; 0,30; 0,35; e 0,29 g/g, respectivamente. Portanto, assim como já constatado por Gibbs e Seviour (1996), altos níveis de oxigênio dissolvido influenciam negativamente na produção de pululana.

O único trabalho encontrado na literatura científica que trata da avaliação conjunta da aeração (1,0; 2,0 e 3,0 vvm) e agitação (200, 400 e 600 rpm) foi a otimização da produção de pululana por *A. pullulans* P56 em meio sintético realizada por Göksungur e colaboradores (2005). No estudo também foi contemplado o efeito da concentração inicial de sacarose (30, 50 e 70 g/L). O máximo de produção (16,7 g/L) foi obtido para 50 g/L de sacarose, 2 vvm e 400 rpm. Na maior taxa de aeração houve redução da produção da pululana, corroborando o reportado por Roukas e Mantzouridou (2001).

- **Caracterização do biopolímero obtido em biorreator**

Com o intuito de garantir a qualidade do biopolímero pululana, foi realizada sua caracterização física e química. Para tanto, os biopolímeros obtidos nas diferentes combinações de aeração e agitação (Tabela 12) foram analisados quanto ao aspecto macroscópico, bem como por TGA e FTIR. Além disso, foram feitas análises viscosimétricas dos mostos nas 6 condições ensaiadas e do polímero recuperado e tratado (ressolubilização e filtração) a partir da amostra de melhor resultado. Para esta determinação, o polímero recuperado foi ressuspendido em água destilada de modo a estabelecer 3 diferentes concentrações (1, 5 e 10% m/v). Para fins comparativos, a análise viscosimétrica do polímero recuperado ressuspendido em água foi realizada simultaneamente com a pululana comercial referência (Sigma-Aldrich).

- **Aspecto macroscópico**

A Figura 30 apresenta o aspecto macroscópico dos biopolímeros obtidos nos ensaios em biorreator. As 6 amostras apresentaram textura semelhante. Porém, as amostras apresentaram diferenças quanto à coloração, sendo as amostras obtidas nas condições 0 vvm e 150 rpm (ensaio 1), 0 vvm e 300 rpm (ensaio 2) e 1,0 vvm e 300 rpm (ensaio 6), ilustradas na Figura 30 – A, B e F, respectivamente, as mais claras, indicativo de menor cogeração de pigmento.

Figura 30. Aspectos dos biopolímero obtidos por *Aureobasidium pullulans* linhagem IOC 3011 em biorreator com variação de aeração e agitação em meio de produção contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC [(A) 0 vvm e 150 rpm (B) 0 vvm e 300 rpm (C) 0,5 vvm e 150 rpm (D) 0,5 vvm e 300 rpm (E) 1 vvm e 150 rpm (F) 1 vvm e 300 rpm.]

A literatura não associa aumento ou redução da pigmentação em função da variação de fatores físicos, como por exemplo, aeração e agitação. Entretanto, alguns autores relatam que variações na taxa de aeração ou na velocidade de agitação podem alterar a morfologia celular, o rendimento e/ou a produtividade da pululana e da biomassa fúngica (GIBBS; SEVIOUR, 1996; ROUKAS; MANTZOURIDOU, 2001). Uma vez que esses fatores estão diretamente relacionados ao metabolismo celular, logo, podem também intervir na síntese de pigmento e, consequentemente, na intensidade da coloração do biopolímero obtido.

❖ Viscosidade do Mosto

A Figura 31 apresenta a análise viscosimétrica dos mostos obtidos em diferentes taxas de aeração e velocidades de agitação. Foram feitas determinações de viscosidade desde 0,1 s^{-1}, contudo, em face da pouca sensibilidade do equipamento em função da baixa viscosidade, foram plotados apenas os dados relativos às taxas de cisalhamento superiores à 100 s^{-1}.

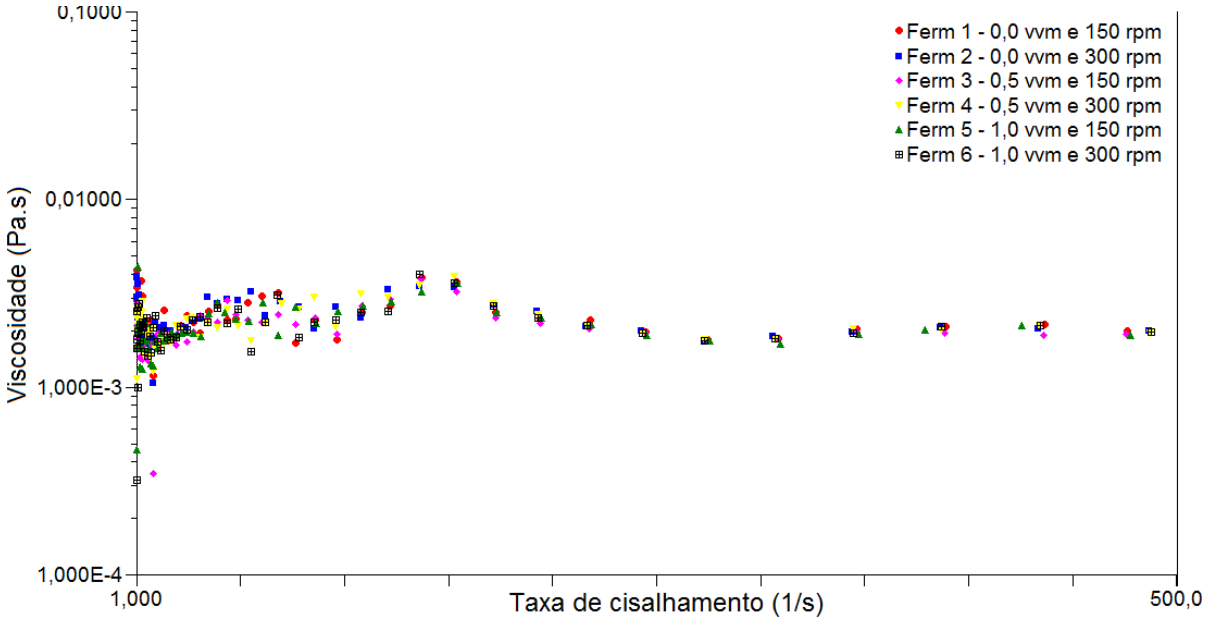


Figura 31. Análise viscosimétrica de mostos obtidos em biorreator em distintas taxas de aeração e velocidades agitação (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C).

Analisando a figura, pode-se observar que, apesar da variação da taxa de aeração e da velocidade de agitação, em geral, a viscosidade praticamente não se alterou. Por exemplo, na faixa de cisalhamento correspondente ao gráfico (Figura 31), as viscosidades dos mostos nas diferentes condições ensaiadas variaram de 0,0019 a 0,0032 Pa.s (150 s^{-1}) e de 0,0021 a 0,0022 Pa.s (420 s^{-1}). Estes apresentam comportamento pseudoplástico, como pode melhor visualizado através da curva de escoamento de tensão *versus* taxa de cisalhamento, no Apêndice 3.

Roukas e Mantzouridou (2001), avaliando a viscosidade aparente do mosto em função da taxa de cisalhamento do mosto fermentado por *A. pullulans* P56 (96h) em meio sintético em fermentador numa taxa de aeração de 2,0 vvm, obtiveram para taxas de cisalhamento de 80 s^{-1}, valor de viscosidade de aproximadamente 0,012 Pa.s.

❖ **Viscosidade de dispersões de biopolímero**

A viscosidade aparente do caldo fermentado tem sido o parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do biopolímero (SUTHERLAND, 2001, BUENO; GARCIA-CRUZ, 2000). Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que este não é o melhor parâmetro de avaliação. Antunes (2000) mostrou que a análise da viscosidade de soluções aquosas de xantana revela, com maior precisão, a potencialidade de

aplicação industrial do biopolímero, se comparada com o resultado de viscosidade do mosto fermentado. A tendência atual é de avaliar a qualidade de um biopolímero através da determinação da viscosidade aparente, em solução aquosa de baixa concentração (SILVA; RAO, 1999; DIAZ, 2002; FORESTI, 2003). Assim sendo, o biopolímero recuperado com álcool e seco foi ressolubilizado em água destilada em 3 diferentes concentrações brutas e analisado quanto a sua viscosidade.

A Figura 32 apresenta a caracterização reológica das dispersões aquosas (1, 5 e 10% m/v – concentração bruta) apenas do biopolímero obtido em biorreator, na condição que proporcionou maiores valores de produção e rendimento (taxa de aeração de 1 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm). Para fins comparativos, no gráfico também foram plotados os dados viscosimétricos das dispersões aquosas da pululana comercial padrão, nas mesmas concentrações.

Na figura nota-se que as viscosidades das diferentes dispersões aquosas do biopolímero apresentaram variação com o aumento da taxa de cisalhamento, o que caracteriza o comportamento pseudoplástico (as curvas de escoamento de tensão *versus* taxa de cisalhamento encontram-se no Apêndice 4). Comportamento similar foi observado para as dispersões aquosas da pululana comercial padrão. Ainda segundo esses mesmos autores, a baixa viscosidade de soluções de pululana é interessante para sua aplicação como revestimento e transportador encapsulado.

Ainda na Figura 32 é possível observar que o aumento da viscosidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de biopolímero, para as duas amostras analisadas (biopolímero produzido e biopolímero comercial padrão). Este efeito pode ser atribuído às interações intermoleculares e à formação de entrelaçamentos/agregados, que resultam no aumento efetivo da viscosidade (MILAS; RINAUDO; TINLAND,1985; RAO, 1999; GARCIA-OCHOA *et al*., 2000).

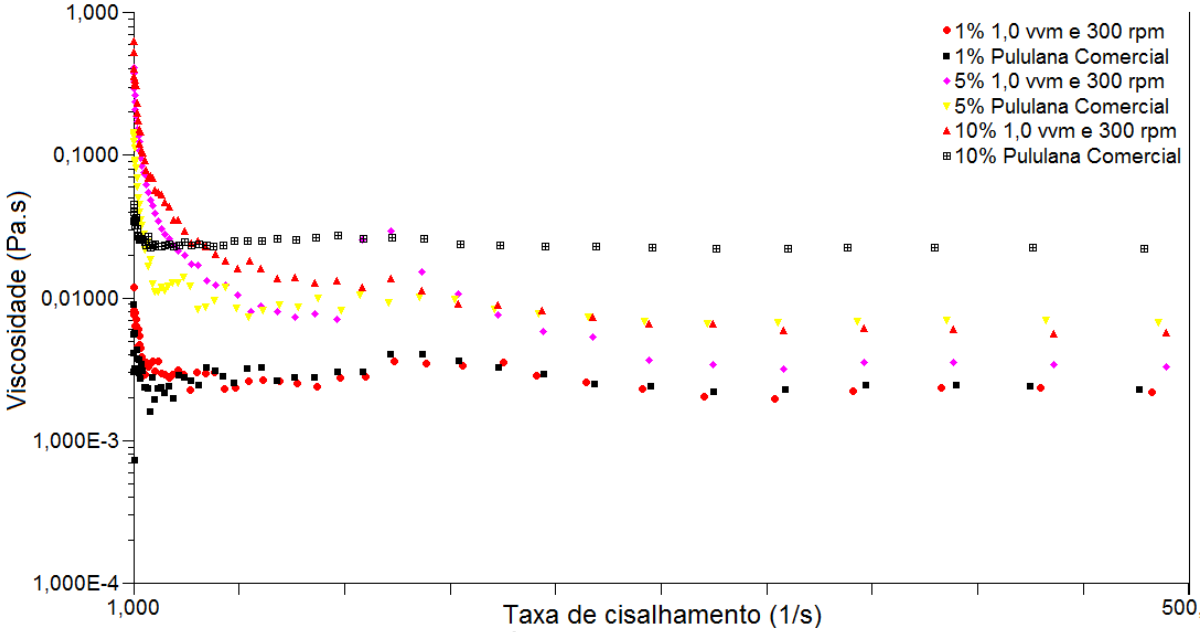


Figura 32. Comportamento viscosimétrico da pululana comercial de referência e do biopolímero produzido por *A. pullulans* IOC 3011 recuperado e ressolubilizado em água em 3 concentrações 1, 5 e 10% m/v, obtido em taxa de aeração de 1 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm, utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C).

Quando analisadas as dispersões dos biopolímeros na concentração bruta de 1%, as viscosidades na taxa de cisalhamento de aproximadamente 150 s^{-1} foram de 0,0046 Pa.s (pululana comercial padrão) e de 0,0034 Pa.s (biopolímero obtido) e, para 430 s^{-1}, de 0,0026 e de 0,0022 Pa.s, respectivamente. Comparando as viscosidades das amostras em cada taxa de cisalhamento, têm-se resultados semelhantes na menor taxa de cisalhamento, enquanto que, na maior taxa de cisalhamento, a viscosidade da pululana comercial de referência foi ligeiramente superior à do biopolímero produzido no biorreator, o que pode ser atribuído a uma maior rigidez da molécula do produto comercial. Por outro lado, maiores variações de viscosidade foram observadas para as dispersões das amostras de biopolímero produzido nas concentrações brutas de 5 e 10%, provavelmente, valores acima da concentração crítica para o polímero.

Vijayendra e colaboradores, em 2001, avaliaram a viscosidade de dispersões de pululana a 1% obtidas em meios contendo sacarose ou açúcar mascavo, como únicas fontes de carbono e obtiveram, respectivamente, 0,032 e 0,1605 Pa.s na taxa de cisalhamento de 1,7 s^{-1}. Este foi o único trabalho encontrado na literatura consultada, que avaliou dispersão de biopolímero na concentração de 1%. Assim

sendo, não há como realizar uma análise comparativa dos resultados obtidos neste trabalho, devido a grande diferença entre as taxas de cisalhamento adotadas em cada estudo. Adicionalmente, não é possível comparar com outros biopolímeros, posto que, segundo Karim e colaboradores (2009), soluções aquosas de pululana apresentam viscosidades relativamente baixas, quando comparadas com outros polissacarídeos.

O aumento de viscosidade entre as dispersões de pululana referência e do biopolímero obtido, numa mesma concentração, pode ser devido à presença de agregados macromoleculares ou microgéis (FRISCH; SIMHA, 1979 *apud* LOPES, 1996), que concorrem para o aumento do volume hidrodinâmico das partículas, bem como pela sua maior resistência ao alinhamento em fluxo.

Os maiores valores de viscosidade apresentados pela dispersão da amostra de pululana referência em relação à pululana obtida neste estudo, provavelmente podem ser atribuídos à escala de produção. Segundo Lopes (1989; 1996), em geral, os biopolímeros produzidos em grande escala (industrial) apresentam mais agregados do que àqueles obtidos em produções de menor escala.

5.4.1. Perfil cinético da produção de biopolímero

Definida a taxa de aeração e a velocidade de agitação de 1,0 vvm e 300 rpm (item 5.4), respectivamente, foi realizada uma nova fermentação em biorreator, nessas condições, para acompanhamento do perfil cinético de produção de biopolímero e consumo de substrato por um período de 120 h (Figura 33).

Analisando a figura, evidencia-se que a biossíntese de biopolímero ocorreu durante todo o período, aumentando exponencialmente. Perfil semelhante foi obtido para cultivo de duas linhagens da mesma espécie fúngica em sacarose (BADR-ELDIN *et al*., 1994; CHENG *et al*., 2010; WANG *et al*., 2014).

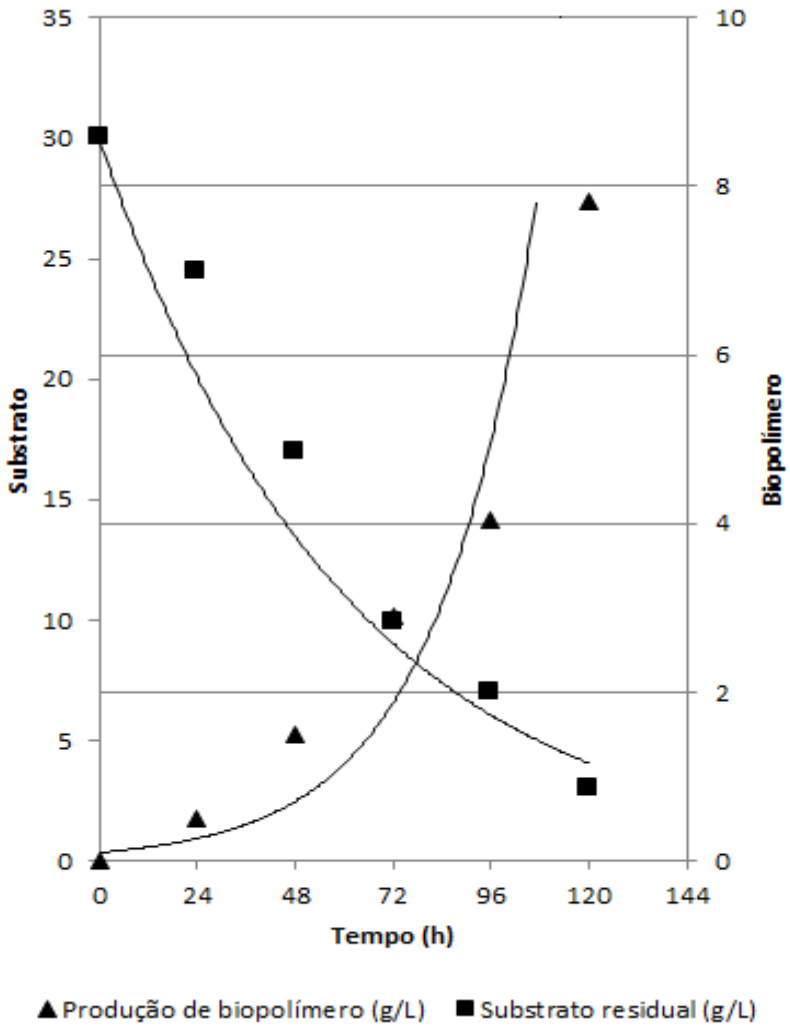


Figura 33. Perfil cinético de produção de biopolímero e consumo de substrato por um período de 120 h em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio de produção à base de açúcar cristal (30 g/L) e LRC (8 g/L).

Nota-se que, nas primeiras 48 horas, a produção do polissacarídeo foi baixa, sendo máxima no restante do tempo. Isto pode estar relacionado à maior disponibilidade de nitrogênio no início do processo ou a produção de distintos polissacarídeos pelo mesmo micro-organismo, conforme explicado a seguir.

De acordo com Badr-Eldin e colaboradores (1994), existe uma relação C/N ideal para produção de pululana, particularmente devido à limitação da fonte de nitrogênio. Ao incrementar a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ de 0,6 g/L para 1,2 e 2,4 g/L, a quantidade do biopolímero produzido por *A. pullulans* NRRL 6220 passou de 26 g/L para 10,5 e 8,4 g/L, respectivamente. Por outro lado, quando utilizada a concentração

da fonte de nitrogênio de 0,3 g/L, a produção de biopolímero foi de apenas 3,4 g/L. Portanto, há que se definir as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio para cada linhagem, com base nos parâmetros operacionais, de modo a atingir o valor máximo de biopolímero produzido.

Anteriormente, Seviour e Kristiansen (1983) já haviam verificado a ocorrência de fase lag na produção de pululana pelo cultivo em batelada da linhagem *A. pullulans* 3092, em meio constituido de sacarose (30 g/L) e $(NH_4)_2SO_4$ (0,6 - 1,2 g/L), como principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Segundo eles, ocorre um rápido consumo de NH_4^+, o que leva que esteja praticamente esgotado em 12 a 20 h, a depender da concentração inicial de $(NH_4)_2SO_4$. Isto foi observado para concentrações iniciais de 0,6 e 1,2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, o que corresponde à aproximadamente 0,13 e 0,26 g/L de nitrogênio. A fase lag foi tanto maior quanto maior a quantidade de nitrogênio no meio. Só depois deste período, é que foi notado aumento do polisacarídeo no meio. Ainda de acordo com os autores, a presença de NH_4^+ livre no meio parece reprimir a sintese de pululana. Quando a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ foi elevada para 2,4 g/L, houve pouca produção de biopolímero, enquanto a quantidade de bomassa foi aumentada em cerca de 90%.

Destaca-se que o consumo de nitrogênio, no caso do emprego de $(NH_4)_2SO_4$, implica em redução do valor do pH que pode vir a atingir 2,0, dependendo da sua concentração inicial no meio. Tal fato, não ocorreu no presente estudo, por ter sido usada uma solução tampão, de modo a evitar a elevação de pH, que ocorre com LRC (OLIVEIRA, 2010). Logo, a indução da síntese de biopolímero pode ser associada à redução da fonte de nitrogênio em decorrência do metabolismo celular.

No caso do micro-organismo ser capaz de produzir mais de um tipo de polissacarídeo extracelular, existe a possibilidade de, conforme as condições do processo forem sendo alteradas, o metabolismo ser direcionado para a síntese de uma macromolécula em detrimento da outra. Por exemplo, Christensen, Kjosbakken e Smidsrød (1985), demonstraram que uma bactéria marinha *Pseudomonas* sp., linhagem NCMB 2021, produzia um polissacarídeo composto de glicose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, numa proporção molar de 1,0:0; 8:0; 4:0,3 durante a fase exponencial de crescimento. Porém, no final da fase exponencial e na

fase estacionária, foi secretado outro tipo de polissacarídeo, composto de quantidades equimolares de N-acetil-glucosamina, ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosonico, além de um composto 6-deoxi-hexose não identificado, e grupos acetil. O primeiro polissacarídeo produzia soluções viscosas, géis em altas concentrações, e precipitava na presença de cátions multivalentes. O outro, de elevada massa molar (10^5 a 10^6 g/mol), formava dispersões em água de viscosidades muito baixas, e também era solúvel em solução aquosa de fenol (90%), metanol (80%) e etanol (80%).

A concentração de açúcar residual decresceu durante a fermentação, coincidindo com o aumento da concentração de biopolímero, o que mostra direcionamento metabólico para a sua biossíntese. Ao final das 120 h, pode-se constatar consumo praticamente total do açúcar, inclusive pela conformação da curva. Isto sugere que a produção máxima do biopolímero ocorre num tempo aproximado.

Sena e colaboradores (2006) observaram depleção total de sacarose (50 g/L), em cerca de 72 h, enquanto a concentração máxima de pululana, cuja síntese foi perceptível pouco após a inoculação, foi atingida em 96 e 120 h, pelo emprego de duas linhagens de *A. pullulans* testadas, ambas da Coleção de Culturas Americana *Nothern Regional Research Laboratory* (NRRL), Y-2311-1 e Y-6220.

Ainda segundo Sena e colaboradores (2006), as duas linhagens apresentaram desempenho comparável quanto à quantidade de pululana produzida, de cerca 20 g/L e ao perfil hiperbólico da produção. Adicionalmente, o cultivo com Y-6220 tornou o meio escuro. Neste caso, a formação do pigmento começou em 72 h, e tornou o mosto fermentado completamente escuro em 120 h.

Sena e colaboradores (2006), e estudos de outros autores que os precederam (LAZARIDOU *et al*., 2002; GÖKSUNGUR *et al.,* 2005), relatam que o prolongamento do tempo de processo possibilita que haja hidrólise da pululana pela enzima endógena glicoamilase, que é secretada pelo micro-organismo nos últimos estágios da fermentação, isto é, quando a concentração de substrato é muito baixa, de modo a disponibilizar açúcares prontamente assimiláveis. No trabalho de Göksungur e colaboradores (2005), a produção máxima de pululana (16,1 g/L) por *A. pullulans* P56 em meio contendo 50 g/L de sacarose em biorreator com 2 vvm de aeração foi atingida

em 96 h. Para tempos maiores de fermentação, os autores reportam ter havido redução na concentração do polissacarídeo. Importante mencionar que este comportamento não foi verificado para *A. pullulans* IOC 3011 no período de 168 h em frascos agitados (OLIVEIRA, 2010).

A partir dos dados de substrato consumido e de biopolímero produzido foi feito o cálculo de rendimento ($Y_{P/S}$), cujos valores acumulativos são apresentados na Figura 34. Pode-se perceber que, no decorrer do processo, ocorreu aumento do rendimento, que foi maior em tempos maiores de processo. A maior conversão ($Y_{P/S}$ = 0,29 g/g) foi verificada em 120 h. Portanto, considerando dados anteriores (OLIVEIRA, 2010) que demonstraram que a fase exponencial de crescimento da linhagem IOC 3011 tem término no tempo de 72 h, mostra que a cinética de produção de pululana ocorre semi-associada ao crescimento celular. Comportamento similar foi apresentado por Sena e colaboradores para duas linhagens *de A. pullulans.* Estes autores apresentam dados de $Y_{P/S}$ de 0,35 e 0,53 g/g.

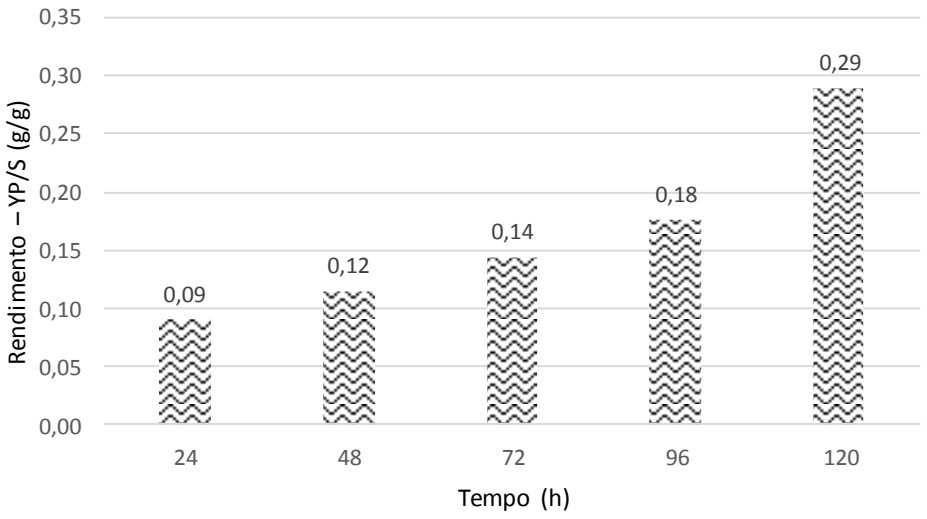


Figura 34. Fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) determinados durante a fermentação de açúcar cristal e LRC em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) por *A. pullulans* IOC 3011.

Em 2001, Lee e colaboradores determinaram valor máximo para $Y_{P/S}$ de 0,27 g/g a partir do cultivo em batelada de *A. pullulans* ATCC 42023 em meio contendo glicose (50 g/L) e sulfato de amônio (0,6 g/L), em pH 4,5. Porém, a partir do ajuste do pH para 6,5, foi atingido 0,33 g/g.

Estas fontes de carbono e nitrogênio também foram as mais adequadas para o cultivo de três isolados de solos de floresta (PUNNAPAYAK *et al*., 2003). Nas condições de pH de 7,5 e 30ºC, o rendimento foi 0,23 g/g para *A. pullulans* PR e 0,19 g/g para *A. pullulans* CU em 120 h e 0,16 g/g para *A. pullulans* SU após 96 h. Ao substituir sulfato de amônio por peptona, houve decréscimo da produção resultando em 0,17 g/g (PR), 0,13 g/g (CU) e 0,03 g/g (SU), nos mesmos períodos.

Em trabalho mais recente, Sugumaran, Jothi e Ponnusami (2013) avaliaram a influência do tempo de fermentação no rendimento de pululana em fermentação no estado sólido empregando *A. pullulans* MTCC 2670 em bagaço de mandioca. Para uma razão bagaço/água de 1:2, o rendimento foi crescente até a 96ª h, quando atingiu 0,024 g/g, e, a seguir, decresceu.

Ao longo do processo fermentativo foram realizadas medições *on line* de oxigênio dissolvido, exibidas na Figura 35. Pode-se observar depleção de oxigênio desde o início do processo, atingindo níveis mínimos em 48 h. A partir daí até o final do processo, manteve-se muito baixo e inalterado. Isto sugere que o suprimento de oxigênio pela injeção de ar na vazão de 1,0 vvm, com agitação de 300 vvm, não foi suficiente para manter níveis de oxigênio adequados para o metabolismo do fungo. Isto fez com que a produção do polissacarídeo fosse reduzida, no entanto, não impossibilitou a sua biossíntese, o que ratifica os resultados anteriormente obtidos. Logo, é possível melhorar a *performance* do processo, a partir do uso combinado de açúcar cristal e LRC, contemplando prioritariamente a otimização destes parâmetros.

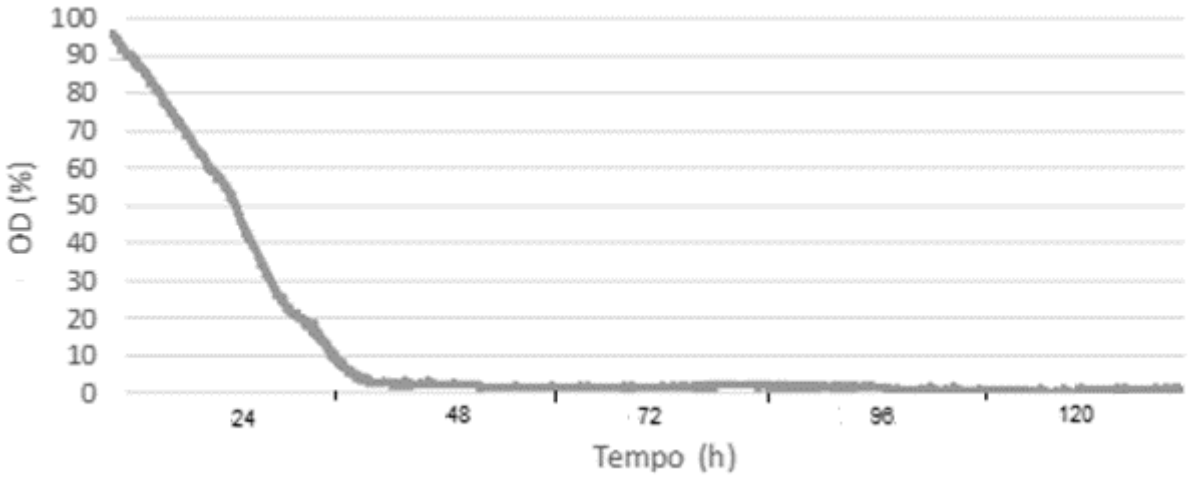


Figura 35. Variação do oxigênio dissolvido no meio reacional ao longo de 120 h de fermentação de açúcar cristal e LRC por *A. pullulans* IOC 3011 em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm).

Para fins comparativos, foi realizada a medida da concentração inicial de oxigênio no meio de mesma composição, para ensaio conduzido em mesa agitadora. Nas condições experimentais adotadas para este estudo, o valor de OD foi 98%. Obviamente, o crescimento do fungo e a produção de biopolímero causaram redução da disponibilidade de oxigênio no decorrer do processo. Contudo, nos ensaios conduzidos em mesa agitadora foi possível suprir maior quantidade de oxigênio para o metabolismo microbiano. Por conseguinte, foi possível obter maior quantidade de biopolímero.

Cabe ainda mencionar que, na ocasião dos ensaios em biorreator, o clima estava muito quente. E, como a refrigeração do sistema se dava por circulação de água da torneira, a maior temperatura do processo neste período (30-31°C) também pode ter comprometido a produção, contribuindo para a redução da síntese de pululana.

Assim como a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, as concentrações relativas de ambos, o pH e a concentração de oxigênio, a temperatura também está entre os principais parâmetros para a síntese de pululana. Especificamente, a temperatura com vista à formação de polissacarídeo por *A. pullulans* ATCC 3092 se situa na faixa de 20 a 36°C de acordo com McNeil e Kristiansen (1990). Esses autores verificaram que a temperatura afeta consideravelmente a fermentação sendo, no caso deles, 24°C, a temperatura ideal para a síntese do produto. De acordo com os autores,

a variação da concentração de polissacarídeo com a temperatura pode ser decorrente de alterações na velocidade de crescimento ou na morfologia do organismo produtor.

Por outro lado, Chi e Zhao (2003) demonstraram que a temperatura ideal para a produção é de 28°C para as linhagens de *A. pullulans* Y68 e que as temperaturas superiores ocasionam redução no rendimento do processo fermentativo proporcionalmente ao aumento da temperatura.

Xia, Wu e Pan (2011), estudando o efeito conjunto do pH e da temperatura, em condições controladas, em relação ao crescimento celular e à produção de pululana por *A. pullulans* AP329, demonstraram que pH baixo (2,5) e temperatura elevada (32°C) são favoráveis ao crescimento do fungo, enquanto pH mais elevado (5,5) e temperatura baixa (26°C) estimulam a síntese de pululana.

Os mostos fermentados, livres de células, de 72 e 120 h de processo foram também analisados quanto a sua viscosidade para determinação do comportamento reológico do polímero produzido em solução (Figura 36). Houve um aumento da viscosidade com o aumento do tempo de processo. Tal comportamento é indicativo de aumento da produção a partir de 72 h, o que corrobora com o gráfico de evolução da produção de biopolímero anteriormente apresentado (Figura 33).

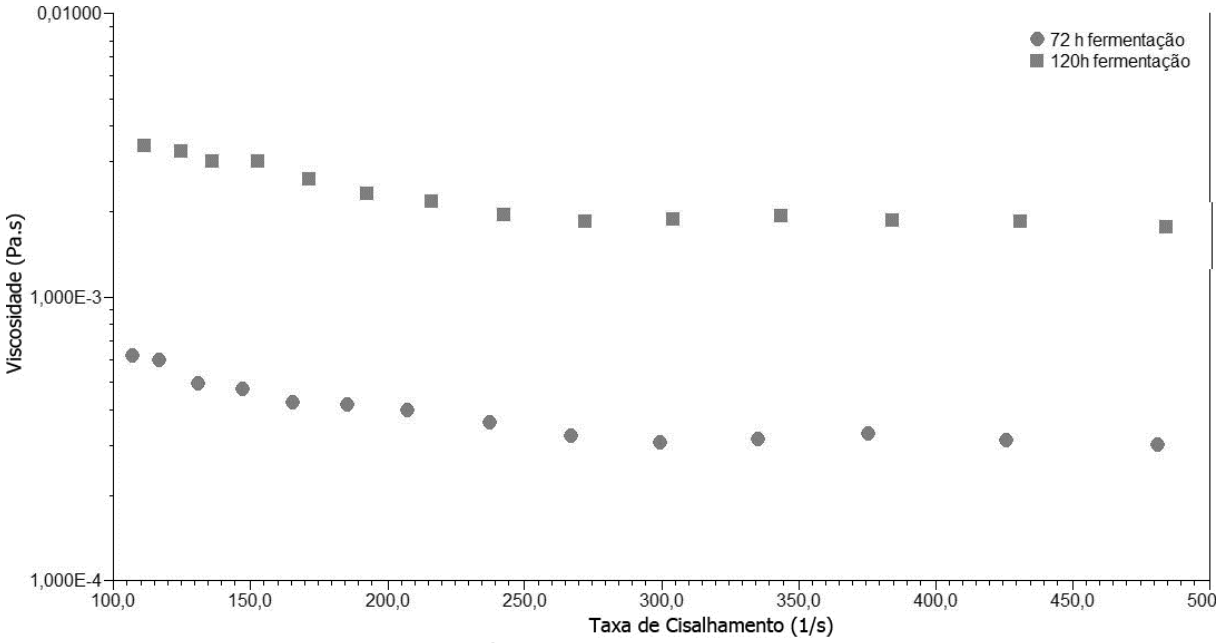


Figura 36. Comportamento viscosimétrico dos caldos fermentados pela linhagem *A. pullulans* IOC 3011, em biorreator de bancada (*Advanced Rheometer* 2000, 25ºC).

Roukas e Mantzouridou, em 2001, estudaram a viscosidade aparente do mosto fermentado sem separação de células ao longo de 215 h em biorreator. Notaram que, nas taxas de aeração de 1, 2 e 3 vvm, as viscosidades aumentaram até 120, 144 e 168 h, respectivamente, e depois decresceram. De acordo com os autores, este aumento pode estar associado ao aumento da concentração de biomassa e polissacarídeo no decorrer do processo. A transferência de massa, ainda segundo os autores, aumentou nas primeiras 24 h de fermentação e depois decresceu até quando a viscosidade máxima foi observada, o que indica correlação entre o aumento de viscosidade com a redução de transferência de massa. Ainda segundo eles, o aumento das concentrações de biomassa e de polissacarídeos dificultam a transferência de oxigênio e a homogeneização do mosto, o que pode ser solucionado com o aumento da taxa de aeração de 1 para 3 vvm.

O acima exposto, pode ser uma explicação para o teor muito baixo de oxigênio após 72 h de processo (Figura 35). Portanto, o aumento da taxa de aeração, bem como a velocidade de agitação, poderia permitir o aumento da disponibilidade do oxigênio, incrementando a produção. Entretanto, o efeito das forças de cisalhamento sobre as células teria que ser verificado, visto que outros trabalhos demonstraram que seu aumento pode inibir a síntese de biopolímero (WECKER; ONKEN, 1991; ROUKAS; MANTZOURIDOU, 2001).

5.4.1.1. Caracterização do biopolímero obtido em biorreator

- **TGA**

A análise térmica dos biopolímeros recuperados, obtidos pela fermentação de açúcar cristal (30 g/L) e LRC (8 g/L) em biorreator de bancada de 2 L (1 vvm e 300 rpm), para tempos de 72 h (item 5.4) e 120 h (item 5.4.1) estão ilustrados na Figura 37. Deve-se mencionar que apenas o biopolímero de 120 h (Figura 37B) foi tratado por ressolubilização e filtração.

Comparativamente ao ensaio conduzido em frascos em mesa agitadora (Figura 25), as amostras de biopolímero obtidas a partir da fermentação em biorreator apresentaram perfis termogravimétricos semelhantes, o que mostra que a qualidade

do biopolímero não foi alterada quando sua produção foi conduzida em maior escala, embora não se tenha conseguido atingir a mesma quantidade produzida.

A curva de TGA na figura mostra que inicialmente, as amostras de ambos os tempos (72 e 120 h), sofrem perda de massa, até por volta de 160°C, o que corresponde à desidratação das amostras. Constantin e colaboradores (2011) também identificaram a presença de água em amostra de pululana pura e na amostra por eles analisada.

A seguir, nota-se um estágio de degradação, indicativo de decomposição do biopolímero, tanto para a amostra de 72 h quanto a de 120 h. No caso da amostra de 72 h de fermentação (Figura 37 A), a degradação teve início em 263,3°C e final em 350°C. Comportamento diferenciado foi evidenciado para a amostra de 120 h de fermentação (Figura 37 B), já que a degradação teve início em 255°C, embora a temperatura final de degradação tenha sido igual. A redução da temperatura inicial de degradação indica uma pequena diminuição de resistência térmica da pululana.

Hussain e colaboradores (2013) analisaram uma pululana comercial quanto à estabilidade térmica. Foram determinadas temperaturas de decomposição inicial e final de 278°C e 371°C, respectivamente. Ambos os valores são superiores aos observados para as amostras de biopolímero resultantes da fermentação em biorreator, objeto deste estudo. Por outro lado, se comparadas com a amostra de pululana avaliada por Prasad e colaboradores (2008), cuja temperatura de degradação inicial foi de 209°C, as amostras do presente estudo apresentam maior resistência térmica. A variação nas temperaturas de degradação, inicial e final, está associada à massa molar da amostra, à presença de agregados e de contaminantes (orgânicos e/ou inorgânicos). Obviamente, as amostras deste trabalho, ainda contêm bastante impurezas, principalmente porque o meio contém vários elementos químicos decorrentes do emprego da LRC.

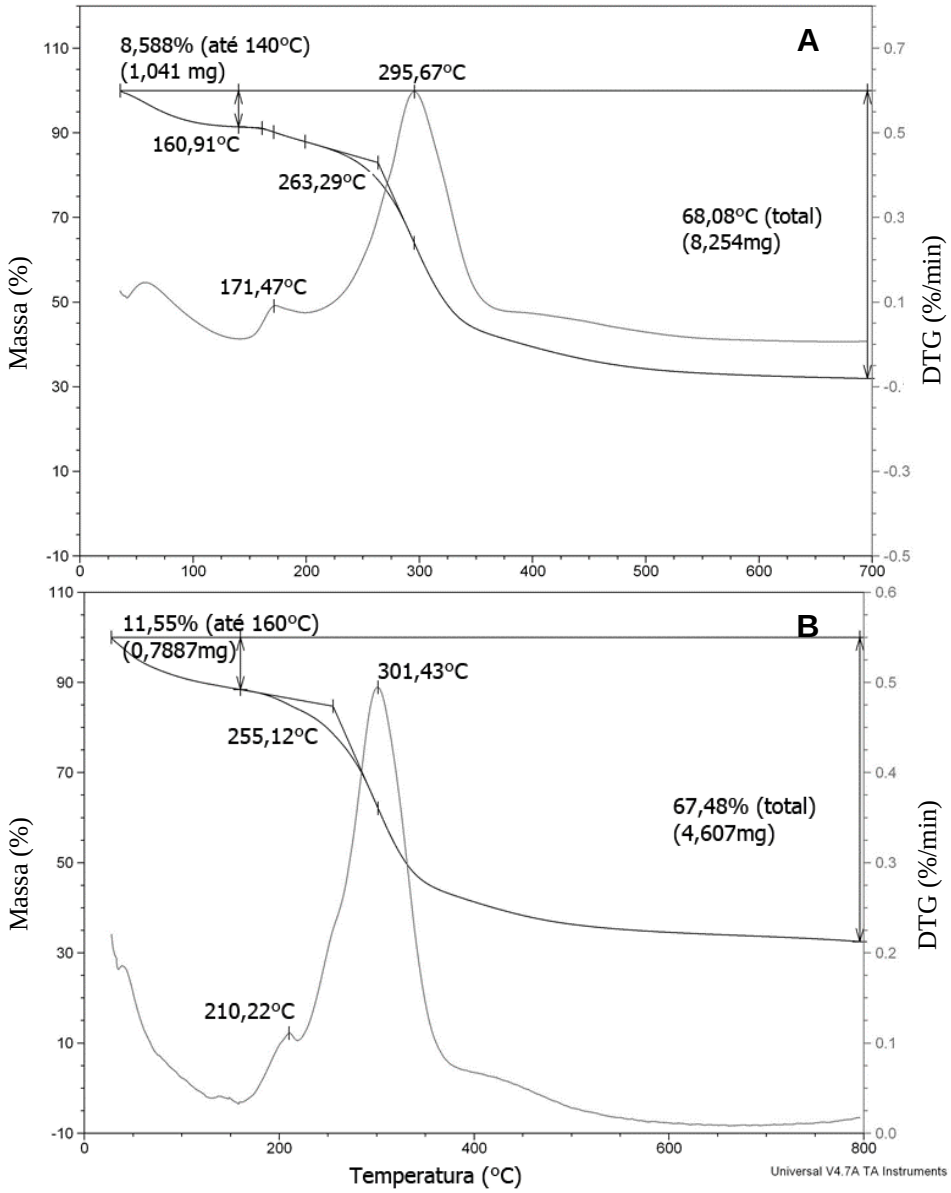


Figura 37. Curvas de Termogravimetria (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG) até 700ºC, com velocidade de aquecimento de 10ºC/min, em atmosfera de nitrogênio, da amostra obtida em biorreator utilizando 1,0 vvm e 300 rpm, para 72 h (A) e 120 h (B) de processo em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm).

Ainda analisando as curvas de TGA na Figura 37 (A e B), na temperatura de 700°C, nota-se que as duas amostras apresentaram 32% de resíduos, compostos por cinzas. Portanto, a ressolubilização acompanhada de filtração, realizada apenas na amostra de 120 h, não foi eficiente na redução de elementos inorgânicos, demonstrando a necessidade de uma etapa adicional de purificação. A presença de 24% de resíduos em amostra de pululana comercial também foi constatada por Constantin e colaboradores (2011).

Pela análise das curvas de DTG (Figura 37 A e B), onde o pico indica a velocidade máxima de decomposição, têm-se temperaturas relativas de aproximadamente 296 e 301°C para as amostras de 72 e 120 h, respectivamente. Constantin e colaboradores (2011) observaram ser a temperatura de 288°C referente à velocidade máxima de degradação para pululana padrão.

Pela análise da curva de DTG, podem ser observados ainda picos de DTG em 171,5 e 210°C para os tempos de 72 e 120 h, respectivamente. O estudo de Sugumaran e colaboradores (2014) revela decomposição semelhante pela análise termogravimétrica de pululana pura, com velocidade máxima de degradação em aproximadamente 180°C. Contudo os autores não comentam o ocorrido. A decomposição pode estar associada à presença de oligossacarídeos, ou mesmo, de contaminantes, como oligômeros de pululana, microagregados glicídicos ou proteínas de baixa massa molar.

- **Elementos inorgânicos**

A fonte de nitrogênio estudada neste trabalho (LRC) foi avaliada quanto a composição dos elementos inorgânicos e apresentou, cobre, potássio, ferro, manganês, zinco, cálcio e molibdênio.

As cinzas geradas quando da análise térmica da amostra de pululana produzida em biorreator foram analisadas para caracterização dos elementos inorgânicos e determinação dos respectivos teores (Tabela 20).

Tabela 20. Análise de elementos inorgânicos da amostra de biopolímero obtida em biorreator

Material	**Concentração (%)**							
	Na	**Mg**	**Al**	**Si**	**P**	**S**	**K**	**Ca**
Biopolímero	0,76	0,5	0,23	0,14	3,25	0,14	2,8	0,23

As presenças de sódio, magnésio, fósforo, enxofre e potássio estão associadas à composição química do meio basal (Tabela 9). Os elementos magnésio e potássio estão presentes não só no meio basal, mas também na LRC, fonte de nitrogênio constituinte do meio de produção, enquanto que o cálcio está presente apenas na LRC.

A cana contém cerca de 80% de água e de 20% de sólidos dos quais, quase da metade são sólidos solúveis e fibras. Considerando a composição do açúcar, composto por material orgânico, essencialmente sacarose (aprox. 80%), glicose e frutose, sais de ácidos inorgânicos e orgânicos, proteínas, amido, goma, ceras e gorduras, a presença de metais pesados não é comum. Os principais sais inorgânicos são cloretos e sulfatos de potássio, cálcio e magnésio. O conteúdo de metais em cana de açúcar é variável e dependente da região de cultivo. Quanto maior for o número de processos envolvidos no tratamento para refino, menor será a quantidade de metais encontrados no açúcar.

A presença de alumínio e silício pode ser devida a sua presença como contaminante no açúcar cristal. Segundo a Usina Alto Alegre (2014), o açúcar cristal apresenta sacarose (aprox. 99,6 %); sais minerais (aprox. 0,10 %); umidade (aprox. 0,07 %); outros componentes 0,23 % e suas cinzas podem apresentar sais de cálcio, magnésio, ferro, silício, entre outros. Estes sais estão presentes no caldo de cana original e são também incorporados a ele pelo processo industrial, principalmente pelo contato com partes metálicas que compõem a fábrica e pela adição de leite de cal. Ainda segundo a Usina Alto Alegre, podem apresentar como contaminantes: antimônio, arsênio, cádmio, cobre, chumbo, cromo, estanho, mercúrio, níquel, selênio e zinco.

O emprego de silício na agricultura promove o fortalecimento da parede celular das folhas e dos caules, aumentando a área de exposição ao sol, o que resulta em mais fotossíntese e menos ataque de pragas, e deixa as plantas mais eretas (FILGUEIRAS, 2007). Tem um papel importante nas relações planta-ambiente, conferindo à cultura condições para suportar variações climáticas, e biológicas, além de favorecer o aumento de produção com melhor qualidade do produto. Por isso, seu emprego na agricultura.

No caso do alumínio, os possíveis focos de contaminação podem ser o tipo de solo onde a cana-de-açúcar foi cultivada ou em decorrência do seu processamento, resultado de más práticas de fabricação ou do desgaste de equipamentos.

Não foi encontrada nenhuma informação para o açúcar cristal da marca União quanto à sua composição. Logo, considerando a presença de elementos contaminantes na principal fonte de carbono e energia empregada na formulação do meio de produção, deve-se estudar mais detalhadamente a sua composição química, o que pode estar influenciando negativamente a produção, ou pelo menos para redução de custos.

- **FTIR**

A Figura 38 (A e B) apresenta os espectros FTIR dos biopolímeros obtidos a partir da fermentação em biorreator (1 vvm e 300 rpm) para tempos de 72 e 120 h, respectivamente.

Assim como observado através das curvas de TGA/DTG, os perfis de FTIR dos biopolímeros foram muito semelhantes aos obtidos para os biopolímeros produzidos em frascos agitados (Figura 26), o que sugere que as ligações presentes no biopolímero foram preservadas, bem como a sua qualidade.

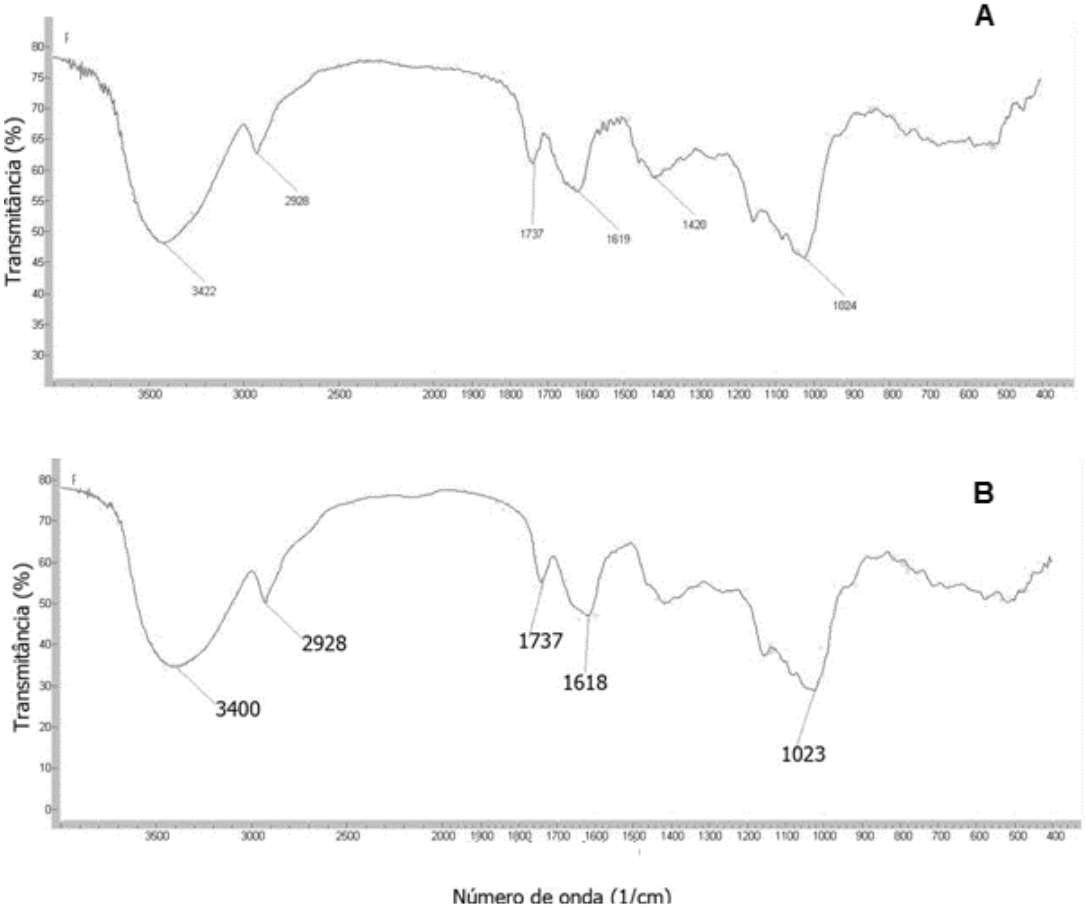


Figura 38. Espectros na região do infravermelho de amostras de biopolímero recuperado de mosto fermentado em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em 72 h (A) e 120 h (B) de processo.

Nota-se uma forte absorção em 3400 cm^{-1}, indicativa de que os dois biopolímeros possuem unidades de repetição de O-H, como a presente em açúcares. As ligações entre os grupamentos O-H são muito fortes, o que leva a uma menor vibração das moléculas, resultando na formação de uma banda larga quando as amostras são analisadas em infravermelho (FREIXO *et al*., 2002). Também é evidente, a presença de outra forte absorção em 2928 cm^{-1}, indicativa de uma ligação sp^3 no C-H de componentes alcanos existentes. O pico em 1737 cm^{-1} está associado ao estiramento vibracional de grupos carboxílicos (deformação axial de C=O de acetato), o que sugere a presença de pequena quantidade de grupos carboxílicos, os quais podem ter se originado da presença de *debris* celulares. A absorção em 1618 cm^{-1} corresponde à água. E, por fim, o pico de absorção em 1023 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-O.

As áreas de absorbância presentes nas amostras de biopolímero em análise se assemelham às encontradas por outros autores, o que indica a possibilidade de tratarem-se de pululana (SEO *et al.,* 2004; SINGH; SAINI, KENNEDY, 2008; GNIEWOSZ; DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2008; THIRUMAVALAVAN; MANIKKADAN; DHANASEKAR, 2009, SUGUMARAN *et al.,* 2013, ZHU *et al*., 2013).

- **RMN**

O biopolímero obtido em biorreator também foi analisado por RMN ^{13}C. Esta análise permite dar maior suporte à interpretação do espectro de FTIR, uma vez que a avaliação das vibrações de moléculas complexas por FTIR nem sempre fornece dados elucidativos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). A análise de RMN ^{13}C só foi feita para o material obtido em biorreator para tempo de fermentação de 120 h, considerando que as análises de FTIR e TGA mostraram similaridade entre as duas amostras.

Na Figura 39 A, que apresenta a estrutura do biopolímero definida por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C), evidencia-se a presença de 20 sinais intensos, 18 característicos dos carbonos C-1 e C-6, correspondentes a três unidades de repetição do polissacarídeo e 2 não relativos ao polissacarídeo. Estes sinais foram correlacionados por comparação com dados de RMN ^{13}C de pululanas publicados anteriormente (YOUSSEF; ROUKAS; BILIADERIS,1999; GLINEL *et al*., 2000; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2009; SUGUMARAN *et al*, 2013).

Em 90 a 110 ppm, região do carbono anomérico, observa-se três sinais (100,9; 100,4 e 98,6 ppm) que foram atribuídos aos carbonos C-1 das unidades A (α-D-glicose (1$\rightarrow$6)), B (α-D-glicose (1$\rightarrow$4) vizinho a unidade (α-D-glicose (1$\rightarrow$6)) e C (α-D-glicose (1$\rightarrow$4) vizinha a outra unidade (α-D-glicose (1$\rightarrow$4). As unidades A, B e C estão ilustradas na Figura 27.

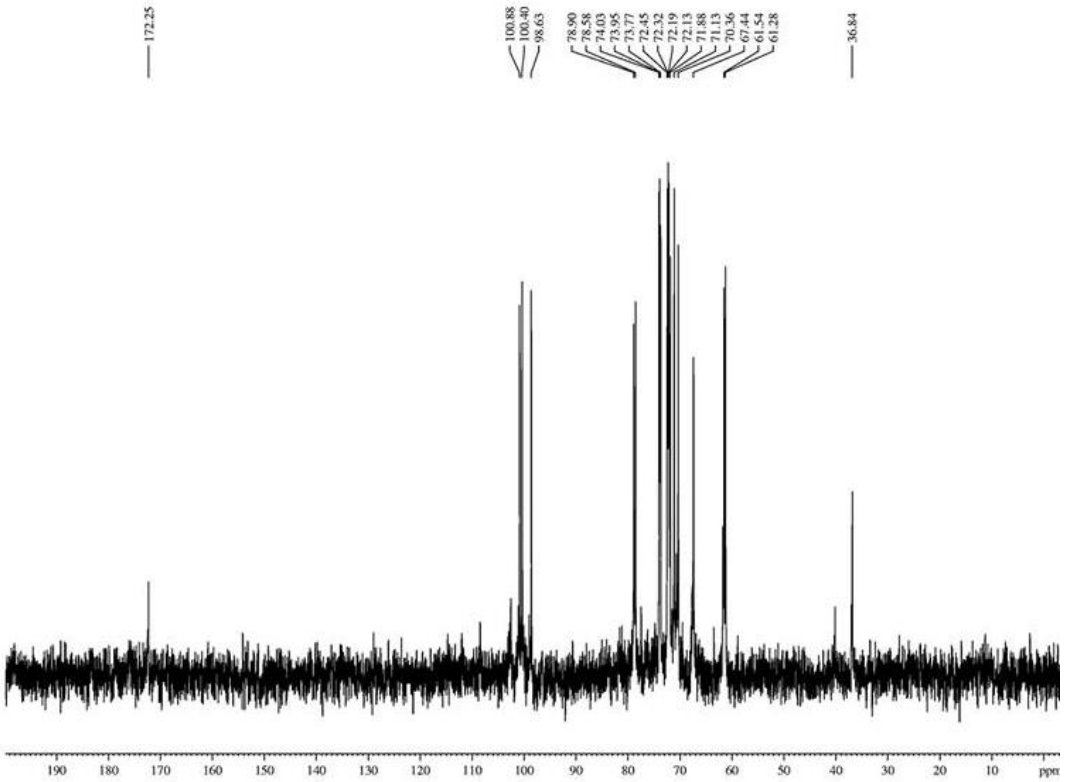


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C em espectrômetro Fourier transform Bruker Avance DRX a 125 MHz da amostra de biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011.

Os sinais na região de 78 a 79 ppm se referem aos C-4 envolvidos na ligação glicosídica das unidades B e C (Figura 27). O C-4 da unidade A pode ser observado em 69,8 ppm.

A partir do espectro de RMN ^{13}C, pode-se concluir que o biopolímero isolado obtido nas condições estudadas nesse trabalho trata-se de pululana. Entretanto, a presença de picos em 172 e 38,8 ppm, característicos de proteína ou resíduos de aminoácidos provenientes da degradação proteica, indica que o biopolímero obtido em biorreator, após ser recuperado e parcialmente purificado (nova solubilização seguida de filtração em membrana com porosidade 0,45 µm), ainda apresentou resquícios de células (*debris* celulares), podendo estas serem provenientes do micro-organismo fermentador (*A. pullulans* IOC 3011) ou da fonte de nitrogênio (LRC). Isso indica que a etapa adotada para redução do pigmento no biopolímero não foi suficiente para a extração completa de *debris* celulares, sendo, portanto, necessária um estudo para definição de forma de tratamento mais adequado.

5.4.2. Avaliação da citotoxicidade do biopolímero produzido

Neste trabalho foi investigado o efeito citotóxico do biopolímero obtido em dispersão aquosa, comparativamente à pululana usada como referência (Sigma Aldrich) em células de neuroblastoma, com a finalidade avaliar a aplicabilidade do biopolímero produzido a partir da fermentação de resíduo industrial (LRC) pela linhagem IOC 3011.

A Figura 40 apresenta imagens referentes às análises de microscopia óptica para culturas de células de neuroblastoma de camundongo N2A após 24 h de exposição à: (A) água – controle de viabilidade celular; (B) 10% de Triton – controle de morte; (C) dispersão aquosa (50 mg/L) do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm), recuperado do mosto fermentado e parcialmente purificado; e (D) dispersão aquosa (50 mg/L) da pululana comercial, marca Sigma-Aldrich.

Na Figura 40 A pode ser observada a morfologia das células viáveis de neuroblastoma, planas e bem distribuídas, com pequena *lamellipodia* (estruturas em forma de leque), sugerindo a mobilidade celular. Morfologia bem diferenciada apresentaram as células após mortalidade induzida por tratamento com Triton (Figura 41 B). Neste caso, as células perderam sua forma típica, tornando-se redondas e de tamanho reduzido, acabando por se desprender da superfície de crescimento, características não observadas nas células controle, que se mantiveram aderentes à superfície de crescimento.

A análise comparativa das Figuras 40 A a D, deixa evidente a alta viabilidade das células quando mantidas por 24 h na presença das pululanas, comercial ou da produzida em biorreator. As células tratadas com os biopolímeros (Figura 40 C e D) não diferiram entre si, mesmo com o aumento gradual da concentração das pululanas.

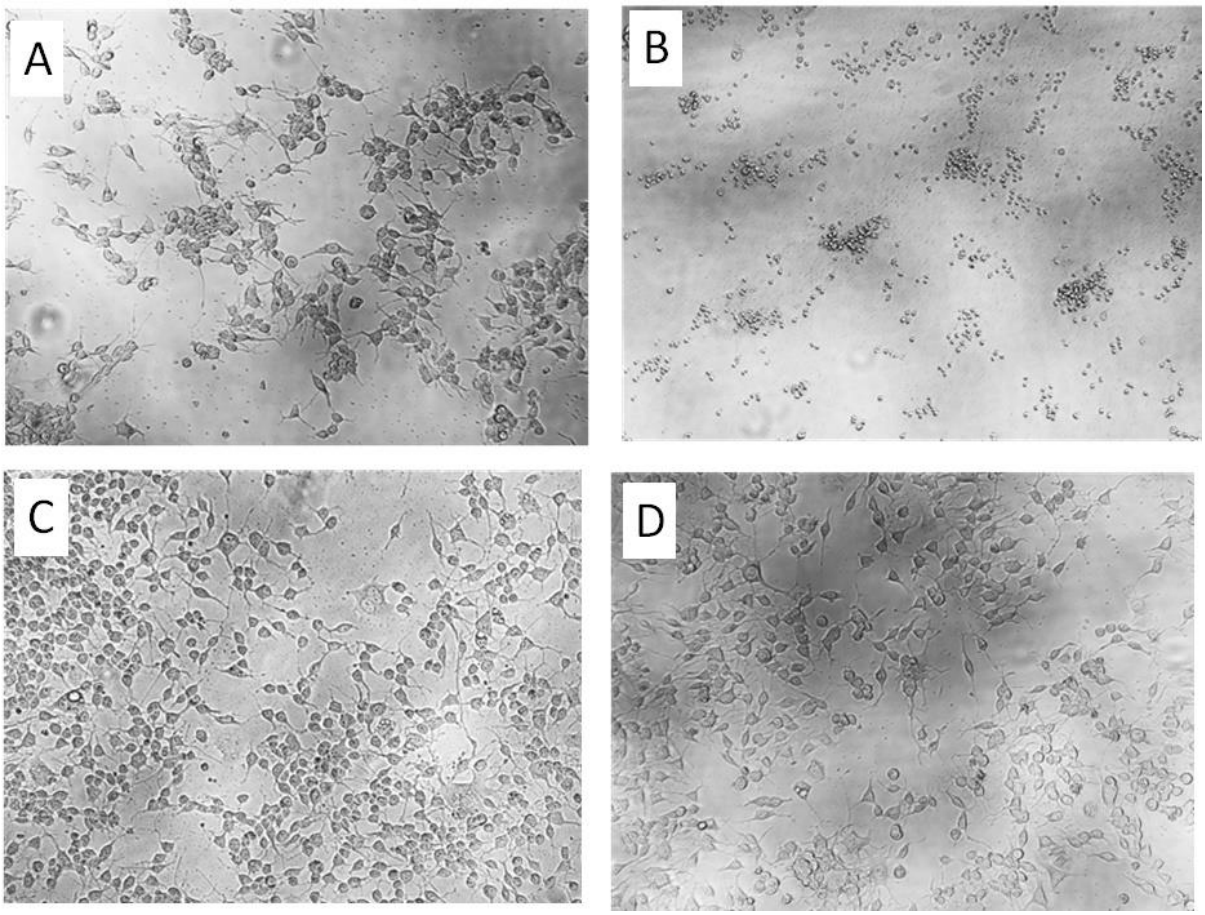


Figura 40. Resultados do exame microscópico óptico (aumento de 40x) da cultura de neuroblastoma de camundongo *in vitro* após 24 h de exposição à: A- água; B-10% de Triton; C- dispersão aquosa (50 mg/L) do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011; D- dispersão aquosa (50 mg/L) de pululana comercial Sigma-Aldrich.

Outro aspecto da resposta de citotoxicidade avaliado no presente estudo foi a viabilidade celular por ensaio do teste do MTT. A avaliação da viabilidade celular foi realizada frente aos produtos testados. A Figura 41 apresenta a leitura de absorbância em 590 nm do MTT, sendo que o valor de absorbância referente ao controle de vida (tratado com água) indica viabilidade de 100% das células.

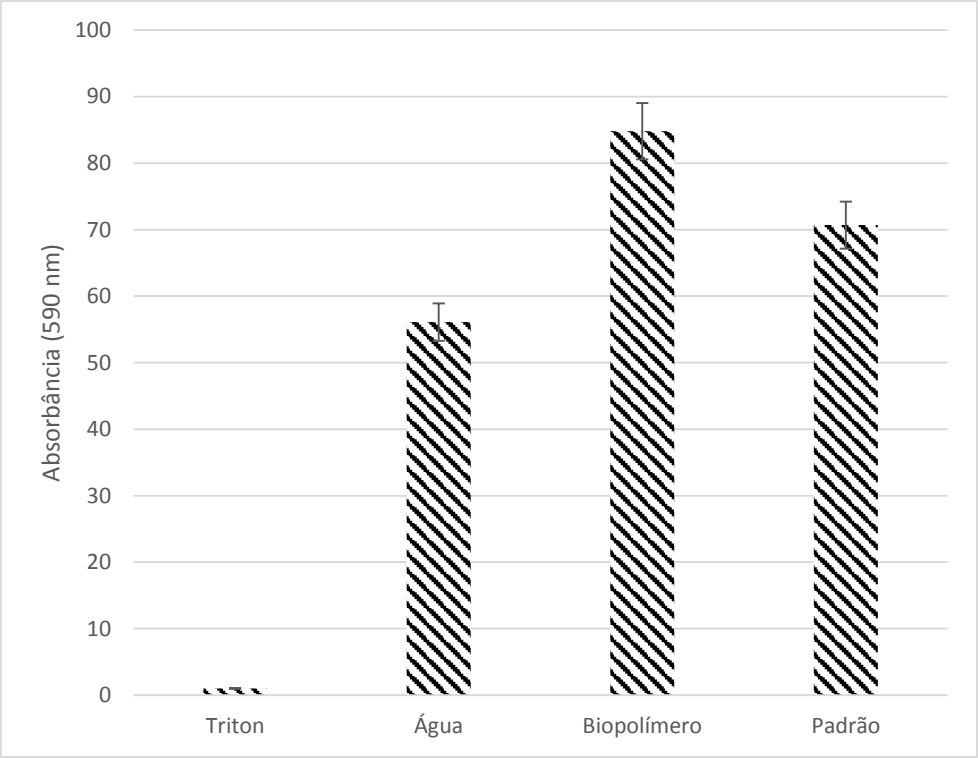


Figura 41. Viabilidade de células no teste MTT de citotoxicidade após tratamento com 10% de Triton; Água; Biopolímero [dispersão aquosa (50 mg/L) do biopolímero obtido em biorreator (1,0 vvm e 300 rpm) em meio contendo 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC por linhagem *A. pullulans* IOC 3011]; Padrão [dispersão aquosa (50 mg/L) de pululana comercial Sigma-Aldrich].

Observando a figura, os valores de 56,1 foi obtido para o grupo controle de viabilidade (tratado com água), o que equivale a 100% de células viáveis; 1,0 para grupo de controle de morte (tratado com Triton), o que equivale a 1,8% de células vivas; 70,7 para a pululana comercial (Padrão) – 126% de células viáveis – e 84,8 para o biopolímero obtido neste trabalho, equivalendo a 151% de células viáveis. Nota-se, quando comparado ao grupo controle, elevada absorbância para os grupos tratados com o biopolímero obtido e com o padrão, sugerindo que a quantidade de células viáveis nesses ensaios foi superior à do controle de viabilidade, indicando não apenas a ausência de citotoxicidade das amostras testadas, mas também a presença de algum componente que pode ter estimulado o aumento de células em relação aos demais grupos.

O fato das células terem mantido sua forma típica (Figura 40) e alta leitura de absorbância (Figura 41) era previsível para a pululana comercial, já que este biopolímero é considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe),* por suas

caracteristicas de não toxicidade e de elevada biodegradabilidade, por isso usado como aditivo alimentar.

Para o biopolímero em teste, a intenção era avaliar o efeito citotóxico por conta das impurezas relativas ao resíduo industrial usado como matéria-prima na produção, mesmo embora, seja oriundo de indústria de bebidas. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir ausência de toxicidade da pululana produzida para a cultura de neuroblastoma.

Os testes de citotoxicidade empregados demonstraram que os biopolímeros testados apresentaram viabilidade superior ao do controle positivo, indicando ausência de citotoxicidade a um nível que permite a sua aplicação experimental com segurança.

Na literatura especializada não foram encontrados trabalhos de citotoxicidade da pululana. Apenas publicações tratando da toxicidade de pululanas modificadas, como por exemplo: pululana modificada de forma catiônica (REKHA; SHARMA, 2009); anticorpos nanoconjugados pululana-histonas (REKHA *et al*., 2013); nanopartículas à base de pululana (DIONÍSIO *et al.,* 2013); conjugado pululana–polietileneimina (REKHA; SHARMA, 2014); pululana-protamina (PRIYA, REKHA, SHARMA, 2014) entre outros.

5.5. Considerações finais

De acordo com planejamento experimental realizado para definir as concentrações das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (LRC) para ensaios de bancada conduzidos em mesa agitadora, o ponto de máxima estimativa de rendimento de biopolímero, viscosidade e massa molar, está fora da região experimental (ponto de máximo global). A análise estatística indicou que utilizar valores de concentração de substratos inferiores a 30 g/L e de LRC superiores a 8 g/L gerariam valores de resposta superiores. Entretanto, para a continuidade desse trabalho, não seria interessante extrapolar esses valores para fora da região de experimentação. Isso se deve ao fato de que a estatística mostra uma tendência matemática, porém, para a produção, poderia não ser viável a utilização de uma concentração tão baixa de fonte de carbono para que ocorresse anabolismo (síntese

celular e de material polimérico), visto que a literatura utiliza valores superiores a 30 g/L, tendo, em sua maioria, utilizada concentração inicial de fonte de carbono igual a 50 g/L (WU *et al*., 2009; CHOUDHURY; SALUJA; PRASAD, 2011; WU; CHEN; PAN, 2012). Inclusive, alguns autores indicam a concentração de glicose e sacarose iniciais de 150 g/L, cinco vezes maior que a concentração proposta neste trabalho (DUAN; CHI; WANG, 2008; CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011; CHOUDHURY; SALUJA; PRASAD, 2011). Na literatura consultada, não foram encontrados valores que fossem inferiores a 30 g/L de substrato inicial. Adicionalmente, a utilização de concentrações muito altas de LRC admitiria a presença de muitos sólidos, que mesmo que não tivessem ação inibitória para a síntese de pululana, implicariam na necessidade de mais etapas de tratamento, deste modo, elevando os custos do processo.

É notória a similaridade entre as amostras de pululana de referência (comercial da marca Sigma Aldrich) no que concerne as análises de FTIR, TGA e RMN ^{13}C e a sintetizada pela linhagem *A. pullulans* IOC 3011 na condição selecionada no planejamento experimental, isto é, meio de produção consistindo de 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de LRC. Portanto, sugere-se ser exopolissacarídeo precipitado ser pululana.

Estranhamente, a produção de biopolímero em biorreator foi bem menor do que a obtida nos ensaios conduzidos em frascos agitados. Uma possível explicação está na mutação espontânea da linhagem. Isto porque, ao dar início aos ensaios em biorreator, a cultura estoque passou a apresentar diferente comportamento, mesmo quando cultivada em frascos agitados. Segundo Nelson (1992) a mutação de fungos pode ocorrer por subcultivos constantes em meios ricos em carboidratos.

As mutações gênicas causam alterações nos genes e, consequentemente nas proteínas, determinando, muitas vezes, a formação de novas proteínas ou alterando a ação de enzimas importantes no metabolismo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Alguns autores demonstraram que houve comprometimento no rendimento em pululana quando utilizadas linhagens mutantes de *A. pullulans* obtidas por indução utilizando agentes mutagênicos (TARABASZ-SZYMANSKA, 1993, TARBASZ-

SZYMANSKA; GALAS, 1993 *apud* KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003; YU *et al*., 2012).

Tentou-se recorrer à linhagem original, solicitando novo exemplar à Coleção de Cultura da Fiocruz. Porém, a linhagem cedida como *A. pullulans* IOC 3011, apresentava morfologia macroscópica diferenciada, característica do gênero *Aspergillus*. Por isso, e considerando a exiguidade de tempo para término deste estudo, deu-se sequência ao trabalho utilizando a linhagem que estava sendo mantida no laboratório da Escola de Química/UFRJ. Mesmo porque interessava determinar o efeito da combinação aeração e agitação, o que seria definido por análise comparativa.

É válido destacar que o valor máximo de taxa de aeração utilizado neste trabalho de 1 vvm não foi o mais indicado pela literatura, uma vez que Roukas e Mantzouridou (2001), Göksungur e colaboradores (2005) reportaram ser maior a produção quando utilizado 2,0 vvm, enquanto Cheng, Demirci e Catchmark (2011), que observaram maior produção em 1,5 vvm. Neste trabalho o fator limitante foi o próprio biorreator, que não permitiu trabalhar com taxa de aeração superior a 1,0 vvm.

Os resultados obtidos apontam para uso de açúcar cristal e do rejeito cervejeiro LRC para a produção de pululana que, apesar de conter percentual considerável de impurezas, se mostrou não citotóxico para células de neuroblastoma. Contudo, em face da baixa quantidade produzida em biorreator, deverão ser definidas as condições operacionais, prioritariamente, temperatura, aeração e agitação, para maximização da produção, antes de se efetuar a avaliação econômica do processo.

Considerando que não foi realizada a otimização das fontes de carbono e de nitrogênio em relação aos sais minerais presentes, portanto, existe a possibilidade de incrementar futuramente a produção de biopolímero e/ou sua qualidade a partir do cultivo microbiano em meio constituído de açúcar cristal e LRC.

Capítulo 6

Conclusões

6. CONCLUSÕES

6.1. Produção e obtenção de biopolímero

- Dentre as três linhagens de *A. pullulans* testadas, apenas a IOC 3011, foi capaz de crescer unicelularmente em meio contendo açúcar cristal e levedura residual de cervejaria; morfologia imperativa para a produção de biopolímero por esta espécie fúngica polimórfica.
- A pigmentação do biopolímero não está associada à presença de luz durante o processo de produção;
- Com a ressolubilização do biopolímero recuperado do mosto fermentado isento de células, seguido de filtração foi possível reduzir a pigmentação, sem alteração da sua qualidade do polissacarídeo, embora não tenha levado à redução dos elementos inorgânicos;
- A partir do planejamento experimental e, levando em consideração a análise técnica, foi possível selecionar as concentrações iniciais de açúcar cristal e de levedura residual de cervejaria (LRC) para a produção de biopolímero por *A. pullulans*, 30 g/L e 8 g/L, respectivamente, em ensaios em frascos agitados, apresentando produção de aproximadamente 12 g/L de biopolímero;
- Dentre as combinações de taxas de aeração e velocidades de agitação ensaiadas em biorreator, a maior quantidade de pululana (7,8 g/L) foi alcançada com 120 h, a 1 vvm e 300 rpm, respectivamente;

6.2. Caracterização do biopolímero

- A avaliação qualitativa do biopolímero produzido neste trabalho permitiu evidenciar a similaridade das estruturas do biopolímero recuperado com a pululana referência (Sigma-Aldrich).

6.3. Tratamento *in vitro*

- O biopolímero produzido não apresentou citotoxicidade/susceptibilidade para cultura de células de neuroblastoma de camundongo (N2A).

7. SUGESTÕES

- Estudar a utilização da LRC com prévia separação do material sólido, por diferentes procedimentos;
- Avaliar a necessidade de complementação ou subtração com íons inorgânicos para maximização da produção;
- Avaliar a citotoxicidade do biopolímero utilizando células Vero (células renais), referência para ensaios de morte, e células Hek (células provenientes de ovário de hamster).
- Avaliar a viabilidade econômica do processo;
- Não realizar qualquer etapa de tratamento do biopolímero e testá-lo em sistema de simulação para a recuperação de petróleo de poços;
- Avaliar etapas de purificação para redução das impurezas aplicação em micro-encapsulamento de fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R. OLAMA, Z. A. L-Asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, 38: 115-122. 2002.

ABDEL-FATTAH, Y. R. Optimization of thermostable lipase from at hermophilic *Geobacillus* sp. Using Box-Behnken experimental design. **Biotechnology Letters**, 38: 1217-1222. 2002.

ABDEL-FATTAH, Y. R. SAEED, H. M. GOHAR, Y. M. EL-BAZ, M. A. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Process Biochemistry**, 40: 1707-1714. 2005.

ABIPLAST. O plástico é o futuro - **Radar Industrial**. 2012. Disponível em: <http://file.abiplast.org.br/Plastinforma/Plastinforma2012/Plastinforma%20Semanal%2019a2303.pdf> Acesso em: 12 jan. 2014.

ALBAN, S., SCHAUERTE, A., FRANZ G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, 47:267–76. 2002.

ALLAN, G. G. BIKALES, N. BROWN, J. CAMPBELL, R. CLEMENTS, D. DOI, Y. EYRING, G. BARRINGTON, T. HIRSCHORN, J. JENSEN, D. KAPLAN, D. **Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper**, OTA-BP-E-102 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office). 1993.

ALMEIDA, M. P. COSTA, U. M. S. Exemplo de Histerese com um Sistema de Massa-Mola. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, 22: 49-53. 2000.

AMASS, W. AMASS, A. TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polyesters and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, 47: 89-144. 1998.

ANTUNES, A. E. C. **Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni em meios convencionais e alternativos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2000.

AUER, D. P. F. SEVIOUR, R. J. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by Aureobasidium pullulans in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 32: 637-644. 1990.

AUGUSTIN, J. KUNIAK, L. HUDECOVÁ, D. Screening of yeasts and yeast-like organisms *Aureobasidium pullulans* for pullulan production. **Biologia**, 52: 399–404. 1997.

BADR-ELDIN, S. M., EL-TAYEB, O. M., EL-MASRY, H. G., MOHAMMAD, F. H. A. ABD EL-RAHMAN, O. A., Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10, 423-426, 1994.

BAE, H. AHARI, F. A. SHIN, H. NICHOL, W. J. HUTSON, B. C. MASAELI, M. KIM, S. H. AUBIN, H. YAMANLAR, S. KHADEMHOSSEINI, A. Cell-laden microengineered pullulan methacylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation. **Soft Matter**, 7: 1903–1911. 2011.

BARBOSA, A. M. CUNHA, P. D. MAGRINI, M. CORRADI DA SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 25: 29-42. 2004.

BARNETT, C. SMITH, A. SCANLON, B. ISRAILIDES, C. J. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. **Carbohydrate Polymers**, 38: 203–209. 1999.

BARROS-NETO, B. SCARMÍNIO, I. BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, Editora Unicamp, Campinas, Brasil, p. 299. 1995.

BARROS-NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas, Unicamp, 2001.

BATAILLE, I. MEDDAHI-PELLE, A. VISAGE, C. L. LETOURNEUR, D. CHAUBET, F. In **Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Application**; Valentin Popa, Ed. iSmithers Rapra Publishing, Chapter 4, p 145. 2011.

BATHISTA, A. L. B. SILVA, E. O. **Conhecendo materiais poliméricos**. Universidade Federal de Mato Grosso Instituto de Ciências Exatas e da Terra. 2003. Disponível em <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/ea000223.pdf> Acessado em: 12 jan. de 2012.

BATTISTI, M. V. CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α-quitina e quitosanas de cascas de Macrobrachium rosembergii. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. **Química Nova**. v1. nº 8. São Carlos, São Paulo. 2008.

BELL, A. A. WHEELER, M. H. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. **Annual Review of Phytopathology**, 24: 411- 451, 1986.

BENDER, H. LEHMANN, J. WALLENFELS, K. Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 36: 309–316. 1959.

BENÍCIO, B. N. SCARMINIO, I. S. BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Editora da Unicamp, São Paulo, 2001.

BENITES, E. S. MENDONÇA, C. E. SCHAEFER, G. R. MANTIN-NETO L. Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo e de um Podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no Infravermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 23: 543–551. 1999.

BERWANGER, A. L. S. DOMINGUES, N. M. VANZO, L. T. V. DI LUCCIO, M. TREICHEL, H. TREICHEL, PADILHA, F. F., SCAMPARINI, A. R. P. Production and rheological characterization of biopolymer of *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 using conventional and industrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 132: 942-950. 2006.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e Caracterização de biopolímero sintetizado por *Shingomonas capsulata***. Dissertação (Mestrado) Engenharia de Alimentos Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 2005.

BOA, J. M. LEDUY, A. Peat hydrolysate medium optimization for pullulan production. **Applied and Environmental Microbiology,** 48: 26-30. 1984.

BOA, J. M. LEDUY, A. Pullulan from peat hydrolysate fermentation kinetics. Biotechnology and Bioengineering, 30: 463-470. 1987.

BOBBIO, F. O. BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimento**. 2ª ed. São Paulo, Livraria Varela. 1992a.

BOBBIO, P. A. BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos à Química de Alimentos**. Livraria Varela, São Paulo. 1992b.

BORGES, A. P. B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção**, 112f. Tese de Doutorado - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1998.

BORGES, C. D. MOREIRA, A. N. MOREIRA, A. S. DEL PINO, F. A. B. VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por Beijerinckia sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24: 327-332. 2004.

BORSCHIVER, S. ALMEIDA, L. F. M. ROITMAN, T. Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 18: 256-261. 2008.

BOUVENG, H. O. KIESSLING, H. LINDBERG, B. MCKAY, J. Polysaccharide elaborated by *Pullulanaria pullulans*. II. The partial acid hydrolysis of the neutral glucan synthesized from sucrose solutions. **Acta Chemica Scandinavica**, 17: 797–800. 1963.

BOX, G. E. P. HUNTER, W. G. HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**, NY, USA, 1978.

BREEDVELD, M. W. ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. CANTER CREMERS, H. C. J. ZEHNDER, A. J. B. Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. Antoine van Leewenhoek. v. 64, p. 1-8, 1993.

BREIEROVA, E, VAJCZIKOVA, I, SASINKOVA, V, STRATILOVA, E, FISERA M, GREGOR T, SAJBIDOR J. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. Z **Naturforsch**, 57:634–639. 2002.

BREITMAIER, E. VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy**, Publishers, V. New York. 1990.

BRETAS, R. S. A reologia dos polímeros para leigos e iniciados. **Plástico Moderno**, 176: 28-35. 1987.

BUENO, F. L. PEREIRA, A. R. B. DIAS, A. L. T. Efeito da Radiação Ultravioleta (UVC) sobre a Produção da Enzima Lacase em isolados clínicos e ambientais de CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS **16° Simpósio Internacional de Iniciação Científica**, 2008.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência do tempo de fermentação e presença de sais na reologia do caldo de fermentação de uma bactéria do gênero *Pseudomonas* isolada do solo. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17, Fortaleza. Livro de Resumos, p.9-47. 2000.

BUMBU, G. G. VASILE, C. CHITANU, G. C. CARPOV, A. On the Compatibility of Polysaccharide/Maleic Copolymer Blends. II. Thermal Behavior of Pullulan-Containing Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, 86: 1782–1791. 2002.

CADE, D. SCOTT, R. HE, X. **Pullulan film compositions**. Pat. No. EP 1072633 A1. 2001.

CALADO, V. MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos utilizando o Statistica***, E-papers* Serviços Editoriais Ltda. 2003.

CAMPANA-FILHO, S. P. BRITTO, D. CURTI, E. ABREU, F. R. CARDOSO, M. B. BATTISTI, M. V. SIM, P. C. GOY, R. C. SIGNINI, R. LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α- E β-quitina. **Química Nova**, 30: 644-650. 2007.

CAMPBELL, B. S. SIDDIQUE, A-B. M. MCDOUGALL, B. M. SEVIOUR, R.J. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production? **FEMS Microbiology Letters**, 232: 225-228. 2004.

CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo i e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE. 2009.

CANDAU, F. REGALADO, E. J. SELB, J. Scaling Behavior of the Zero Shear Viscosity of Hydrophobically Modified Poly(acrylamide)s. **Macromolecules**, 31, p.5550. 1998.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber. 2004.

CANILHA, L. SILVA, D. D. V. CARVALHO, W. MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa, Parte 3: Polissacarídeos e Enzimas. **Revista Analítica**, São Paulo, 20: 32-41. 2006.

CATLEY, B. J., MCDOWELL, W. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Research**, 103: 65–75. 1982.

CAZETTA, M. L. CELLIGOI, M. A. P. C. BUZATO, J. B. SCARMINO, I. S. da SILVA, R. S. F. Optimização study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry**, 40: 747-751. 2005.

CERETTA, C. A. BAYER, C. DICK, D. P. MARTIN-NETO, L. COLNAGO, L. A. **Métodos espectroscópicos**, In: SANTOS, G. A. CAMARGO, F. A. O. eds. *Fundamentos da matéria orgânica do solo. Porto Alegre*, Gêneses, 293-336. 1999.

CHANDRA, R. R. RUSTGI. Preparation and characterisation of ethylcellulose microparticles. **Progress in Polymer Science**, 23: 1273-335. 1998.

CHANG, Y. H. **The effect of light on the production of the fungal extracellular polysaccharide by *Aureobasidium pullulans***. Dissertação (mestrado), Taoyen, Taiwan. 2009.

CHAVES, N. A. **Produção e Caracterização do exopolissacarídeo sintetizado por *Rhizobium tropici* CIAT 899**, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS. 2000.

CHENG, K. C. DEMIRCI, A. CATCHMARK, J. M. PURI, V. M. Effects of initial ammonium ion concentration on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* and its modeling. **Journal of Food Engineering**, 103:115–122. 2011.

CHENG, K. C. DEMIRCI, A. CATCHMARK, J. M. PURI, V. M. Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans* **Journal of Food Engineering**, 98: 353-359. 2010.

CHENG, K-. DEMIRCI, A. CATCHMARK, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, 92:29–44. 2011.

CHEREMISINOFF, N. P. **An Introduction to Polymer rheology and Processing**, USA C Press, v. 280. 1992.

CHI, Z. WANG, F. CHI, Z. YUE, L. L. G. ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 82: 793. 2009.

CHI, Z. ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology***,* 33: 206–211. 2003.

CHOUDHURY, A. R. SALUJA, P. PRASAD, G. S. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. **Carbohydrate Polymers**, 83: 1547–1552. 2011.

CHRISMAN, E. C. A. N. **Estudo de Desenvolvimento de Processos Orgânicos em Escala de Bancada**. Material Didático. EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

CHRISTENSEN, B. E. KJOSBAKKEN, J. SMIDSRØD, O. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. **Applied and Environmental Microbiology**, 50: 837–845. 1985.

CONSTANTINA, M. MIHALCEAA, I. OANEAA, I. HARABAGIUA, V. FUNDUEANUA, G. Studies on graft copolymerization of 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride on pullulan. **Carbohydrate Polymers**, 84: 926–932. 2011.

CORRADI DA SILVA, M. L. MARTINEZ, P. F. IZELI, N. L. SILVA, I. R. VASCONCELOS, A. F. D. CARDOSO, M. S. STELUTTI, R. M. GIESE, E. C. BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas*.* **Química Nova**, 29: 85-92. 2006.

CROGUENNOC, P. MEUNIER, V. DURAND, D. NICOLAI, T. Characterization of semi-dilute Nicolai, T. Characterization of semi-dilute. **Macromolecules**, v. 33, n.20, p.7471-7474, 2000.

CUNHA, P. D. T. **Produção de exopolissacarídeos fúngicos e suas aplicações**. Monografia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2002.

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

DAIS, P. In Fifth **International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules**; THEOPHANIDES, T. ANASTASSOPOULO J. FOTOPOULOS N. Eds. Kluwer, Dordrecht, p 217. 1995.

DAIS, P. VLACHOU, S. TARAVEL, F. **(13)C nuclear magnetic relaxation study of segmental dynamics of the heteropolysaccharide pullulan in dilute solutions. Biomacromolecules**, 2, 1137. 2001.

DIAB, BILIADERIS, T. C. G GERASOPOULOS, D. SFAKIOTAKIS, E. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81: 988-1000. 2001.

DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2002.

DIAZ, P. S. VENDRUSCOLO, C. T. VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. *Semina:* **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 25: 15-28. 2004.

DIONÍSIO, M. CORDEIRO, C. REMUÑÁN-LÓPEZ, C. SEIJO, B. COSTA, A. M. R. GRENHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Volume 50, Issue 1, 27, Pages 102-113, 2013.

DOERING, T. L. NOSANCHUKI, J.D. ROBERTS, W.K. CASADEVALL. Melanin as a potencial cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical Mycology**, v.37, n.3, p.175-181, 1999.

DUAN, X. CHI, Z. WANG, L. WANG, X. Influence of different sugars on pullulan production and activities of a-phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68 **Carbohydrate Polymers***,*73: 587–593. 2008.

FARRIS, S. INTROZZI, L. FUENTES-ALVENTOSA, J. M. SANTO, N. ROCCA, R. PIERGIOVANNI, L. Self-Assembled Pullulan–Silica Oxygen Barrier Hybrid Coatings for Food Packaging Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 782. 2012.

FARRIS, S. UNALAN, I. U. INTROZZI, L. FUENTES-ALVENTOSA, J. M. COZZOLINO, C. A. Pullulan-based films and coatings for food packaging: present applications, emerging opportunities, and future challenges. **Journal of Applied Polymer Science**, 40539- 40539, 2014.

FDA. Agency Response Letter: **GRAS Notice**, No. GRN 000099 [Pullulan]. 2002.

FILGUEIRAS, O. Silício na agricultura. **Pesquisa FAPESP**, 140: 72-74. 2007.

FOGARTY, R. V., TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**, 19: 311-7. 1996.

FORABOSCO, A. BRUNO, G. SPARAPANO, L. LIUT, G. MARINO, D. DELBEN, F. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*—I. Production and characterisation of the exopolysaccharides. Carbohydrate. **Polymers**, 63: 535–544. 2006.

FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes linhagens de *Xhantomonas campestris* em meios modificados**, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2003.

FREIXO, A. A. MACHADO, P. L. O. A. SANTOS, H. P. SILVA, C. A. FADIGAS, F. P. **Soil Tillage And Research**, 64: 221-230. 2002.

FUENTES-ALVENTOSA, J. M. INTROZZI, L. SANTO, N. CERRI, G. BRUNDU, A. FARRIS, S. Self-assembled nanostructured biohybrid coatings by an integrated 'sol-gel – intercalation' approach. ***RSC Advances***, 3: 25086-25096. 2013.

FUFENG-GROUP. **Industry Outlook**. 2011. Disponível em: <http://www.fufeng-group.com/uploads/soft/121205/1-121205151512.pdf> Acesso em: 15 nov. 2013.

GADD, G. M. Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi* **Transactions of the British. Mycological Society**, Volume 78, Issue 1, Pages 115–122. 1982.

GAIDHANI, H. K. MCNEIL, B. NI, X. Fermentation of pullulan using an oscillatory baffled fermenter. **Chemical Engineering Research and Design**, 83: 640–645. 2008.

GAMBETTA, R**. Análise teórica e experimental da curva de distribuição de massas molares do poli((r)-3-hidróxi-butirato) produzido pela bactéria *Alcaligenes latus***, Tese apresentada à COPPE/UFRJ. 2006.

GARCIA-OCHOA, F. SANTOS, V. E. CASA, A. GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, New York, v.18, p.549-579, 2000.

GARGALLO, L. G. RADIC, D. F. ABUIN, E. S. LISSI, E. G. Propriedades Hidrodinâmicas. **Macromoléculas en solución**, Santiago, PNUD-UNESCO (CHI-84/006), cap. IV, p. 92-106. 1987.

GAUR, R. SINGH, R. TIWARI, S. YADAV, S. K. DARAMWAL, N. S. Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for a novel pullulan-producing fungus, *Eurotium chevalieri*. **Journal of Applied Microbiology**, 109: 1035–1043. 2010.

GIBBS, P. A. SEVIOR, R. J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence of polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? **Applied Microbiology and Biotechnology**, 46: 503-510. 1996.

GIBSON, L. H. COUGHLIN, R. W. Optimization of high molecular weight pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch fermentations. **Biotechnology Progress**, 18:675–8. 2002.

GLINEL, K. SAUVAGE, J. P. OULYADI, H. HUGUET, J. Determination of substituents distribution in carboxymethyl pullulans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, 328: 343–354. 2000.

GNIEWOSZ, M. DUSZKIEWICZ-REINHARD, W. Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. **Carbohydrate Polymers**, 72: 3431–438. 2008.

GNIEWOSZ, M., KRAŚNIEWSKA, K., SYNOWIEC, A. The effect of agitation on pullulan production by a white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 in batch culture **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Volume 16 Issue 2, 2013.

GOKSUNGUR, Y. DAGBAGLI, S. UÇAN, A. GUVENC, U. Optimization of pullulan production from synthetic medium by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor by response surface methodology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 80: 819–827. 2005.

GOKSUNGUR, Y. UCAN, A. GUVENC, U. Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. **Turkish Journal of Biology**, 28, 23-30. 2004.

GOKSUNGUR, Y. UZUNOGULLARI, P. DAGBAGLI, S. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, 83: 1330–1337. 2011.

GONÇALVES, R. C. R. Pombeiro-Sponchiado, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 28, 1129–1131. 2005.

GORIN, P. A. J. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**; Whistler, R. L. Be Miller, J. N. eds. *Academic Press: New York*, 1981, 38, p. 12. 1981.

GOUNGA, M. E., XU, S. Y., WANG, Z., YANG, W. G. Effect of whey protein isolate-pullulan edible coating on the quality and shelf life of freshly roasted and freeze-dried Chinese chestnut. **Journal of Food Science**, 73: 155–161. 2008.

GOY; R. C. ASSIS; O. B. G. CAMPANA-FILHO. S. P. Produção de esferas de quitosana. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 33. 2004.

GRAESSLEY, W. W. Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions. **Physical properties of polymers**, American Chemical Society, Washington, p. 97-163. 1984.

GUPTA, M., GUPTA, A. K. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier. **Journal of Controlled Release**, 99, 157–166, 2004.

GUTIÉRREZ, A. PIETRO, A. MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, 281: 143-154. 1996.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2009.

HAWKES, M. RENNIE, R. SAND, C. VAUDRY, W. *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 51: 209–213. 2005.

HORNER, W. E. WORTHAN, A. G. MOREY, P. R. Air- and Dustborne Mycoflora in Houses Free of Water Damage and Fungal Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 6394–6400. 2004.

HUI, Y. H. KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology: Microorganisms**. Ed. John Wiley & Sons, 952 p. 1995.

HUSSAIN, M. A. ABBAS, K. LODHI, B. A. SHER, M. ALI, M. TAHIR, M. N. TREMEL, W. IQBAL, S. Fabrication, characterization, thermal stability and nanoassemblies of novel pullulan-aspirin conjugates. **Arabian Journal of Chemistry**, 1-7. 2013.

ISRAILIDES, C. J. VLYSSIDES, A. G. MOURAFERI, V. N. KARVOUNI, G. Olive oil waste water treatment with the use of an electrolysis system. **Bioresource Technology**, 61: 163–170. 1977.

ISRAILIDES, C. SCANLON, B. SMITH, A. HARDING, S. E. JUMEL, K. Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, 25: 203 209. 1994.

IZYDORCZYK, M. S. BILIADERIS, C. G. Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan. **Carbohydrate Polymers**, 17: 237–247. 1992.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p-708-717. 2000.

JIANG, L. Effect of nitrogen source on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749 **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 52, Pages 218–220. 2013.

JIANG, L. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, 79: 414–417. 2010.

JIANG, L. WU, S. KIM, J. M. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 86: 1085– 1088. 2011.

KACHHAWA, D. K. BHATTACHARJEE, P. SINGHAL, R. S. Studies on downstream processing of pullulan. **Carbohydrate Polymers**, 52: 25–28. 2003.

KACURÁKOVÁ, M. CAPEK, P. SASINKOVA, V. WELLNER, N. EBRINGEROVA, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, 43, 195 e 203. 2000.

KANDEMIR, N. YEMENICIOGWLU, A. MECITOGWLU, Ç. ELMACI, Z. S. ARSLANOGWLU, A. GÖKSUNGUR, Y. Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides from *Aureobasidium pullulans* fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, 43, 343-350. 2005.

KARIM, M. R. LEE, H. W. KIM, R. JI, B. C. CHO, J. W. SON, T. W. OH, W. YEUM, J. H. Preparation and characterization of electrospun pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, 78: 336–342. 2009.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, 59: 81-84. 1998.

KAYA, A. DU X. LIU, Z. LU, W. J. MORRIS, R.J. GLASSER, G. W. HEINZE, T. ESKER R. A. Surface plasmon resonance studies of pullulan and pullulan cinnamate adsorption onto cellulose. **Biomacromolecules**, 10:2451–2459. 2009.

KHAN, T. PARK, J. K. KWON, J-H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 24: 816-826. 2007.

KHANNA, S. SRIVASTAVA, A. S. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, 40: 2173-2182. 2005.

KIM, J-H. KIM, M-R. LEE, J-H. LEE, J-W. KIM, S-K. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. **Biotechnology Letters**, 22: 987–990. 2000.

KIMHI, Y. PALFREY, C. SPECTOR, I. BARAK, Y. LITTAUER, U. Z. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 73: 462-466. 1976.

KLINGEBERG, M. VORLOP, K.D. ANTRAKINIAN, G. Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable α-amylases and pullulanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 33: 494-500. 1990.

KOLYBARA, M. A. TABIL, L. G. PANIGRAHI, S. A. Recent developments in the Biopolymer Industry. **Anais da North Central ASAE/CSAE Conference**, Manitoba, Canadá. 2004.

KONG, L. ZIEGLER, G. R. Rheological aspects in fabricating pullulan fibers by electro-wetspinning. **Food Hydrocolloids**, 38: 220-226. 2014.

KRISTO, E. BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, 68 (1), 146-158. 2007

KUMAR, A. S. MODY, K. JHA, B. Bacterial exopolysaccharides—a perception. **Journal of Basic Microbiology**, 47:103–117. 2007.

KUMAR, D. SAINI, N. PANDIT, V. ALI, S. An Insight To Pullulan: A Biopolymer in Pharmaceutical Approaches International. **Journal of Basic and Applied Sciences**, 1: 202-219. 2012.

LAKSHMAN, K. RASTOGI, N. K. SHAMALA, T. R. Simultaneous and comparative assessment of parent and mutant strain of *Rhizobium meliloti* for nutrient limitation and enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production using optimization studies. **Process Biochemistry**, 39: 1977-1983. 2004.

LANGFELDER, K. STREIBEL, M. JAHN, B. HAASE, G. BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LAZARIDOU, A. BILIADERIS, C. G. KONTOGIORGOS, V. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. **Carbohydrate Polymers**, 52: 151–166. 2003.

LAZARIDOU, A. BILIADERIS, C.G. ROUKAS, T. IZYDORCZYK, M. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 97: 1-22. 2002a.

LAZARIDOU, A. ROUKAS, T. BILIADERIS, C. G. VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 122–132. 2002b.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62: 468-473. 2003.

LEATHERS, T. D. GUPTA, S. C. Production of pullulan from fuel ethanol byproducts by *Aureobasidium* sp. strain NRRL Y-12, 974. **Biotechnology Letters**, 16: 1163-1166. 1994.

LEATHERS, T. D., NOFSINGER, G. W., KURTZMAN, C. P. BOTHAST, R. J., Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Industrial Microbiology**, No. 3, 231-239, 1998.

LEDUY, A. MARSAN, A. A. COUPAL, B. A study of the rheological properties of a non-Newtonian Fermentation broth. **Biotechnology and Bioengineering**, 16: 61 – 76. 1974.

LEE, J. H. HWA, J. ZHU, I. H. ZHAN, X. B. LEE, J. W. SHIN, D. H. KIM, S. K. Optimization of conditions for the production of pullulan and high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, 23: 817–820. 2001.

LEE, J. W. YEOMANS, W. G. ALLEN, A. L. DENG, F. GROSS, R. A. KAPLAN, D. L. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 5265–5271. 1999.

LEE, K. Y. YOO, Y. J. Optimization of pH for high molecular weight pullulan. **Biotechnology Letters**, 15: 1021–1024. 1993.

LEITE, D. C. PERES, G. L. SCHMITZ, D. SILVEIRA, N. P. Estudo da estabilidade térmica e das propriedades moleculares de complexos de chumbo e cobre com amilopectina. **12° Congresso Brasileiro de Polímeros**. 2013.

LENK, R. S. The characterization of viscous flow. Viscosity, shear rate and shear stress. **Polymer Rheology**, London, *Applied Science Publishers Ltd*. 1978.

LEUNG, S-H. LEONE, R. S. KUMAR, L. D. KULKARNI, N. SORG, A. F. Fast dissolving orally consumable films. **US Patent Office**, Pat. No. 7 025 983. 2006.

LI, C. LI, W. CHEN, X. FENG, M. RUI, X. JIANG, M. DONG, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **Food Science and Technology**, 57:477-485. 2014.

LI, G.-Q. QIU, H.-W. ZHENG, Z.-M. CAI, Z.-L. YANG, S.-Z. Effect of fluid rheological properties on mass transfer in a bioreactor. ***Journal of Chemical Technology & Biotechnology***, 62: 385 – 391. 1995.

LI, H. YANG, J. HU, X. LIANG, J. FAN, Y. ZHANG, X. Superabsorbent polysaccharide hydrogels based on pullulan derivate as antibacterial release wound dressing. **Journal of Biomedical Materials Research**, 98A:31–39. 2011.

LIMA, M. A. G. A. **Obtenção e Caracterização de xanthanas produzidas por diferentes linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris***, Tese de Doutorado - Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro 163 p. 1999.

LIN, Y. ZHANG, Z. THIBAULT, J. *Aureobasidium pullulans* batch cultivations based on a factorial design for improving the production and molecular weight of exopolysaccharides. **Process Biochemistry**, 42: 820-827. 2007.

LIU, X. WANG, Y. YU, L. TONG, Z. CHEN, L. LIU, H. LI, X. Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. **Starch**, 65: 48–60. 2013.

LOGUERCIO-LEITE, C. GROPOSO, C. DRESCHLER-SANTOS, E. R. FIGUEIREDO, N. F. GODINHO, P. S. ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo –I. Constituintes celulares. **Biotemas**, 19 (2): 17-27, 2006.

LOPES, L. M. A. **Caracterização viscosimétrica de misturas das gomas xantana e guar**, Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, IMA/UFRJ. 1989.

LOPES, L. M. A. **Influência de Agregados sobre propriedades em solução de welana**. Dissertação de Doutorado. Rio de Janeiro, IMA/UFRJ. 1996.

LORET, C. MEUNIER, V. FRITH, W. J. FRYER, P. J Rheological characterization of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v.57, n.2, p. 153-163. 2004.

LUCAS, E. F. SOARES, B. G. MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros – Determinação de massa molar e análise térmica**. Rio de Janeiro: Ed. E-papers. 2001.

LUVIELMO, M. M. SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, 5: 50-67. 2009.

MA, X. ZHANG, H. PETERSON, E. C. CHEN, L. Enhancing exopolysaccharide antioxidant formation and yield from *Phellinus* species through medium optimization studies. **Carbohydrate Polymers**, 107: 214-220. 2014.

MACEDO, R. S. **Evolução do processo de produção de açúcar no setor sucroenergético no Brasil**. Trabalho (Graduação) Apresentado ao Curso de Tecnologia em Bicombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2013.

MACHADO, S. S. **Tecnologia da Fabricação do Açúcar,** Caderno Técnico Ed. e-Tec Brasil. 2012.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M. PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2004.

MAHAPATRA, S. BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, 97: 627-634. 2013.

MANITCHOTPISIT, P. LEATHERS, T. D. PETERSON, S. W. KURTZMAN, C. P. LIE, X-L. EVELEIGH, D. E. LOTRAKUL, P. S. PRASONGSUK, C. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research.** 113: 1107–1120. 2009.

MANO, E. B. Fatores que afetam as propriedades de polímeros. In: **Introdução a polímeros**. Ed. Edgard Blücher, São Paulo, Cap. 5, item 5.1, p. 12-30. 1985.

MARGARITIS, A. PACE, G. W. **Microbial polysaccharides**. *Comprehensive Biotechnology*. Canada: University of Waterloo, 1985. cap.49, p.1005-1044. 1985.

MAUGERI FILHO, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. SCHEMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Blücher Ltda. v. 3, 2001.

MCNEIL, B. KISTIANSEN, B. Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation. **Biotechnology Letters**, 9: 101-104. 1987.

MCNEIL, B., KRISTIANSEN, B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. **Journal Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 12 No. 7 pp. 521-526, 1990.

MELLO, I. L. COUTINHO, F. M. B. DELPECH, M. C. ALBINO, F. F. M. SANTOS, S. M. Polibutadieno Alto-cis: Estudo Viscosimétrico em Tolueno e Ciclo-hexano. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 16: 53-60. 2006.

MERSHON-SHIER, K. L. DEVILLE, J. G. DELAIR, S. FOTHERGILL, A. W. WICKES, B. HOOG, G. S. SUTTON, D. A. LEWINSKI, M. A. *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum fungemia in a pediatric patient. **Medical Mycology**, 49: 80-3. 2011.

MILAS, M. RINAUDO, M. TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, Berlin, v.14, p.157-164, 1985.

MOCANU, G. CARPOV, A, CHAPELLE, S. MERLE, L. MULLER, G. Chemically modified pullulans II. New hydrophobically substituted derivatives. **Canadian Journal Chemistry**, 73:1933–1940. 1995.

MOCANU, G. NICHIFOR, M. PICTON, L. ABOUT-JAUDET, E. LE CERF, D. Preparation and characterization of anionic pullulan thermoassociative nanoparticles for drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, 111: 892-900. 2014.

MOGHIMI, S. M. HUNTER, A. C. MURRAY, J. C. Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. **Pharmacological Reviews**, 53: 283. 2001.

MOHAMMAD, F.H. A., BADR-ELDIN, S.M., EL-TAYEB, O.M., EL-RAHMAN, O. A., Polysaccharide production by *A. pullulans III*: The influence of initial sucrose concentration on the dynamics of the fermentation. **African Journal of Mycology and Biotechnology**, No. 2, 61-75, 1995.

MONTGOMERY, D. C. **Design in Analysis of Experiments**, John Wiley & Sons. New York 4ª ed. 1997.

MORAES, P.C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**, 73f. Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2002.

MORAIS, L. C. CAMPANA-FILHO, S. P. Carboximetilação de Polpas de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Caracterização dos Materiais Absorventes Obtidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 46-51. 1999.

MOREIRA, A. N. MOREIRA, A. S. DIA, P. S. VENDRUSCOLO, C. T. Comportamento reológico e composição química do biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 produzido por via enzimática. **Brazilian Journal Food Technology**, 8: 135-142. 2005.

MORITA, T, ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA. 1968.

MORRIS, E. R. CUTLER, A. N. ROSS-MURPHY, S. B. REES, A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. **Carbohydrate Polymers**, v.1, n.1, p. 5-21, 1981.

MOSCOVICI, M. IONESCU, C. ONISCU, C. FOTEA, O. PROTOPOPESCU, P. HANGANU, L. D. Improved exopolysaccharide production in fed-batch fermentation of *Aureobasidium pullulans* with increased impeller speed. **Biotechnology Letters**, 18: 787–90. 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63. 1983.

MOTAWIA M. S. DAMAGER I. OLSEN CE, MØLLER BL, ENGELSEN SB, HANSEN S, ØGENDAL LH, BAUER R. Comparative study of small linear and branched alpha-glucans using size exclusion chromatography and static and dynamic light scattering. **Biomacromolecules**, 6(1):143-51. 2005.

MOTHÉ, C. G. AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**, São Paulo: I@editora. 2002.

MOUBASHER, H. WAHSH, S. S. Pullulan production from *Aureobsidium pullulans* by continuous culture. **Basic Research Journal of Microbiology**, 1: 11-15. 2014.

MYERS, R.H. MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology**, Wiley, New York. 2002.

NAKASHIO, S. SEKINE, N. TOYOTA, N. FUJITA, F. **Paint containing pullulan**, Pat. No. 3,888,809. 1975.

NAMPOOTHIRI, K.M. SINGHANIA, R. R. SABARINATH, C. PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, 38: 1513-1519. 2003.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de Reologia de Polímeros**. 1ª ed. Caxias do sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 300, 1997.

NAWANI, N. N. KAPADNIS, B. P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. **Process Biochemistry**, 40: 651-660. 2005.

NELSON, D. L. COX, M. M. Lehninger, **Princípios de Bioquímica**, 3ª ed. São Paulo: SARVIER. 2002.

NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**. 117, 29-36, 1992.

NIETO, M. B. **Pullulan replacements for films and coatings**. Pat. No. US20120037039 A1. 2012.

NISHINARI, K. KOHYAMA, K. WILLIAMS, P. A. PHILLIPS, G. O. BURCHARD, W. OGINO, K. Solution properties of pullulan. **Macromolecules**, 24, 20, 5590. 1991.

NOBRE, M. O. ANTUNES, T. A. MEIRELES, M. C. A. FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii.* **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004.

OGUZHAN, P. YANGILAR, F. Pullulan: Production and usage in food ındustry. **African Journal of Food Science and Technology**, 4 57–63. 2013.

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

ORR, D. ZHENG, W. CAMPBELL, B. S. MCDOUGALL, B. M. SEVIOUR, R. J. Culture conditions affecting the chemical composition of the exopolysaccharide synthesized by the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Applied Microbiology**, 07:691–698. 2009.

PACE, N. R. Origin of life--Facing up to the physical setting. **Cell**, 65: 531-533. 1991.

PANDA, A. K. SINGH, R.K. MISHRA, D.K. Thermolysis of waste plastics to liquid fuel: A suitable method for plastic waste management and manufacture of value added products - A world prospective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14: 233-248. 2010.

PELCZAR, M. **Microbiology: concepts and applications,** Ed. McGraw Hill. 1993.

PENNA, T. C. V. **Produção de ácidos**. In: Lima, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. SCHEMIDELL, W. Eds. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Editora Blücher Ltda. v. 3, 2001.

PETER, R. WILLIAMSON, K. W. SHOSUKE, I. Melanin Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans.* **Journal of Bacteriology**, p. 1570–1572. 1998.

PIMENTA, F. D. **Estudo de parâmetros de processo para a produção de biopolímeros de *Rhizobium tropici***, Tese (Doutorado) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

PINHEIRO-ROBERG, R. A. **Aproveitamento de efluentes industriais para a produção de biomassa entomopatogênica à base *Bacillus sphaericus***. Dissertação (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2000.

POLLOCK, T. J. THORNE, L. ARMENTROUT, R. W. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 58: 877-883. 1992.

POLLOCK, T. J. THORNE, L. ARMENTROUT, R. W. Isolation of new Aureobasidium strains that produce high molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 58, 877– 883. 1992.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**, São Paulo. 2006.

PRAJAPATI, V. D. JANI, G. K. KHANDA, S. M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, 95: 540– 549. 2013.

PRASAD, P. GURU, G. S. SHIVAKUMAR, H. R. RAI, K. S. Miscibility, Thermal, and Mechanical Studies of Hydroxypropyl Methylcellulose/Pullulan Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, 110: 444–452. 2008.

PRASONGSUK, S. BERHOW, M. A. DUNLAP C. A. WEISLEDER D. LEATHERS, T. D. EVELEIGH, D. E. PUNNAPAYAK, H. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34: 55–61. 2007.

PRASONGSUK; S. SULLIVAN; R. F. KUHIRUN; M. EVELEIGH; D. E. PUNNAPAYAK H. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, *21*, 393–398. 2005.

PRIYA, S. S. REKHA, M. R. SHARMA, C. P. Pullulan–protamine as efficient haemocompatible gene delivery vector: Synthesis and in vitro characterization. Carbohydrate Polymers, Volume 102, 15, Pages 207-215, 2014.

PUNNAPAYAK, H. SUDHADHAM, M. PRASONGSUK, S. PICHAYANGKURA, S. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30: 89–94. 2003.

QUEIROZ, C. E. S. **Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.** Araraquara, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 133p, 1997.

RACUSEN, L. C. SOLEZ, K. COLVIN, R. B. BONSIB, S. M. CASTRO, M. C. CAVALLO, T. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney International**, 55: 713-23. 1999.

RADULOVIC, M. D. CVETKOVIC, O. G. NIKOLIC, S. D. DJORDJEVIC, D. S , JAKOVLJEVIC, D. M, V. M. M. Simultaneous production of pullulan and biosorption of metals by

Aureobasidium pullulans strain CH-1 on peat hydrolysate, **Bioresource Technology**, 99: 6673-6677. 2008.

RAO, M. A. **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications**, New York: Ed. Aspen Publishers, p.433. 1999.

RAVI, P. R. VATS, R. BALIJA, J. ADAPA, S. P. N. ADITYA, N. Modified pullulan nanoparticles for oral delivery of lopinavir: Formulation and pharmacokinetic evaluation. **Carbohydrate Polymers**, 110: 320-328. 2014.

RAY, R. C. MOORTHY, S. N. Exopolysaccharide (pullulan) production from cassava starch residue by Aureobasidium pullulans strain MTTC 1991. **Journal of Scientific and Industrial Research**, 66. 2007.

REKHA, M. R. PAL, K. BALA, P. SHETTY, M. MITTRA, I. BHUVANESHWAR, G. S. SHARMA, C. P. Pullulan-histone antibody nanoconjugates for the removal of chromatin fragments from systemic circulation. **Biomaterials**. 34: 6328-38. 2013.

REKHA, M. R. SHARMA, C. P. Hemocompatible pullulan-polyethyleneimine conjugates for liver cell gene delivery: In vitro evaluation of cellular uptake, intracellular trafficking and transfection efficiency. **Acta Biomaterialia**, 7: 370–379. 2011.

REKHA, M. R. SHARMA, C. P. Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, 20: 116-121. 2007.

REKHA, M. R. PAL, K. SHETTY, P. B. M. MITTRA, I. BHUVANESHWAR, G. S SHARMA, C. P. Pullulan-histone antibody nanoconjugates for the removal of chromatin fragments from systemic circulation. Biomaterials, Volume 34, Issue 27, Pages 6328-6338, 2013.

REKHA, M. R. SHARMA C. P. Blood compatibility and in vitro transfection studies on cationically modified pullulan for liver cell targeted gene delivery. Biomaterials, Volume 30, Issue 34, Pages 6655-6664, 2009.

RHO, D. MULCHANDANI A. LUONG, J. H. T. LEDUY, A. Oxygen requirement in pullulan fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28:361–6. 1988.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, 15: 433-440. 2001.

RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos visando a otimização de processos**, Ed. Casa do Pão. FEA/UNICAMP. 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Ed. Casa do Pão. FEA/UNICAMP. 2005.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor**, Tese de Doutorado *(FEQ/DPQ/UNICAMP)*. 2003.

ROGERO; S. O. LUGÃO, A. B. IKEDAII; T. I. CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research Bulletin**, vol.6 no.3 São Carlos. 2003.

ROSATO, D. V. ROSATO, M. G. ROSATO, D. V. **Concise Encyclopedia of Plastics**, Springer, 716 p., p. 269. 2000.

ROUKAS, T. BILIADERIS, C. G. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 55: 27–44. 1995.

ROUKAS, T. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Production of pullulan from beet molasses by Aureobasidium pullulans in a stirred tank fermentor. **Journal of Food Engineering**, 40: 89-94. 1999.

ROUKAS, T. MANTZOURIDOU, F. Effect of aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheological properties in an airlift reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 76:371–376. 2001.

ROUKAS, T. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 15: 447-450. 1999.

ROYCHOUDHURY, A. R. BHATTACHARYYA, M. S. PRASAD, G. S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 1: 232–237. 2012.

SAKATAA, Y. OTSUKAB, M. Evaluation of relationship between molecular behaviour and mechanical strength of pullulan films. **International Journal of Pharmaceutics**. 33-8. 2009.

SANO, T. UEMURA, Y. FURUTA, A. **Photosensitive resin composition containing pullulan or esters thereof**. Pat. No. 3 960 685. 1976.

SANTOS, E. **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP, 2008.

SCHARAMM, G. A. **Practical Approach to Rheology and Rheometry. Haake**, Germany. 1994.

SCHMID, F. STONE, B. A. MCDOUGALL, B. M. BACIC, A. MARTIN, K. L. BROWNLEE, R. T. CHAI, E. SEVIOUR, R. J. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1-->3; 1-->6)-beta-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. **Carbohydrate Research**, 331: 163-171. 2001.

SCOTT, R. A. CADE, D. HE, X. **Pectin film compositions**. Pat. No. 7041315. 2001.

SCOTT, R. A. CADE, D. HE, X. **Pectin film compositions**. Pat. No. US7041315 B2. 2012.

SENA, R. F.; COSTELLI, M. C.; GIBSON, L. H.; COUGHLIN, R. W. Enhanced production of pullulan by two strains of Aureobasidium pullulans with different concentration of soyaben oil in sucrose solution in batch fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 23: 507-515. 2006.

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**, 95: 293–299. 2004.

SEVIOUR, R. J. KRISTIANSEN, B. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by Aureobasidium pullulans. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 17: 178–181. 1983.

SEVIOUR, R. J. STASINOPOULOS, S. J. AUER, D. P. F. GIBBS, P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, 12: 279-298. 1992.

SHABTAI, Y. MUKMCNEV, I. Enhanced production of pigment-free pullulan by a morphogenetically arrested *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) in a two-stage fermentation with shift from soy bean oil to sucrose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43, 595-603. 1995.

SHARMA, N. PRASAD, G. S. CHOUDHURY, A. R. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, 93: 95-101. 2013.

SHARMILA, G. MUTHUKUMARAN, C. NAYAN, G. NIDHI, B. Extracellular biopolymer production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195 Using Jackfruit Seed Powder. **Journal of Polymers and the Environment**, 21: 487–494. 2013.

SHATWELL, K. P. SUTHERLAND, I. W. DEA, I. C. M. ROSS- MURPHY, S. B. The influence of acetyl and piruvate substituents on the helix-coil transition behavior of xanthan. **Carbohydrate Research**, 206: 87-103. 1990.

SHENGJUN, W. JIN, Z. TONG, Q., CHEN, H. Sweet potato: a novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 76: 645–649. 2009.

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

SHINGEL, K. I. PETROV, P.T. Behavior of γ-ray-irradiated pullulan in aqueous solutions of cationic (cetyltrimethylammonium hydroxide) and anionic (sodium dodecyl sulfate) surfactants. **Colloid and Polymer Science**, 280:176–182. 2002.

SIBIKINA, O. V. IOZEP, A. A. PASSET, B. V. Reactions of carboxymethyl polysaccharides and their ethyl esters with amines. **Russian Journal of Applied Chemistry**, 77: 263-266. 2004.

SIBIKINA, O. V. IOZEP, A. A. PASSET, B. V. The reaction of carboxymethyl polysaccharides and their ethyl esters with amines. **Russian Journal of Applied Chemistry***,* 77: 263-266. 2004.

SILVA, J. A. L. RAO, M. A. Role of rheological behavior in sensory assessment of fluid foods. In: RAO, A. **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications**, New York: Aspen, p.443. 1999.

SILVA, J. A. RAO, M. A. Viscoelastic properties of food hydrocolloids dispersions. Viscoelastic properties of foods. **Elsevier Applied Science Publishers**, London, cap. 11, 285 p. 1992.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 460 p. 2000.

SILVERSTEIN, R.M. BASSLER, G. C. and MORRILL, T. C**. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5nd ed. Rio de Janeiro, Guanabara & Koogan. 387p. 1994.

SIMON, L. BOUCHET, B. BREMOND, K. GALLANT, D. J. BOUCHONNEAU, M. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, 44: 1193-1199. 1998.

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

SINGH, R. S. SAINI, G. K. KENNEDY, J. F. Downstream processing and characterization of pullulan from a novel colour variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1. **Carbohydrate Polymers**, 78 89–94. 2009.

SINGH, R. S. SAINI, G. K. KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, 73: 515-531. 2008.

SLODKI, M. E. CADMUS, M.C. Production of microbial polysaccharide**. Advances in Applied Microbiology**, 23, 19–54. 1978.

SOARES, L. A. GIL, E. S. REZENDE, K. R. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3, 63-67. 2006.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugar. **Journal Biological Chemistry**, 160: 61-68. 1945.

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

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2ª ed. Freeman Press, East Lansing, MI, USA. 1996.

STEINBÜCHEL, A. General Aspects and Special Applications, edited by A. Steinbüchel. Weinheim. **Biopolymers**, Volume 10, Germany: Wiley, 2003, 516 pp. 2003.

STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. **Macromolecular Bioscience**, v. 1: 1-23. 2001.

STEVENSON. F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**, New York: J. Wiley & Sons, 443p. 1982.

SUGINOSHITA, Y. TABATA, Y. MORIYASU, F. IKADA, Y. CHIBA, T. Liver targeting of interferon-b with a liver-Affinity polysaccharide based on metal coordination in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 298: 805 – 811. 2001.

SUGUMARAN, K. R. JOTHI, P. PONNUSAMI, V. Bioconversion of industrial solid waste--cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. **Carbohydrate Polymers**, 99: 22-30. 2013.

SUGUMARAN, K. R. SINDHU, R. V. SUKANYA, S. AISWARYA, N. PONNUSAMI V. Statistical studies on high molecular weight pullulan production in solid state fermentation using jack fruit seed. **Carbohydrate Polymers**, 98. 854– 860. 2013.

SUGUMARAN, K. R. GOWTHAMI, E. SWATHI, B. ELAKKIYA, S. SRIVASTAVA, S.N. RAVIKUMAR, R. GOWDHAMAN, D. PONNUSAMI V. Production of pullulan by *Aureobasidium*

pullulans from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, 92. 697– 703. 2013.

SUH, J. H. YUN J. W. KIM, D. S. Comparison of Pb^{2+} accumulation characteristics between live and dead cells of Saccharomyces cerevisiae and *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, 20: 247–51. 1998.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, Edinburgh. 23: 79-106. 1982.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Kidlington, v.11, p.663-674. 2001.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, 16: 41-46. 1998.

SUVOROVA, O. B. IOZEP, A. A. PASSET, B. V. Reactivity of Polysaccharide Aldehydes toward N-Nucleophiles. **Russian Journal of Applied Chemistry***, Vol. 74, No. 11, 1016-1020.* 2001.

TANYILDIZI, M. S. ÖZER, D. ELIBOL, M. Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, 40: 2291-2296. 2005.

TARABASZ-SZYMANSKA L. GALAS E. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, *15*, 317–320. 1993.

TAYLOR, K. C. NASR-EL-DIN, H. A. **Water-soluble hydrophobically associating polymers for improved oil recovery: a literature review**, SPE 29008, p. 675. 1995.

TERAMOTO, N. SHIBATA, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. **Carbohydrate Polymers**, 63: 476–481. 2006.

THIRUMAVALAVAN, K. MANIKKANDAN, T. R. DHANASEKAR, R. Batch fermentation kinetics of pullulan from *Aureobasidium pullulans* using low cost substrates. **Biotechnology**, 7: 317-322. 2008.

THIRUMAVALAVAN, K. T. MANIKKADAN, R. DHANASEKAR, R. Pullulan production from coconut by-products by Aureobasidium pullulans. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 8 (2), pp. 254-258. 2009.

THOMAS, J. E. Fundamentos de Engenharia de Petróleo. **Interciência**. 2001.

THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.;SAAL, F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends Phil. **Philosophical transactions of the**

Royal Society of London. Series A. Physical sciences and engineering, 364: 2153-2166. 2009.

TONELI, J. T. C. L. MURR, F. E. X. PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 7, 181-204. 2005.

TSAI, H. F. CHANG, Y. C. WASHBURN, R. G. WHEELER, M. H. KWON-CHUNG, K. J. The developmentally regulated alb-1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p. 3031-3038, 1998.

TSUJISAKA, Y. MITSUHASHI, M. In **Pullulan in industrial gums: polysaccharides and their derivatives**, 3rd ed.; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N., Eds.; Academic Press: San Diego, 447 p. 1993.

TYLIANAKIS, M. SPYROS, A. DAIS, P. TARAVEL, F. R. PERICO, A. NMR study of the rotational dynamics of linear homopolysaccharides in dilute solutions as a function of linkage position and stereochemistry. **Carbohydrate Research**, 315 16–34. 1999.

UEDA, S. FUJITA, K. KOMATSU, K. NAKASHIMA, Z. Polysaccharide produced by the genus *Pullulanaria*. I. Production of polysaccharides by growing cells. **Journal of Applied Microbiology**, 11:211–5. 1963.

URKUT, Z. DAGBAGLI, S. GOKSUNGUR, Y. Optimization of pullulan production using Ca-alginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 82: 837–846. 2007.

US Congress, Office of Technology Assessment, **Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper***, OTA-BP-E-102* (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1993.

USINA ALTO ALEGRE. **Aspectos microbiológicos**. 2014. Disponível em: <http://www.altoalegre.com.br/>. Acessado em 7 ago 2014.

VAN HAMME, J. D. SINGH, A. WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 67: 503–549. 2003.

VIDAL-CROS, A. VIVIANI, F. LABESSE, G. BOCCARA, M. AND GAUDRY, M. Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. Purification, cDNA cloning and sequencing. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, p. 985-992. 1994.

VIEIRA, M. M. LIU UN RIGO, L. U. MARAGCHAL, L. R. VEIGA L. A. Induction and catabolite repression of l-rhamnose dehydrogenase in *pullularia pullulans*. **Journal of Bacteriology**, 38: 55-59. 1979.

VIJAYENDRA, S. V. N. BANSAL, D. M. S. PRASAD, K. N. *Jaggery*: a novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77. **Process Biochemistry**, 37: 359–364. 2001.

VILLANOVA; J. C. O. ORÉFICE; R. L. CUNHA A. S. **Aplicações farmacêuticas de polímeros Polímeros**, vol.20 no.1 São Carlos Epub Mar 05, 2010.

WANG, D. JU, X. ZHOU, D. WEI, G. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, 164: 12-19. 2014.

WEBB, J. S. NIXON, M. EASTWOOD, I. M. GREENHALGH, M. ROBSON, G. D. HANDLEY, P. S. Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 3194–3200. 2000.

WECKER, A. ONKEN U. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, 13: 155-160. 1991.

WEST, T. P. Effect of carbon source on polysaccharide production by alginate-entrapped *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 cells. **Journal of Basic Microbiology**, 51: 673–677. 2011.

WEST, T. P. REED-HAMER, B. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus Aureobasidium pullulans. **FEMS Microbiology Letters**, 113: 345–350. 1993.

WHEELER, M. H. AND BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 2, p. 338-387. 1988.

WILEY, B. J. BALL, D. H. ARCIDIACONO, S. M. KAPLAN, D. L. Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by Aureobasidium pullulans. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, 1, 3–9. 1993.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**. Tese de Doutorado em Processos biotecnológicos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2001.

WU, C. F. HAMADA, M. **Experiments: planning, analysis, and parameter design optimization**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2000.

WU, S. CHEN, J. PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, 87: 1696– 1700. 2012.

WU, S. CHEN, J. PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, 87: 1696– 1700. 2012.

WU, S. JIN, Z. TONG, Q. CHEN, H. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 76: 645–649. 2009.

XIA, Z. WU, S. PAN, S. Effect of two-stage controlled pH and temperature on pullulan production by *Auerobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 86: 1814–1816. 2011.

YAMADA, E. A. ALVIM, I. D. SANTUCCI, M. C. C. SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, *16*, 423-432, 2003.

YOUSSEF, F. BILIADERIS, C. G. ROUKAS, T. Enhancement of pullulan production by Aureobaisdium pullulans in batch culture using olive oil and sucrose as carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 74: 13-30. 1998.

YOUSSEF, F. ROUKAS, T. BILIADERIS, C. G. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using a batch and fed-batch culture. **Process Biochemistry**, 34: 355-362. 1999.

YU, X. WANG, Y. WEI, G. DONG, Y. Media optimization for elevated molecular weight and mass production of pigment-free pullulan. **Carbohydrate Polymers**, 89, 928– 934. 2012.

YURLOVA, N. A. HOOG G. S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek***,* 72: 141–147, 1997.

ZHANG, H. GAO, F. LIU, L. LI, X. ZHOU, Z. YANG, X. ZHANG, Q. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, 71: 19–26. 2009.

ZHAO, S. CHI, Z. A new pullulan-producing yeast and medium optimization for its exopolysaccharide production. **Journal of Ocean University of Qingdao**, 2: 53-57. 2003.

ZHENG, W. CAMPBELL, B. S. MCDOUGALL, B. M. SEVIOUR, R. J. Effects of melanin on the accumulation of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* grown on nitrate. **Bioresource Technology**, 99: 7480–7486. 2008.

ZHU, G. SHENG, L. LI, J. TONG, Q. Preparation and characterisation of gellan/pullulan composite blend films International. **Journal of Food Science and Technology**, 48: 2683–2687. 2013.

Apêndice 1

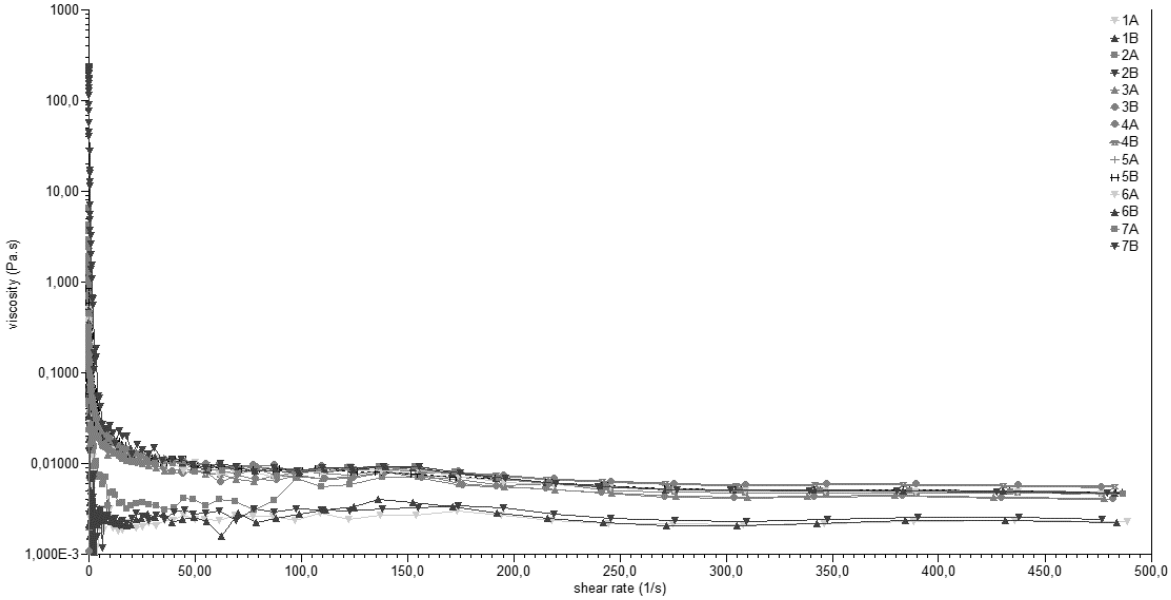


Figura 42. Análise viscosimétrica do mosto obtido do Planejamento Experimental. Concentrações iniciais de açúcar cristal e levedura residual de cervejaria, respectivamente: 30 e 2 g/L (1A e 1B); 70 e 2 g/L (2A e 2B);30 e 8 g/L (3A e 3B); 70 e 8 g/L (4A e 4B);50 e 5 g/L (5A, 5B, 6A, 6B, 7A e 7B) após 96 h de fermentação (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C).

Apêndice 2

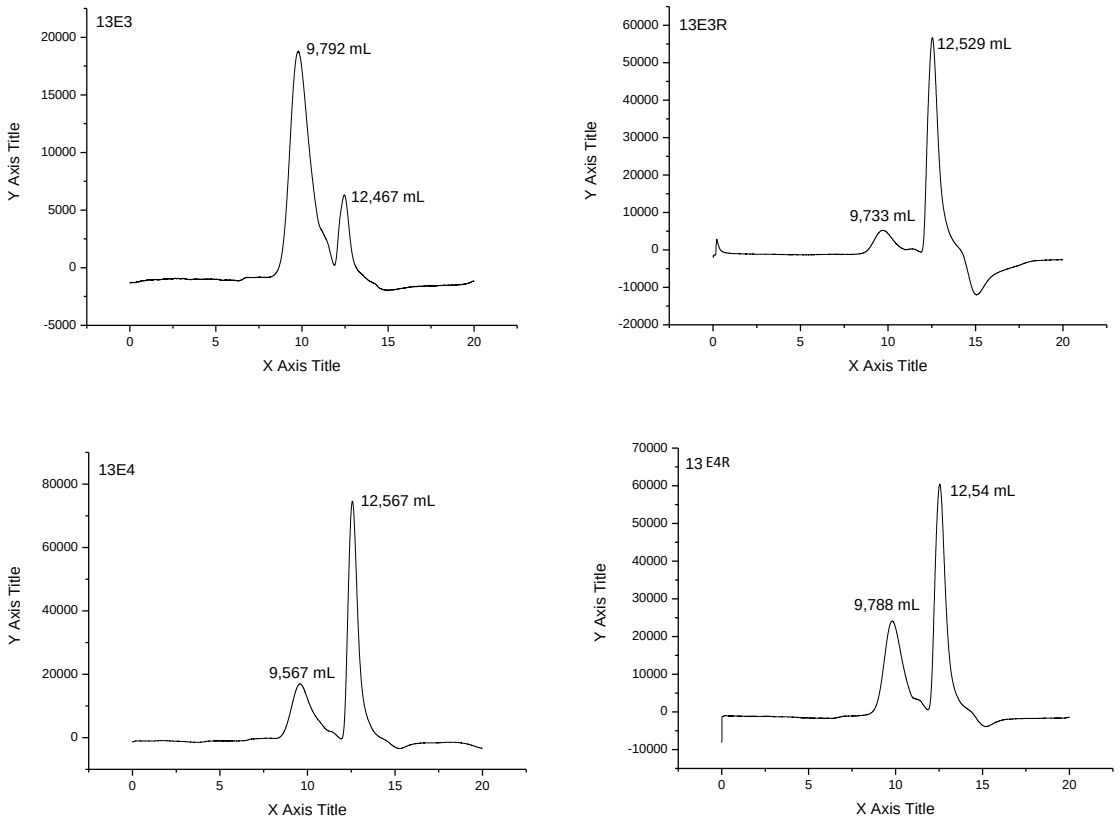


Figura 43. Cromatogramas das amostras obtidas do Planejamento Experimental para avaliar as concentrações iniciais ideais das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (levedura residual de cervejaria) após 96 h de fermentação. [Concentrações iniciais de açúcar cristal e LRC, respectivamente: 30 e 8 g/L (13E3); 30 e 8 g/L (13E3R); 70 e 8 g/L (13E4) e 70 e 8 g/L (13E4R)].

Apêndice 2 (cont.)

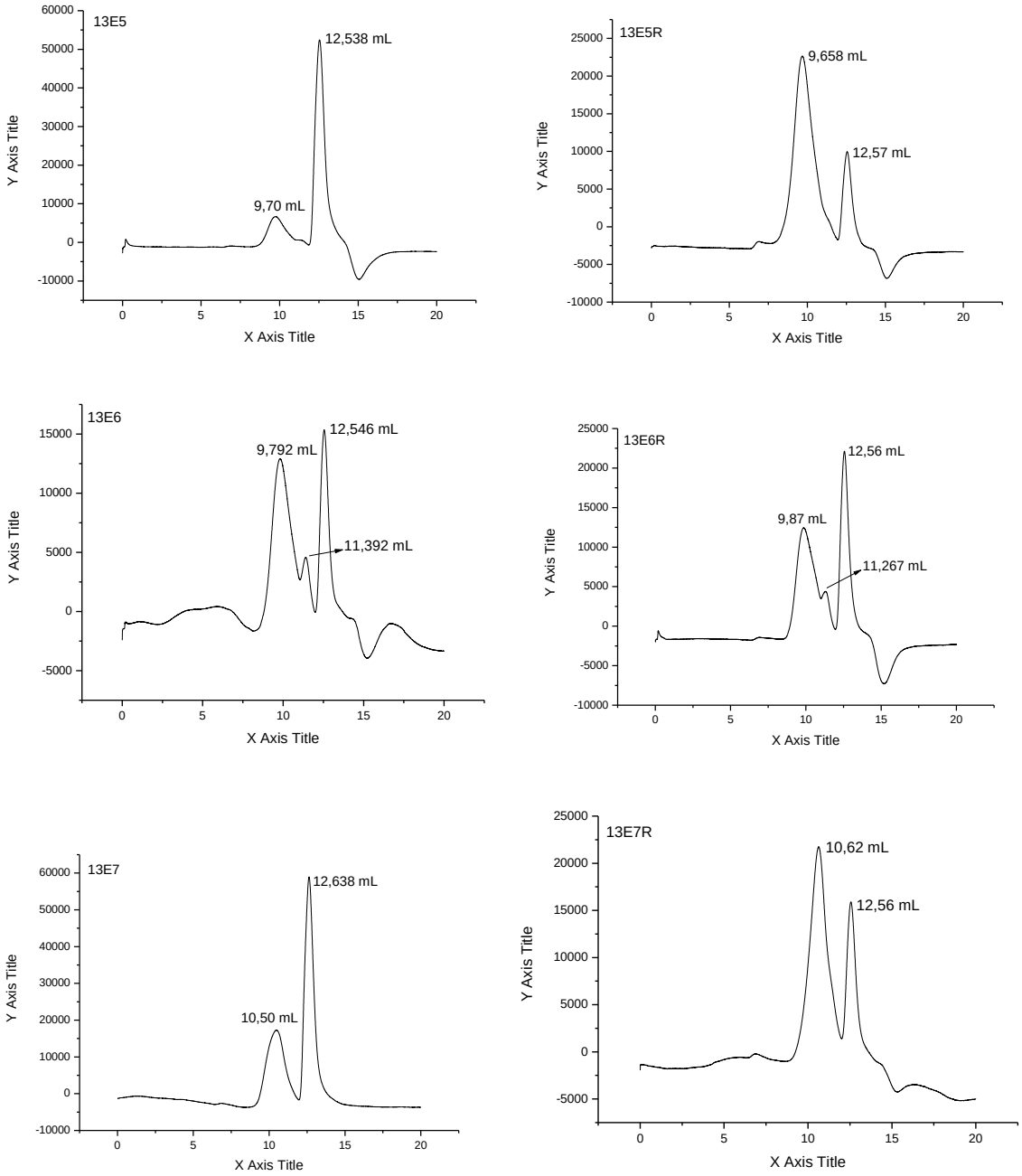


Figura 44. Cromatogramas das amostras obtidas do Planejamento Experimental para avaliar as concentrações iniciais ideais das fontes de carbono (açúcar cristal) e de nitrogênio (levedura residual de cervejaria) após 96 h de fermentação. [Concentrações iniciais de açúcar cristal e LRC, respectivamente: 50 e 5 g/L (13E5); 50 e 5 g/L (13E5R); 50 e 5 g/L (13E6); 50 e 5 g/L (13E6R); 50 e 5 g/L (13E7); 50 e 5 g/L (13E7R)].

Apêndice 3

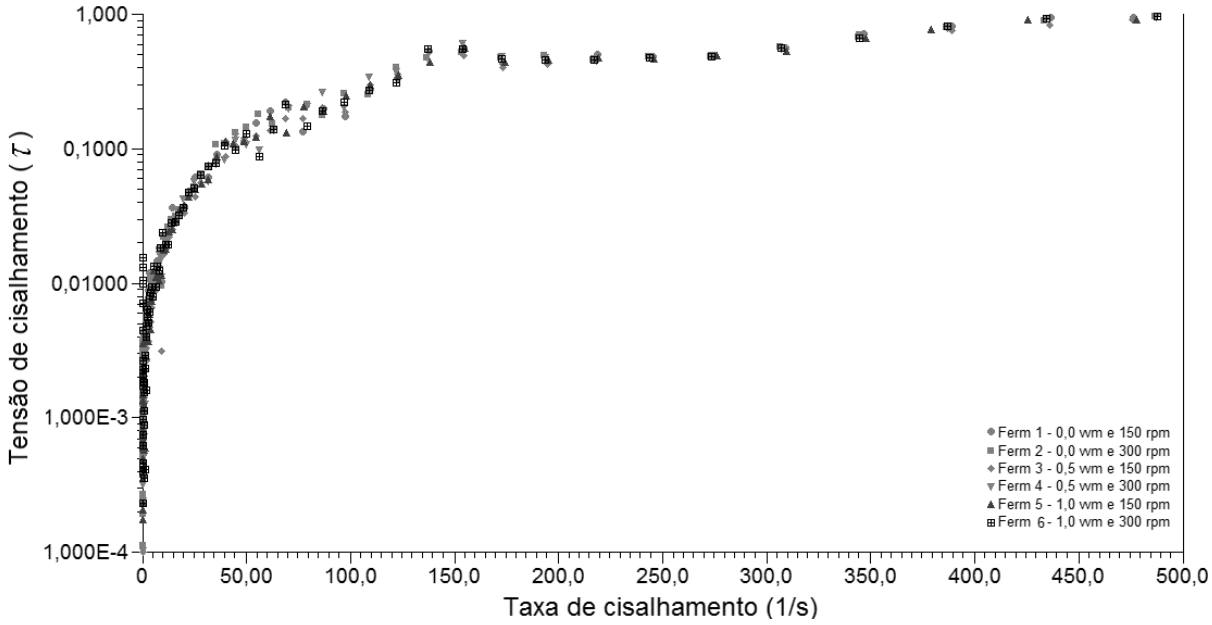


Figura 45. Curvas de escoamento dos mostos obtidos em biorreator em distintas taxas de aeração e velocidades agitação (Advanced Rheometer 2000, 25°C).

Apêndice 4

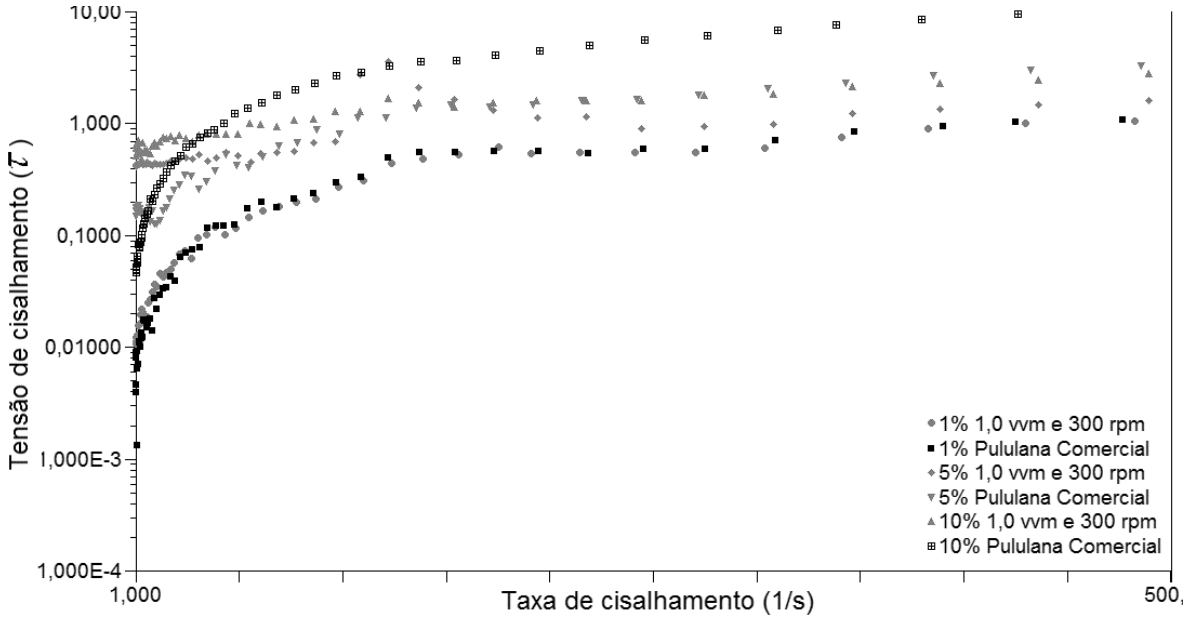


Figura 46. Curvas de escoamento da pululana comercial de referência e do biopolímero produzido por *A. pullulans* IOC 3011 recuperado e ressolubilizado em água em 3 concentrações 1, 5 e 10% m/v, obtido em taxa de aeração de 1 vvm e velocidade de agitação de 300 rpm, utilizando 30 g/L de açúcar cristal e 8 g/L de levedura residual de cervejaria (*Advanced Rheometer* 2000, 25 °C).