

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

PROGRAMA DE MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES DE POTENCIAL  
ANTITUMORAL POR *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 EM PROCESSO  
DESCONTÍNUO

GISELE MARTINI BORGES

ORIENTADORA: Dra. SANDRA APARECIDA FURLAN

JOINVILLE

2009

GISELE MARTINI BORGES

PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES DE POTENCIAL  
ANTITUMORAL POR *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 EM PROCESSO  
DESCONTÍNUO

Dissertação de Mestrado apresentada  
como requisito parcial para obtenção do  
título de mestre em Saúde e Meio  
Ambiente na Universidade da Região de  
Joinville – UNIVILLE.

Área de concentração: Biotecnologia.  
Orientadora: Dra. Sandra Aparecida  
Furlan

JOINVILLE

2009

## TERMO DE APROVAÇÃO

“A natureza sempre encontra um meio de adaptação em seu processo evolutivo, mas a inteligência que faz com que isso aconteça será sempre o grande mistério”.

## DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho ao carinho mútuo,  
apoio altruísta e ao amor incondicional  
de minha família”.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a energia divina que me guiou às atividades científicas para o início de minha carreira profissional.

Agradeço ao amor incondicional e altruísta de minha família, papai, mamãe e minhas três irmãs que sempre me deram apoio de forma individual, para a superação dos desafios de forma equilibrada, meu eterno muito obrigada.

Agradeço a todos os professores que auxiliaram ao fomento da informação e construção do conhecimento como um todo.

Agradeço a todas as professoras do “Grupo Cogumelos”, Professora Regina Gern, que me deu os primeiros passos e conceitos básicos no laboratório. Professora Elizabeth Wisbeck, percussora de anseios e ambições para o futuro profissional, todas as suas orientações foram muito importantes para mim. Agradeço a Professora Mariane Bonatti que sempre deu o apoio necessário a todos os detalhes experimentais.

Agradeço a Professora Sandra Furlan que acreditou em meu trabalho e esforços pessoais, abrindo espaço para novos conceitos, por toda a dedicação durante suas orientações para elaboração e concretização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos que trilharam o caminho da pesquisa, Jamile Rampinelli, Nelson Libardi, técnicas dos laboratórios e demais colegas que me auxiliaram e compartilharam juntos momentos importantes para a minha formação profissional.

Agradeço ao apoio financeiro do fundo de apoio à pesquisa da universidade (FAP/UNIVILLE).

E agradeço a todos aqueles que não mencionei o nome, mas participaram de alguma forma durante toda a vivência para a efetivação de um sonho, o meu muito obrigada.

## RESUMO

Fungos pertencentes à classe dos basideomicetos, como os do gênero *Pleurotus*, possuem a capacidade de sintetizar compostos bioativos. Um dos principais metabólitos sintetizados por estes fungos em cultivo submerso são os  $\beta$ -glucanos, polissacarídeos que além de estarem relacionados à composição da parede celular, operam com respostas bioativas, melhorando o sistema imunológico humano, aumentando a ativação das células imunes, macrófagos e células “natural killers” (NK), resultando na produção de citosinas. Assim sendo, o objetivo deste foi estudar o cultivo submerso, em biorreator de bancada, da espécie *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 para a produção de polissacarídeos extracelulares. Para tanto, utilizou-se um planejamento fatorial  $2^2$  para verificar a influência da concentração inicial de substrato (40 e 50 g L<sup>-1</sup>) e do pH (3,0 e 4,0) em processo descontínuo, contribuindo assim para um estudo cinético do crescimento micelial e da produção de polissacarídeos extracelulares. Os resultados obtidos mostram que a concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 maximizou o fator de conversão de substrato em polissacarídeo extracelular ( $Y_{P/S} = 0,072$  g g<sup>-1</sup>), o fator de conversão de substrato em biomassa micelial ( $Y_{X/S} = 0,244$  g g<sup>-1</sup>), a produtividade máxima em polissacarídeo extracelular ( $Q_{Pmax} = 11,260$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e a produtividade máxima em biomassa ( $Q_{Xmax} = 32,20$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em menor tempo de processo (226 h). Já, com concentração inicial de glicose de 50 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 as concentrações de polissacarídeos extracelulares ( $\dot{A}P = 2,528$  g L<sup>-1</sup>) e de biomassa micelial ( $\dot{A}X = 9,479$  g L<sup>-1</sup>) foram mais elevadas quando comparadas às demais condições de processo. Através da análise de Pareto observou-se que pH 3,0 maximizou a concentração de polissacarídeos extracelulares ( $\dot{A}P$ ), não apresentando diferença significativa quanto a concentração inicial de substrato (40 ou 50 g L<sup>-1</sup>).

## ABSTRACT

Fungi belonging to basidiomycetes class such as the *Pleurotus* genus have the capacity to synthesize bioactive compounds. One of the main metabolites synthesized by these fungi in submerged culture are the  $\beta$ -glucans, polysaccharides reported to be related to the cell wall composition. These polysaccharides promote bioactive responses, improving the human immune system, increasing the immune cell activation, macrophages and natural killer cells (NK), resulting in the cytokines production. Based on this, the objective of the present work was to study the submerged culture of *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001 in bioreactor for the production of extracellular polysaccharides. A factorial design  $2^2$  was used to investigate the initial substrate concentration (40 and 50 g L<sup>-1</sup>) and pH (3.0 and 4.0) in batch process, contributing to the kinetic study of mycelial growth and polysaccharide production. The results obtained show that the initial glucose concentration of 40 g L<sup>-1</sup> and pH 3.0 maximizes the yield of extracellular polysaccharide on substrate ( $Y_{P/S} = 0.072$  g g<sup>-1</sup>), the yield factor of biomass on substrate ( $Y_{X/S} = 0.244$  g g<sup>-1</sup>), the maximum extracellular polysaccharide productivity ( $Q_{Pmax} = 11.260$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) and the maximum biomass productivity ( $Q_{Xmax} = 32.200$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), in less time process (226 h). Already, with the initial glucose concentration of 50 g L<sup>-1</sup> and pH 3.0 the extracellular polysaccharides concentration ( $\Delta P = 2.528$  g L<sup>-1</sup>) and the biomass concentration ( $\Delta X = 9,479$  g L<sup>-1</sup>) were higher when compared with the other process conditions. Through Pareto analysis was observed that pH 3.0 maximized the extracellular polysaccharides concentration ( $\Delta P$ ) with no significant difference between the initial substrate concentration (40 or 50 g L<sup>-1</sup>).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais estruturas de um cogumelo do Filo Basidiomycota.....	22
Figura 2. Estrutura de $\beta$ -glucano obtido a partir de <i>Pleurotus florida</i> .....	26
Figura 3. Vista superior do biorreator, destacando seus componentes .....	34
Figura 4. Esquema do sistema de fermentação .....	35
Figura 5. Esquema de metodologia utilizada.....	36
Figura 6. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 40 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0.....	42
Figura 7. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 40 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0.....	43
Figura 8. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 50 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0.....	43
Figura 9. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 50 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0.....	44
Figura 10. Efeito da concentração inicial de substrato e pH sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares.....	48
Figura 11. Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de glicose dos experimentos em biorreator.....	62
Figura 12. Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de polissacarídeos extracelulares dos experimentos em biorreator .....	62
Figura 13. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 40 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0 (Experimento 1) .....	64
Figura 14. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 40 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0 (Experimento 1') .....	64
Figura 15. Variação das concentrações de glicose (S , $\diamond$ ), biomassa (X , $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de <i>P. djamor</i> com 40 g L <sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0 (Experimento 2) .....	66

- Figura 16. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0 (Experimento 2') ..... 66
- Figura 17. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0 (Experimento 3) ..... 68
- Figura 18. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0 (Experimento 3') ..... 68
- Figura 19. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0 (Experimento 4) ..... 69
- Figura 20. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\ddot{A}$ ) e polissacarídeos extracelulares (P , ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0 (Experimento 4') ..... 69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento fatorial ( $2^2$ ) dos experimentos. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente .....	36
Tabela 2. Comparativos cinéticos entre os cultivos de 40 e 50 g L <sup>-1</sup> de substrato e pH 3,0 e 4,0.....	45
Tabela 3. Planejamento fatorial $2^2$ para estudo do efeito da concentração inicial de substrato (S0) e do pH sobre a biomassa micelial (ÄX) e os polissacarídeos extracelulares (ÄP) produzidos .....	47
Tabela 4. Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^2$ com um nível mínimo de 95% de confiança .....	47
Tabela 5. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 40 g L <sup>-1</sup> e pH 3,0 (1 e 1') .....	63
Tabela 6. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 40 g L <sup>-1</sup> e pH 4,0 (2 e 2') .....	65
Tabela 7. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 50 g L <sup>-1</sup> e pH 3,0 (3 e 3') .....	67
Tabela 8. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 50 g L <sup>-1</sup> e pH 4,0 (4 e 4') .....	69
Tabela 9. Variação da concentração de polissacarídeos extracelulares de cultivo na condição de 50 g L <sup>-1</sup> de glicose e pH 4 .....	71
Tabela 10. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 40 g L <sup>-1</sup> e pH 3,0 (1 e 1').....	72
Tabela 11. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 40 g L <sup>-1</sup> e pH 4,0 (2 e 2').....	74
Tabela 12. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 50 g L <sup>-1</sup> e pH 3,0 (3 e 3').....	76
Tabela 13. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 50 g L <sup>-1</sup> e pH 4,0 (4 e 4').....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$K_{La}$  : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

nm: nanômetros

P: Concentração final de produto ( $\text{g L}^{-1}$ )

$P_0$  : Concentração inicial de produto ( $\text{g L}^{-1}$ )

$Q_P$ : Produtividade total em produto ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$Q_{P_{\text{máx}}}$ : Produtividade máxima em produto ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$Q_X$ : Produtividade total em biomassa ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$Q_{X_{\text{máx}}}$ : Produtividade máxima em biomassa ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$S_0$  : Concentração inicial de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ )

$S_f$  : Concentração final de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ )

t : Tempo de processo (h)

$t_{m_P}$ : Tempo no qual a produtividade em produto é máxima (h)

$t_{m_X}$ : Tempo no qual a produtividade em biomassa é máxima (h)

v/v: volume/volume

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

X: Concentração final de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X_0$  : Concentração inicial de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$Y_{P/S}$  : Fator de conversão de substrato em produto ( $\text{g g}^{-1}$ )

$Y_{X/S}$  : Fator de conversão de substrato em biomassa ( $\text{g g}^{-1}$ )

$\ddot{A}P$  = Produto formado ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\ddot{A}P_m$  : Concentração de produto para a qual a produtividade em produto é máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\ddot{A}X$  : Biomassa formada ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\ddot{A}X_m$  : Concentração de biomassa para a qual a produtividade em biomassa é máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$  : velocidade específica máxima de crescimento microbiano ( $\text{h}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	xii
INTRODUÇÃO .....	15
1 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
1.1 Neoplasias .....	17
1.1.1 Incidência no mundo e no Brasil.....	18
1.1.2 Formas de tratamento.....	20
1.2 Biologia de fungos.....	21
1.2.1 Filo basideomycota.....	22
1.2.1.1 O gênero <i>Pleurotus</i> .....	23
1.3 Polissacarídeos fúngicos .....	24
1.3.1 Estrutura e composição dos polissacarídeos .....	24
1.3.2 Síntese dos polissacarídeos .....	26
1.3.2.1 Formas de condução de processo em meio líquido .....	26
1.4 Exigências nutricionais dos fungos .....	27
1.5 Meios e condições ambientais para produção de polissacarídeos fúngicos.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Microrganismos e manutenção.....	33
2.2.1 Preparo de inóculo.....	33
2.2.2 Meios e Condições de Cultivo.....	33
2.3 Métodos analíticos.....	37
2.3.1 Análise da concentração de de biomassa micelial.....	37
2.3.2 Análise da concentração de glicose .....	37

2.3.3 Dosagem da concentração dos polissacarídeos extracelulares.....	38
2.4. Cálculos dos parâmetros de processo .....	39
2.4.1 Velocidades .....	39
2.4.2 Fatores de Conversão.....	40
2.5 Análise estatística .....	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES .....	62
A CURVAS DE CALIBRAÇÃO .....	62
B DADOS EXPERIMENTAIS .....	63
ANEXO A – COMPARAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS .....	71
ANEXO B – CÁLCULOS DE VELOCIDADE .....	73

## INTRODUÇÃO

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008) indicam o câncer de pele do tipo não melanoma como sendo o mais incidente na população brasileira, com 466 730 novos casos da doença estimados para o ano de 2008, sendo 231 860 no sexo masculino e 234 870 no sexo feminino.

As células neoplásicas não respondem aos mecanismos de controle do crescimento celular, entram em colapso e possuem, portanto, a capacidade de se dividir, de se tornar autônomas, proliferando-se excessivamente, de uma maneira descontrolada, formando uma protuberância ou uma massa tecidual (MONTENEGRO e FRANCO, 1999; ROBBINS e COTRAN, 2005).

As terapias para tratar o câncer incluem as convencionais, tais como cirurgia, quimioterapia e terapia de radiação e uma grande variedade de tratamentos alternativos, na sua maioria ainda experimental. Todas as terapias, exceto a cirurgia, têm em comum a destruição direta ou indireta das células tumorais (GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005).

Na busca de terapias alternativas para o tratamento do câncer, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo da produção de substâncias bioativas em cultivo sólido (ROUT *et al.*, 2005) ou líquido (WANG *et al.*, 2005; FURLAN *et al.* 2009), por fungos da classe dos Basideomicetos, para serem testadas tanto *in vitro* (LAVI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008) quando *in vivo* (WOLFF *et al.*, 2008) no combate a células tumorais.

A classe dos Basideomicetos abriga diversas espécies de fungos, entre as quais as espécies pertencentes ao gênero *Pleurotus*. Estas espécies são conhecidas em vários países pela facilidade de cultivo, valor nutricional e medicinal, sendo este último uma propriedade atribuída aos polissacarídeos que compõem a parede celular dos fungos, chamados de polissacarídeos intracelulares (CHANG e MILES, 1993; GUNDE-CIMERMAN, 1999). Estes polissacarídeos podem ser secretados para fora da célula, sendo então chamados de polissacarídeos extracelulares (WISBECK, 2003).

Os polissacarídeos são carboidratos que envolvem diferentes compostos químicos incluindo os complexos como os  $\alpha$ -glucanos, hetero- $\alpha$ -glucanos, heteroglucanos,  $\alpha$ -manno- $\alpha$ -glucanos etc. (MORADALI *et al.*, 2007). Dentre os numerosos compostos bioativos, os polissacarídeos e, em particular, os  $\beta$ -glucanos extraídos de fungos macroscópicos, são considerados como imunomoduladores que interferem na proliferação e diferenciação de células imunes, como citocinas e interleucócitos (WASSER e WEIS, 1999).

Pesquisadores vêm desenvolvendo trabalhos em frascos agitados e em biorreatores utilizando diferentes espécies de fungos do gênero *Pleurotus*, com a finalidade de otimizar a produção de polissacarídeos, variando a concentração das fontes de nutrientes e também as condições de cultivo como pH, temperatura e aeração (HWANG *et al.*, 2003; WISBECK, 2003; GERN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2005; CHOU *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2008). No entanto, ainda há falta de conhecimento sobre a cultura submersa da espécie *Pleurotus djamor* para a produção de polissacarídeos.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo geral estudar o cultivo submerso, em biorreator de bancada, de uma linhagem de *Pleurotus djamor* isolada no *Campus* da Univille, em Joinville – SC (BORGES *et al.*, 2006), para produção de polissacarídeos extracelulares. O objetivo específico do trabalho foi estudar duas condições de processo ( $[S_0]$  e pH) visando à maximização da conversão de glicose em polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus djamor* 001, utilizando processo descontínuo em meio líquido, tomando como base os resultados obtidos previamente por Wisbeck (2003) no cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833.



## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Neoplasias

Respostas adaptativas reversíveis a alguns estímulos agressivos provocam alterações no material genético que é transmitido a cada nova geração de células filhas, que passam a diferir tanto na morfologia quanto na função da sua célula-mãe, resultando em alguma alteração permanente no padrão normal do crescimento celular. Estas células alteradas são as principais características das células neoplásicas. Elas não respondem mais aos mecanismos de controle do crescimento celular, entram em colapso e possuem, portanto, a capacidade de se dividir, de se tornar autônomas, proliferando-se excessivamente, de uma maneira descontrolada, formando uma protuberância ou uma massa tecidual conhecida como neoplasia, que significa o processo de um “novo crescimento” (STEVENS e LOWE, 1998; MONTENEGRO e FRANCO, 1999).

Uma massa de células neoplásicas é conhecida como tumor, termo originalmente aplicado ao edema causado por uma inflamação, ou seja, para descrever qualquer aumento de volume tecidual, que significa literalmente o processo de um “novo crescimento” (BRASILEIRO, 1998; STEVENS e LOWE, 1998; COTRAN *et al.*, 2000).

O câncer, por sua vez, é o termo comumente utilizado para qualquer neoplasia maligna. O estudo dos diferentes tumores revela que cânceres originários de diferentes tecidos apresentam graus variáveis de agressividade. O desenvolvimento de um tumor a partir de uma única célula transformada em tumor metastático é categorizado por estágios e graus que envolvem três fases: iniciação, promoção e progressão. A fase de iniciação é caracterizada pelas séries de mutações genéticas que ocorrem em seqüência. Para as células iniciadas se tornarem células tumorais é necessária alguma condição ou exposição a agentes promotores (fase de promoção). O fim da fase de promoção é caracterizado pelo aparecimento das primeiras células neoplásicas (GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005).

Alguns tipos de câncer apresentam crescimento lento e latente, enquanto outros propagam-se rapidamente para outras partes do organismo. Dependendo da velocidade de crescimento, destroem o órgão do qual se originam. Quando a alteração é acentuada (fase de progressão), a célula tumoral pode se infiltrar pelos interstícios dos órgãos, ganhar a circulação e, através dos vasos sanguíneos e linfáticos, ser transportada para outros locais, onde cresce sob a forma de massas tumorais filhas, chamadas metástases (BRASILEIRO, 1998; STEVENS e LOWE, 1988; MONTENEGRO e FRANCO, 1999; GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005).

Conforme Cotran *et al.* (2000), a causa básica do desenvolvimento neoplásico está relacionada ao funcionamento inadequado de genes reguladores da proliferação das células transformadas. Em condições normais o crescimento celular é controlado por duas classes de genes, uma que codifica proteínas indutoras da transmissão de sinais positivos para a proliferação (proto-oncogenes), e outra que participa do controle negativo da proliferação (genes supressores). Após alterações mutacionais, os proto-oncogenes se tornam ativados atuando como oncogenes, proporcionando estímulos para o crescimento celular desordenado ao passo que a inativação dos genes supressores desempenha um papel chave na progressão da maioria dos cânceres humanos.

Além dos fatores genéticos, o desenvolvimento do câncer é fortemente dependente da influência do ambiente. A exposição a carcinógenos químicos e físicos é responsável pela maioria dos cânceres nos países industrializados. Cerca de 80 a 90% dos cânceres humanos estão relacionados a carcinógenos encontrados no ambiente, incluindo o ambiente ocupacional (como indústria química e afins) e hábitos associados ao meio sócio-cultural, tais como estresse, alimentação, tabagismo e exposição à luz solar (GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005; INCA, 2008).

#### 1.1.1 Incidência no mundo e no Brasil

Conforme Blot (2005), o câncer afeta toda população mundial, variando geograficamente e diferindo pelo tipo. Um dos padrões geográficos mais distintivos é encontrado no câncer de esôfago, com bolsões de mortalidade excepcionalmente elevados nas áreas ao norte da China central, no litoral Cáspio do Irã e na África do Sul. Em Lixian, na China, por motivos ainda desconhecidos, o câncer de esôfago/cardiógástrico é a causa mais comum de óbito, respondendo por mais de um terço de todos os óbitos entre os adultos. Os cânceres da cavidade oral são mais incidentes na Índia e em regiões no sul da região central da Ásia. No sudeste da China, o câncer de nasofaringe é a malignidade mais comum, apresentando-se também como uma causa comum de morte entre os aleútes e esquimós do Alasca.

Os tumores mais comuns nos países ocidentais tais como o câncer de mama, de cólon e de pulmão também variam geograficamente (BLOT, 2005). Entre as mulheres, o câncer de mama é a causa mais comum de morte sendo responsável por 16% das mortes entre mulheres adultas (WORLD HEALTH STATISTIC, 2008). O câncer de colorretal é uma das neoplasias mais comuns em regiões industrializadas. Exibe amplas variações geográficas na sua frequência, sendo mais comum na região oeste da Europa, na América do Norte, na Nova Zelândia e na Austrália (FENOGLIO-PREISER, 1998).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), o câncer de cólon e reto é a terceira causa mais comum de câncer no mundo, em ambos os sexos, e a segunda causa em países desenvolvidos. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres, porém, o câncer de reto é cerca de 20 a 50% maior em homens na maioria das populações. A sobrevivência média global para este tipo de neoplasia em 5 anos varia entre 40 e 50%, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 12 490 casos em homens e de 14 500 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres.

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão), de estômago (cerca de 1 milhão), de fígado (662 mil), de cólon (655 mil) e de mama (502 mil). Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (*idem ibidem*).

De acordo com a Cancer Facts and Figures (2008), cerca de 1 437 180 novos casos de câncer foram estimados para o ano de 2008 nos Estados Unidos, não incluindo casos de carcinoma *in situ* (câncer não invasivo). Os índices de mortalidade estimados para o ano de 2008 foram de: 40 930 mortes para câncer de mama entre mulheres e 450 mortes entre homens, 49 960 mortes para câncer de cólon e reto, 21 710 mortes para leucemia, 161 840 mortes para pulmão e brônquios, 7 590 mortes para cavidade oral e faringe, 15 520 mortes para câncer de ovários, 34 290 mortes para câncer de pâncreas, 28 660 mortes para câncer de próstata, 14 100 mortes para câncer de bexiga urinária, 3 870 mortes para colo uterino e 7 470 mortes para câncer endometrial.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, apontavam ocorrência de 466 730 casos novos de câncer dos quais 231 860 casos novos, para o sexo masculino e 234 870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) seja o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil). As estimativas para o sexo masculino indicam que o câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), próstata (49 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e de cólon e reto (12 mil) sejam os de maior incidência. Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (19 mil), cólon e reto (14 mil) e de pulmão (9 mil) (INCA, 2008).

### 1.1.2 Formas de tratamento

Conforme o World Cancer Research Fund (2007), a medicina convencional também conhecida como moderna, ocidental ou alopática, depende do diagnóstico da doença através de exames e testes para prever seu tratamento. No caso do câncer, o tratamento inclui basicamente cirurgia, quimioterapia e radioterapia.

A cirurgia é utilizada de forma isolada para estabelecer um diagnóstico tissular, para retirar um tumor primário com margens cirúrgicas livres. É um método seguro de remover tumores sólidos, quando o tumor está restrito a um local específico, no entanto, na maior parte dos tumores sólidos há existência de metástases, sendo importante a avaliação risco/benefício do paciente (BERTINO e HAIT, 2005).

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral, tendo por objetivo destruir rapidamente as células em divisão e deixar as outras intactas. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga, podendo ocasionar efeitos indesejáveis tais como mielodepressão, alopecia e alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) (GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005; INCA, 2008).

A radioterapia é utilizada de forma isolada ou em conjunto com cirurgia e/ou quimioterapia. A maturação, proliferação e diferenciação celulares são afetadas pela radiação ionizante. Os efeitos da radiação mostram-se diferentes em vários níveis sendo que, ao nível celular, por exemplo, o alvo mais sensível à radiação é o DNA (GOEDEGEBUURE *et al.*, 2005).

Segundo Bertino e Hait (2005), existe uma quarta modalidade, que acrescenta uma nova dimensão aos programas terapêuticos, a terapia biológica, na qual utilizam-se citocinas, anticorpos e vacinas. Conforme Goedegebuure *et al.* (2005), ainda existem as terapias alternativas (muitas em experimentação) que incluem: a terapia oncoviral, onde ocorre a lise da célula tumoral através de vírus se replicando seletivamente, a terapia genética, que resulta na inibição da expressão de um gene particular das células tumorais, a terapia antiangiogênese, onde ocorre o bloqueio da vasculatura do tumor, a terapia imune, onde ocorre a lise do tumor através da manipulação do sistema imune do hospedeiro e a terapia com células-tronco, que constitui um tratamento padrão para malignidade hematológica, tendo por objetivo a indução de uma resposta de malignidade *versus* transplante mediada por células T doadoras, que reconhecem proteínas tumorais específicas, proteínas normais superexpressas em células malignas e antígenos de histocompatibilidade.

Outras terapias alternativas são reportadas em literatura, embora a eficácia de muitas permaneça pouco clara e muitas vezes controversa. Estes tratamentos incluem intervenções mente-corpo, como a meditação, regimes nutricionais, suplementos com micronutrientes, plantas medicinais e produtos manipulados, além de técnicas corporais (WORLD CANCER REASERCH FUND, 2007).

Alimentos e produtos naturais têm sido tradicionalmente aceitos como soluções para a saúde, devido a crenças populares, por apresentarem menores efeitos adversos (MANTOVANI *et al.*, 2007). Fungos comestíveis têm sido amplamente utilizados como alimentos funcionais e seus extratos vêm sendo estudados na terapia natural para prevenção e tratamento de tumores, despertando interesse comercial (FIRENZUOLI *et al.*, 2008). Estudos *in vivo* (WOLFF *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009) e *in vitro* (LAVI *et al.*, 2006) têm demonstrado os efeitos imunomodulatórios e antitumorais de cogumelos, o que está discutido no item 1.3.

## 1.2 Biologia dos fungos

Os fungos são organismos eucariotos que originam-se de uma única célula ou de um fragmento da hifa e estas unidades apresentam estruturas variadas (TRABULSI *et al.*, 1999). Embora muitos fungos sejam unicelulares, a maioria é filamentosa, e estruturas como as dos cogumelos consistem em muitos filamentos densamente unidos. Os filamentos dos fungos são conhecidos como hifas e uma massa de hifas é chamada de micélio (RAVEN *et al.*, 2001).

O crescimento das hifas ocorre pela região apical, embora as proteínas sejam sintetizadas em todo o micélio. A parede celular é composta por glucanas, mananas e, em menor quantidade, por quitina, proteínas e lipídios. As glucanas e as mananas estão combinadas com proteínas, formando as glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas. Estudos comprovam que cada camada possui um polissacarídeo dominante. As camadas mais internas contêm  $\alpha$ -(1-3)-glucanas e mananas, enquanto as mais externas contêm mananas e  $\alpha$ -(1-6)-glucanas (RAVEN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 1999).

As glucanas nas células fúngicas são normalmente polímeros de D-glicose, ligados por pontes betaglicosídicas. As mananas, polímeros de manose, representam o material amorfo da parede, sendo diferenciadas em dois tipos: uma manoproteína não-enzimática, envolvida na arquitetura da parede, e uma manoproteína com características enzimáticas relacionada com a degradação de macromoléculas (TRABULSI *et al.*, 1999).

Na taxonomia tradicional, a principal característica que separa as categorias superiores do reino, filos ou divisões, baseia-se principalmente, nas estruturas sexuadas: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e divisão-forma Deuteromycota. Estudos comprovam que com o rRNA 18S, microbiologistas moleculares incluíram a divisão Deuteromycota (Fungos Imperfeitos) nos filos Zygomycota, Ascomycota ou Basidiomycota em função de suas semelhanças (PRESCOTT *et al.*, 2002; LOGUERCIO-LEITE, 2004).

### 1.2.1 Filo Basidiomycota

O filo Basidiomycota compreende 22 300 espécies distribuídas em três classes, 41 ordens e 165 famílias (HAWKSWORTH *et al.* (1995) *apud* LOGUERCIO-LEITE, 2004), englobando os cogumelos comestíveis, como por exemplo os dos gêneros *Pleurotus* e *Agaricus*, os venenosos, os dentiformes e os coralóides (RAVEN *et al.*, 2001).

A maioria das espécies forma uma frutificação macroscópica, com hifas modificadas que originam pseudotecidos e estruturas de reprodução características, os basídios. Estas estruturas são especializadas na formação de esporos exógenos. Os esporos são denominados basidiósporos, sendo geralmente formados nos ápices de prolongamentos denominados esterigmas. Um cogumelo geralmente consiste em um chapéu ou píleo que se assenta em um pedúnculo, também chamado de haste ou estipe. Em alguns gêneros deste filo, a superfície inferior do píleo consiste em estruturas radiadas chamadas lamelas, onde se encontra o himênio (RAVEN *et al.*, 2001; PUTZKE e PUTZKE, 1998). A Figura 1 mostra esquematicamente as principais estruturas de um cogumelo do filo Basidiomycota.

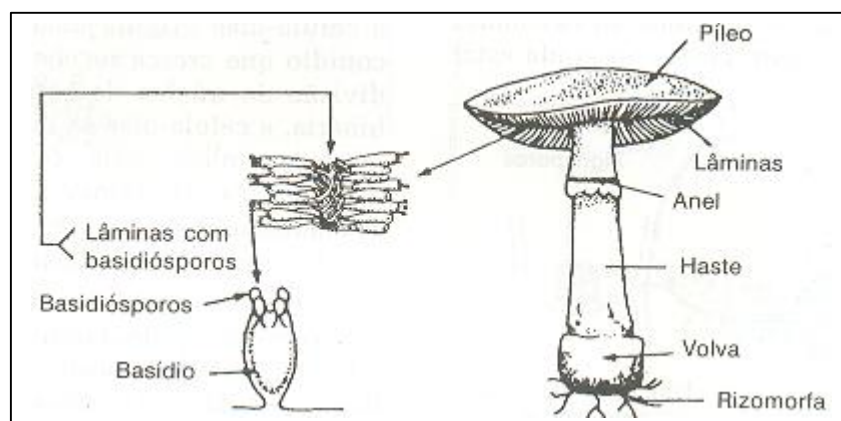


Figura 1. Principais estruturas de um cogumelo do filo Basidiomycota.

Fonte: TRABULSI *et al.*, (1996).

O aglomerado de hifas septadas, bem desenvolvidas e microscópicas forma o micélio, que pode ser facilmente observado ao formar a massa micelial, característica típica deste filo (PUTZKE e PUTZKE, 1998; RAVEN *et al*, 2001).

#### 1.2.1.1 O gênero *Pleurotus*

Dentre as diversas espécies pertencentes à classe dos Basideomicetos, encontram-se aquelas do gênero *Pleurotus*, que constituem-se em fungos comestíveis, comumente chamados de cogumelo ostra, devido à forma de concha do corpo frutífero. No Brasil, são popularmente conhecidos como caetetuba, cogumelo gigante ou fungi. No oriente são conhecidos como “hiratake” e, no caso de cogumelos colhidos menores e crescidos sob condições de menor iluminação e ventilação, são denominados “shimeji” (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984; CHANG, 1999).

Espécies do gênero *Pleurotus* estão amplamente distribuídas geograficamente, podendo ser naturalmente encontradas nas zonas temperadas, tropicais e subtropicais, sendo comuns em áreas temperadas (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984; COEHN *et al.*, 2002).

Na natureza, espécies pertencentes a este gênero, como *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. flabellatus*, *P. cornucopiae*, *P. sapitus* etc., são decompositores primários, que crescem na madeira, geralmente decompondo troncos de árvores e outros resíduos vegetais, podendo ser parasitas ou saprófitas (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984).

Uma das grandes vantagens do cultivo sólido de *Pleurotus* spp. é a sua capacidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais, evitando desperdícios e mostrando-se, portanto, importante do ponto de vista econômico. Esta capacidade deste gênero é atribuída ao seu complexo enzimático lignocelulotítico específico, capaz de degradar tanto lignina quanto celulose (COHEN *et al.*, 2002).

Enzimas como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), lacase e celulase são produzidas por fungos do gênero *Pleurotus*, representando um grande potencial na biotransformação de ligninas e de seus derivados. Esta capacidade de degradar lignina permite também a utilização destes fungos na área ambiental para descontaminação de efluentes papeleiros e têxteis (DURÁN, 2004).



Diversos trabalhos (GERN, 2005; SHIH *et al.*, 2006; FURLAN *et al.*, 2009; DALONSO *et al.*, 2009) vêm aprofundando estudos a partir de corpos frutíferos, micélio e caldo de cultivo de várias espécies de fungos deste e de outros gêneros, apontando a importância dos polissacarídeos constituintes da parede celular. De acordo com SANDULA *et al.* (1995) e MORADALI *et al.* (2007) os polissacarídeos estão localizados na camada intermediária da parede celular e na parte adjacente da membrana plasmática, com a função de manter a rigidez e a forma da célula.

### 1.3 Polissacarídeos fúngicos

Muitas substâncias terapêuticas com atividade imunomoduladora e/ou antitumoral têm sido isoladas de cogumelos, dentre as quais os complexos polissacarídicos e polissacarídeos-proteínas, decorrentes de seus benefícios fisiológicos. Entre os efeitos imunomoduladores destas substâncias bioativas, incluem-se a mitogenicidade e ativação das células imunes, como células hematopoiéticas, linfócitos, macrófagos, células dendríticas e células “natural killers” (NK), resultando na produção de citocinas. Sendo assim, os efeitos terapêuticos dos cogumelos, como atividade antitumoral, supressão de disfunções auto-imunes e alérgicas têm sido associados em muitos casos a seus efeitos imunomoduladores (CUI e CHISTI, 2003; LULL *et al.*, 2005).

Assim sendo, tem sido estudada a estrutura e a composição química (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008; SMIDERLE *et al.*, 2006), além dos métodos de produção e extração (HWANG *et al.*, 2003; SHIH *et al.*, 2008) desses polissacarídeos originários de diferentes linhagens de fungos, principalmente da classe dos basidiomicetos.

Paralelamente, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de validar *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2004; LAVI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008) e *in vivo* (WANG *et al.*, 2005; SARANGI *et al.*, 2006; FURLAN *et al.*, 2009) a capacidade terapêutica dos fungos.

#### 1.3.1 Estrutura e composição dos polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular. Os polissacarídeos, também chamados glucanos, diferem entre si na identidade das suas unidades monossacarídicas respectivas, nos tipos de ligação que as une, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação das cadeias (LEHNINGER, 2006).



Os polissacarídeos com fortes atividades antitumorais, entre outras propriedades terapêuticas, diferem principalmente por suas estruturas químicas. A atividade antitumoral é exibida pela vasta gama de glucanos variando de homopolímeros até heteropolímeros de alta complexidade. A estrutura química dos polissacarídeos antitumorais e imunomoduladores provenientes dos cogumelos da classe dos Basideomicetos varia de acordo com cada espécie (OOI e LIU, 1999; ZHANG *et al.*, 2007).

Como as estruturas naturais das glucanas são muito diversificadas, é difícil definir um protocolo universal para suas análises. Os blocos residuais de açúcar do complexo polissacarídico possuem estruturas similares e diversificados tipos de ligações. As glucanas são lineares ou ramificadas tendo uma cadeia composta por ligações  $\alpha$  e  $\beta$  de unidades de glicose, sendo que algumas delas contêm cadeias laterais que estão ligadas em diferentes posições. Cadeias laterais de heteroglucana contem ácido glucurônico, xilose, galactose, manose, arabinose ou ribose, podendo ter diferentes combinações (ZHANG *et al.*, 2007).

A estrutura primária de um polissacarídeo é definida pela composição monossacarídica, configuração e posição das ligações glicosídicas. As ligações glicosídicas estão associadas aos glucanos (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanos e (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glucanos. Análises precisas de monossacarídeos fornecem a proporção molar de açúcares individuais, sugerindo a presença de oligossacarídeos específicos classificados como N ou O-glucanos. A composição analítica dos monossacarídeos envolve a clivagem de todas as ligações glicosídicas, fracionamento dos monossacarídeos e detecção e quantificação de cada monossacarídeo (OOI e LIU, 1999; SMIDERLE *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2009).

Polissacarídeos extracelulares produzidos em cultura líquida a partir de fungos ligninolíticos como *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. floridanus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* e *P. sajor-caju* foram analisados por Gultirrés *et al.* (1996), mostrando composições estruturais similares. As principais frações apresentaram uma cadeia principal de  $\beta$ -glucanos com ligações (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6). Os monossacarídeos encontrados foram D-glucose, D-manose, D-galactose e proteínas ricas em resíduos de amido e hidroxilas que envolvem ligações polissacarídeos-proteínas. Santos-Neves *et al.* (2008), analisando polissacarídeos extraídos de *P. florida*, identificaram também uma cadeia principal de  $\beta$ -glucanos de ligações (1 $\rightarrow$ 3) com cadeias laterais de glicopeptídeos. Smiderle *et al.* (2006) analisaram a estrutura de polissacarídeos de *P. florida*, observando igualmente a existência de uma cadeia principal de  $\beta$ -glucanos de ligações 1 $\rightarrow$ 3, conforme apresentado na Figura 2.

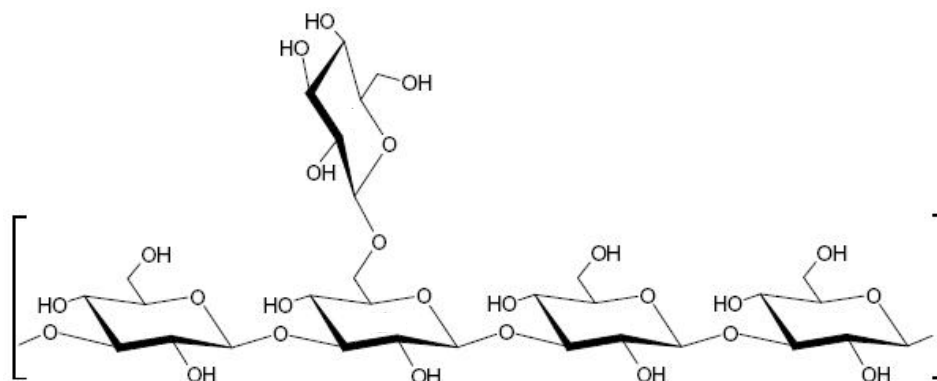


Figura 2. Estrutura de  $\beta$ -glucano obtido a partir de *Pleurotus florida*.

Fonte. SMIDERLE *et al.* (2006).

### 1.3.2 Síntese dos polissacarídeos

Os polissacarídeos podem ser isolados a partir dos corpos frutíferos de fungos cultivados em meio sólido (ROUT *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2008), assim como da biomassa micelial (ZHANG *et al.*, 2004; LAVI *et al.*, 2006, SARANGI *et al.*, 2006) e do caldo de cultivo obtido a partir do cultivo submerso (WANG *et al.*, 2005; LAVI *et al.*, 2006; FURLAN *et al.*, 2009).

O cultivo de fungos para formação de corpos frutíferos é um processo longo e complexo envolvendo a utilização de substratos lignocelulósicos (POKHREL e OHGA, 2007). Em função disso, estudos utilizando fungos pertencentes principalmente à classe dos Basidiomicetos vêm apontando o cultivo submerso como uma alternativa vantajosa quando comparado à produção de corpos frutíferos. Devido ao curto período de tempo e custo, este tipo de processo permite agregar um grande valor ao produto final, tornando-se uma alternativa viável para a produção de substâncias bioativas, sendo essencial para satisfazer a demanda nos mercados internacionais (BEROVIC *et al.*, 2003).

#### 1.3.2.1 Formas de condução de processo em meio líquido

O cultivo submerso é geralmente conduzido em biorreator, que tem como função através de meio líquido, fornecer um ambiente favorável para um microrganismo sintetizar o produto de interesse, seja a biomassa ou algum metabólito (WAITES *et al.*, 2001; GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004).

Existem diversos tipos de biorreatores, sendo classificados de diversas maneiras, porém o mais amplamente empregado é o reator agitado mecanicamente (*Stirred Tank Reactor - STR*), conhecido também como reator de mistura (SCHMIDELL e FACCIOTI, 2001). Os principais fatores que interferem no desempenho de um biorreator, e que podem ser controlados são o microrganismo utilizado, o método de preparo do inóculo, a concentração microbiana no biorreator, a composição do meio de cultivo, a temperatura, o pH, o fornecimento de oxigênio e de nutrientes durante o desenvolvimento do processo (WAITES *et al.*, 2001).

Conforme Shmidell. (2001), um cultivo submerso pode ser conduzido de diversas formas, sendo que a escolha depende de fatores como as características do microrganismo, do meio de cultivo e das etapas de recuperação do produto.

Segundo Borzani *et al.* (2001) e Galvagno e Forchiassin (2004), os fungos podem crescer em processo conduzido em regime descontínuo, que corresponde a um sistema fechado e, em sistema aberto, em regime contínuo. No entanto, no caso específico do cultivo de fungos filamentosos, processos descontínuos muito prolongados, podem levar a mudanças na reologia do meio, dificultando a transferência de oxigênio. Conforme Carvalho e Sato (2001), devido à baixa velocidade de crescimento desses microrganismos, o risco de contaminação também é maior em cultivos muito prolongados, como é o caso do processo contínuo.

Algumas características do processo descontínuo, no entanto, podem ocasionar baixos rendimentos e/ou produtividades, tornando este tipo de cultivo pouco vantajoso em relação a outros para várias aplicações. Além dos tempos mortos, a adição de substrato de uma só vez no início do processo pode ocasionar efeitos de inibição ou repressão (CARVALHO e SATO, 2001).

Uma alternativa que tem sido buscada por alguns grupos de pesquisadores para reduzir estes problemas é o uso dos processos semicontínuos (BONATTI *et al.*, 2008a) e descontínuo alimentado (BONATTI *et al.*, 2008b).

#### 1.4 Exigências nutricionais dos fungos

Como todos os organismos vivos, os fungos utilizam os compostos químicos presentes no meio, como fonte de energia e para seu crescimento, reprodução e manutenção (WAITES *et al.*, 2001; GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004).

Conforme Galvagno e Forchiassin (2004), os fungos mostram um requerimento indispensável de determinados elementos, chamados de elementos essenciais, sem os quais não poderiam crescer. Os macroelementos são aqueles elementos necessários em maiores concentrações no meio e microelementos aqueles requeridos em menor quantidade.

Os macronutrientes carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre são os principais constituintes dos polímeros celulares como lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos, sendo assim, requeridos em grande quantidade. Os microrganismos utilizam como fonte de carbono a energia de diversos açúcares, tais como glicose, polissacarídeos como amido e celulose, ou ainda em grandes escalas matérias-primas naturais. Como fonte de nitrogênio, utilizam-se sais, como o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , provocando reduções significativas de pH. Como fonte de fósforo, utilizam-se fosfatos solúveis como o monoamônio fosfato (MAP), ou diamônio fosfato (DAP), passando a ser fontes de nitrogênio e fosfato simultaneamente (SCHIMIDELL, 2001; GALVAGNO e FORCHIASSI, 2004).

Dentre os carboidratos testados como fonte de carbono em cultura submersa, utilizam-se glicose, sacarose, lactose, maltose e frutose. Como fonte de nitrogênio inclui-se peptona, extrato de levedura, levedo, coco, girassol e óleo de oliva, farinha de amendoim, derivados de soja, como farinha e molho de soja (shoyu) entre outros, apresentando melhores resultados em termos de crescimento micelial (CUI e CHISTI, 2003; SHIH *et al.*, 2008).

Os micronutrientes também chamados de elementos traço incluem manganês, zinco, cobalto, molibdênio, níquel, cobre e selênio, que são frequentemente utilizados em baixas concentrações. Estes micronutrientes cumprem três funções básicas: atuam como coenzimas ou co-fatores enzimáticos, transferem elétrons em reações de oxi-redução e regulam as reações osmóticas (WAITES *et al.*, 2001; PRESCOTT *et al.*, 2002; GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004).

Os fatores de crescimento (aminoácidos e vitaminas), como tiamina, riboflavina, biotina, cobalamina, ácido pantotéico, ácido nicotínico, entre outros, são componentes orgânicos que não são produzidos pelos próprios microrganismos, mas que são essenciais para os cofatores enzimáticos e outros componentes celulares, sendo necessária uma mistura equilibrada entre macronutrientes, micronutrientes e fatores de crescimento para que o microrganismo desenvolva-se da melhor maneira possível (SCHIMIDELL, 2001; PRESCOTT *et al.*, 2002).

### 1.5 Meios e condições de cultivo para produção de polissacarídeos fúngicos

As condições do meio de cultivo devem estar relacionadas às necessidades nutricionais do microrganismo, a fim de que ocorra a síntese do produto de interesse, que tem forte influência tanto na formação do metabólito de interesse, como dos polissacarídeos intracelulares (SHIH *et al.*, 2006) e extracelulares (HWANG *et al.*, 2003; WISBECK, 2003; GERN *et al.*, 2008; SHIH *et al.*, 2008; FURLAN *et al.*, 2009), quanto na produção de biomassa (HWANG *et al.*, 2003; WISBECK, 2003; CHOU *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2008).

Pesquisadores vêm desenvolvendo trabalhos em frascos agitados e em biorreatores utilizando diferentes espécies de fungos com a finalidade de otimizar a produção de polissacarídeos, variando a concentração das fontes de nutrientes e também as condições de cultivo como pH, temperatura e aeração (HWANG *et al.*, 2003; WISBECK, 2003; GERN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2005; CHOU *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2006; SHIH *et al.*, 2008).

WISBECK (2003) investigou a produção de biomassa e polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, em biorreator, utilizando meio POL (5,0 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 1,0 g L<sup>-1</sup> peptona, 1,0 g L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>). Um planejamento experimental 2<sup>3</sup> foi utilizado para verificar a influência dos fatores ambientais como a concentração inicial de substrato (glicose) nos níveis 20 e 40 g L<sup>-1</sup>, o pH nos níveis 4,0 e 6,0 e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K<sub>L</sub>a) nos níveis 15,0 e 27,0 h<sup>-1</sup>, em processo descontínuo, com temperatura controlada em 30°C e agitação em 300 min<sup>-1</sup>. Ao analisar a influência da concentração inicial de glicose, a autora observou que quanto maior a concentração de glicose, maior a concentração de biomassa, podendo-se ter um ganho de até 4,5 g L<sup>-1</sup> de células quando a concentração de glicose passa de 20 para 40 g L<sup>-1</sup>. O pH 4,0 maximizou a concentração de biomassa (X = 12,86 g L<sup>-1</sup>) e o fator de conversão de substrato em célula (Y<sub>X/S</sub> = 0,321 g g<sup>-1</sup>) e o K<sub>L</sub>a = 27,0 h<sup>-1</sup> maximizou a produtividade em células (Q<sub>X</sub> = 0,0315 g L h<sup>-1</sup>). A produção de polissacarídeo extracelular foi maximizada quando utilizou-se K<sub>L</sub>a inicial igual a 15 h<sup>-1</sup>, pH 4,0 e S<sub>0</sub> = 40 g L<sup>-1</sup> (P = 1,325 g L<sup>-1</sup>, Y<sub>P/S</sub> = 0,0815 g g<sup>-1</sup> e Q<sub>Pmáx</sub> = 0,0075 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

No estudo realizado por Hwang *et al.* (2003) utilizando o fungo *Phellinus linteus* em frascos agitados e em biorreator, determinou-se pH 4,0 e 30° C como condições ótimas e meio contendo 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3 g L<sup>-1</sup> de milho em pó, 0,68 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,55 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, como ideal para o cultivo. Utilizando estas condições em biorreator, o crescimento micelial foi continuamente aumentando até o final do cultivo, atingindo uma concentração de 11 g L<sup>-1</sup> em 15 dias. A produção máxima de polissacarídeo extracelular alcançado foi de 3,3 g L<sup>-1</sup> em 14 dias.

Chou *et al.* (2006) testaram o desempenho de *Tremella fuciformis* em frascos agitados para otimização das condições de produção de biomassa micelial e de polissacarídeo extracelular. Determinou-se valores de temperatura igual a 28° C e pH 8,0 como condições ótimas de processo e meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 2 g L<sup>-1</sup> peptona, 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 0,46 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, como sendo o ideal para o cultivo. Utilizando as melhores condições encontradas em experimento em frascos agitados, os autores avaliaram o desempenho do processo em biorreator agitado e em reator de fluxo ascendente “air lift”. Os melhores resultados foram obtidos com reator de fluxo ascendente, com X<sub>máx</sub> = 10,4 g L<sup>-1</sup>, P<sub>máx</sub> = 3,05 g L<sup>-1</sup> e Y<sub>P/S</sub> = 0,15 g g<sup>-1</sup>.

Conforme trabalho realizado por Shih *et al.* (2006), com intuito de investigar as exigências nutricionais de *Androdia cinnamomea* em cultura submersa para produção de polissacarídeos intra e extracelular, foram realizados diversos testes relacionados à composição do meio de cultivo: lactose, sacarose, maltose, frutose e glicose (1 a 4 %) como fonte de carbono; extrato de milho, extrato de levedura e extrato de malte, como fontes de nitrogênio (0,5 a 3%); e plantas oleaginosas como soja, amendoim, coco, girassol e óleo de oliva (0,1 a 1 % em volume) para estimular o crescimento de biomassa micelial. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados, incubados a 25°C e 100 min<sup>-1</sup>. Os meios contendo 4% de maltose e 4% de glicose alcançaram concentrações relativamente altas de biomassa micelial, de 8,29 e 8,69 g L<sup>-1</sup> (massa seca), respectivamente, após 10 dias de cultivo. As concentrações máximas de polissacarídeos extracelulares foram de 1,482 g L<sup>-1</sup> e 1,318 g L<sup>-1</sup> após 10 dias de cultivo, em meio contendo 4% de lactose e 4% sacarose, respectivamente.

Zou (2006) realizou um processo de produção simultânea de polissacarídeo e ergosterol pelo cultivo em batelada alimentada de *Agaricus blazei*. Os efeitos da fonte de carbono e da concentração inicial de açúcar foram investigados para melhorar a densidade celular final e a produtividade dos metabólitos. O processo foi iniciado com as concentrações de glicose de 20, 30, 40 e 50 g L<sup>-1</sup>, em biorreator de 7 L e alimentado com 15 g L<sup>-1</sup> de glicose em intervalos de 24 horas para aumentar a concentração de glicose total quando a concentração deste açúcar no caldo era inferior a 15 g L<sup>-1</sup>. O autor obteve concentração máxima de biomassa micelial de 2,25 g L<sup>-1</sup>, de polissacarídeos extracelulares igual a 1,14 g L<sup>-1</sup> e produtividade global igual a 162,8 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>.

Gern *et al.* (2008) testaram a suplementação do meio de cultivo com água de maceração de milho (10 e 20 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2 ou 5 g L<sup>-1</sup>) e sulfato de amônio (0 ou 5 g L<sup>-1</sup>) variando a concentração da fonte de carbono (glicose) entre 20 ou 40 g L<sup>-1</sup> com vistas a maximização da produção de biomassa e polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em frascos agitados. O meio com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e ausência de sulfato de amônio foi a melhor condição para produção de polissacarídeos (20,05 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>). Apesar dos resultados indicarem o uso de extrato de levedura os autores optaram pelo meio contendo água de maceração de milho com produtividade em polissacarídeo de 17,01 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> devido ao menor custo, este meio foi escolhido para avaliação do K<sub>L</sub>a (10,2 e 19,3 h<sup>-1</sup>), em biorreator utilizando pH 4,0 e temperatura de 30°C. Os melhores resultados foram obtidos com K<sub>L</sub>a = 10,2 h<sup>-1</sup>, onde X<sub>máx</sub> = 27,72 g L<sup>-1</sup>, P<sub>Xmáx</sub> = 4,56 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, Y<sub>X/S</sub> = 1,18 g g<sup>-1</sup>, Q<sub>P</sub> = 168,33 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> e Y<sub>P/S</sub> = 47,14 mg g<sup>-1</sup>.

Fan *et al.* (2007), utilizando o fungo *Agaricus blazei* Murril, investigaram as condições nutricionais, temperatura e pH, em experimentos realizados em frascos de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo e em biorreator (2 L) com intuito de maximizar a produção de polissacarídeos extracelulares. Em frascos agitados foi definido que o meio de cultivo contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,6 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,3 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, sob temperatura de 30°C e pH 6,1, agitados duas vezes ao dia durante uma semana, promoveu os melhores resultados para a produção de polissacarídeos extracelulares, atingindo 0,382 g L<sup>-1</sup>. Em biorreator com volume de trabalho de 1 L, foi conduzido experimento utilizando este meio de cultivo, sob aeração de 1vvm e frequência de agitação de 150 min<sup>-1</sup>, resultando na produção máxima de polissacarídeo extracelular de 0,321 g L<sup>-1</sup>.

Bonatti *et al.* (2008a) realizaram processo semicontínuo com cortes de 50 e 75% de volume com a finalidade de avaliar a conversão de glicose em polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus*. Os experimentos foram realizados em biorreator (5 L) contendo 4 L de meio POL, pH 4,0, temperatura de 30°C, vazão de ar 0,25 L min<sup>-1</sup> e frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup>, com concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup>. Os cortes foram realizados quando a concentração residual de glicose atingia 20 g L<sup>-1</sup>. Segundo os autores foram encontrados valores mais elevados de Y<sub>X/S</sub> no primeiro e segundo ciclos com corte de 75% (0,5 e 0,4 g g<sup>-1</sup> respectivamente), enquanto que o processo com corte de 50% favoreceu Y<sub>P/S</sub> (0,09 g g<sup>-1</sup>) e Q<sub>Pmáx</sub> (9 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) no segundo ciclo.

Bonatti *et al.* (2008b) estudaram também a produção de polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus* em processo batelada alimentada, utilizando os mesmos parâmetros utilizados por Bonatti *et al.* (2008a). Quando a concentração de glicose atingia  $25 \text{ g L}^{-1}$  o biorreator era realimentado com solução concentrada desse substrato para que sua concentração atingisse  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Neste caso, os autores observaram que  $P_m = 0,8 \text{ g L}^{-1}$  e  $Q_{P_{\text{máx}}} = 3,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , após aproximadamente 230 horas de cultivo equivalendo a 39% do valor obtido pelos mesmos autores em processo semi contínuo.



## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Microrganismo e Manutenção

*Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, isolado de solo do *campus* Joinville da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE (BORGES *et al.*, 2006), foi utilizado para o cultivo e síntese de polissacarídeos. A linhagem foi mantida em meio sólido TDA (Trigo- Dextrose-Ágar), sob refrigeração (4°C) e os repiques foram feitos a cada três meses. O meio TDA é constituído de 20,0 g de dextrose e 15,0 g de agar por litro de extrato de trigo, sendo que o pH variou entre 6,0 e 6,5 (pH natural do meio), conforme descrito por FURLAN *et al.* (1997).

#### 2.1.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frasco da marca DURAN de 2 L contendo 400 mL de meio POL. O meio POL foi preparado conforme descrito por Cavazzoni e Adami (1992): 5,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de peptona; 1,0 g de  $\text{CaCO}_3$ ; 1,0 L de  $\text{H}_2\text{O}$  qsp; pH 6,5 – 7,0), com concentração inicial de glicose igual a  $20 \text{ g L}^{-1}$ . O frasco foi inoculado com micélio de 7 dias, contido em uma placa de Petri. Após a inoculação, o frasco foi incubado a 30°C e mantido sob agitação recíproca de  $120 \text{ min}^{-1}$ , por seis dias. A fração de inóculo utilizada foi de 10%, ou seja, 400mL para um volume final de 4L (WISBECK, 2003).

#### 2.2.2 Meio e Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em duplicata, em regime descontínuo, em reator de mistura completa modelo Biostat B, B. BRAUN, com dorna de vidro de capacidade de volume útil de 5,0 L e volume de trabalho de 4,0 L. O sistema possuía três turbinas, estando a primeira turbina situada imediatamente acima do anel dispersor de ar. O diâmetro das turbinas era de 63mm e a distância entre elas de 75mm. O pH foi controlado pela da adição automática de soluções de NaOH 6M e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  12N, tendo acoplado ao biorreator um sensor de pH modelo 405/DPAS-K8S/325, INGOLD ELECTRODES.

Conforme Wisbeck (2001), a temperatura foi controlada em 30° C através de sensor de temperatura (modelo PT 100, B.BRAUN) e um banho termostático. A vazão de ar foi mantida em 0,25 L min<sup>-1</sup> e a frequência de agitação fixada em 300 min<sup>-1</sup>. No entanto durante o cultivo não foi monitorado a pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO<sub>2</sub>) através do eletrodo polarográfico, devido a aderência dos pellets formados à sonda de pO<sub>2</sub> dificultando assim a medida do K<sub>L</sub>a.

Na preparação do sistema, o biorreator contendo 1,5 L de água destilada foi esterilizado em autoclave a gás a 121°C por 20 minutos. Neste processo, os sensores de temperatura e pH foram esterilizados juntamente com o biorreator. O meio de cultivo (POL), concentrado em 1,5 L, a solução de glicose, concentrada em 0,4 L e a solução de CaCO<sub>3</sub>, concentrada em 0,2 L, foram esterilizados separadamente. O volume de inóculo foi de 0,4 L, completando o volume de trabalho de 4L e, tendo-se uma fração de inóculo equivalente a 10% v/v (WISBECK, 2003). Após toda a preparação e montagem do sistema, foi dado início ao processo de cultivo, mostrado nas Figuras 3 e 4.

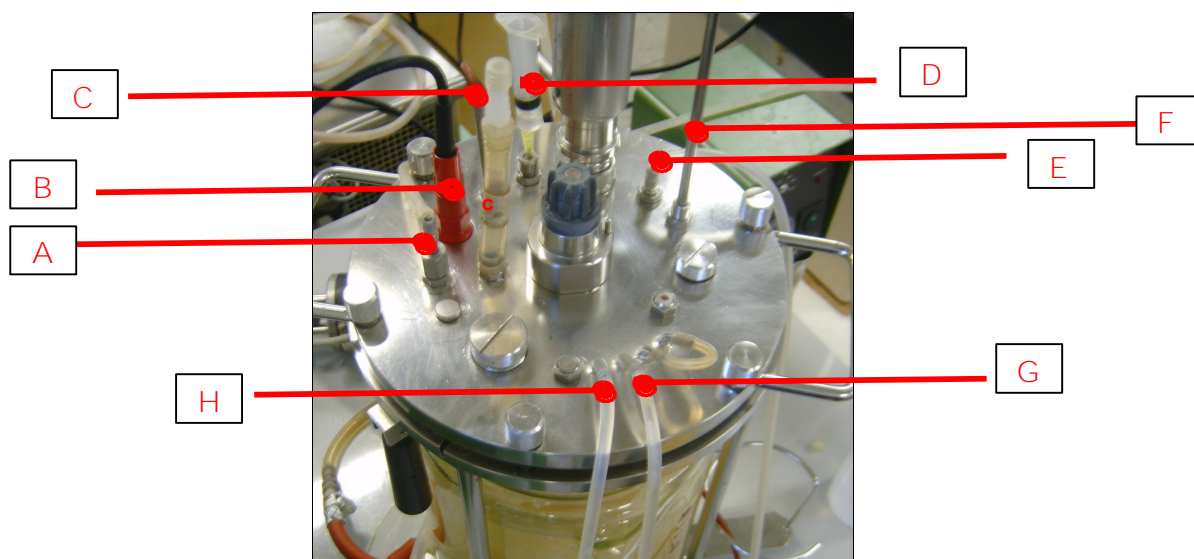


Figura 3. Vista superior do biorreator destacando seus componentes: saída de meio de cultivo e biomassa (A), sensor de pH (B), entrada de meio de cultivo e inóculo (C), antiespumante (D), entrada de ar (E), dispositivo circular interno para retirada do acúmulo de micélio nas paredes internas do biorreator (F), entrada de ácido (G), entrada de base (H).

Fonte: Libardi (2007).

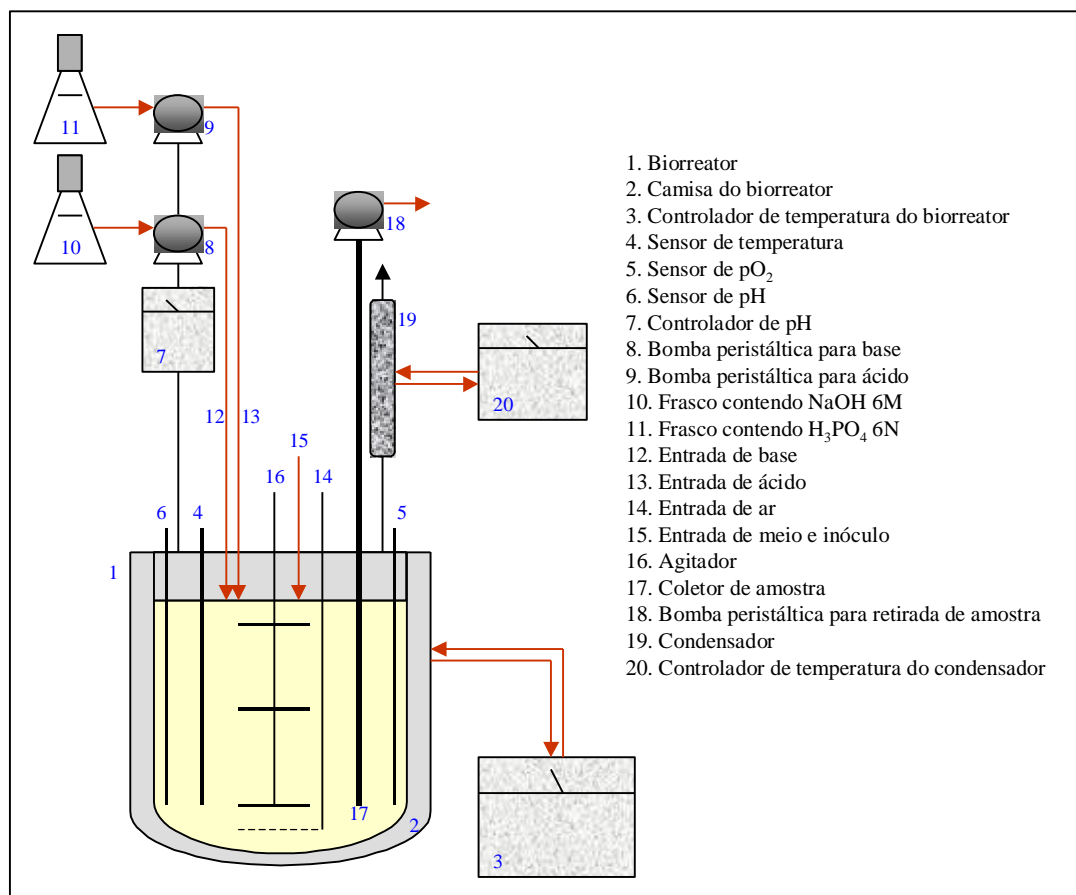


Figura 4 – Esquema do sistema de fermentação.

Fonte: Wisbeck, 2003.

Foi utilizado um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 1) para avaliar a influência da concentração inicial de glicose (40 e 50 g L<sup>-1</sup>) e do pH (3,0 e 4,0), em processo descontínuo, sobre a concentração de biomassa (X) e de polissacarídeo extracelular (P). Estes valores foram baseados nos resultados obtidos por Wisbeck (2003) que verificou que para *Pleurotus ostreatus* a concentração inicial de glicose de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 maximizaram Y<sub>P/S</sub>. Como a concentração de 40 g L<sup>-1</sup> representou o nível superior do planejamento para esta variável e o pH 4,0, o nível inferior, concluiu-se que uma concentração mais elevada de glicose inicial (50 g L<sup>-1</sup>) e um valor menor de pH (3,0) deveriam ser testados a fim de maximizar a produção de polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus djamor*.

Tabela 1. Planejamento fatorial ( $2^2$ ) dos experimentos. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente.

Variáveis	Níveis	
Concentração inicial de glicose (g L <sup>-1</sup> )	-	+
pH	3,0	4,0

Foram retiradas amostras periódicas para análise da concentração de glicose, de células e de polissacarídeos. A medida da concentração de biomassa foi realizada imediatamente após a amostragem. Parte da amostra foi tratada conforme descrito no item 2.3.3 para posterior análise da concentração de polissacarídeos. O restante da amostra foi congelado para posterior análise da concentração de glicose. A partir do momento em que a biomassa entrou em fase estacionária, as dosagens de glicose passaram a ser feitas imediatamente após a amostragem a fim de se definir o momento de interrupção do processo (esgotamento do substrato).

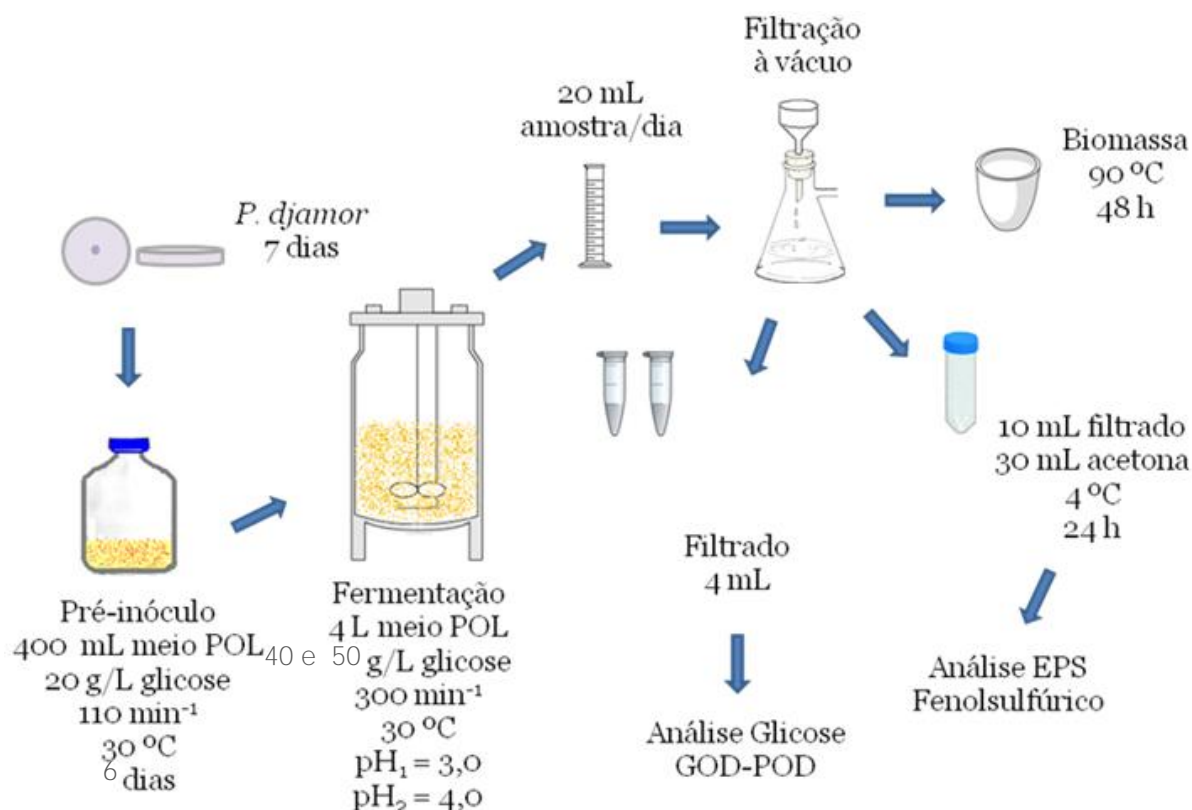


Figura 5 – Esquema de metodologia utilizada.

## 2.3 Métodos analíticos

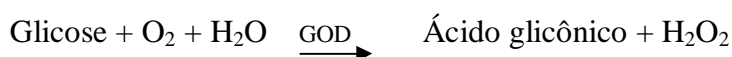
### 2.3.1 Análise da concentração de biomassa micelial

A concentração da biomassa micelial foi determinada pelo método gravimétrico como segue: foi retirada diariamente uma amostra de aproximadamente 20 mL de caldo de cultivo, filtrada em papel Whatman nº1, lavada com água destilada, transferida a cadinhos pré-pesados e seca por 48h a 90°C. A massa obtida foi dividida pelo volume da amostra, expressando-se assim a concentração celular em g L<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Análise da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método Glicemia Enzimática (WIENER LABORATÓRIOS), em que a enzima glicose oxidase (GOD) catalisa a reação de oxidação da glicose a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e o fenol, através de uma reação oxidativa catalisada pela enzima peroxidase (POD), formam um complexo de cor avermelhada (quinoneimina), cuja absorvância medida em 500 nm é proporcional à concentração de glicose na amostra (TRINDER, 1969). A seqüência reacional é descrita a seguir:



As amostras foram diluídas em água deionizada de forma a obter-se soluções de glicose com concentração variando entre 0,1 e 1,0 g L<sup>-1</sup>. Em seguida, 20 µL destas soluções diluídas foram adicionados a 1,0 mL de reativo GOD-POD e a mistura foi incubada a 37 °C por 5 minutos. Após este período realizou-se as medições de absorvância em espectrofotômetro BEL PHOTONICS, modelo UV – 2000, utilizando comprimento de onda de 505 nm. O branco constituiu-se de uma preparação idêntica, contudo, a amostra foi substituída por água. Todas as análises foram realizadas em duplicata para cada amostra.

A concentração de glicose nas amostras foi calculada através de equações obtidas por regressão linear, com base nas leituras de absorvância de quatro soluções padrão de glicose, 0,1, 0,5, 0,8 e 1,0 g L<sup>-1</sup>.

### 2.3.3 Dosagem da concentração dos polissacarídeos extracelulares

Após a separação da biomassa por filtração, 10 mL do caldo foram tratados com acetona resfriada a 8° C, na proporção 3:1 (v/v) (MAZIERO, 1996), e mantidos por 24 horas sob refrigeração (4° C), para precipitação dos polissacarídeos extracelulares. Após este período, realizou-se a centrifugação a 4500 min<sup>-1</sup> (3373 g) por 5 min. Retirou-se o sobrenadante e procedeu-se a lavagem do precipitado, por duas vezes, utilizando uma solução acetona:etanol:água destilada, na proporção 3:1:1 (v/v/v) (CAVAZZONI e ADAMI, 1992).

Nos experimentos utilizando 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 4 e 50 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 3, o precipitado foi solubilizado em 10 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 75% conforme descrito por PARK *et al.* (2002). No entanto, este método foi alterado nos laboratórios da Univille, de modo que o volume de ácido nos experimentos utilizando 40 g L<sup>-1</sup> e pH 3 e 50 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 4 foi de 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (75%) e 7 mL de H<sub>2</sub>O. Cabe esclarecer que testes comparativos entre as duas metodologias foram realizados, não tendo sido observadas alterações nos resultados, o que permitiu a mudança da metodologia durante os experimentos (ANEXO A).

Quando necessário, as amostras solubilizadas foram diluídas em água deionizada de forma a se obter soluções com concentração de glicose, que é o monossacarídeo proveniente da hidrólise ácida sofrida pelo polissacarídeo, entre 0,01 e 0,1 g L<sup>-1</sup>.

Em tubos de ensaio, 0,5 mL das amostras foram misturados a 0,5 mL de solução de fenol 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tempo de reação foi de 20 minutos e em seguida mediu-se a absorbância a 490 nm em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV – 160A. Todas as análises foram realizadas em duplicata para cada amostra (DUBOIS *et al.*, 1956).

Paralelamente, uma curva padrão foi preparada, substituindo-se a amostra por 0,5 mL de soluções padrão de glicose, com concentrações variando entre 0,01 e 0,1 g L<sup>-1</sup>. Baseando-se nas leituras obtidas com os padrões, foi definida uma equação (Apêndice A), por regressão linear, através da qual foram calculadas as concentrações de açúcar total nas amostras.

## 2.4 Cálculos dos parâmetros de processo

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os cálculos dos parâmetros de processo foram feitos com base nas curvas cinéticas, traçadas a partir de todos os pontos das duas repetições.

### 2.4.1 Velocidades

#### a) Produtividades

A produtividade representa a taxa de formação de biomassa ou de produto, e é um parâmetro importante quando se avalia a capacidade de produção de biomassa ou do produto desejado (NIELSEN, 2001). O desempenho de um cultivo submerso pode ser avaliado através das produtividades totais e máximas em biomassa ( $Q_X$  e  $Q_{Xmáx}$ ) e em produto ( $Q_P$  e  $Q_{Pmáx}$ ) que são representadas pelas equações 1, 2, 3 e 4 respectivamente .

$$Q_X = \frac{X - X_0}{t} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad (1)$$

$$Q_{Xmáx} = \frac{X_m - X_0}{t_{mx}} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad (3)$$

$$Q_{Pmáx} = \frac{P_m - P_0}{t_{mp}} \quad (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \quad (4)$$

Cabe esclarecer que o tempo de processo (t) foi definido como aquele referente ao momento em ocorreu a estabilização da formação de produto (P), chamado neste trabalho de concentração final de produto. A concentração de biomassa neste ponto foi chamada de concentração final de biomassa (X). Já  $t_{mx}$  e  $t_{mp}$  foram obtidos traçando-se uma reta partindo de  $X_0$  e  $P_0$ , respectivamente e tangenciando as respectivas curvas em seus pontos de inflexão. As coordenadas desses pontos são  $X_m$  e  $t_{mx}$  para a curva de  $X = f(t)$  e  $P_m$  e  $t_{mp}$  para a curva de  $P = f(t)$ .

b) Velocidade específica máxima de crescimento microbiano

As velocidades específicas de crescimento microbiano ( $\mu$ ) ao longo do cultivo foram calculadas pelo método de Le Duy Zargic, considerando:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Analisando-se os diferentes valores de  $\mu$  ao longo do cultivo identificou-se seu valor máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ).

#### 2.4.2 Fatores de conversão

Os fatores de conversão são parâmetros que representam a maneira pela qual as células distribuem o carbono obtido do substrato através das diferentes rotas metabólicas até se transformar em produto. Estes coeficientes, também conhecidos por fatores de conversão ou rendimento podem ser considerados como uma determinação geral dos fluxos metabólicos, sendo que quantificam o montante de substrato convertido em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e substrato convertido em produto ( $Y_{P/S}$ ) (NIELSEN, 2001). Os coeficientes utilizados neste trabalho são definidos pelas equações 5 e 6.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad (5)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad (6)$$

Os fatores de conversão foram calculados com base no mesmo tempo de processo (t) utilizando para cálculo das produtividades totais.



## 2.5 Análise Estatística

Para traçar as curvas nos gráficos, através dos pontos experimentais, foi utilizado o Programa Microsoft Office Excel 2007® e o Programa Emerson, desenvolvido pelo IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo.

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado a análise de Pareto (Barros Neto *et al.*, 1996) que permite identificar e quantificar o efeito de cada um das variáveis e de suas interações nos experimentos realizados. Para tanto, foram traçadas as curvas cinéticas individuais de cada repetição, de onde foram obtidos os valores de biomassa formada ( $\Delta X$ ) e de produto formado ( $\Delta P$ ) para cada repetição. Onde  $\Delta X = X - X_0$  g L<sup>-1</sup> e  $\Delta P = P - P_0$  g L<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam as curvas cinéticas de consumo de glicose (S), formação de biomassa (X) e produção de polissacarídeos extracelulares (P), obtidos em experimentos feitos em duplicata, variando a concentração inicial de glicose em 40 e 50 g L<sup>-1</sup> e o pH em 3,0 e 4,0, de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (Tabela 1).

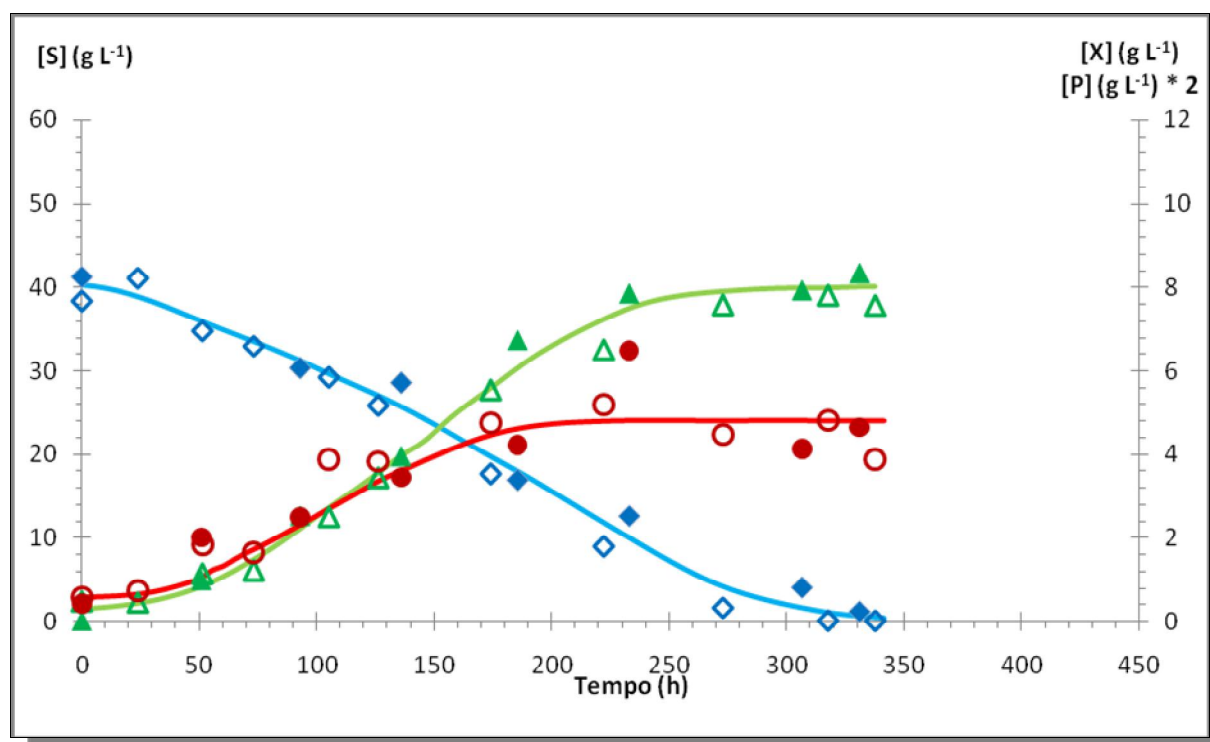


Figura 6. Variação das concentrações de glicose (S,  $\diamond$ ), biomassa (X,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P,  $\circ$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

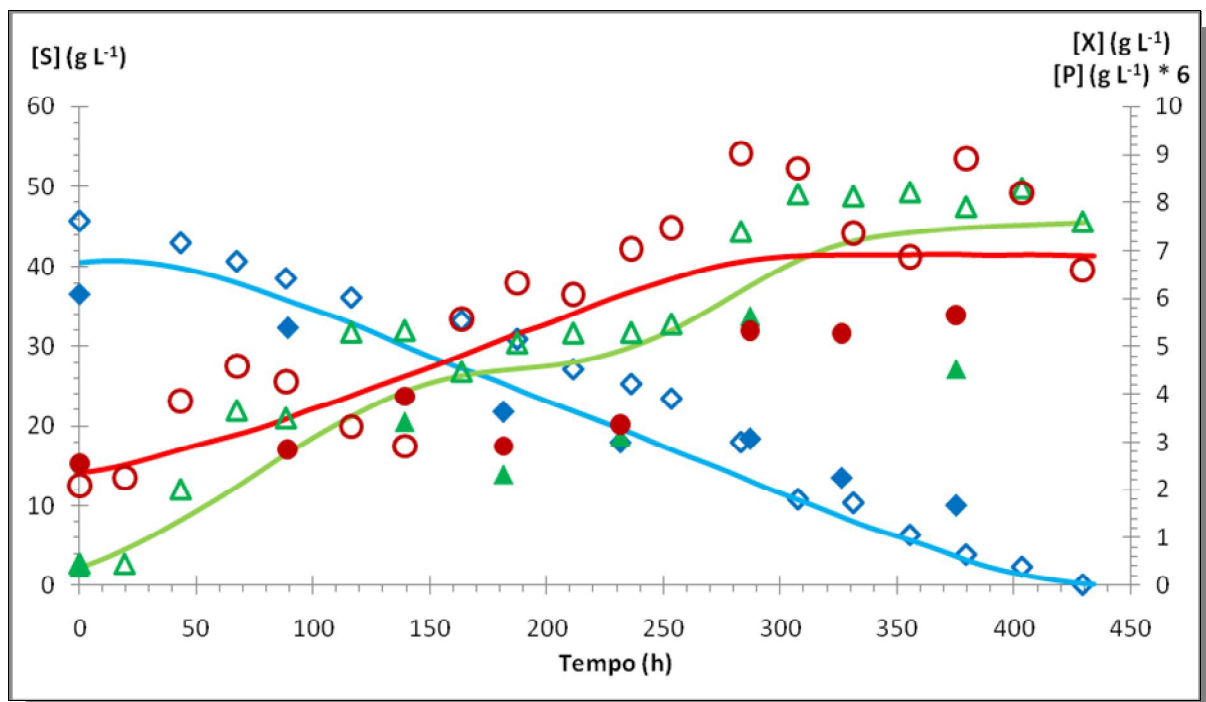


Figura 7. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

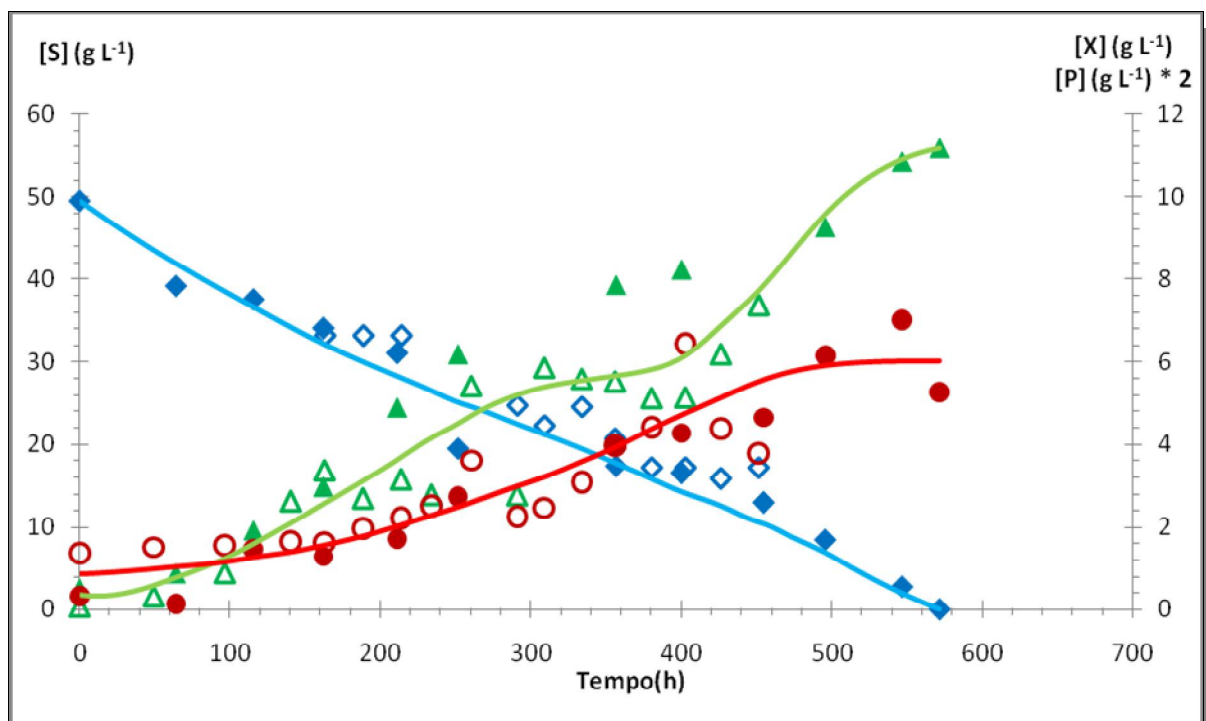


Figura 8. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

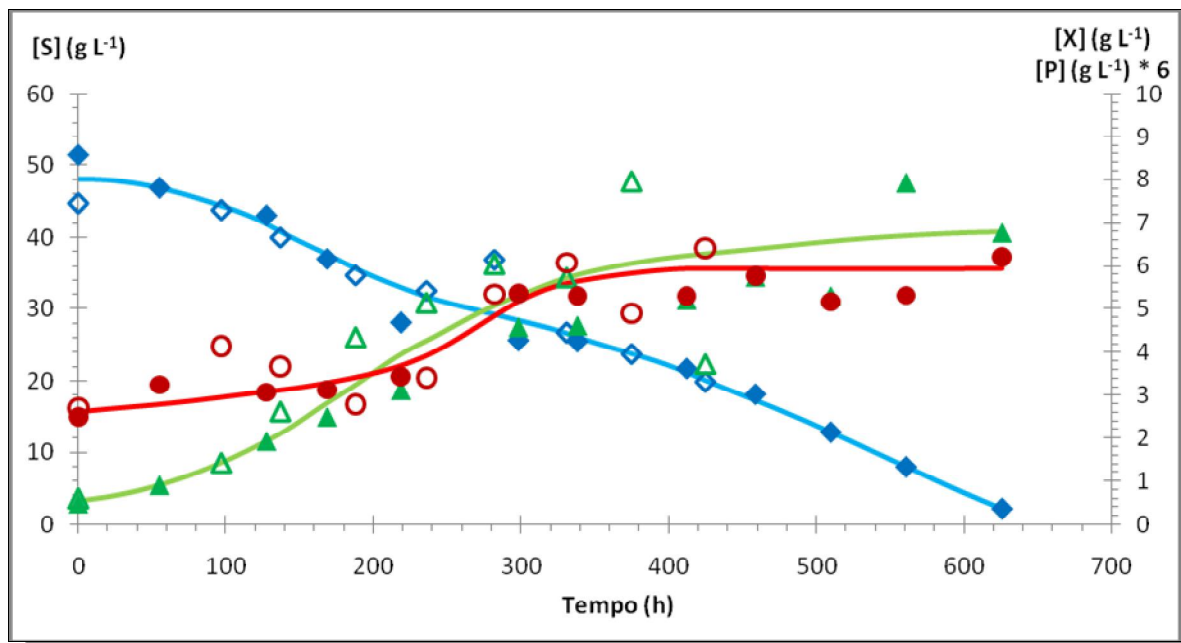


Figura 9. Variação das concentrações de glicose (S,  $\diamond$ ), biomassa (X,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas.

Analisando-se os perfis cinéticos, observa-se que o tempo necessário para o consumo do substrato aumenta com o aumento da concentração inicial de substrato de 40 para 50 g L<sup>-1</sup>, 341 e 571 horas (Figuras 5 e 7, respectivamente) e 429 e 650 horas, aproximadamente (Figuras 6 e 8, respectivamente). O mesmo efeito foi observado quando o pH foi aumentado de 3,0 para 4,0 (comparação entre as Figuras 5 e 6 e entre as Figuras 7 e 8).

Ao analisar o comportamento do crescimento microbiano nas diferentes condições estudadas, observa-se que em algumas situações (Figuras 6 e 7) existe nitidamente uma segunda fase de latência, onde, o microrganismo parece estar preparando seu maquinário biológico para degradação de um novo substrato, uma vez que em seguida retoma o crescimento. Acredita-se que este fenômeno ocorra devido à aderência de polissacarídeos extracelulares aos “pellets” de micélio, dificultando a transferência do substrato para o interior da célula, fazendo com que o microrganismo sintetize e secrete a enzima  $\alpha$ -glucanase para o meio extracelular (BURNS *et al.*, 1994; WISBECK, 2003; SHU *et al.*, 2006; CONFORTIN *et al.*, 2008). Esta enzima, ao mesmo tempo em que quebra os polissacarídeos, liberando glicose, facilita a entrada da glicose do meio para o interior da célula. Isto pode ser observado nas Figuras 6 e 7, pois, a segunda fase de latência ocorre quando ainda existe cerca de 50% da concentração inicial de substrato no meio.

Observou-se visualmente, nos experimentos que concentrações iniciais de glicose e valores de pH mais elevados, favoreceram a formação de “pellets” maiores, prejudicando ainda mais a transferência de massa. Os experimentos que apresentaram nitidamente uma segunda fase de latência foram conduzidos com 40 g L<sup>-1</sup> de substrato inicial e pH 4,0 (Figura 6) e 50 g L<sup>-1</sup> de substrato inicial e pH 3,0 (Figura 7). Estas condições proporcionaram a formação destes “pellets” maiores, devido, provavelmente, ao pH 4,0 na primeira condição e à concentração inicial de substrato de 50 g L<sup>-1</sup> na segunda condição. No entanto, nos experimentos conduzidos com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 3,0 e com 50 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 não foi possível observar de forma clara a existência de uma segunda fase de latência.

A Tabela 2 apresenta as concentrações de polissacarídeos extracelulares ( $\ddot{A}P$ ) e de biomassa micelial ( $\ddot{A}X$ ) sintetizadas até o momento da estabilização da concentração de polissacarídeos extracelulares em seu valor máximo, ou seja, no tempo de processo ( $t$ ); a concentração de produto formado até o momento em que a produtividade em produto é máxima ( $\ddot{A}P_m$ ); a concentração de biomassa formada até o momento em que a produtividade em biomassa é máxima ( $\ddot{A}X_m$ ); os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ); as produtividades totais em produto ( $Q_P$ ) e em biomassa ( $Q_X$ ); as produtividades máximas em produto ( $Q_{Pm\acute{a}x}$ ) e em biomassa ( $Q_{Xm\acute{a}x}$ ); as velocidades específicas máximas de crescimento microbiano ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ); o tempo de processo ( $t$ ); o tempo no qual a produtividade em produto é máxima ( $t_{mp}$ ); e tempo no qual a produtividade em biomassa é máxima ( $t_{mx}$ ).

Tabela 2. Comparativos cinéticos dos cultivos realizados com 40 e 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial, pH 3,0 e 4,0, de acordo com planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Parâmetros cinéticos	40 g L <sup>-1</sup> pH 3,0	40 g L <sup>-1</sup> pH 4,0	50 g L <sup>-1</sup> pH 3,0	50 g L <sup>-1</sup> pH 4,0
$\Delta P$ (g L <sup>-1</sup> )	2,111	0,758	2,528	0,557
$\Delta X$ (g L <sup>-1</sup> )	7,110	6,670	9,479	5,730
$\Delta P_m$ (g L <sup>-1</sup> )	1,812	0,647	2,416	0,496
$\Delta X_m$ (g L <sup>-1</sup> )	6,473	6,585	4,460	3,800
$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,072	0,025	0,058	0,020
$Y_{X/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,244	0,216	0,220	0,206
$Q_P$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	9,337	2,380	5,035	1,316
$Q_X$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	31,400	20,900	18,800	13,540
$Q_{Pm\acute{a}x}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	11,260	2,670	5,173	1,512
$Q_{Xm\acute{a}x}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	32,200	21,040	16,830	15,830
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	0,041	0,029	0,021	0,011
$t$ (h)	226	318	502	423
$t_{mp}$ (h)	161	242	467	328
$t_{mx}$ (h)	201	313	265	240

Analisando-se os parâmetros cinéticos (Tabela 2) relativos aos experimentos realizados com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, observa-se que a concentração de polissacarídeos sintetizados ( $P$ ), bem como a conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), obtidas no experimento conduzido em pH 3,0, foram cerca de 2,8 vezes maiores que aquelas obtidas no experimento realizado em pH 4,0. Observa-se, também, um menor tempo de processo (226 horas) em pH 3,0 que em pH 4,0 (318 horas). Conseqüentemente, as produtividades total ( $Q_P$ ) e máxima ( $Q_{Pmáx}$ ) em produto obtidas em pH 3,0 foram 292 e 321% superiores, respectivamente, em relação àquelas obtidas utilizando-se pH 4,0.

Nos cultivos conduzidos com concentração inicial de substrato de  $50 \text{ g L}^{-1}$  (Figuras 7 e 8), observa-se uma tendência semelhante. Alcançou-se a estabilização da concentração de polissacarídeos extracelulares no tempo de 502 horas de cultivo quando conduzido em pH 3,0 e de 423 horas em pH 4,0. Apesar do maior tempo de cultivo, o experimento em pH 3,0 proporcionou valores de produtividades total ( $Q_P$ ) e máxima ( $Q_{Pmáx}$ ) em produto de 282 e 242%, respectivamente, mais elevados que em pH 4,0. Verifica-se ainda, que o valor de  $Y_{P/S}$  em pH 3,0, também foi mais elevado, cerca de 190% maior que o encontrado em pH 4,0.

Com respeito à biomassa, a Tabela 2 mostra que a concentração inicial de  $40 \text{ g L}^{-1}$  favoreceu as produtividades total ( $Q_X$ ) e máxima ( $Q_{Xmáx}$ ) em biomassa, independentemente do pH. No entanto, a condição de  $S_0 = 40 \text{ g L}^{-1}$  e pH 3,0 foi a que apresentou valores mais elevados de  $Y_{X/S}$  ( $0,244 \text{ g g}^{-1}$ ),  $Q_X$  ( $31,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ),  $Q_{Xmáx}$  ( $32,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e  $\mu_{máx}$  ( $0,041 \text{ h}^{-1}$ ). O anexo B apresenta os dados das velocidades específicas de crescimento obtidas ao longo de todos os cultivos, de onde foram retirados os valores de  $\mu_{máx}$ .

Com o intuito de avaliar a influência da concentração inicial de glicose ( $40$  e  $50 \text{ g L}^{-1}$ ) e do pH ( $3,0$  e  $4,0$ ) sobre a concentração de biomassa micelial ( $\Delta X$ ) e de polissacarídeos extracelulares ( $\Delta P$ ), obtidos até o momento da estabilização da produção de polissacarídeos extracelulares, foi realizada uma análise estatística (Pareto) com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1. Assim, a Tabela 3 apresenta os valores de  $\Delta X$  e  $\Delta P$  obtidos em cada uma das duplicatas dos experimentos realizados. A opção pela análise da concentração de polissacarídeos formado em detrimento do fator de conversão deu-se em função do elevado valor agregado do produto comparativamente ao do substrato. Da mesma forma, o elevado valor do produto pode justificar uma eventual produtividade baixa.

Tabela 3. Planejamento fatorial  $2^2$  para o estudo do efeito da concentração inicial de substrato ( $S_0$ ) e do pH sobre a biomassa micelial ( $\Delta X$ ) e os polissacarídeos extracelulares ( $\Delta P$ ) produzidos.

Experimentos	$S_0$ (g L <sup>-1</sup> )	pH	$\Delta X$ (g L <sup>-1</sup> )	$\Delta P$ (g L <sup>-1</sup> )
1	40	3	5,798	2,016
1'	40	3	7,933	2,610
2	40	4	7,860	0,993
2'	40	4	4,695	0,470
3	50	3	6,020	1,484
3'	50	3	9,700	2,815
4	50	4	5,343	0,545
4'	50	4	5,864	0,580

Com os dados da Tabela 3 foram calculados os resultados apresentados na Tabela 4, que correspondem aos efeitos das variáveis sobre a biomassa micelial ( $\Delta X$ ) e os polissacarídeos extracelulares ( $\Delta P$ ) produzidos.

Tabela 4. Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^2$  com um nível mínimo de 95% de confiança.

Variáveis	Efeitos $\pm$ erro padrão	
	$\Delta X$ (g L <sup>-1</sup> )	$\Delta P$ (g L <sup>-1</sup> )
pH (1)	-1,42225 $\pm$ 1,332040	-1,58425 $\pm$ 0,387230*
$S_0$ (2)	0,16025 $\pm$ 1,332040	-0,16625 $\pm$ 0,387230
Interação entre (1) e (2)	-0,83425 $\pm$ 1,332040	-0,00275 $\pm$ 0,387230

- Efeito estatisticamente significativo (95% de nível de confiança).

Um efeito positivo expressa que o valor da variável aumenta na direção do nível superior do planejamento fatorial  $2^2$  e um efeito negativo que o valor da variável aumenta na direção do nível inferior.

Verifica-se, então, pela Tabela 4, que  $\ddot{A}X$  não sofreu influência da concentração inicial de substrato, no entanto, o pH apresentou efeito negativo sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares, ou seja, utilizando-se um valor menor de pH, no caso 3,0, tem-se um ganho de aproximadamente  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  de polissacarídeos extracelulares em relação a condição de pH 4,0. No entanto, cada ressaltar que o erro experimental mostrou-se elevado, o que pode comprometer a análise estatística dos resultados. Observa-se na Figura 10 a influência do pH sobre  $\ddot{A}P$  e, também, que para qualquer valor de  $S_0$  testado (40 ou 50  $\text{g L}^{-1}$ ) não se verifica um aumento significativo de  $\ddot{A}P$ .

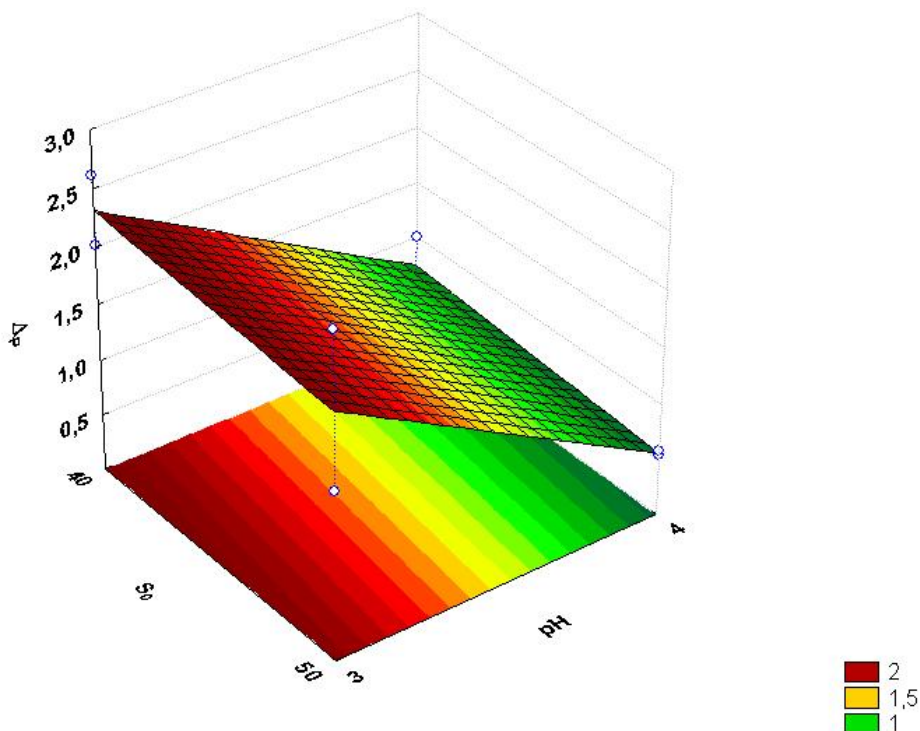


Figura 10. Efeito da concentração inicial de substrato e pH sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares.

Assim, de acordo com os resultados da Tabela 4 e da Figura 10, não se justifica utilizar uma maior concentração inicial de substrato, ou seja, a condição de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial e pH 3,0 foi a que favoreceu a produção de polissacarídeos extracelulares. Isto corrobora com o que já foi observado nos dados cinéticos apresentados na Tabela 2.

Shih *et al.* (2006), com intuito de investigar as exigências nutricionais de *Androdia cinnamomea* em frascos agitados, obtiveram, após 10 dias de cultivo em meio contendo 4% de glicose,  $8,69 \text{ g L}^{-1}$  (massa seca) de biomassa micelial, valor que encontra-se, em média, superior aos obtidos neste trabalho. E em meio contendo 4% de lactose,  $1,48 \text{ g L}^{-1}$  de polissacarídeos extracelulares foram detectados, valor inferior aos observados neste trabalho quando se usou 40 e  $50 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e pH 3,0.



Cho *et al.* (2006) realizaram experimentos em biorreator de 5 L com *Tremella fuciformis*, atingindo  $10,4 \text{ g L}^{-1}$  de concentração máxima de biomassa micelial,  $3,05 \text{ g L}^{-1}$  de concentração máxima de polissacarídeos extracelulares e fator de conversão de substrato em polissacarídeos de  $0,15 \text{ g g}^{-1}$ , após 5 dias de cultivo. Já, Hwang *et al.* (2003) conduziram experimentos com *Phellinus linteus* em pH 4 e obtiveram concentração máxima de biomassa micelial igual a  $11 \text{ g L}^{-1}$  após 15 dias de cultivo e de polissacarídeos extracelulares de  $3,3 \text{ g L}^{-1}$  após 14 dias de cultivo. Ambos os trabalhos revelaram resultados superiores aos observados nesta pesquisa, porém para outros microrganismos.

Em processo de produção simultânea de polissacarídeos e ergosterol pelo cultivo em batelada alimentada de *Agaricus blazei*, Zou (2006) atingiu concentração máxima de biomassa micelial ( $12,25 \text{ g L}^{-1}$ ) superior às observadas neste trabalho. No entanto, tanto a concentração de polissacarídeos extracelulares ( $1,14 \text{ g L}^{-1}$ ), quanto a produtividade máxima ( $162,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  ou  $6,78 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) obtidas pelo autor foram inferiores às observadas neste trabalho quando se utilizou  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e pH 3,0.

Gern *et al.* (2007) testaram dois valores de  $K_{La}$  ( $10,2 \text{ h}^{-1}$  e  $19,3 \text{ h}^{-1}$ ) para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Encontraram os melhores resultados com  $K_{La} = 10,2 \text{ h}^{-1}$ , onde  $X_{máx} = 27,72 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Y_{X/S} = 1,18 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Q_P = 168,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  ( $7,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e  $Y_{P/S} = 47,14 \text{ mg g}^{-1}$  ( $0,047 \text{ g g}^{-1}$ ). O fator de conversão de substrato em produto e a produtividade total em polissacarídeos, reportados pelos autores, foram inferiores em cerca de 35 % e 25 %, respectivamente, quando comparados aos melhores resultados obtidos neste trabalho (para  $S_0 = 40 \text{ g L}^{-1}$  e pH 3,0).

Em experimentos realizados por Fan *et al.* (2007) com *Agaricus Blazei* Murril, a produção máxima de polissacarídeos extracelulares foi de  $0,321 \text{ g L}^{-1}$  em pH 6,1, resultado muito inferior aos obtidos neste trabalho.

Bonatti *et al.* (2008a), cultivando *Pleurotus ostreatus* em processo semicontínuo com cortes de 50 e 75%, alcançaram valores mais elevados para a conversão de substrato em biomassa no primeiro ( $0,5 \text{ g g}^{-1}$ ) e segundo ( $0,4 \text{ g g}^{-1}$ ) ciclos com corte de 75%, enquanto que o processo com corte de 50% favoreceu a produção de polissacarídeos, com melhores valores de  $Y_{P/S}$  ( $0,09 \text{ g g}^{-1}$ ) e  $Q_{Pmáx}$  ( $9 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no segundo ciclo. Os autores conseguiram aumentar a produtividade em quase 30% em relação ao processo descontínuo. Observa-se que os autores obtiveram fator de conversão de substrato em polissacarídeos mais elevado que o obtido neste trabalho ( $0,072 \text{ g g}^{-1}$ ) com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose em pH 3,0. Porém, a produtividade máxima em polissacarídeos de nosso trabalho foi cerca de 25% superior à produtividade encontrada no trabalho dos autores.

Em relação à análise estatística do planejamento experimental, Wisbeck (2003) ao avaliar a produção de polissacarídeos extracelulares através de um planejamento experimental variando a concentração inicial de glicose em 20 e 40 g L<sup>-1</sup>, pH em 4 e 6 e K<sub>L</sub>a em 15 e 27 h<sup>-1</sup>, concluiu que valores mais elevados de concentração inicial de glicose (>40 g L<sup>-1</sup>) e valores menores de pH (<4,0) maximizavam a produção de polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus*. Neste trabalho, com *P. djamor*, observou-se que em relação ao pH, o comportamento das duas espécies foi semelhante (pH 3,0, ou seja, pH < 4,0 foi melhor), no entanto, a concentração inicial de glicose, para a espécie *P. djamor*, não apresentou efeito significativo sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares.

## CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

- O tempo necessário para o consumo total do substrato aumenta com o aumento de  $S_0$  de 40 para 50 g L<sup>-1</sup> e com o aumento do pH de 3,0 para 4,0.
- A condição que proporcionou os mais elevados valores de  $Y_{X/S}$  (0,244 g g<sup>-1</sup>) e  $Q_X$  (31,4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi  $S_0 = 40$  g L<sup>-1</sup> e pH 3,0, embora a análise de Pareto não tenha identificado efeito significativo dessas variáveis sobre a biomassa formada ( $\Delta X$ ).
- A análise de Pareto revelou que o pH 3,0 em comparação ao pH 4,0 maximizou a concentração de polissacarídeos extracelulares ( $\Delta P$ ) contribuindo com o incremento médio de aproximadamente 110%.
- O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade máxima em produto ( $Q_{Pmax}$ ) obtidas com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3 foram de 188% e 321% superiores, em relação aos respectivos valores obtidos com 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 4,0.
- O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade máxima em produto ( $Q_{Pmax}$ ) obtidas com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 3 foram de 190% e 242% superiores, em relação aos respectivos valores obtidos com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 4,0.
- Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho para *P. djamor* com aqueles obtidos por Wisbeck (2003) para *P. ostreatus*, obteve-se um ganho de 59% na concentração de polissacarídeos extracelulares e de 24% na produtividade total desse produto.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se deixar como sugestão para a continuidade:

- Avaliar a concentração de polissacarídeos intracelulares, uma vez que alta concentração de biomassa é produzida na melhor condição de produção de polissacarídeos extracelulares.
- Avaliar o processo semicontínuo, uma vez que conforme resultados obtidos por Bonatti *et al.* (2008a), este processo permitiu aumentar a produtividade em polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus ostreatus* em quase 30% em relação ao processo descontínuo, revelando que o processo semicontínuo pode ser uma interessante alternativa para melhorar a produção também por *P. djamor*.
- Medir a atividade da enzima  $\alpha$ -glucosidade durante o cultivo a fim de validar as hipóteses levantadas neste trabalho a respeito da síntese e secreção desta enzima.
- Avaliar a produção de polissacarídeos extracelulares variando-se a concentração inicial de glicose em torno de  $40 \text{ g L}^{-1}$  e pH em torno de 3,0, devido ao resultado da análise estatística do planejamento experimental para obtenção de uma condição ótima.
- Caracterizar os polissacarídeos extracelulares e intracelulares.
- Resolver os problemas relacionados a transferência de massa afim de se poder medir a concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido no meio.

## REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. (1996). Planejamento e Otimização de Experimentos. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 299p.
- BEROVIC, M., HABIJANIC, J., ZORE, I., WRABER, B.; HODZAR, D., BOH, B., POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. Journal of Biotechnology, v. 103, p. 77-86, 2003.
- BERTINO, J. R.; HAIT, W. Oncologia: Princípios do Tratamento do Câncer /In GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. CECIL tratado de medicina interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- BLOT, W. J. Oncologia: Epidemiologia do câncer /In GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. CECIL tratado de medicina interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- BONATTI, M., JUNIOR, L.N., BORGES, G.M., WISBECK, E., FURLAN, S.A. Produção de Polissacarídeos Extracelulares provenientes de *Pleurotus ostreatus* por processo semicontínuo. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química 14 a 17 de Setembro de 2008a.
- BONATTI, M., JUNIOR, L.N., BORGES, G.M., WISBECK, E., FURLAN, S.A. Produção de Polissacarídeos Extracelulares provenientes de *Pleurotus ostreatus* por processo em batelada alimentada. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química 14 a 17 de Setembro de 2008b.
- BORGES, G.M., WISBECK, E., SOUZA, O. Valorização de resíduos da cultura da banana em processo de compostagem para produção de fungos do gênero *Pleurotus*. Caderno de Iniciação à Pesquisa, 2006.
- BORZANI, W. Fermentação semi contínuo /In: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia industrial, São Paulo: Edgard Blücher Ltda. cap. 11, v. 2, p. 219 – 222, 2001.
- BRASILEIRO, G. F. Patologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BURNS, P.J., YEO, P., KESHAVARZ, T., ROLLER, S., EVANS, C.S. Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp. *Florida*; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. *Enzyme Microbiology Technology*, n.34, p. 566-572, 1994.

CANCER FACTS AND FIGURES 2008. American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 8 mar. 2009.

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Italian Journal of Food Science*, n1, p.9-15, 1992.

CARVALHO, J. C. M., SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. *In*: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia industrial*, v. 2, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, cap. 10, p. 205 – 218, 2001.

CHANG, S.T., MILES, P.G. Mushrooms: Trends in production and technological development. *Genetic Engineering and Biotechnology Monitor*, v. 41-42, p. 73-81, 1993.

CHANG, S.T. Global impact of edible and medicinal mushroom on human welfare in the 21st century: non-green revolution. *International Journal of Medicinal Mushroom*, v.1, p. 1-7, 1999.

CHEN, W., ZHAO, Z., CHEN, S. F., LI, C. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3187–3194, 2008.

CHOU, E. J., OH, J. Y., CHANG, H. Y., YUN, J. W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelia culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 127, p. 129-140, 2006.

COHEN, R., PERSKY, L., HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 5, p. 582 – 594, 2002.

CONFORTIN, F. G., MARCHETTO, F. B., CAMASSOLA, M., SALVADOR M., DILLON, A. J. P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. J Ind Microbiol Biotechnol v. 35 p. 149 – 1155, 2008.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T., BARBOSA, J. B., VOEUX, P. J.. Robbins patologia estrutural e funcional, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

CUI, J., CHISTI, Y. Polisaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. Biotechnology Advances, v. 21, p. 109-122, 2003.

DALONSO, N., SOUZA, R., SILVEIRA, M. L. L., RUZZA, A. A., WAGNER, T. M., WISBECK, E., FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. x, p. x, 2009.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356.

DURÁN, N. Enzima ligninolíticas /n: ESPOSITO, E., AZEVEDO., J.L. FUNGOS: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 510 p., 2004.

FAN, L., SOCCOL, A.T., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. LWT - Food Science and Technology., n. 40, p. 30 – 35, 2007.

FENOGLIO-PREISER, C. Gastrointestinal Pathology an Atlas and Text. 2 ed, New York: Lippincott-Raven, 1998.

FIRENZUOLI, F., GORI, L., LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. Oxford Journal, v. 5 p. 3-15, 2008.

FURLAN, S. A., VIRMOND, L. J., MIERS, D. A., BONATTI, M., GERN, R. M., JONAS, R. Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. World Journal of Microbiology Biotechnology, v. 13, p. 689-692, 1997.

FURLAN, S. A., SILVEIRA, M. L. L., WISBECK, E., WOLFF, E. R. S., DALONSO, N., RUZZA, A. A., PINHO, M. S. L. Antitumor activity of *Pleurotus spp.* In: PANDEY A., LARROCHE C., SOCCOL C.R., DUSSAP, C-G. (Org.). New Horizons in Biotechnology. 1a ed. New Delhi: Asiatech Publishers Inc, p. 429-439, 2009.

GALVAGNO, M. A., FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E., AZEVEDO., J.L. FUNGOS: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 510 p., 2004.

GERN, R. M. M. Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. 2005. 128 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Pós-graduação em Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GERN, R. M. M., WISBECK, E., RAMPINELLI, J. R., NINOW, J. L., FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. Bioresource Technology, v. 99, p. 76 – 82, 2008.

GOEDEGEBUURE, P. S., UDAYA, L., EBERLEIN, T. J. Biologia do Tumor e Marcadores Tumorais. In: SABISTON JR., David C; LYERLY, H. Kim. Tratado de cirurgia: a base biológica da prática cirúrgica moderna. 17. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal Value of the Genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.I., Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, v.1., p. 69-80, 1999.

GUTIÉRREZ, A., PRIETO, A., MARTÍNEZ, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. Carbohydrate Research, v. 281, p. 143-154, 1996.

HWANG, H-J., KIM, S-W., CHOI, J-W., YUN, J-W. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 309–319, 2003.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. São Paulo, 2008. Disponível: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 27 set. 2009.



LAVI, I., FRIESEM, D., GERESH, S., HADAR, Y., SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic on HT-29 colon cancer-cells. *Cancer Letters*, v. 244, p. 61-70, 2006.

LEHNINGER, Albert Lester, 1917; NELSON, David Lee; COX, Michael M.; SIMÕES, Arnaldo Antônio; LODI, Wilson Roberto Navega (Tradutor). *Lehninger princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIBARDI, N. J. Estudo cinético da produção de compostos bioativos por *Pleurotus ostreatus* em processo descontínuo e semicontínuo. *Monografia – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE*, Joinville, p. 36, 2007.

LULL, C., WICHERS, H., SAVELKOUL, H.F.J. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites (Review). *Mediators of Inflammation*, v. 2, p. 63-80, 2005.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos Fungos *in* ESPOSITO, E. ZEVEDO, J. L. FUNGOS: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 510 p., 2004.

MANTOVANI, M. S., BELLINI, M. F., ANGELI, J. P. F., OLIVEIRA, R. J., SILVA, A.F., RIBEIRO, L. R.  $\beta$ -Glucan in promoting health: Prevention against mutation and cancer (Mini-Review). *Mutat. Rev. Mutat. Res.*, 2007.

MAZIEIRO, R. Produção de exopolissacarídeos por basideomicetos em cultura submersa: screening, caracterização química preliminar e estudo da produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr:Fr)Fr. 1996. 180p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1996.

MONTENEGRO, M, R; FRANCO, M. *Patologia: processos gerais*. 4º ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

MORADALI, M-F., MOSTAFAVI, H., GHODNS, S., HEDJAROUDE, G-A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 701–724, 2007.

NIELSEN, J. Microbial process kinetics. //: RATLEDGE, C., KRISTIANSEN, B. Basic Biotechnology. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

OOI, V.E.C., LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 1, p. 195-206, 1999.

PARK, J.P., KIM, Y.M., KIM, S.W., HWANG, H.J., CHO, Y.J., LEE, Y.S., SONG, C.H., YUN, J.W. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. Process Biochemistry, v. 37, p. 1257-1262, 2002.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. Microbiology. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2002.

POKHREL, C.P., OHGA, S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. Food Chemistry, v. 105, p. 641-646, 2007.

PUTZKE, Jair; PUTZKE, Marisa Terezinha Lopes. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H.. Biologia Vegetal. 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogar, 2001.

ROBBINS, S., COTRAN, R. Bases Patológicas das doenças. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROUT, D., SOUMITRA, M., INDRANIL, C., MALAY, P. and SYED, S. I. Chemical analysis of a new (1-3)-, (1-6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. Carbohydrate Research, v. 340, p. 2533-2539, 2005.

SANDULA, J., MACHOVÁ, E., HØIBALOVÁ V. Mitogenic activity of particulate yeast  $\beta$ -(1-3)-d-glucan and its water-soluble derivatives. International Journal of Biological Macromolecules, v. 17, p. 323-326, 1995.

SANTOS-NEVES, J. C., PEREIRA, M.I., CARBONERO E. R., GRACHER A.H.P., GORIN P.A.J., SASSAKI G.L., IACOMINI, M. A gel-forming  $\beta$ -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. Carbohydrate Research, v. 343, p. 1456-1462, 2008.

SARANGI, I., GHOSH, D., BHUTIA, S. K., MALLICK, S. K., MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*, v. 6, p. 1287-1297, 2006.

SCHMIDELL, W. Microorganismos e meios de cultura para utilização industrial. *In*: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnology industrial*, v. 2, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. cap 2, p. 124 – 135.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. *In*: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnology industrial*, v.2, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. cap. 4, p. 214 – 165.

SMIDERLE, F.R., CARBONERO E.R., MELLINGER C.G., SASSAKI, G.L., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a  $\beta$ -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2189-2196, 2006.

SHIH, I-L., PAN, K., HSIEH, C. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelia growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1129–1135, 2006.

SHIH, I-L., CHOU, B-W., CHEN, C-C., WU, J-Y., HSIEH, C. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 785–793, 2008.

SHU, C.-H., XU, C.-J. LIN, E.-S. Production, purification and partial characterization of a novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry* v. 41, p. 1229-1233, 2006.

STEVENS, Alan; LOWE, James. *Patologia*. 2. ed Sao Paulo: Manole, 1998.

TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. *Microbiologia*. 2. ed Sao Paulo: Atheneu, 1996.

TRABULSI, R.T., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRINDER, R. Annual Clinical Biochemistry, 1969. In: CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E.

WAITES, J. M., MORGAN, N. L., ROCKEY, J. S., HIGTON, G. Industrial microbiology. London: Blackwell science ltda, 2001.

WANG, J.C., HU, S.H., LIANG, Z., YEH, C.J. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. Biotechnological products and process engineering, v. 67, p. 759-766, 2005.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: a modern perspective. Critical Reviews in Immunology, v. 19, p. 65-96, 1999.

WISBECK, E. Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WOLFF, E. R. S., WISBECK, E., SILVEIRA, M. L. L., GERN, R. M. M., PINHO, M. S. L., FURLAN, S. A. Antimicrobial and Antineoplastic Activity of *Pleurotus ostreatus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, n. 151, p. 402-412, 2008.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007.

WORLD HEALTH STATISTICS 2008. World Health Organization. Disponível em: < <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 08 mar. 2009.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J.R.H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H. Tropical Mushrooms. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. 493p, p. 277-278, 1984.

ZHANG, M., ZHANG, L., CHEUNG, P. C. K., OOI, V. E. C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 123-128, 2004.

ZHANG, M., CUI, S.W, CHEUNG, P. C. K., WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZOU, X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 970-974, 2006.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A CURVAS DE CALIBRAÇÃO

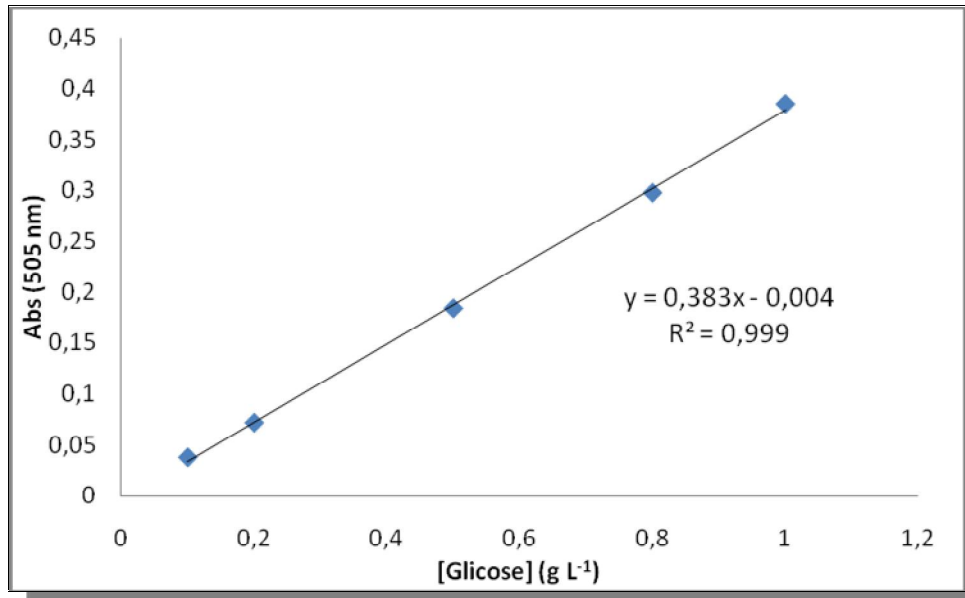


Figura 11. Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de glicose dos experimentos em biorreator.

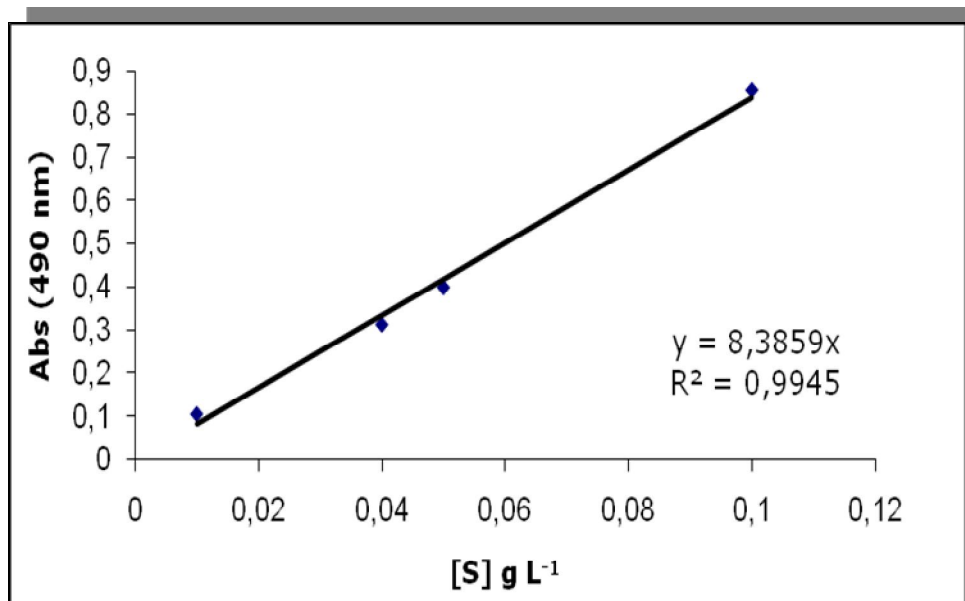


Figura 12. Exemplo de uma curva de calibração típica para a medida da concentração de polissacarídeos extracelulares dos experimentos em biorreator.

## APÊNDICE B - DADOS EXPERIMENTAIS

B.1 - CULTIVO 40 g L<sup>-1</sup> pH 3,0 - EXPERIMENTOS 01 E 01'Tabela 5. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 (1 e 1').

Tempo (h)	Tempo' (h)	[S] (g L <sup>-1</sup> )	[S]' (g L <sup>-1</sup> )	[X] (g L <sup>-1</sup> )	[X]' (g L <sup>-1</sup> )	[P] (g L <sup>-1</sup> )	[P]' (g L <sup>-1</sup> )
0	0,0	38,377	41,279	0,471	0,015	0,287	0,207
23,5	50,5	41,087		0,442	1,000	0,366	1,000
51,2	92,5	34,812	30,366	1,140	2,535	0,913	1,247
73,1	134,5	32,958	28,603	1,215	3,955	0,817	1,725
105,1	185,2	29,243	16,945	2,495	6,743	1,929	2,110
126,1	232,5	25,891	12,604	3,434	7,855	1,907	3,238
174,05	306,2	17,690	4,054	5,539	7,938	2,372	2,064
222,1	330,5	8,987	1,125	6,500	8,345	2,594	2,317
272,55		1,635		7,579		2,229	
317,4		0,092		7,805		2,402	
337,45		0,069		7,564		1,937	

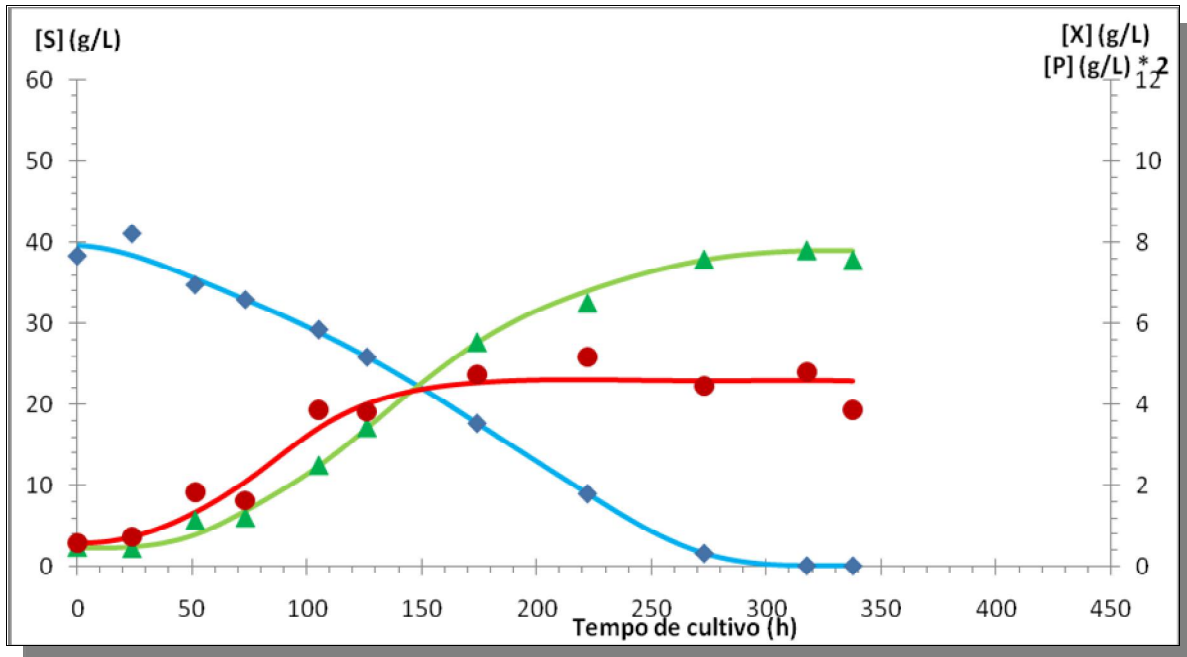


Figura 13. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 1).

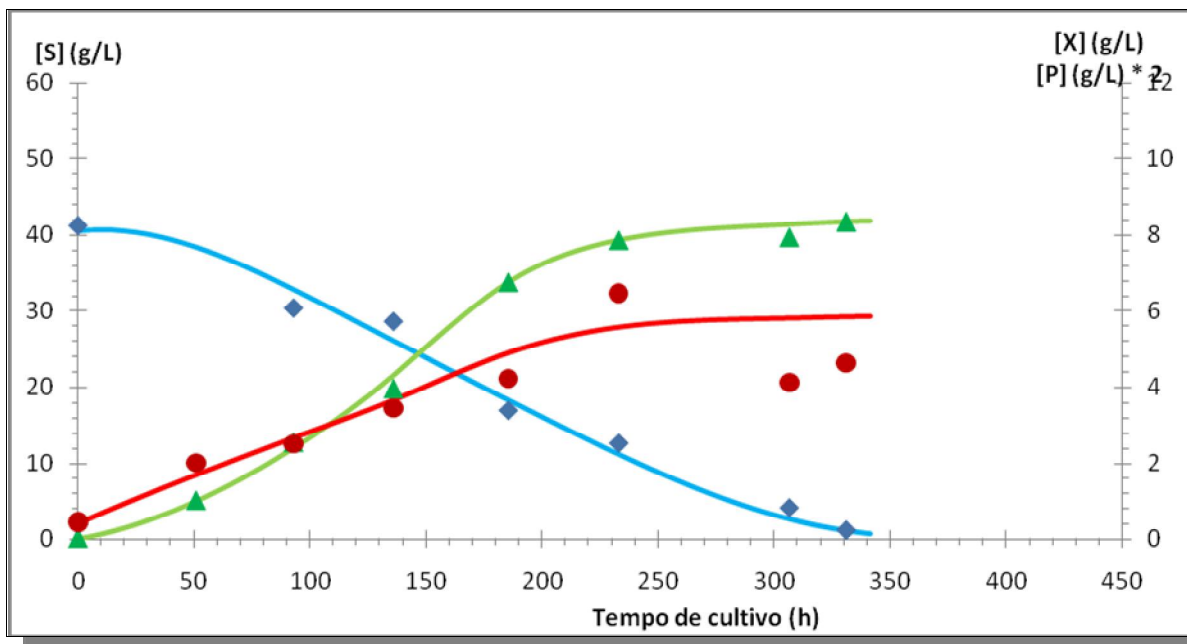


Figura 14. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 1').



B.2 - CULTIVO 40 g L<sup>-1</sup> pH 4,0 - EXPERIMENTOS 2 E 2'Tabela 6. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 (2 e 2').

Tempo (h)	Tempo' (h)	[S] (g L <sup>-1</sup> )	[S]' (g L <sup>-1</sup> )	[x] (g L <sup>-1</sup> )	[x]' (g L <sup>-1</sup> )	[P] (g L <sup>-1</sup> )	[P]' (g L <sup>-1</sup> )
0,000	0,000	45,665	36,508	0,442	0,356	0,348	0,425
19,500	89,167		32,293	0,442		0,377	0,474
43,500	139,167	42,941	21,755	2,000	3,423	0,642	0,486
67,500	181,417	40,659	17,945	3,650	2,318	0,764	0,561
88,583	231,500	38,520	18,416	3,490	3,111	0,711	0,888
116,500	287,000	36,095	13,471	5,284	5,636	0,555	0,878
139,250	326,167		10,026	5,320	2,742	0,658	0,942
163,833	375,167	33,165	6,702	4,461	4,531	0,929	0,838
187,500		30,883		5,062		1,055	
211,500		27,104		5,268		1,015	
236,167		25,250		5,281		1,174	
253,500		23,396		5,458		1,247	
283,083		17,976		7,386		1,506	
307,750		10,787		8,160		1,453	
331,250		10,331		8,115		1,227	
355,667		6,335		8,201		1,148	
379,667		3,853		7,897		1,486	
403,500		2,305		8,285		1,367	
429,500		0,052		7,588		1,101	

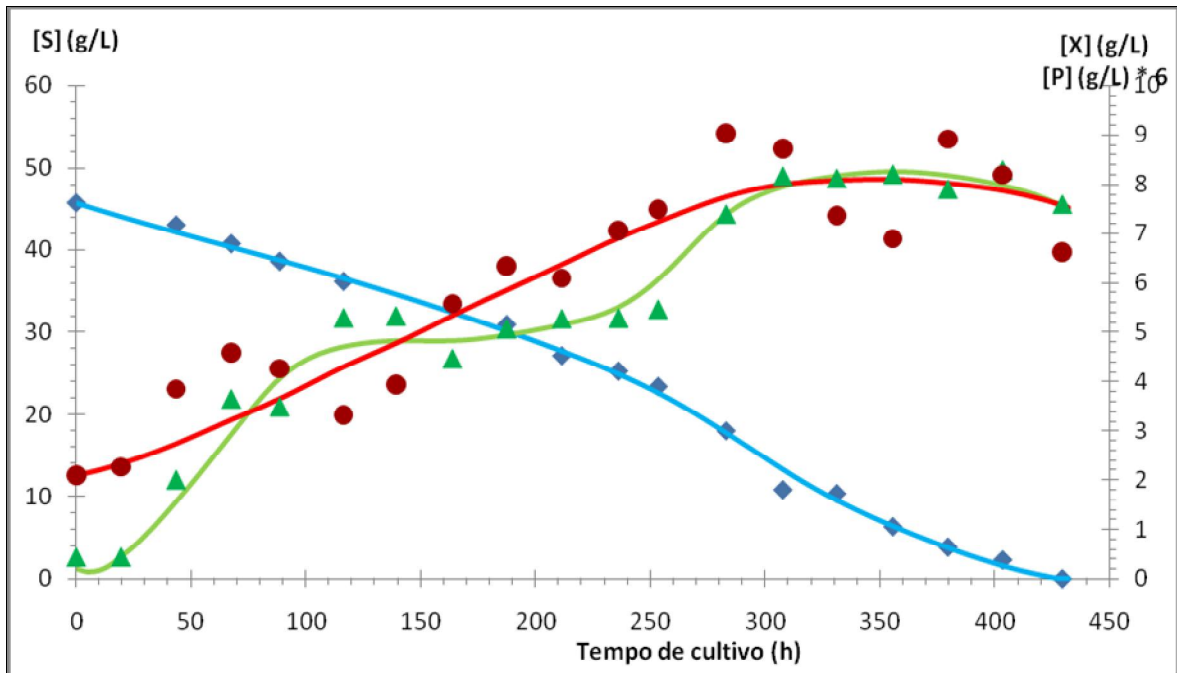


Figura 15. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 2).

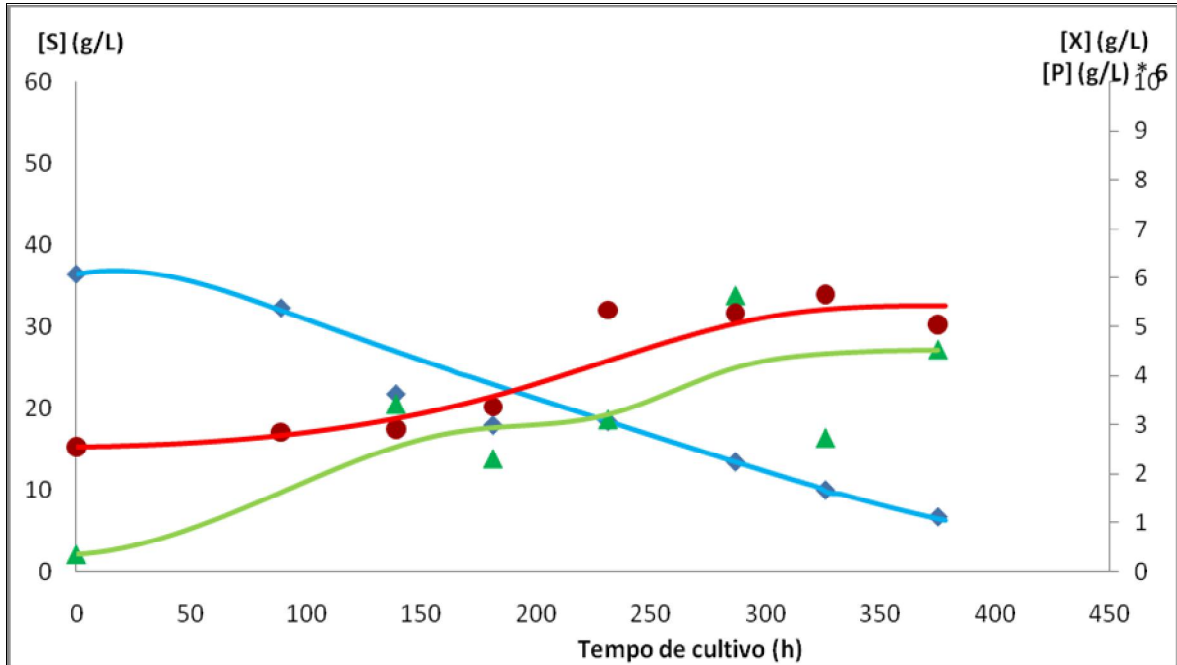


Figura 16. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 2').

B.3 - CULTIVO 50 G L<sup>-1</sup> pH 3,0 - EXPERIMENTOS 3 e 3'Tabela 7. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 50 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 (3 e 3').

Tempo (h) 1	Tempo' (h)	[S] (g L <sup>-1</sup> )	[S]' (g L <sup>-1</sup> )	[X] (g L <sup>-1</sup> )	[X]' (g L <sup>-1</sup> )	[P] (g L <sup>-1</sup> )	[P]' (g L <sup>-1</sup> )
0	0		49,508	0,059	0,500	0,691	0,168
49,25	64		39,180	0,310	0,867	0,767	0,072
96,5	115,5		37,541	0,883	1,917	0,787	0,740
140,25	162,0		34,098	2,625	2,967	0,837	0,652
162,75	211,0	33,22	31,148	3,366	4,895	0,815	0,867
188,25	251,5		19,508	2,693	6,197	0,990	1,377
213,583	356,5		17,377	3,150	7,860	1,119	1,989
233,75	400,0	24,73	16,557	2,776	8,237	1,257	2,142
260,25	454,5	22,26	13,033	5,424		1,808	2,334
290,75	495,5	24,56	8,525	2,768	9,273	1,138	3,086
308,75	546,5	20,67	2,820	5,871	10,850	1,238	3,515
333,667	571,5	17,14	0,082	5,595	11,183	1,550	2,641
355,75		17,14		5,532		1,989	
380,083		15,84		5,129		2,210	
402,5		17,14		5,146		3,224	
426,083		12,08		6,200		2,197	
451,25		11,73		7,380		1,890	

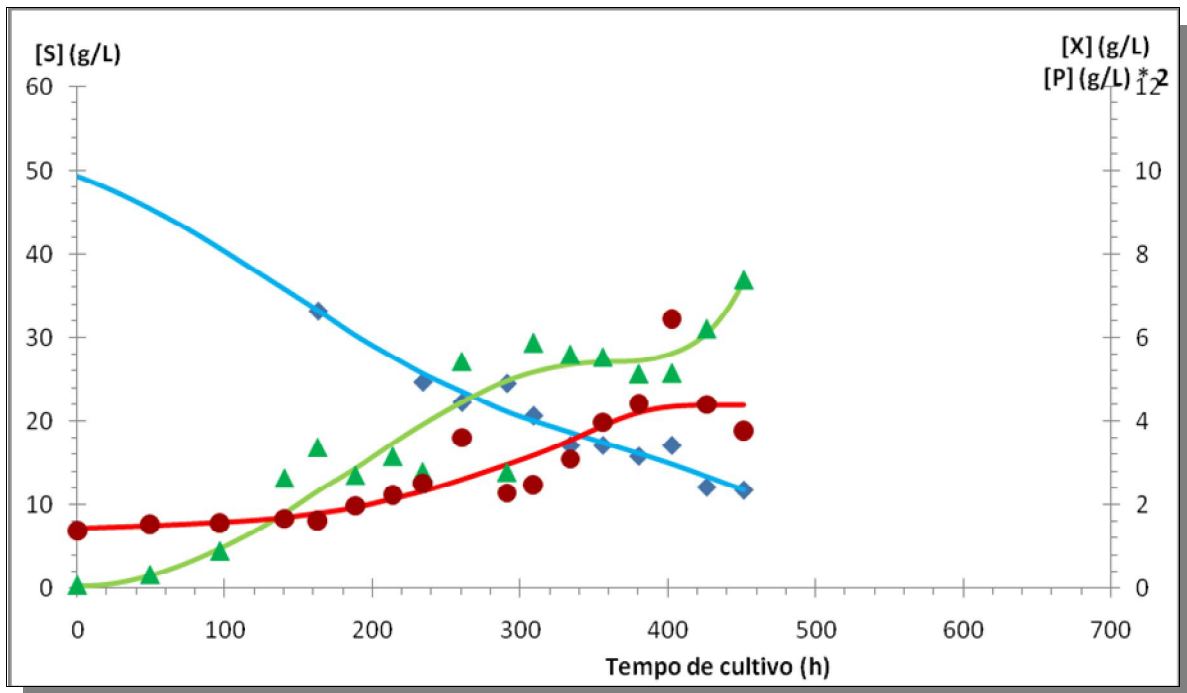


Figura 17. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 3).

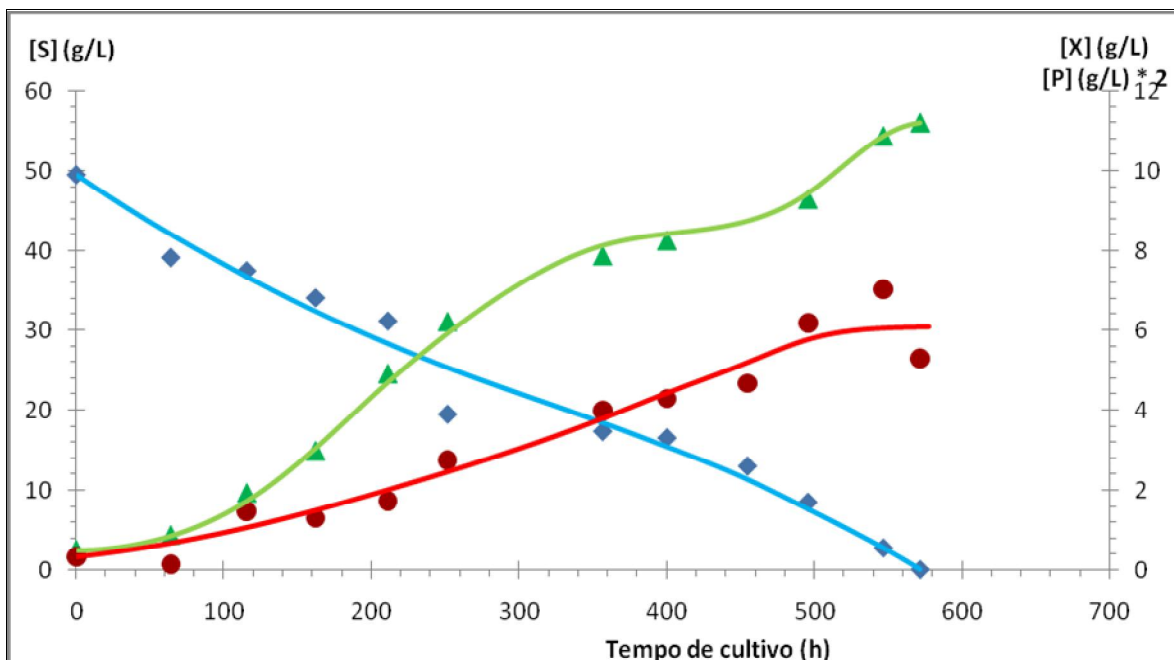


Figura 18. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 3,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 3').

B.4 - CULTIVO 50 G L<sup>-1</sup> pH 4,0 - EXPERIMENTOS 4 E 4'Tabela 8. Variação das concentrações de substrato (S), biomassa (X) e polissacarídeo extracelular (P) com o tempo dos experimentos nas condições de 50 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 (4 e 4').

Tempo (h) 1	Tempo (h) 1'	[S] (g L <sup>-1</sup> ) 1	[S]' (g L <sup>-1</sup> )	[x] (g L <sup>-1</sup> )	[x]' (g L <sup>-1</sup> )	[P] (g L <sup>-1</sup> )	[P]' (g L <sup>-1</sup> )
0	0,0	44,766	51,394	0,595	0,473	0,45	0,416
97	55,0	43,828	46,813	1,415	0,896	0,69	0,542
137	127,5	40,000	43,028	2,620	1,920	0,61	0,514
188	168,5	34,688	36,952	4,351	2,490	0,47	0,522
236	218,5	32,500	28,088	5,145	3,113	0,57	0,574
282	298,0	36,875	25,647	6,048	4,581	0,89	0,893
331	338,0	26,719	25,498	5,735	4,617	1,01	0,883
375	412,0	23,750	21,713	7,971	5,209	0,81	0,883
425	458,5		18,127		5,748		0,961
	509,5		12,799		5,301		0,860
	560,5		7,943		7,940		0,886
	625,5		2,181		6,787		1,036

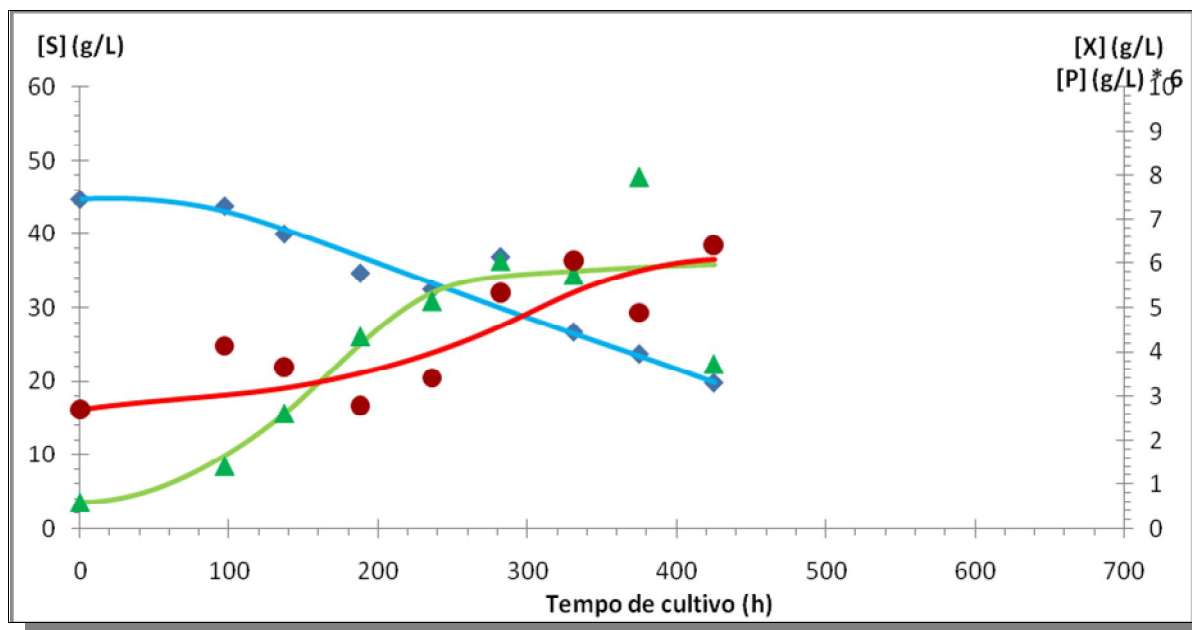


Figura 19. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 4).

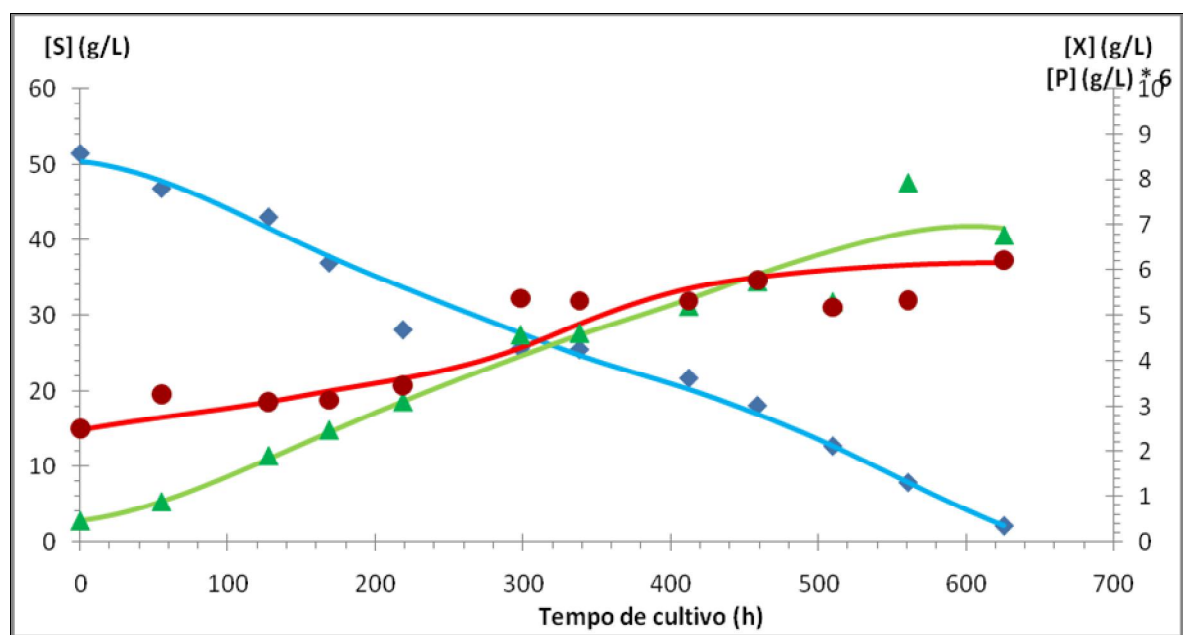


Figura 20. Variação das concentrações de glicose (S ,  $\diamond$ ), biomassa (X ,  $\blacktriangle$ ) e polissacarídeos extracelulares (P ,  $\bullet$ ) com o tempo de cultivo de *P. djamor* com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose inicial e pH 4,0. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas (Experimento 4').

## ANEXO

ANEXO A Comparação de dados experimentais entre o método de dosagem de polissacarídeo extracelular proposto por Park *et al.* (2002) e o mesmo método modificado no Laboratório de Biotecnologia II.

Tabela 9. Variação da concentração de polissacarídeos extracelulares de cultivo na condição de 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose e pH 4.

Concentração de polissacarídeo extracelular	Método de Park <i>et al.</i> (2002)	Método modificado nos laboratórios da Univille
1	0,197	0,187
2	2,263	2,228
3	2,177	2,400
4	2,934	2,610
5	2,803	2,826

## ANEXO B - CÁLCULOS DE VELOCIDADE

## ANEXO B.1 - CÁLCULOS PELO MÉTODO LE DUY ZARGIC DOS EXPERIMENTOS 1 e 1'

Tabela 10. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 (1 e 1').

Tempo (h)	dXdt (g L h <sup>-1</sup> )	dS/dt (g L h <sup>-1</sup> )	dP/dt (g L h <sup>-1</sup> )	uX (L h <sup>-1</sup> )	uS (g g h <sup>-1</sup> )	Up (g g h <sup>-1</sup> )
0						
5,0236	0,003	-0,037	0,003	0,011	-0,130	0,011
10,0471	0,003	-0,054	0,003	0,010	-0,180	0,010
15,0707	0,004	-0,068	0,004	0,011	-0,219	0,011
20,0943	0,005	-0,082	0,005	0,015	-0,245	0,015
25,1178	0,007	-0,093	0,007	0,020	-0,256	0,020
30,1414	0,011	-0,102	0,011	0,027	-0,251	0,027
35,165	0,017	-0,108	0,017	0,035	-0,229	0,035
40,1885	0,023	-0,112	0,023	0,041	-0,197	0,041
45,2121	0,027	-0,114	0,027	0,039	-0,161	0,039
50,2357	0,025	-0,114	0,025	0,030	-0,134	0,030
55,2592	0,023	-0,112	0,023	0,024	-0,117	0,024
60,2828	0,025	-0,111	0,025	0,023	-0,103	0,023
65,3064	0,027	-0,110	0,027	0,023	-0,091	0,023
70,3299	0,031	-0,111	0,031	0,023	-0,082	0,023
75,3535	0,035	-0,112	0,035	0,023	-0,074	0,023
80,3771	0,038	-0,115	0,038	0,022	-0,068	0,022
85,4006	0,041	-0,119	0,041	0,022	-0,062	0,022
90,4242	0,043	-0,123	0,043	0,020	-0,058	0,020
95,4477	0,045	-0,127	0,045	0,019	-0,054	0,019
100,4713	0,045	-0,128	0,045	0,018	-0,050	0,018
105,4949	0,044	-0,126	0,044	0,016	-0,045	0,016
110,5184	0,043	-0,123	0,043	0,014	-0,041	0,014
115,542	0,043	-0,122	0,043	0,013	-0,038	0,013
120,5656	0,043	-0,123	0,043	0,012	-0,036	0,012
125,5891	0,043	-0,127	0,043	0,012	-0,035	0,012
130,6127	0,045	-0,134	0,045	0,012	-0,034	0,012
135,6363	0,045	-0,142	0,045	0,011	-0,035	0,011
140,6598	0,046	-0,150	0,046	0,011	-0,035	0,011
145,6834	0,046	-0,156	0,046	0,010	-0,034	0,010
150,707	0,045	-0,161	0,045	0,009	-0,034	0,009
155,7305	0,045	-0,163	0,045	0,009	-0,033	0,009
160,7541	0,044	-0,164	0,044	0,008	-0,031	0,008
165,7777	0,043	-0,162	0,043	0,008	-0,030	0,008
170,8012	0,041	-0,159	0,041	0,007	-0,028	0,007
175,8248	0,039	-0,155	0,039	0,007	-0,026	0,007
180,8484	0,038	-0,154	0,038	0,006	-0,025	0,006
185,8719	0,036	-0,157	0,036	0,006	-0,025	0,006
190,8955	0,034	-0,162	0,034	0,005	-0,025	0,005



195,9191	0,032	-0,166	0,032	0,005	-0,025	0,005
200,9426	0,030	-0,169	0,030	0,004	-0,025	0,004
205,9662	0,028	-0,173	0,028	0,004	-0,025	0,004
210,9898	0,026	-0,174	0,026	0,004	-0,025	0,004
216,0133	0,024	-0,174	0,024	0,003	-0,024	0,003
221,0369	0,022	-0,173	0,022	0,003	-0,024	0,003
226,0605	0,020	-0,171	0,020	0,003	-0,023	0,003
231,084	0,018	-0,169	0,018	0,002	-0,023	0,002
236,1076	0,016	-0,168	0,016	0,002	-0,022	0,002
241,1312	0,013	-0,166	0,013	0,002	-0,022	0,002
246,1547	0,011	-0,162	0,011	0,001	-0,021	0,001
251,1783	0,010	-0,157	0,010	0,001	-0,020	0,001
256,2018	0,008	-0,150	0,008	0,001	-0,019	0,001
261,2254	0,007	-0,142	0,007	0,001	-0,018	0,001
266,249	0,005	-0,132	0,005	0,001	-0,017	0,001
271,2725	0,005	-0,121	0,005	0,001	-0,015	0,001
276,2961	0,004	-0,108	0,004	0,001	-0,014	0,001
281,3197	0,004	-0,096	0,004	0,000	-0,012	0,000
286,3432	0,003	-0,085	0,003	0,000	-0,011	0,000
291,3668	0,003	-0,076	0,003	0,000	-0,010	0,000
296,3904	0,002	-0,069	0,002	0,000	-0,009	0,000
301,4139	0,001	-0,063	0,001	0,000	-0,008	0,000
306,4375	0,000	-0,059	0,000	0,000	-0,007	0,000
311,4611	0,000	-0,056	0,000	0,000	-0,007	0,000
316,4846	-0,001	-0,050	-0,001	0,000	-0,006	0,000
321,5082	-0,001	-0,040	-0,001	0,000	-0,005	0,000
326,5318	-0,001	-0,032	-0,001	0,000	-0,004	0,000
331,5553	-0,002	-0,027	-0,002	0,000	-0,003	0,000
336,5789	-0,003	-0,025	-0,003	0,000	-0,003	0,000
341,6025	-0,004	-0,021	-0,004	-0,001	-0,003	-0,001

ANEXO B.2 - CÁLCULOS PELO MÉTODO LE DUY ZARGIC DOS EXPERIMENTOS 2 e 2'

Tabela 11. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 40 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 (2 e 2').

Tempo (h)	dXdt (g L h <sup>-1</sup> )	dS/dt (g L h <sup>-1</sup> )	dP/dt (g L h <sup>-1</sup> )	uX (L h <sup>-1</sup> )	uS (g g h <sup>-1</sup> )	uP (g g h <sup>-1</sup> )
0						
5,0505	0,008	0,021		0,017	0,045	0,000
10,101	0,013	0,009	0,013	0,024	0,017	0,024
15,1515	0,017	-0,003	0,017	0,028	-0,005	0,028
20,202	0,020	-0,014	0,020	0,029	-0,021	0,029
25,2525	0,023	-0,025	0,023	0,029	-0,031	0,029
30,303	0,026	-0,035	0,026	0,028	-0,038	0,028
35,3535	0,029	-0,045	0,029	0,027	-0,042	0,027
40,404	0,030	-0,054	0,030	0,025	-0,044	0,025
45,4545	0,032	-0,062	0,032	0,023	-0,045	0,023
50,5051	0,033	-0,070	0,033	0,022	-0,046	0,022
55,5556	0,034	-0,078	0,034	0,020	-0,046	0,020
60,6061	0,035	-0,085	0,035	0,018	-0,045	0,018
65,6566	0,035	-0,092	0,035	0,017	-0,045	0,017
70,7071	0,035	-0,098	0,035	0,016	-0,044	0,016
75,7576	0,035	-0,103	0,035	0,014	-0,042	0,014
80,8081	0,034	-0,106	0,034	0,013	-0,041	0,013
85,8586	0,033	-0,107	0,033	0,012	-0,039	0,012
90,9091	0,032	-0,105	0,032	0,011	-0,036	0,011
95,9596	0,030	-0,101	0,030	0,010	-0,033	0,010
101,0101	0,029	-0,100	0,029	0,009	-0,031	0,009
106,0606	0,027	-0,102	0,027	0,008	-0,030	0,008
111,1111	0,025	-0,107	0,025	0,007	-0,031	0,007
116,1616	0,022	-0,114	0,022	0,006	-0,032	0,006
121,2121	0,020	-0,121	0,020	0,005	-0,033	0,005
126,2626	0,017	-0,126	0,017	0,005	-0,033	0,005
131,3131	0,015	-0,128	0,015	0,004	-0,033	0,004
136,3636	0,014	-0,127	0,014	0,004	-0,032	0,004
141,4141	0,013	-0,123	0,013	0,003	-0,031	0,003
146,4646	0,012	-0,119	0,012	0,003	-0,029	0,003
151,5152	0,010	-0,115	0,010	0,003	-0,028	0,003
156,5657	0,009	-0,110	0,009	0,002	-0,026	0,002
161,6162	0,008	-0,106	0,008	0,002	-0,025	0,002
171,7172	0,007	-0,104	0,007	0,002	-0,024	0,002
176,7677	0,006	-0,111	0,006	0,001	-0,026	0,001
181,8182	0,005	-0,121	0,005	0,001	-0,028	0,001
191,9192	0,006	-0,119	0,006	0,001	-0,027	0,001
196,9697	0,008	-0,113	0,008	0,002	-0,025	0,002
202,0202	0,009	-0,110	0,009	0,002	-0,024	0,002
212,1212	0,010	-0,109	0,010	0,002	-0,024	0,002
217,1717	0,011	-0,110	0,011	0,002	-0,024	0,002

222,2222	0,012	-0,110	0,012	0,003	-0,023	0,003
232,3232	0,017	-0,111	0,017	0,003	-0,023	0,003
237,3737	0,018	-0,113	0,018	0,004	-0,023	0,004
252,5253	0,019	-0,124	0,019	0,004	-0,024	0,004
257,5758	0,021	-0,118	0,021	0,004	-0,022	0,004
262,6263	0,025	-0,113	0,025	0,005	-0,021	0,005
267,6768	0,029	-0,112	0,029	0,005	-0,020	0,005
277,7778	0,036	-0,118	0,036	0,006	-0,020	0,006
282,8283	0,040	-0,126	0,040	0,007	-0,021	0,007
292,9293	0,037	-0,123	0,037	0,006	-0,019	0,006
297,9798	0,030	-0,115	0,030	0,004	-0,017	0,004
303,0303	0,024	-0,111	0,024	0,004	-0,016	0,004
308,0808	0,021	-0,109	0,021	0,003	-0,016	0,003
313,1313	0,019	-0,111	0,019	0,003	-0,016	0,003
318,1818	0,018	-0,113	0,018	0,002	-0,016	0,002
323,2323	0,016	-0,116	0,016	0,002	-0,016	0,002
328,2828	0,014	-0,120	0,014	0,002	-0,016	0,002
333,3333	0,012	-0,115	0,012	0,002	-0,016	0,002
338,3838	0,009	-0,103	0,009	0,001	-0,014	0,001
348,4848	0,006	-0,090	0,006	0,001	-0,012	0,001
353,5354	0,004	-0,091	0,004	0,001	-0,012	0,001
358,5859	0,004	-0,095	0,004	0,000	-0,013	0,000
363,6364	0,003	-0,101	0,003	0,000	-0,013	0,000
368,6869	0,003	-0,105	0,003	0,000	-0,014	0,000
373,7374	0,002	-0,109	0,002	0,000	-0,014	0,000
378,7879	0,001	-0,110	0,001	0,000	-0,014	0,000
388,8889	0,001	-0,088	0,001	0,000	-0,012	0,000
398,9899	0,001	-0,068	0,001	0,000	-0,009	0,000
404,0404	0,000	-0,061	0,000	0,000	-0,008	0,000
409,0909	0,000	-0,055	0,000	0,000	-0,007	0,000
419,1919	-0,001	-0,043	-0,001	0,000	-0,006	0,000
429,2929	-615,917	0,001	-615,917	-81,214	0,000	-81,214
429,2929	52369,114	7054,860	52369,114	6912,776	931,249	6912,776

ANEXO B.3 - CÁLCULOS PELO MÉTODO LE DUY ZARGIC DOS EXPERIMENTOS 3 e 3'

Tabela 12. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 50 g L<sup>-1</sup> e pH 3,0 (3 e 3').

Tempo (h)	dXdt (g L h <sup>-1</sup> )	dS/dt (g L h <sup>-1</sup> )	dP/dt (g L h <sup>-1</sup> )	uX (L h <sup>-1</sup> )	uS (g g h <sup>-1</sup> )	uP (g g h <sup>-1</sup> )
0,0000						
5,7727						
11,5455	0,000	-0,126	0,000	0,000	-0,383	0,000
17,3182	0,003	-0,123	0,003	0,008	-0,368	0,008
23,0909	0,005	-0,121	0,005	0,013	-0,340	0,013
28,8636	0,007	-0,119	0,007	0,017	-0,305	0,017
34,6364	0,009	-0,117	0,009	0,020	-0,269	0,020
40,4091	0,010	-0,116	0,010	0,021	-0,235	0,021
46,1818	0,012	-0,114	0,012	0,021	-0,205	0,021
51,9545	0,013	-0,112	0,013	0,020	-0,179	0,020
57,7273	0,013	-0,110	0,013	0,019	-0,158	0,019
63,5000	0,013	-0,109	0,013	0,017	-0,140	0,017
69,2727	0,013	-0,107	0,013	0,016	-0,125	0,016
75,0455	0,013	-0,106	0,013	0,014	-0,114	0,014
80,8182	0,014	-0,104	0,014	0,014	-0,103	0,014
86,5909	0,015	-0,103	0,015	0,014	-0,094	0,014
92,3636	0,016	-0,102	0,016	0,014	-0,086	0,014
98,1364	0,017	-0,101	0,017	0,014	-0,079	0,014
103,9091	0,019	-0,100	0,019	0,014	-0,073	0,014
109,6818	0,019	-0,099	0,019	0,013	-0,067	0,013
115,4545	0,020	-0,099	0,020	0,012	-0,062	0,012
121,2273	0,020	-0,098	0,020	0,012	-0,057	0,012
127,0000	0,020	-0,097	0,020	0,011	-0,053	0,011
132,7727	0,021	-0,096	0,021	0,011	-0,049	0,011
138,5455	0,021	-0,095	0,021	0,010	-0,046	0,010
144,3182	0,021	-0,093	0,021	0,010	-0,042	0,010
150,0909	0,021	-0,092	0,021	0,009	-0,039	0,009
155,8636	0,021	-0,090	0,021	0,009	-0,037	0,009
161,6364	0,021	-0,087	0,021	0,008	-0,034	0,008
167,4091	0,021	-0,085	0,021	0,008	-0,032	0,008
173,1818	0,021	-0,083	0,021	0,007	-0,030	0,007
178,9545	0,021	-0,081	0,021	0,007	-0,028	0,007
184,7273	0,021	-0,080	0,021	0,007	-0,026	0,007
190,5000	0,022	-0,078	0,022	0,007	-0,025	0,007
196,2727	0,022	-0,077	0,022	0,007	-0,023	0,007
202,0455	0,023	-0,076	0,023	0,007	-0,022	0,007
207,8182	0,023	-0,076	0,023	0,007	-0,021	0,007
213,5909	0,024	-0,075	0,024	0,007	-0,020	0,007
219,3636	0,024	-0,076	0,024	0,006	-0,020	0,006

225,1364	0,023	-0,078	0,023	0,006	-0,020	0,006
230,9091	0,022	-0,081	0,022	0,005	-0,020	0,005
236,6818	0,020	-0,084	0,020	0,005	-0,020	0,005
242,4545	0,019	-0,085	0,019	0,004	-0,020	0,004
248,2273	0,020	-0,079	0,020	0,005	-0,018	0,005
254,0000	0,022	-0,068	0,022	0,005	-0,015	0,005
259,7727	0,022	-0,060	0,022	0,005	-0,013	0,005
265,5455	0,020	-0,063	0,020	0,004	-0,013	0,004
271,3182	0,018	-0,068	0,018	0,004	-0,014	0,004
277,0909	0,016	-0,072	0,016	0,003	-0,014	0,003
282,8636	0,014	-0,073	0,014	0,003	-0,014	0,003
288,6364	0,013	-0,073	0,013	0,003	-0,014	0,003
294,4091	0,012	-0,071	0,012	0,002	-0,014	0,002
300,1818	0,011	-0,069	0,011	0,002	-0,013	0,002
305,9545	0,009	-0,069	0,009	0,002	-0,013	0,002
311,7273	0,008	-0,069	0,008	0,001	-0,013	0,001
317,5000	0,007	-0,069	0,007	0,001	-0,013	0,001
323,2727	0,006	-0,071	0,006	0,001	-0,013	0,001
329,0455	0,005	-0,073	0,005	0,001	-0,013	0,001
340,5909	0,005	-0,078	0,005	0,001	-0,014	0,001
346,3636	0,005	-0,080	0,005	0,001	-0,014	0,001
352,1364	0,005	-0,080	0,005	0,001	-0,014	0,001
357,9091	0,005	-0,080	0,005	0,001	-0,014	0,001
363,6818	0,006	-0,079	0,006	0,001	-0,014	0,001
369,4545	0,006	-0,079	0,006	0,001	-0,014	0,001
375,2273	0,008	-0,080	0,008	0,001	-0,014	0,001
381,0000	0,010	-0,081	0,010	0,002	-0,014	0,002
386,7727	0,012	-0,082	0,012	0,002	-0,014	0,002
392,5455	0,016	-0,080	0,016	0,003	-0,013	0,003
398,3182	0,020	-0,076	0,020	0,003	-0,012	0,003
404,0909	0,025	-0,068	0,025	0,004	-0,011	0,004
409,8636	0,029	-0,062	0,029	0,005	-0,010	0,005
415,6364	0,031	-0,061	0,031	0,005	-0,009	0,005
421,4091	0,032	-0,064	0,032	0,005	-0,010	0,005
427,1818	0,033	-0,072	0,033	0,005	-0,010	0,005
432,9545	0,033	-0,082	0,033	0,005	-0,012	0,005
438,7273	0,033	-0,085	0,033	0,005	-0,012	0,005
444,5000	0,035	-0,080	0,035	0,005	-0,011	0,005
450,2727	0,038	-0,068	0,038	0,005	-0,009	0,005
456,0455	0,040	-0,057	0,040	0,005	-0,007	0,005
461,8182	0,042	-0,080	0,042	0,005	-0,010	0,005
467,5909	0,044	-0,094	0,044	0,005	-0,011	0,005
473,3636	0,044	-0,093	0,044	0,005	-0,011	0,005
484,9091	0,042	-0,083	0,042	0,005	-0,009	0,005
490,6818	0,040	-0,085	0,040	0,004	-0,009	0,004
496,4545	0,038	-0,093	0,038	0,004	-0,010	0,004
508,0000	0,032	-0,106	0,032	0,003	-0,011	0,003
519,5455	0,026	-0,101	0,026	0,003	-0,010	0,003
525,3182	0,024	-0,098	0,024	0,002	-0,009	0,002
536,8636	0,019	-0,092	0,019	0,002	-0,009	0,002
548,4091	0,015	-0,086	0,015	0,001	-0,008	0,001
559,9545	0,011	-0,079	0,011	0,001	-0,007	0,001
565,7273	0,008	-0,076	0,008	0,001	-0,007	0,001
571,5000	0,007	-0,072	0,007	0,001	-0,006	0,001

ANEXO B.4 - CÁLCULOS PELO MÉTODO LE DUY ZARGIC DOS EXPERIMENTOS 4 e 4'

Tabela 13. Cálculos de velocidade pelo método Le Duy Zargic a partir dos dados obtidos pelo programa Emerson dos experimentos de 50 g L<sup>-1</sup> e pH 4,0 (4 e 4').

Tempo (h)	dXdt (g L h <sup>-1</sup> )	dS/dt (g L h <sup>-1</sup> )	dP/dt (g L h <sup>-1</sup> )	uX (L h <sup>-1</sup> )	uS (g g h <sup>-1</sup> )	uP (g g h <sup>-1</sup> )
0,0000						
6,3182	0,004	-0,003	0,001	0,007	-0,006	0,001
12,6364	0,005	-0,009	0,001	0,008	-0,015	0,001
18,9545	0,006	-0,015	0,001	0,009	-0,024	0,001
25,2727	0,006	-0,020	0,001	0,010	-0,031	0,001
31,5909	0,007	-0,026	0,001	0,010	-0,037	0,001
37,9091	0,008	-0,032	0,001	0,010	-0,042	0,001
44,2273	0,009	-0,037	0,001	0,011	-0,046	0,001
50,5455	0,009	-0,042	0,001	0,011	-0,049	0,001
56,8636	0,010	-0,047	0,001	0,011	-0,052	0,001
63,1818	0,011	-0,052	0,001	0,011	-0,053	0,001
69,5000	0,012	-0,056	0,001	0,011	-0,053	0,001
75,8182	0,012	-0,059	0,001	0,011	-0,053	0,001
82,1364	0,013	-0,062	0,001	0,011	-0,052	0,001
88,4545	0,014	-0,065	0,001	0,011	-0,050	0,001
94,7727	0,015	-0,066	0,001	0,011	-0,048	0,001
101,0909	0,015	-0,069	0,001	0,010	-0,047	0,001
107,4091	0,016	-0,074	0,001	0,010	-0,047	0,000
113,7273	0,017	-0,081	0,001	0,010	-0,048	0,000
120,0455	0,017	-0,092	0,001	0,010	-0,052	0,000
126,3636	0,018	-0,105	0,001	0,009	-0,055	0,000
132,6818	0,019	-0,113	0,001	0,009	-0,056	0,000
139,0000	0,021	-0,110	0,001	0,010	-0,051	0,000
145,3182	0,022	-0,103	0,001	0,010	-0,045	0,000
151,6364	0,023	-0,099	0,001	0,010	-0,041	0,000
157,9545	0,023	-0,097	0,001	0,009	-0,038	0,000
164,2727	0,023	-0,099	0,001	0,008	-0,036	0,000
170,5909	0,022	-0,102	0,001	0,008	-0,036	0,000
176,9091	0,022	-0,104	0,001	0,007	-0,035	0,000
183,2273	0,022	-0,102	0,001	0,007	-0,033	0,000
189,5455	0,023	-0,097	0,001	0,007	-0,030	0,000
195,8636	0,024	-0,090	0,001	0,007	-0,026	0,000
202,1818	0,024	-0,085	0,001	0,007	-0,024	0,000
208,5000	0,023	-0,082	0,002	0,006	-0,022	0,000
214,8182	0,022	-0,080	0,002	0,006	-0,021	0,000
221,1364	0,019	-0,078	0,002	0,005	-0,020	0,001
227,4545	0,018	-0,075	0,002	0,004	-0,018	0,001
233,7727	0,017	-0,070	0,003	0,004	-0,016	0,001
240,0909	0,018	-0,063	0,003	0,004	-0,015	0,001

246,4091	0,018	-0,057	0,003	0,004	-0,013	0,001
252,7273	0,018	-0,053	0,003	0,004	-0,012	0,001
259,0455	0,018	-0,052	0,003	0,004	-0,011	0,001
265,3636	0,018	-0,051	0,004	0,004	-0,011	0,001
271,6818	0,017	-0,050	0,004	0,003	-0,010	0,001
278,0000	0,016	-0,050	0,004	0,003	-0,010	0,001
284,3182	0,015	-0,051	0,003	0,003	-0,010	0,001
290,6364	0,014	-0,052	0,003	0,003	-0,010	0,001
296,9545	0,014	-0,052	0,003	0,003	-0,010	0,001
303,2727	0,014	-0,050	0,003	0,003	-0,009	0,001
309,5909	0,014	-0,050	0,002	0,002	-0,009	0,000
315,9091	0,013	-0,052	0,002	0,002	-0,009	0,000
322,2273	0,012	-0,056	0,002	0,002	-0,010	0,000
328,5455	0,011	-0,062	0,001	0,002	-0,011	0,000
334,8636	0,010	-0,069	0,001	0,002	-0,012	0,000
341,1818	0,009	-0,070	0,001	0,001	-0,012	0,000
347,5000	0,008	-0,066	0,001	0,001	-0,011	0,000
353,8182	0,007	-0,063	0,001	0,001	-0,011	0,000
360,1364	0,007	-0,061	0,001	0,001	-0,010	0,000
366,4545	0,006	-0,060	0,001	0,001	-0,010	0,000
372,7727	0,006	-0,060	0,001	0,001	-0,010	0,000
379,0909	0,006	-0,062	0,001	0,001	-0,010	0,000
385,4091	0,005	-0,064	0,001	0,001	-0,010	0,000
391,7273	0,005	-0,067	0,001	0,001	-0,011	0,000
398,0455	0,005	-0,071	0,000	0,001	-0,012	0,000
404,3636	0,004	-0,076	0,000	0,001	-0,012	0,000
410,6818	0,004	-0,081	0,000	0,001	-0,013	0,000
417,0000	0,003	-0,087	0,000	0,001	-0,014	0,000
448,5909	0,003	-0,082	0,000	0,001	-0,013	0,000
454,9091	0,003	-0,081	0,000	0,001	-0,013	0,000
461,2273	0,004	-0,082	0,000	0,001	-0,013	0,000
467,5455	0,004	-0,084	0,000	0,001	-0,013	0,000
473,8636	0,004	-0,085	0,000	0,001	-0,013	0,000
499,1364	0,003	-0,091	0,000	0,001	-0,014	0,000
505,4545	0,003	-0,092	0,000	0,001	-0,014	0,000
562,3182	0,002	-0,096	0,000	0,000	-0,014	0,000
568,6364	0,002	-0,095	0,000	0,000	-0,014	0,000
574,9545	0,002	-0,094	0,000	0,000	-0,014	0,000
581,2727	0,002	-0,093	0,000	0,000	-0,014	0,000
587,5909	0,002	-0,092	0,000	0,000	-0,014	0,000
593,9091	0,001	-0,091	0,000	0,000	-0,013	0,000
600,2273	0,001	-0,089	0,000	0,000	-0,013	0,000
606,5455	0,001	-0,087	0,000	0,000	-0,013	0,000
612,8636	0,001	-0,085	0,000	0,000	-0,013	0,000
619,1818	0,001	-0,083	0,000	0,000	-0,012	0,000
625,5000	0,001	-0,080	0,000	0,000	-0,012	0,000