

Produção e Caracterização de Biomassa Extracelular Obtida por Fermentação Submersa Usando *Lasidiopodia theobromae* Isolado do Cacau

Josileide Gonçalves Borges

Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, UFBA

Larissa Alves de Sousa Costa

Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, UFBA

Janice Isabel Druzian

Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, UFBA

Resumo: Gomas produzidas por microrganismos são usadas como modificadores de alimentos e a biomassa residual para isolamento de seus constituintes. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar biomassa extracelular por fermentação submersa com *Lasidiopodia theobromae* isolado de cacau da Bahia com morte descendente. Foram testadas quatro fontes de carbono fermentadas a 28 °C, 180 rpm por 72 horas. A que resultou em maior produção de biomassa foi avaliada quanto à variação da concentração e pH. As frações obtidas foram caracterizadas por infravermelho (FTIR) e análise por termogravimetria (TG), composição centesimal e monossacarídica. A fermentação submersa da sacarose comercial a 40 g.L⁻¹ em pH 4,0 por *L. theobromae* resultou em máxima produção da fração I (8,64g.L⁻¹), e a 50g.L⁻¹, pH 5,0, da fração II (23,69 g.L⁻¹). Os espectros de FTIR mostraram presença de grupos amino, polióis e ésteres, e nas análises termogravimétricas observaram-se três eventos de perda de massa em diferentes intensidades. As frações contêm mesma composição em proporções diferenciadas, sendo fontes de proteínas (19,88-29,45%), lipídios (11,07-28,79%), cinzas (3,55-3,88%), e carboidratos (30,16-37,96%) compostos unicamente de glicose e manose em diferentes proporções, portanto ambas glucomananas. As frações apresentam propriedades e potencial desejáveis para ampla utilização em processos biotecnológicos de alta relevância científica.

Palavras-chave: *Goma, Lasidiopodia theobromae, biomassa residual.*

Production and Characterization of Extracellular Biomass Obtained by the Fermentation Submerged with *Lasidiopodia theobromae* Isolate from Cocoa

Abstract: Gums produced by microorganisms are used as food improvement agents and the residual biomass is used for the isolation of their constituents. The objective of this work was to produce and characterize fractions of extracellular biomass in submerged fermentation with *Lasidiopodia theobromae* isolated from cocoa of Bahia with descending death. We tested four carbon sources fermented at 28 °C, 180 rpm for 72 h. The one resulting in greater production of biomass was evaluated with regard to changes in concentration and pH. The fractions obtained were characterized by infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA), percentage composition and monosaccharide. The submerged fermentation by *L. theobromae* with commercial sucrose at 40 g.L⁻¹ and pH 4.0 led to a maximum production of fraction I (8.64 g.L⁻¹), while the fermentation at 50 g.L⁻¹ and pH 5.0 yielded maximum production of fraction II (23.69 g.L⁻¹). The FTIR spectra indicated the presence of amino groups, polyols and esters. Three weight loss events with different intensities were observed in the thermogravimetric analysis. The fractions have the same composition, but with different proportions, being sources of protein (19.88-29.45%), lipids (11.07-28.79%), ash (3.55-3.88%), and carbohydrates (30.16-37.96%) made only of glucose and mannose, i.e. they are both glucomannans. The fractions have desirable properties for wide use in biotechnological processes of high scientific relevance.

Keywords: *Gum, Lasidiopodia theobromae, residual biomass.*

Introdução

Muitos microrganismos são fitopatógenos de várias espécies vegetais causando enormes prejuízos durante a colheita. Entre os fitopatógenos do cacau (*Theobroma cacao*) estão os fungos *Moniliophthora perniciosa* (Vassoura-de-bruxa) e *Lasidiopodia theobromae* (morte descendente). Estes microrganismos possuem mecanismos de adesão ao hospedeiro, na qual as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de natureza proteica ou glicoproteica e, por isso, a produção de biopolímeros extracelulares têm sido associada à capacidade do microrganismo causar doenças em plantas^[1-3].

Os biopolímeros têm um alto potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais, destacando-se a indústria alimentícia e petroquímica. As vantagens dos biopolímeros microbianos sobre os obtidos de forma tradicional estão ligadas às propriedades físico-químicas reprodutíveis, custo e suprimentos estáveis. A pesquisa visando à aplicação industrial está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, que tem processos de extração e purificação mais simples e maior produtividade e são livres de contaminantes^[4,5].

Devido, às propriedades funcionais versáteis, os biopolímeros podem se tornar produtos de grande interesse na criação de novas texturas e, conseqüentemente, na geração de novos produtos^[6]. Na indústria de alimentos esses biomateriais têm sido usados no revestimento de alimentos retendo sabor e aparência, preparação de filmes e fibras, agentes emulsificantes, espessantes, gelificantes e texturizantes^[7,8]. A biomassa residual obtida durante o processo fermentativo tem sido estudada para isolamento de seus principais constituintes, tais como enzimas, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Estes compostos também apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e grande valor agregado devido ao seu potencial como suplementos na alimentação, e uma vez utilizados evitam a geração de rejeitos^[9,10].

Para a biossíntese de glucomanas os requisitos nutricionais mínimos necessários do meio fermentativo são fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P). Além disto, o pH, a temperatura, agitação, aeração da etapa de fermentação são variáveis que exercem importante influência na produção^[9,11,12]. Para que ocorra maior produção de biomassa residual ou de exopolissacarídeos no final do processo, estas variáveis devem ser definidas no cultivo microbiano.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção e caracterizar as macromoléculas extracelulares obtidas por fermentação submersa do fungo *Lasidiopodia theobromae* isolado de cacau em morte descendente.

Parte Experimental

Microrganismos

O microrganismo utilizado foi *Lasidiopodia theobromae* isolado do cacau apresentando morte descendente e identificado taxonomicamente pela CEPLAC-Itabuna/Bahia/Brasil.

Meios de cultura

O microrganismo foi repicado em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e mantido em estufa bacteriológica a 28 °C ± 2 °C por 7 dias. O meio fermentativo foi preparado com extrato de levedura (2 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄ (2 g.L⁻¹), Peptona (10 g.L⁻¹), Extrato malte (2 g.L⁻¹) e a fonte de carbono^[13,14].

Seleção da fonte de carbono do meio fermentativo

Foram transferidas 3 esferas colonizadas de 0,5 cm de diâmetro, contendo meio de cultivo com micélio, para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio fermentativo e inicialmente 10 g.L⁻¹ da fonte de carbono (sacarose comercial e sacarose grau analítico, glicerina e glicose) em pH 5,0. Os frascos Erlenmeyers foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação (Modelo Tecnal) a 28 °C ± 2 °C por 72 horas, a 180 rpm^[14]. Após esse período, o meio foi ultracentrifugado sendo o sobrenadante precipitado em 3 volumes de etanol gelado. O peso da goma e da biomassa residual foi determinado por gravimetria e a fonte de carbono que apresentou melhor produção foi selecionada para os demais testes^[15].

Efeito da concentração e pH na produção de biomassa extracelular

Diferentes concentrações da fonte de carbono (10 g.L⁻¹-50 g.L⁻¹) e o pH (4,0-8,0) do meio foram testadas, buscando avaliar a influência destes fatores na produção das macromoléculas fúngicas e o ensaio de maior produção foi selecionado para testes de caracterização^[15].

Composição centesimal das frações

A umidade foi obtida por secagem no infravermelho, em equipamento da marca Mettler LTJ, ajustando-se a intensidade da radiação emitida de modo que a amostra atingisse 180 °C. Os teores de proteína bruta e cinzas foram determinados segundo metodologia AOAC^[16] por Kjeldall modelo TE-036/1 da Tecnal e mufla modelo 402 D da Lavosier Fornos. O teor de lipídios totais foi determinado por Bligh e Dyer^[17] e o percentual de carboidratos foi calculado por diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína bruta, lipídios totais e cinzas. Os açúcares redutores totais foram determinados por DNS (ácido 3-5-dinitrossalicílico) segundo Miller^[18].

Quantificação de açúcares redutores totais e composição em monossacarídeos

Os açúcares redutores totais foram quantificados por espectrofotometria em 540 nm, utilizando curva padrão de glicose (0,2 até 1,5 mg/mL) e os resultados foram expressos em ART (Açúcares Redutores Totais). Para composição em monossacarídeos, cada fração foi submetida à hidrólise ácida (TFA × 1M, 100 °C, 10 h), em tubos selados. Os hidrolisados foram dissolvidos em água cromatográfica tipo I, e filtrados em membrana de celulose regenerada com poros de 0,2 µm. Frações contendo cerca de 5 µL dos hidrolisados foram injetadas

em CLAE Séries 200 da Perkin Elmer equipado com um detector de índice de refração e fluxo de 0,1 mL / min a 80 °C^[4].

Análise por FTIR

Os espectros de FTIR (4000 e 600 cm⁻¹) foram obtidos em espectrofotômetro modelo Spectrum 100 com resolução 4 cm⁻¹. A análise foi realizada nas pastilhas formadas por 1 mg de cada fração macerado com 250 mg de KBr e com a aplicação de pressão de 5,5 t por 3 min^[19].

Análise por Termogravimetria

Os ensaios foram realizados em analisador térmico modelo DTG-60, marca Shimadzu, em amostras com massas de aproximadamente 8 mg, cadinho de alumínio, atmosfera inerte de nitrogênio de 20 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25 a 600 °C^[20].

Resultados e Discussão

Após a fermentação, as frações foram recuperadas e quantificadas para avaliação da produção. A Figura 1 apresenta os aspectos das frações produzidas por fermentação submersa do fungo *L. theobromae* em meio de sacarose.

As frações I e II apresentam diferenças visuais quanto à precipitação em etanol, características físicas, consistência e rendimentos da produção. A fração I apresentou aspecto transparente com leve coloração amarelada, provavelmente influenciada pela pouca pureza da sacarose comercial e consistência bastante gelatinosa, o que sugere a capacidade do biopolímero ser

usado como espessante. A fração II apresenta cor marrom claro, aspecto semelhante ao de uma banana amassada, consistência firme e pouca transparência. Muitos microrganismos produtores de polissacarídeos como o *L. theobromae* respondem de maneiras diferentes a fatores físico-químicos o que influencia na gelatinosidade da goma^[21] sendo que a fonte de carbono é a principal determinante da quantidade e qualidade do polissacarídeo e biomassa residual (Tabela 1).

Constata-se pelos dados da Tabela 1 que a sacarose, tanto comercial como grau analítico, foi a fonte de carbono que resultou em maior produção de ambas as frações extracelulares. Apesar das produções das frações terem sido similares entre si, supõe-se que a pureza da sacarose grau analítico tenha favorecido mais a produção da fração I. Considerando a similaridade dos resultados obtidos, a sacarose comercial foi selecionada para os ensaios posteriores em função do menor custo.

Na Tabela 2 observa-se a influência da concentração e pH do meio fermentativo na produção das macromoléculas.

Ivanovi e colaboradores^[22] relataram produção de goma precipitável em etanol por fermentação de glicose em concentrações de 20 g.L⁻¹ a 60 g.L⁻¹ por *L. theobromae* com produção máxima de 7,01 g.L⁻¹ e de biomassa residual de 17,2 g.L⁻¹, valores superiores aos obtidos neste estudo com fermentação da mesma fonte de carbono a 10 g.L⁻¹ por *L. theobromae* isolado do cacau em morte descendente (Tabela 1). Entretanto, o fungo apresentou uma melhor bioconversão em sacarose comercial, resultando em produções da goma e biomassa residual, em todos os pH e concentração. A maior quantidade da goma precipitável em etanol (Fração I = 8,64 g.L⁻¹) foi

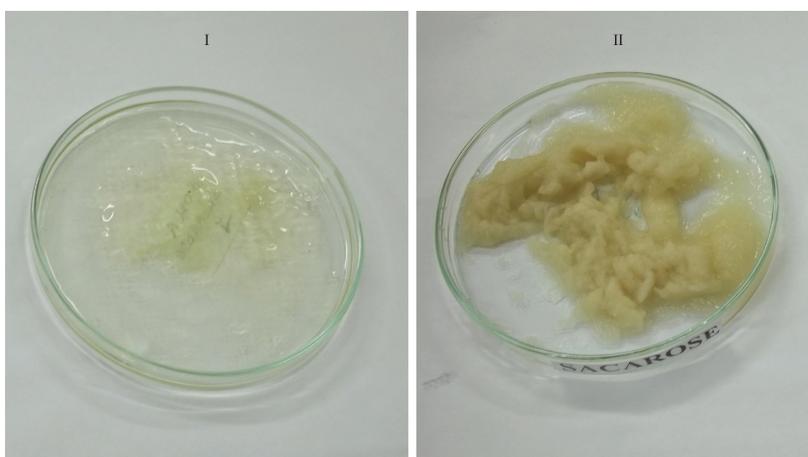


Figura 1. Aspectos da Fração I e II produzidas por *L. theobromae* após ultracentrifugação e precipitação em etanol. I = Goma precipitável em etanol; II = Biomassa residual.

Tabela 1. Produção da fração I e II da biomassa em função da fonte de carbono por *L. theobromae*.

Fonte de carbono	Peso seco Fração I (g)	Produção Fração I (g.L ⁻¹)	Peso seco Fração II (g)	Produção Fração II (g.L ⁻¹)
Sacarose comercial	0,20	2,26	1,18	13,12
Sacarose grau analítico	0,24	2,65	1,08	12,02
Glicose	0,19	2,13	0,94	10,49
Glicerina	0,05	0,56	0,39	4,44

I = Goma precipitável em etanol; II = Biomassa residual.

Tabela 2. Efeito da variação da concentração de sacarose comercial e do pH na produção das frações I e II da biomassa pelo fungo *Lasidiopodia theobromae*.

Ensaio	pH	Sacarose (g.L ⁻¹)	Fração I ± dp (g.L ⁻¹)	Fração II ± dp (g.L ⁻¹)
1	4,0	10	3,39 ± 0,4 ^b	12,01 ± 1,26 ^a
2	4,0	20	2,33 ± 0,38 ^c	12,81 ± 1,37 ^b
3	4,0	30	3,45 ± 0,23 ^d	14,4 ± 1,15 ^c
4	4,0	40	8,64 ± 0,04 ^e	17,33 ± 0,94 ^d
5	4,0	50	6,86 ± 0,43 ^f	21,55 ± 0,26 ^c
6	5,0	10	2,26 ± 0,12 ^g	13,12 ± 0,23 ^f
7	5,0	20	5,89 ± 1,33 ^h	18,25 ± 1,45 ^g
8	5,0	30	4,18 ± 0,53 ⁱ	15,58 ± 2,44 ^h
9	5,0	40	3,69 ± 0,40 ^a	18,71 ± 0,40 ⁱ
10	5,0	50	6,74 ± 0,37 ^j	23,69 ± 2,09 ^j
11	6,0	10	1,95 ± 0,22 ^l	12,96 ± 0,26 ^l
12	6,0	20	1,73 ± 0,11 ^m	14,51 ± 1,46 ^m
13	6,0	30	4,22 ± 0,27 ⁿ	15,41 ± 0,31 ⁿ
14	6,0	40	4,64 ± 0,20 ^o	20,11 ± 0,46 ^o
15	6,0	50	4,07 ± 0,33 ^p	18,68 ± 0,11 ^p
16	7,0	10	2,52 ± 1,03 ^q	12,14 ± 0,91 ^q
17	7,0	20	5,45 ± 1,15 ^r	19,35 ± 0,29 ^r
18	7,0	30	4,59 ± 0,15 ^s	13,42 ± 0,93 ^s
19	7,0	40	3,34 ± 1,61 ^t	22,68 ± 0,49 ^t
20	7,0	50	5,09 ± 1,13 ^u	20,25 ± 0,49 ^u
21	8,0	10	2,86 ± 0,06 ^v	11,75 ± 0,79 ^v
22	8,0	20	2,98 ± 0,48 ^s	15,93 ± 2,69 ^s
23	8,0	30	3,68 ± 0,52 ^a	8,36 ± 0,15 ^z
24	8,0	40	4,89 ± 0,69 ^w	15,06 ± 3,05 ^w
25	8,0	50	8,27 ± 0,48 ^k	13,33 ± 0,08 ^k

I = Goma precipitável em etanol; II = Biomassa residual. Média ± desvio padrão de análises em triplicata. *Valores que apresentam a mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas (p>0,05) pelo Teste de Tuckey a 95% de confiança.

obtida por fermentação de 40 g.L⁻¹ de sacarose comercial em pH 4,0, enquanto que para a biomassa residual (Fração II = 23,69 g.L⁻¹) foi 50 g.L⁻¹ a pH 5,0 (Tabela 2).

A composição química da goma (Fração I) e da biomassa residual (Fração II) produzidas pelo *L. theobromae* é bastante semelhante (Tabela 3), indicando que ambas podem ser utilizadas como fonte de carboidratos, proteínas e lipídios. Apesar da similaridade e da composição, a goma apresenta um percentual muito maior de lipídios totais (28,79%) do que a biomassa residual (11,07%). Por outro lado a biomassa residual é mais rica em proteínas e carboidratos (29,45 e 37,96% respectivamente) do que a goma (19,88 e 30,16%), o que justifica estudos para diferentes aplicações como suplementos nutricionais e/ou aditivos alimentares e cosméticos.

A literatura carece de dados sobre a composição centesimal das frações da biomassa, entretanto, devido à similaridade dos constituintes, parece haver uma correlação entre os componentes da parede celular microbiana e as frações excretadas em meios fermentativos^[23].

Campioni e colaboradores^[24] relatam que a composição centesimal da biomassa residual de *Lasidiopodia theobromae* em Vogel e sacarose (50 g.L⁻¹) por 96 horas também é composta por carboidratos (28,76%), lipídeos (5,33%), proteínas brutas (18,03%) e minerais (13,80%). Com exceção dos teores de cinzas,

Tabela 3. Composição centesimal (%) da Fração I e II em base seca.

Composição	Fração I	Fração II
Umidade	17,29 ^a	17,97 ^a
Lipídio	28,79 ^b	11,07 ^c
Cinzas	3,88 ^d	3,55 ^d
Proteínas	19,88 ^c	29,45 ^f
Carboidratos	30,16 ^e	37,96 ^h
Total	100	100

I = Goma precipitável em etanol; II = Biomassa residual. Média ± desvio padrão de análises em triplicata. *Valores que apresentam a mesma letra, em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas (p>0,05) pelo Teste de Tuckey a 95% de confiança.

todos os outros constituintes de ambas as frações obtidas por *L. theobromae* (Ensaio 4 e 10, Tabela 2) foram superiores, o que parece indicar que a origem do microrganismo, a composição do meio de cultura e as variáveis usadas no processo fermentativo exercem grande influência na rota biossintética^[7,21,22].

Os espectros FTIR das frações da biomassa extracelular de *L. theobromae* estão demonstrados na Figura 2 e permitem avaliar estruturalmente polímeros sintetizados por microrganismos. A absorção na região próxima a 3400 cm⁻¹ nas frações I e II é típica de grupos hidroxilas, o que sugere que a substância tem

carboidratos, dados também comprovados pela análise da composição centesimal.

Os sinais em 1643 e 1655 cm^{-1} para fração I e II, respectivamente, podem ser referentes às carboxilas dos grupos ésteres dos triglicerídeos da fração lipídica^[25]. Bandas em 885 e 896 cm^{-1} presentes na região de impressão digital do espectro indicam a presença de ligações glicosídicas do tipo β . O sinal em 1060 e 1061 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos C-O presentes nos açúcares. Horn^[26] e Monteiro et al.^[11] encontraram os mesmos sinais para espectros de goma xantana, e géis produzidos por bactérias respectivamente, embora existam deslocamentos das bandas para frequências maiores ou menores aos encontrados neste trabalho.

As curvas de termogravimetria (TG) das frações I e II da biomassa produzidas pelo fungo *L. theobromae* estão

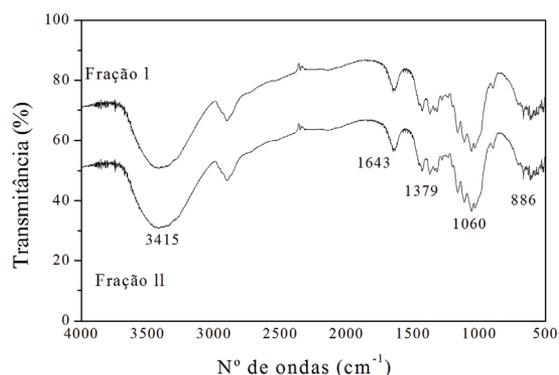
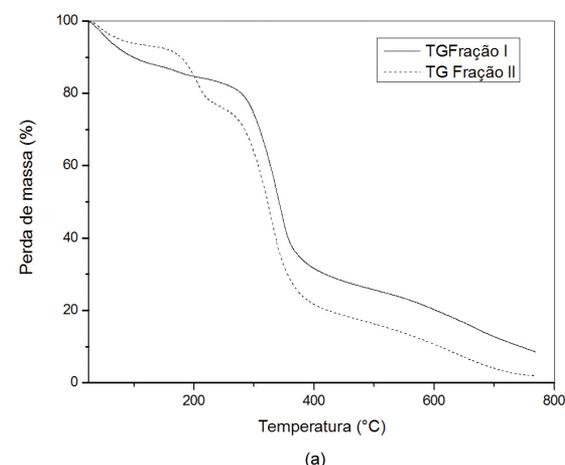


Figura 2. Espectros de FT-IR das frações I e II da biomassa do fungo *L. theobromae*.



apresentadas na Figura 3, mostrando ambas, três eventos de degradação.

As curvas de termogravimetria (TG) apresentam perdas de massa em três estágios. O primeiro evento é resultado da saída de água superficial ocorrendo entre 40 e 100 °C com perda de massa máxima em 55 °C. O segundo evento, que se deve à decomposição das frações da biomassa, ocorreu entre 100-250 °C, enquanto o terceiro estágio, entre 250-400 °C, é atribuído à decomposição e carbonização do material com velocidade máxima de perda de massa em 341 °C^[25-27]. Esses dados permitem acompanhar mudanças nas propriedades físicas e químicas da amostra em relação à temperatura proporcionando uma caracterização do seu perfil de degradação^[28]. Polímeros semelhantes a este, com boa estabilidade térmica, podem ter ampla utilização em processos industriais.

Os açúcares redutores totais e a composição monomérica das frações I e II produzidas pelo fungo *L. theobromae* estão expressas na Tabela 4. Os açúcares redutores totais para a Fração I (2,7%) e para Fração II (4,3%) apresentam valores altos quando comparados a outros estudos^[11,26].

Os hidrolisados indicam uma semelhança na composição monomérica e são compostos unicamente por monômeros de glicose e manose, em relações molares aproximadamente de 1:2 e 3:1 para goma e biomassa residual sendo a fração II mais ramificada que a fração I, devido maior teor de açúcares redutores totais, sendo que ambas são identificadas como glicomananas.

Comparado com outros estudos, este percentual de açúcar redutor se mostra alto, podendo indicar alto grau de ramificação das moléculas polissacarídicas, ou que nem todos os carboidratos presentes nas amostras se encontram na forma de polissacarídeo^[11,27].

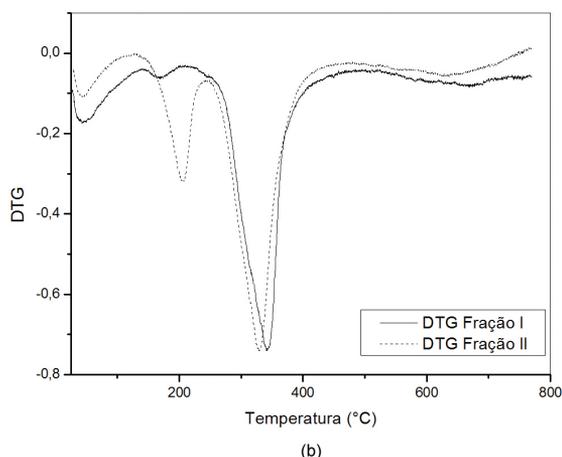


Figura 3. Curvas de termogravimetria (TG) e DTG das frações I e II da biomassa produzida pelo fungo *L. theobromae*.

Tabela 4. Açúcares redutores totais e composição monomérica das frações de biomassa produzidas por *L. theobromae*.

Fração	Açúcar redutor (mg/mL)	Açúcar redutor (%)	Composição monomérica (mg/mL)		Composição monomérica (%)	
			Glicose	Manose	Glicose	Manose
Fração I	0,41 ^a	2,70 ^c	0,59 ^e	0,94 ^g	5,90 ⁱ	9,40 ^l
Fração II	0,65 ^b	4,30 ^d	1,27 ^f	0,45 ^h	12,70 ^j	4,50 ^m

*Valores que apresentam a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey a 95% de confiança.

Conclusão

A fermentação submersa de sacarose comercial pelo fungo *Lasidiopodia theobromae* isolado de cacau da Bahia com morte descendente resultou na máxima produção de duas frações com diferentes comportamentos frente à precipitação com etanol, características visuais e rendimentos. Nas melhores condições de fermentação, 40-50 g.L⁻¹ e pH ácido, a produção da fração I precipitável em etanol, foi inferior a da fração II. Embora contenham os mesmos constituintes as frações de biomassa extracelulares apresentam composições distintas, sendo fontes de proteínas, lipídios, cinzas, e carboidratos compostos unicamente de glicose e manose em diferentes proporções, portanto ambas glucomanas. As frações apresentam propriedades e potencial desejáveis para ampla utilização em processos biotecnológicos de alta relevância científica.

Agradecimentos

CEPLAC pela identificação taxonômica do fungo, CAPES-NANOBIOTEC 13 pelo suporte financeiro, FAPESB e CAPES pela bolsa de mestrado.

Referências Bibliográficas

1. Sogui, J. A.; Leite, B. & Nicholson, R. L. - *Physiol. Mol. Plant P.*, **52**, p.411 (1998). <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1998.0162>
2. Leite, B.; Pascholati, S. F.; Kitajima, W. & Ishida, M. L. - "Revisão Anual de Patologia de", p.119 (2001).
3. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br>>. Acesso em: mar. 2012.
4. Druzian, J. I. - "Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados do solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L)", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2000).
5. Brandão, L. V.; Esperidião, M. C. A. & Druzian, J. I. - *Polímeros*, **20**, p.175 (2010). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000029>
6. Gilad, N. L.; Barnun, N. & Mayer, A. M. - *Microbiol. Lett.*, **199**, p.109 (2001).
7. Barbosa, A. M.; Cunha, P. D. T.; Pigatto, M. M. & Silva, M. L. C. - *Semina: Ciênc Exatas Tecnol*, **25**, p.29 (2004).
8. Canuto, A. P. - "Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais", Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil (2009).
9. Seviour, R. J.; Stasinopoulos, S. J.; Auer, D. P. F. & Gibbs, P. A. - *Cr. Rev. Biotechn.*, **12**, p.279 (1992). <http://dx.doi.org/10.3109/07388559209069196>
10. Cameron, D. R.; Cooper, D. G. & Neufeld, R. J. - *Appl. Environ. Microb.*, **54**, p.1420 (1988).
11. Monteiro, N. K.; Selverio, G. A.; Exposti, D. T. D.; Silva, M. L. C.; Lemos, E. G. M.; Campanharo, J. C. & Silveira, J. L. M. - *Quím. Nova*, p.1-4 (2012).
12. Pavlova, K.; Panchev, I. & Hristozova, T.S. - *World J. Microb. Biot.*, **21**, p.279 (2005). <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-3632-z>
13. Aguiar, C. M.- "Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*", Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil (2010).
14. Dhandhukia, P. C. & Thakkar, V. R. - *African J. Biot*, **6**, p.707 (2007).
15. Steluti, R. M.; Giese, E.C & Piggato, M. M.- *J. Basic Microb.*, **44**, p.480 (2004). <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200410415>
16. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. - "Official methods of analysis", AOAC, Maryland (1995).
17. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. - *J. Biochem. Physiol.*, **37**, p.911 (1959).
18. Miller, G. L.- *Anal. Chem*, **31**, p.426 (1959). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
19. Silva, J. B. A.; Santos, A. V.; Vargas, F. P.; Druzian, J. I. - "Preparação e caracterização de filmes de fécula de mandioca e nanowhiskers de celulose", in: Tópicos temáticos do 11º Congresso Brasileiro de Polímeros, Campos do Jordão, out (2011).
20. Kock, F. V. C.; Filho, E. S.; Oliveira, A. S. & Castro, E. V. R. - "Obtenção e caracterização do biopolímero β -(1-4)-D-glucosamina", in: Tópicos temáticos do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, out (2009).
21. Cunha, P. D. T. - "Produção de exopolissacarídeos fúngicos e suas aplicações", Monografia, Universidade Estadual de Londrina, Brasil (2002).
22. Ivanovi, R. C. - "Produção de biopolímero sintetizado pelo fungo *Lasidiopodia theobromae* em fermentação submersa", in: Anais do IX Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, p.1-4, Paraná (2009).
23. Smith, G. K.; Kapteyn, J. C.; Van Den End, H. & Klis, F. M. - *Curr. Opin. Microb.*, **2**, p.348 (1999).
24. Campioni, T. S.; Oliveira, K. S. & Lima, V. M. G. - "Análise bromatológica da biomassa de *Lasidiopodia theobromae* visando sua aplicação como suplemento Alimentar", in: Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, São José do Rio Preto, (2010).
25. Hong, P. Z.; Li, S. D.; Ou, C. Y.; Li, C. P.; Yang, L. & Zhang, C. H. - *J. Appl. Polym. Sci.* **105**, p.547 (2007). <http://dx.doi.org/10.1002/app.25920>
26. Horn, M. M. - "Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico", Dissertação de Mestrado, Universidade São Paulo, Brasil (2008).
27. Selverio, G. A.; Penna, A. L. B.; Campos-Sás, L. F.; Santos Junior, O.; Vasconcelos, A. F. D.; Silva, M. L. C.; Lemos, E. G. M.; Campanharo, J. C. & Silveira, J. L. M. - *Quím. Nova*, **33**, p.895 (2010).
28. Brown, M. E. - "Introduction to thermal analysis: techniques and applications", Klumer Academic publishers, Dordrecht (2001).

Enviado: 24/05/12
Reenviado: 15/03/13
Aceito: 18/03/13