



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE  
MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO  
DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

**Mariana Mendonça Geraime Teodoro**

**Belo Horizonte - MG  
2015**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE  
MINAS GERAIS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO  
DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

**Mariana Mendonça Geraime Teodoro**

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Augusta G. Gonçalves

**Co-orientadora:** Jacqueline A. Takahashi

**Banca Examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Augusta G. Gonçalves (orientadora)**

**Prof<sup>a</sup> Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira**

**Prof. Dr. Ildefonso Binatti**

**Monografia aprovada em 10 de Junho de 2015**

**Belo Horizonte - MG  
2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Flávia Gonçalves, por ter exercido tão bem esta função.

À Prof<sup>a</sup> Jacqueline Takahashi, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar a parte prática deste trabalho.

À Raquel, à Gesiane, ao Gabriel, à Larissa, à Marina e a todos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da UFMG, que tanto me ajudaram neste processo.

À Dra. Vany Ferraz, do Laboratório de Cromatografia da UFMG, pelas análises cromatográficas.

Ao meu namorado, Bê, pelas vírgulas corrigidas.

Às amigas Quel, Mandinha, Marina, Daphne, Paulinha e Gabi, minhas queridas companheiras de curso.

Ao CEFET pela minha formação e, em especial, aos meus antigos orientadores Fátima de Cássia, Fernanda Badotti e Patterson Patrício.

Aos amigos e à minha família, em especial ao meu irmão João Gabriel, por existirem.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*Ac* - *Absidia cylindrospora*

ACL - Enzima ATP-citrato liase

AG - Ácidos graxos

AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados

AMP - Adenosina monofosfato

CEFET-MG - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

C/N - Razão carbono/nitrogênio

FID - Detector de ionização de chamas (do inglês, *Flame Ionization Detector*)

GC - Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*)

ICEX - Instituto de Ciências Exatas

*Mp* - *Mucor plumbeus*

*Pc* - *Penicillium citrinum*

PDA - Ágar batata dextrose (do inglês, *Potato Dextrose Agar*)

*Pj* - *Penicillium janthinellum*

*Pl* - *Paecilomyces lilacinus*

*Ro* - *Rhizopus oryzae*

SCO - Óleos microbianos (do inglês, *Single Cell Oil*)

*Sr* - *Syncephalastrum racemosum*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (a) Estrutura básica de uma molécula de triacilglicerol e (b) exemplos de moléculas de ácidos graxos monoinsaturada, insaturada e poli-insaturada.....	3
Figura 2 – Biossíntese de lipídios em microrganismos oleaginosos em função da limitação de nitrogênio. (a) Conversão da AMP em amônia; (b) Acúmulo do citrato na mitocôndria; (c) Conversão do citrato em Acetil-CoA no citosol; (d) Produção de malato e conversão da Acetil-CoA em lipídios. Figura extraída de (ROSSI et al., 2011).....	11
Figura 3 – Atividade metabólica de microrganismos oleaginosos em função do aumento do fluxo de carbono, para um fluxo pré determinado de nitrogênio. (a) lipídeos armazenados nas células são utilizados no crescimento celular; (b) há apenas crescimento celular; (c) crescimento celular seguido de acúmulo de lipídios; (d) crescimento celular, acúmulo de lipídio e produção de ácido cítrico. Figura adaptada de Beopoulos et al. (2009a). ....	14
Figura 4 - Esquema simplificado de um cromatógrafo gasoso, com as principais partes indicadas. Figura adaptada de Skoog et al. (2004). ....	18
Figura 5 - Câmara de Neubauer utilizada na contagem de esporos. Figura adaptada de (VICCINI, 2004). ....	20
Figura 6 – Crescimento em grânulos da espécie <i>Penicillium janthinellum</i> . (a) após 24 horas de agitação; (b) após 6 dias; (c) detalhe da forma dos micélios; (d) separação dos micélios por filtração a vácuo.....	23
Figura 7 - (a) micélios da espécie <i>Penicillium janthinellum</i> , após serem secos em estufa. (b) visão superior de um frasco de penicilina contendo o óleo extraído dos micélios da espécie <i>Rhizopus oryzae</i> . ....	24
Figura 8 – Exemplo do cromatograma obtido, após a análise por GC-FID, pela espécie <i>A. cylindrospora</i> . ....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos ácidos graxos de maior ocorrência na natureza. ....	4
Tabela 2 - Ocorrência dos ácidos graxos mais comuns na natureza.....	5
Tabela 3 - Massa seca das células e dos óleos extraídos dos micélios e dos meios de cultivo.....	24
Tabela 4 - Quantidades acumuladas de lipídios intra e extracelular. ....	26
Tabela 5 - Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos intracelulares, obtidas por GC-FID.....	29
Tabela 6 - Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos extracelulares, obtidas por GC-FID.....	31
Tabela 7 - Frações de ácidos saturados e insaturados obtidas por cada espécie.....	33

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

**TEODORO, M. M. G.; GONÇALVES, F. A. G.**

No presente estudo foi avaliada a produção de *Single Cell Oil* por sete espécies de fungos filamentosos, com posterior determinação de seus perfis de ácidos graxos. As espécies escolhidas foram cultivadas em meio com excesso de fonte de carbono e limitação de fonte de nitrogênio, e cultivadas por fermentação submersa, por seis dias, sob constante agitação de 180 rpm e temperatura ambiente. A extração dos óleos se deu por contato vigoroso com hexano por 24 h. Após a extração os micélios e os óleos tiveram suas massas determinadas e os óleos, após serem hidrolisados e metilados foram analisados por GC-FID. Os resultados indicaram que a agitação do meio proporcionou crescimento desejável granular dos micélios. As quantidades de micélio e óleo obtidas e, conseqüentemente, os acúmulos de lipídios indicaram que as espécies, nas condições testadas, não são oleaginosas. Diversos fatores contribuíram para este resultado, como a razão C/N do meio de cultivo, o pH do meio e o tempo de incubação dos microrganismos. Quanto ao perfil de ácidos graxos dos óleos intra e extracelulares, a maioria das espécies apresentou perfis semelhantes e quantidades de ácidos graxos saturados superiores aos insaturados.

**Palavras-chave:** *Single Cell Oil*, fungos filamentosos, ácidos graxos.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Óleos e gorduras .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Características, ocorrências e usos dos ácidos graxos.....	4
2.1.2 Aplicações tecnológicas dos óleos vegetais .....	6
<b>2.2 <i>Single Cell Oil</i> .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Óleos produzidos por fungos filamentosos .....	9
2.2.2 Síntese e acúmulo de lipídeos .....	10
2.2.3 Condições do meio de cultivo: fontes de carbono e nitrogênio .....	12
2.2.4 Aplicações tecnológicas dos óleos microbianos .....	14
<b>2.3 Fungos filamentosos .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Fungos filamentosos utilizados.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Cultivo dos fungos por fermentação submersa .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Preparo do inóculo .....	19
3.2.2 Padronização do inóculo.....	19
3.2.3 Cultivo em fermentação submersa.....	20
<b>3.3 Extração dos óleos .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Determinação das massas de óleo produzidas e biomassas fúngicas	21
<b>3.4 Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama .....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Preparo das amostras .....	22
3.4.2 Análise por GC-FID.....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Cultivo dos fungos.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Avaliação do crescimento e da produção de óleo .....</b>	<b>24</b>

<b>4.3 Perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos .....</b>	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais possuem cada vez mais aplicações industriais por serem matérias-primas renováveis e sustentáveis, capazes de substituir derivados do petróleo. Além dos óleos, os ácidos graxos possuem grande interesse industrial e na alimentação humana. Entretanto, a produção de óleos vegetais demanda grandes áreas de cultivo, e a utilização de novas áreas cultiváveis para este fim pode acarretar em problemas ambientais, como desmatamentos e perdas de habitats naturais. Além disso, os usos não alimentícios dos óleos competem com seus usos alimentícios e podem levar a um aumento no preço dos alimentos.

Em função dos problemas ambientais referentes à expansão da produção de óleos vegetais, fontes alternativas de óleo são cada vez mais pesquisadas. É neste contexto que os óleos produzidos por microrganismos se tornam bastante atrativos. Os óleos microbianos, mais conhecidos como *Single Cell Oil* (SCO), são vantajosos porque possuem ciclo produtivo rápido, não competem com a alimentação, são produzidos sem influência de variações climáticas e estações do ano, além de não provocarem danos ambientais.

Os *Single Cell Oil* são produzidos por microrganismos oleaginosos, como fungos filamentosos, leveduras, algas unicelulares e bactérias. Microrganismos oleaginosos são aqueles que, por definição, acumulam em suas células uma quantidade mínima de 20% de óleo em relação ao seu peso seco. Entretanto, este acúmulo pode chegar a mais de 70 % de sua biomassa, dependendo das condições de cultivo.

Os meios de cultivo correspondem à maior parte dos gastos com SCO e são, portanto, o alvo de diversos estudos que buscam potencializar a produção de óleo e minimizar os custos do processo. Os óleos produzidos por fungos filamentosos se destacam, dos produzidos pelos demais microrganismos oleaginosos, por serem ricos em ácidos graxos poli-insaturados. A presença de ácidos graxos com duas ou mais insaturações é bastante desejável, pois estes são de grande interesse médico e dietético e, conseqüentemente, possuem alto valor agregado. A obtenção de óleos com de alto valor é fundamental, pois viabiliza a produção dos mesmos.

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de óleo de sete espécies de fungos filamentosos, pertencentes à coleção do laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da UFMG, em meio de cultivo com limitação de nitrogênio e excesso de carbono, além de determinar a composição de ácidos graxos desses óleos.

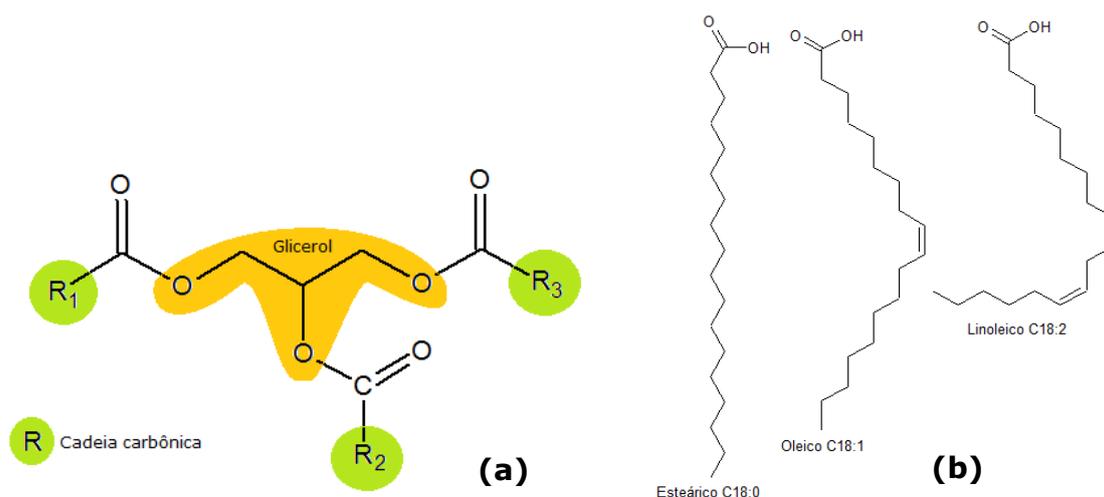
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Óleos e gorduras

A classe dos lipídios é composta por inúmeras estruturas quimicamente diferentes, mas que compartilham a baixa solubilidade em água como característica definidora e comum. De um modo geral, os óleos são lipídeos líquidos à temperatura ambiente de 20 °C, enquanto as gorduras são sólidas nas mesmas condições. Além dessa definição mais abrangente, são conhecidos também os azeites, as manteigas, as ceras e outros tipos de lipídeos menos comuns, mas de grande importância (GIOIELLI, 1996; NELSON & COX, 2002).

De acordo com Gioielli (1996), óleos e gorduras de ocorrência natural são constituídos majoritariamente de triacilgliceróis, sendo que o teor destes varia de 95 a 97 % em óleos brutos e pode ultrapassar 99 % após o processo de refino. Os demais componentes se dividem em esteróis, hidrocarbonetos, corantes, álcoois graxos e tocoferóis.

Os triacilgliceróis (Figura 1a) são considerados os lipídeos mais simples formados a partir de ácidos graxos (AG - Figura 1b). São constituídos de uma molécula de glicerol ligada, por ligação éster, a três ácidos graxos iguais ou diferentes entre si. Os ácidos graxos por sua vez, são ácidos carboxílicos de cadeia carbônica longa (4 a 36 carbonos) podendo conter ou não insaturações (MARZZOCO & TORRES, 1999; NELSON & COX, 2002).



**Figura 1 – (a) Estrutura básica de uma molécula de triacilglicerol e (b) exemplos de moléculas de ácidos graxos monoinsaturada, insaturada e poli-insaturada.**

### 2.1.1 Características, ocorrências e usos dos ácidos graxos

Os ácidos graxos possuem mais comumente número par de carbonos (12 a 24) e cadeias não ramificadas. Além disso, as insaturações apresentam uma localização regular, ocorrendo geralmente entre os carbonos 9 e 10 ( $\Delta^9$ ) quando monoinsaturados. Nos poli-insaturados as outras ligações duplas são comumente  $\Delta^{12}$ . Os ácidos graxos mais frequentes na natureza estão listados na Tabela 1 (MARZZOCO & TORRES, 1999; NELSON & COX, 2002).

**Tabela 1 - Características dos ácidos graxos de maior ocorrência na natureza.**

	<b>Nomenclatura</b>	<b>Nomenclatura Simplificada</b>	<b>Nº átomos de C</b>	<b>Insaturação</b>
<b>Saturados</b>	Mirístico	C14:0	14	-
	Palmítico	C16:0	16	-
	Esteárico	C18:0	18	-
	Araquídico	C20:0	20	-
	Lignocérico	C24:0	24	-
<b>Insaturados</b>	Palmitoleico	C16:1	16	$\Delta^9$
	Oleico	C18:1	18	$\Delta^9$
	Linoleico	C18:2	18	$\Delta^{9,12}$
	$\alpha$ -Linolênico	C18:3 ( $\omega$ -3)	18	$\Delta^{9,12,15}$
	$\gamma$ -Linolênico	C18:3 ( $\omega$ -6)	18	$\Delta^{6,9,12}$
	Araquidônico	C20:4	20	$\Delta^{5,8,11,14}$

Fonte: MARZZOCO & TORRES (1999) modificado.

Os ácidos graxos saturados de maior ocorrência possuem de 12 a 22 átomos de carbonos e a temperatura de fusão destes varia de 42 a 80 °C. Os monoinsaturados possuem de 16 a 22 átomos de carbono com ligação dupla na configuração *cis*, e temperaturas de fusão que vão de 1 a 24 °C.

Já a grande maioria dos poli-insaturados apresentam ligações duplas separadas por um grupo metileno e temperaturas de fusão variando de -49,5 a -5 °C. A ocorrência na natureza de alguns destes ácidos graxos está descrita na Tabela 2 (GURR et al., 2002).

**Tabela 2 – Ocorrência dos ácidos graxos mais comuns na natureza.**

<b>Ácido Graxo</b>	<b>Ocorrência</b>
<b>Mirístico (C14:0)</b>	Componente minoritário de plantas, animais e microrganismos.
<b>Palmítico (C16:0)</b>	O ácido graxo mais comum em animais, plantas e microrganismos.
<b>Palmitoleico (C16:1)</b>	Componente de plantas, animais e microrganismos, e majoritário em algumas sementes oleaginosas.
<b>Estearico (C18:0)</b>	Componente majoritário em animais e fungos e minoritário na maioria das plantas.
<b>Oleico (C18:1)</b>	Ácido graxo monoinsaturado mais comum em plantas e animais, e é encontrado na maioria dos microrganismos.
<b>Linoleico (C18:2)</b>	Componente majoritário dos lipídios das plantas.
<b>Araquídico (C20:0)</b>	Componente minoritário de plantas, animais e microrganismos.
<b>Behênico (C22:0)</b>	Componente minoritário de triacilgliceróis de sementes e ceras de plantas.

Fonte: GURR et al. (2002) modificado.

Os ácidos graxos listados na Tabela 2 possuem diversos usos na indústria de alimentos e em outros segmentos. Os ácidos mirístico, palmítico e palmitoleico são empregados na indústria de cosméticos e sabões, já os ácidos oleico, linoleico, araquídico e behênico possuem aplicações nos setores de lubrificantes, tintas e revestimentos, enquanto que na produção

de alimentos são usados os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Os ácidos graxos poli-insaturados, como o linolênico, são de grande importância na indústria de alimentos por serem ácidos graxos essenciais, ou seja, não são sintetizados pelos mamíferos sendo obtidos apenas pela alimentação (GURR et al., 2002; MURPHY, 2012).

### 2.1.2 Aplicações tecnológicas dos óleos vegetais

Durante os últimos 40 anos houve um aumento de mais de 400 % na produção mundial de óleos vegetais, em função do maior consumo e demanda dos mesmos. Este aumento foi impulsionado pela indústria alimentícia, responsável pelo consumo de mais de 80 % do total produzido. O restante da produção é destinado a outros setores industriais, sendo que a indústria de biodiesel consome aproximadamente 50 % desta parcela (NUNES, 2007; ROSILLO-CALLE et al., 2009).

Na indústria alimentícia os óleos são empregados na produção de margarina, maionese e outros tipos de gorduras, além de estarem presentes em menores quantidades na composição de diversos alimentos, e serem utilizados na preparação por fritura de *chips*, biscoitos, macarrões instantâneos, entre outros inúmeros produtos. O uso doméstico dos óleos na alimentação também contribui significativamente para seu consumo (GUNSTONE, 2002).

Nos segmentos industriais não alimentícios são diversos os produtos que possuem óleos vegetais em suas formulações, como: cosméticos, sabões, tintas, vernizes, lubrificantes, inseticidas e herbicidas, polímeros, entre outros (MURPHY, 2012). Óleos produzidos em menor escala e que, conseqüentemente, possuem preços elevados são bastante empregados na indústria de cosméticos na formulação de hidratantes, xampus e condicionadores em função de suas propriedades emolientes (ANTONIASSI & FREITAS, 2015; PIERI et al., 2009).

A indústria de biodiesel é, dentre os setores não alimentícios, o segmento que consome maior quantidade de óleos vegetais, e para a sua produção uma grande diversidade de óleos pode ser empregada. Entretanto, em função da crescente demanda deste setor, óleos oriundos da palma ou do dendê, por exemplo, se tornam mais atrativos, pois apresentam maior

rendimento por hectare cultivado quando comparados a outras espécies (NUNES, 2007).

Os óleos vegetais possuem um importante papel como matéria-prima sustentável em todos os ramos da indústria, principalmente na produção de biodiesel. Entretanto, os usos não alimentícios dos óleos possuem algumas restrições sendo, as terras disponíveis para o cultivo das sementes oleaginosas, a mais importante. Além disto, a utilização de novas terras para o cultivo de espécies oleaginosas pode resultar em desmatamentos e degradação dos solos, contaminações de corpos d'água e perdas de habitats (FRITSCHÉ et al., 2006). O desvio de áreas de cultivo destinadas à alimentação para o plantio com foco na produção de biocombustíveis pode levar a um aumento do preço dos alimentos (CHRISTOPHE et al., 2012).

Em função dos problemas ambientais citados acima e do alto custo de produção do biodiesel produzido por óleos vegetais (CHRISTOPHE et al., 2012) fontes alternativas de óleo são cada vez mais pesquisadas. Neste contexto, os óleos produzidos por microrganismos se tornam bastante atrativos, em função da facilidade de manuseio destes microrganismos e de padronização do processo, além do espaço ocupado e da fácil manutenção do processo.

## **2.2 Single Cell Oil**

*Single Cell Oil* (SCO) é o termo referente aos óleos produzidos por microrganismos oleaginosos, como fungos, leveduras, algas unicelulares e bactérias. Por definição, microrganismos oleaginosos precisam acumular em suas células uma quantidade mínima de óleo, que corresponde a 20 % de seu peso seco. Entretanto, em condições de cultivo com excesso da fonte de carbono e limitação da fonte de nitrogênio, este acúmulo pode chegar a mais de 70 % de sua biomassa (BEOPOULOS et al., 2009a; THEVENIEAU & NICAUD, 2013).

Para avaliar o potencial de um microrganismo como produtor de óleo, são levados em consideração (THEVENIEAU & NICAUD, 2013):

- A quantidade de óleo que ele consegue acumular, pois quanto maior sua produção, mais atrativo economicamente ele se torna;

- A composição do óleo produzido, uma vez que certos ácidos graxos possuem mais aplicações e maior interesse industrial que outros;
- O seu desempenho em meios de cultivo de baixo custo, pois este representa grande parte dos gastos com a produção de SCO.

Para o cultivo das algas unicelulares, três tipos de culturas podem ser empregados. As fotoautotróficas, utilizando CO<sub>2</sub> e luz solar como fonte de carbono e de energia, em culturas heterotróficas, que usam carbono orgânico ao invés da luz solar e em culturas mistas que além da luz solar, utiliza carbono orgânico como fonte de carbono suplementar. Dentre estas culturas, a heterotrófica é a forma de cultivo mais fácil, pois não depende da luz solar. Entretanto, o custo da fonte de carbono pode limitar a produção. Em média as algas unicelulares acumulam de 20 a 50 % de óleo em relação ao seu peso seco, e as espécies *Chlorophyta* e *Bacillariophyceae* apresentam elevados teores de óleo, fácil cultivo e, portanto atraem a atenção para suas aplicações industriais (LIANG & JIANG, 2013).

Algumas espécies de bactérias são capazes de produzir óleos. Entretanto, apenas os óleos produzidos por poucas espécies podem ser usados como matéria-prima para o biodiesel, pois a maioria produz apenas lipídios complexos como os ácidos polihidroxicanoatos. Já foram descritos na literatura que espécies pertencentes aos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* conseguem acumular quantidades consideráveis de triacilgliceróis. Apesar de ainda apresentarem baixos rendimentos, quando comparados a outros microrganismos, tais como fungos, o uso de engenharia genética e outras tecnologias podem modificar essas espécies bacterianas com o intuito de aprimorar a produção de óleos (LIANG & JIANG, 2013).

Das espécies de leveduras já testadas, 30 são oleaginosas, acumulando em média 40 % de lipídios, sendo os gêneros mais conhecidos: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Destes, a espécie *Yarrowia lipolytica* possui grande destaque, pois produz óleo rico em ácido linoleico (C18:2) (mais de 51 % da sua composição) e, portanto é alvo de diversos estudos (BEOPOULOS et al., 2009a).

Linhagens selvagens e geneticamente modificadas de *Y. lipolytica* foram relatadas como capazes de produzir grandes quantidades de óleos e

representam uma potencial fonte de óleos comestíveis, substituintes da manteiga de cacau e lipídios estruturados. A quantidade de óleo e a composição de ácidos graxos produzidos por esta espécie variam com a fonte de carbono utilizada (PAPANIKOLAOU et al., 2007; RATLEDGE & WYNN, 2002).

Os óleos microbianos possuem diversas vantagens, dentre elas um ciclo produtivo rápido, não competir com a produção de óleos destinados à alimentação, além da sua produção não ser influenciada por variações climáticas e não ser sazonal (ROSSI et al., 2011). Entretanto, a produção de SCO em larga escala ainda é inviável devido aos altos custos (FAKAS et al., 2009b).

### 2.2.1 Óleos produzidos por fungos filamentosos

As leveduras já eram conhecidas nos anos 70 pela sua habilidade de sintetizar e acumular lipídios, ao contrário dos fungos filamentosos que possuem um histórico de pesquisas mais recente (ROSSI et al., 2011). Embora seja o foco de menos estudos, os fungos filamentosos possuem grande importância, principalmente por produzirem óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)(RATLEDGE, 2002; ROSSI et al., 2011).

Ratledge (2002) citou algumas espécies que produzem óleos com altos teores de AGPIs, sendo *Mucor circinelloides* fonte de ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3,  $\omega$ -6), *Mortierella alpina* fonte de ácido araquidônico (C20:4,  $\omega$ -6) e as espécies *Cryptocodinium cohnii* e *Schizochytrium spp.* fontes do ácido docosahexaenóico (C22:6,  $\omega$ -3). Por ser fonte de ácido  $\gamma$ -linolênico, a espécie *Mucor circinelloides* foi utilizada na produção do primeiro óleo microbiano em escala comercial em 1985 (RATLEDGE, 2004).

Liang e Jiang (2013) e Meng et al. (2009) citaram em seus trabalhos algumas linhagens de fungos que apresentaram características interessantes em relação a produção de óleos, sendo algumas dessas espécies a *Cunninghamella echinulata*, *Mucorales fungi*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus oryzae*, *Humicola lanuginosa*, *Mortierella vinacea* e *Mortierella isabelina*.

Abu-Elreesh e Abd-El-Haleem (2014), pesquisando novos fungos em diversos ecossistemas egípcios, identificaram quatro espécies como promissoras para a produção de lipídios. Os fungos isolados foram

identificados como *Drechslera nobleae*, *Fusarium solani*, *Fusarium neocosmosporiellum* e *Aspergillus fumigates*, e acumularam 50, 49, 46 e 71 % de lipídios, respectivamente.

### 2.2.2 Síntese e acúmulo de lipídeos

Os microrganismos necessitam ter disponíveis, no meio de cultura, carbono e nutrientes para que ocorra a síntese de novas células. Entretanto, a limitação na quantidade de alguns elementos como fósforo, magnésio, zinco e, principalmente o nitrogênio, provoca um desequilíbrio no metabolismo das células que induz a produção e acúmulo de óleo pelas mesmas (CHRISTOPHE et al., 2012; GONÇALVES et al., 2014; ROSSI et al., 2011).

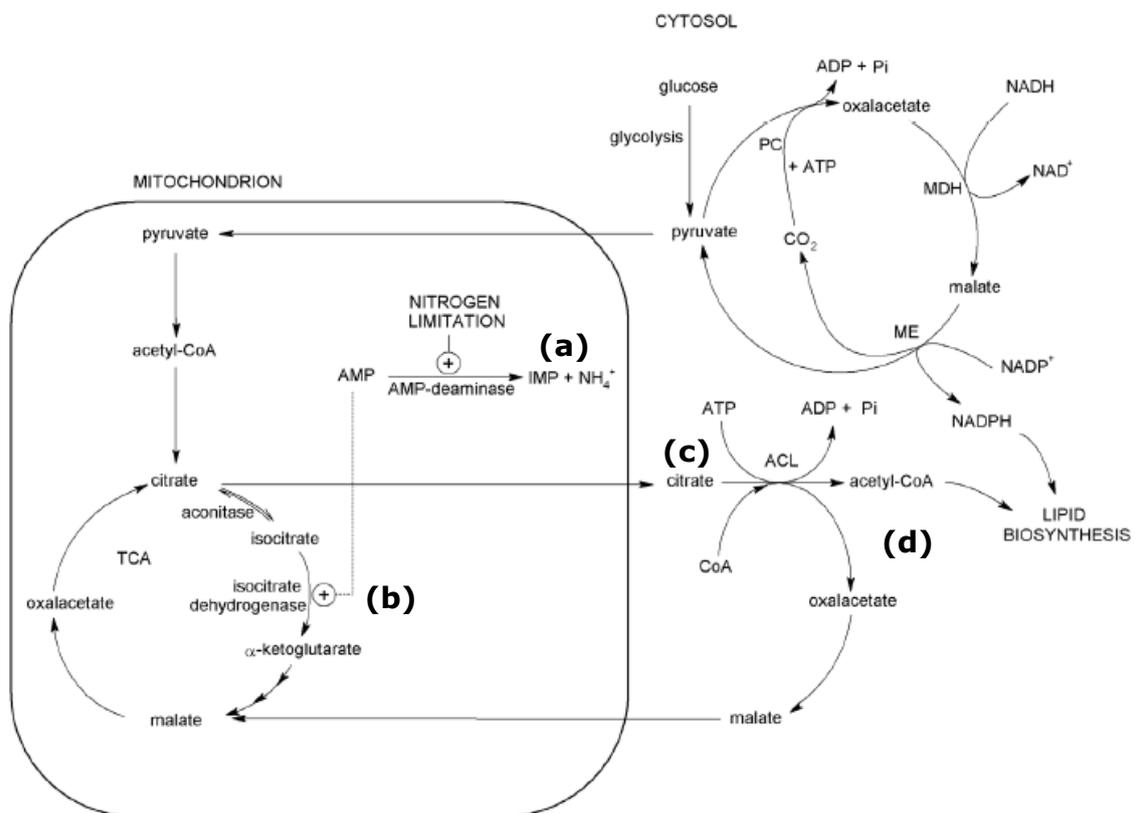
Durante a fase de crescimento das células, o nitrogênio é essencial na síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Em condições limitantes deste nutriente, essas reações são inibidas e a taxa de multiplicação celular reduz rapidamente. Neste momento, o carbono presente no meio continua a ser assimilado e é direcionado para a síntese de lipídeos, que se acumulam nos corpos lipídicos na forma de triglicerídeos (BEOPOULOS et al., 2009b; CHRISTOPHE et al., 2012).

O acúmulo de lipídeos pelas células pode ocorrer por duas rotas distintas: a via de síntese *de novo* e a via de acúmulo *ex novo*. Nas condições descritas acima, a limitação de nitrogênio induz as células a produzirem acetil-CoA e manoil-CoA, precursores dos ácidos graxos, além de integrá-los na biossíntese de armazenamento de lipídeos, caracterizando um acúmulo via síntese *de novo*. Já a via de acúmulo *ex novo*, caracteriza-se pela captação dos lipídeos presentes no meio de cultura, na sua forma original ou modificada, e seu acúmulo nas células (BEOPOULOS et al., 2009a).

De um modo simplificado, a privação de nitrogênio induz uma série de reações bioquímicas que ocorrem tanto na mitocôndria, quanto no citosol das células (Figura 2). Abaixo estão os passos seguidos pela via de síntese *de novo* (BEOPOULOS et al., 2009a; PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011a; RATLEDGE, 2004; ROSSI et al., 2011):

- A adenosina monofosfato mitocondrial é convertida em amônia em virtude do aumento da atividade da enzima AMP desaminase, um modo rápido de compensar a falta de nitrogênio no meio (Figura 2a).

- A redução na quantidade de AMP na mitocôndria bloqueia o ciclo do ácido cítrico, pois impede a ação da enzima isocitrato desidrogenase que metaboliza o isocitrato. Conseqüentemente, há um acúmulo de isocitrato no interior da mitocôndria que é convertido em citrato, via aconitase, em busca de equilíbrio (Figura 2b).
- O excesso de citrato é transportado para o citosol e quebrado em acetil-CoA e oxaloacetato. Esta reação é catalisada pela enzima ATP-citrato liase (ACL) (Figura 2c).
- O oxaloacetato é convertido em malato, que retorna à mitocôndria no lugar do citrato, e a acetil-CoA é usada na biossíntese dos ácidos graxos (Figura 2d).



**Figura 2 – Biossíntese de lipídios em microrganismos oleaginosos em função da limitação de nitrogênio. (a) Conversão da AMP em amônia; (b) Acúmulo do citrato na mitocôndria; (c) Conversão do citrato em Acetil-CoA no citosol; (d) Produção de malato e conversão da Acetil-CoA em lipídios. Figura extraída de (ROSSI et al., 2011).**

Segundo Ratledge (2004), a característica que difere os microrganismos oleaginosos dos não-oleaginosos é a dependência da atividade da enzima isocitrato desidrogenase com a concentração de AMP na mitocôndria. Tal dependência proporciona o acúmulo de citrato nas células que leva à produção da acetil-CoA. Além disso, a enzima ACL, que catalisa a conversão citrato em acetil-CoA, não está presente na maioria das espécies não oleaginosas.

### 2.2.3 Condições do meio de cultivo: fontes de carbono e nitrogênio

São inúmeras as opções de substratos para o cultivo de microrganismos oleaginosos e, desde o início da produção de SCO, diversos meios já foram testados visando a redução de custos do processo. As fontes de carbono variam de açúcares, álcoois, alcanos, óleos vegetais e lipídeos a subprodutos e materiais residuais como glicerol, etanol e ácidos orgânicos (FAKAS et al., 2009b; PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011a).

Assim como em todos os outros processos fermentativos, a glicose é o substrato mais comumente utilizado para a produção de SCO, pois a grande maioria dos microrganismos é capaz de assimilá-la e transformá-la em óleo. Deste modo, este substrato é frequentemente utilizado como base de comparação para determinar o desempenho de fontes alternativas de carbono (FAKAS et al., 2009b).

O baixo custo dos materiais residuais, ou até mesmo seu custo zero ou negativo, os tornam bastantes atraentes pela ótica econômica e ambiental. Por outro lado, estes materiais podem apresentar problemas, como serem restritos a um determinado local e época do ano, ou apresentarem diferenças em sua composição que interfiram nas características dos óleos e rendimento do processo. Além disso, os resíduos podem conter polissacarídeos não assimiláveis que necessitam ser química ou enzimaticamente hidrolisados em açúcares assimiláveis. Esses tratamentos adicionam custos ao substrato e os tornam menos vantajosos economicamente (FAKAS et al., 2009b).

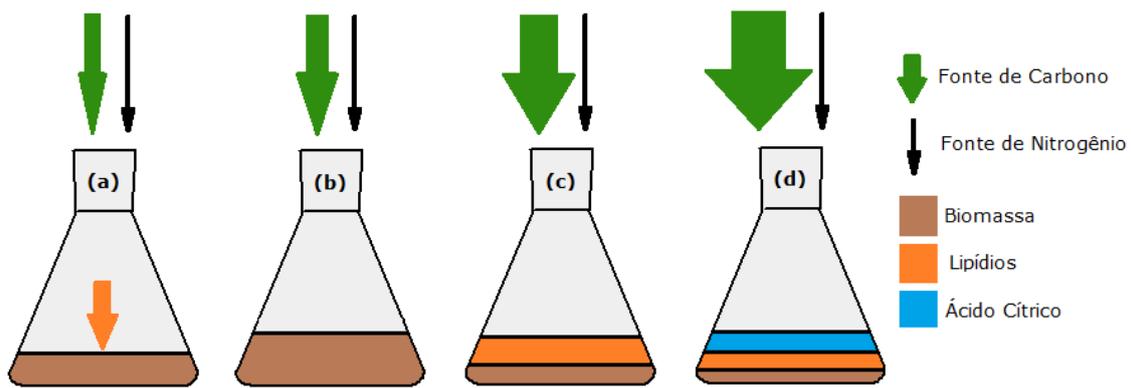
Por corresponderem de 60 a 75 % do valor total da produção dos óleos (THEVENIEAU & NICAUD, 2013), as fontes de carbono estão sendo cada vez mais diversificadas. El-Fadaly et al. (2009) produziram SCO a partir de melaço da cana de açúcar, melaço de açúcar de beterraba, cascas de batata

e cascas de tomate, obtendo resultados satisfatórios quando comparados com a produção realizada com glicose.

Com relação às fontes de nitrogênio, Evans & Ratledge (1983) mostraram que certas linhagens de leveduras produzem maiores quantidades de lipídeos em fontes orgânicas de nitrogênio, enquanto que outras apresentam rendimentos bastante semelhantes entre as fontes orgânicas e inorgânicas. Dentre as fontes inorgânicas já testadas, estão presentes nas literaturas sais de amônia e nitratos. Já as fontes orgânicas são extrato de levedura e de malte, ureia, farelo de soja e de arroz, tripeptona e polipeptona (AKI et al., 2001; EL-FADALY et al., 2009; EVANS & RATLEDGE, 1983).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, a proporção entre estes nutrientes exerce papel fundamental na produção de lipídio pelos microrganismos. A fim de determinar a melhor razão carbono/nitrogênio (C/N), vários estudos foram conduzidos com diferentes espécies oleaginosas. Entretanto, a levedura *Y. lipolytica* destaca-se entre elas por ser o foco da maioria dos estudos (BEOPOULOS et al., 2009a; ROSSI et al., 2011).

Foi estudando o comportamento da espécie *Y. lipolytica* que Beopoulos e colaboradores (2009a) observaram quatro estados metabólicos distintos, à medida que a razão C/N aumentava (Figura 3). De acordo com os autores, o primeiro estado ocorre quando a quantidade de carbono é inferior à requerida pelas células para seu crescimento e elas utilizam lipídios armazenados como fonte de carbono (Figura 3a). O segundo estado, representa a taxa de crescimento máxima, onde o fluxo de carbono é ideal para a produção de biomassa em relação ao fluxo de nitrogênio (Figura 3b). No terceiro estado há um excesso de carbono no meio, o qual, após o fim da etapa de crescimento, será convertido em lipídios. Esta razão resulta na produção de altos teores de lipídios (Figura 3c). Já no quarto estado, a grande quantidade de carbono em excesso inibe o acúmulo de lipídios em função da produção de metabólitos secundários, como o ácido cítrico (Figura 3d).



**Figura 3 – Atividade metabólica de microrganismos oleaginosos em função do aumento do fluxo de carbono, para um fluxo pré determinado de nitrogênio. (a) lipídeos armazenados nas células são utilizados no crescimento celular; (b) há apenas crescimento celular; (c) crescimento celular seguido de acúmulo de lipídios; (d) crescimento celular, acúmulo de lipídio e produção de ácido cítrico.**

**Figura adaptada de Beopoulos et al. (2009a).**

#### 2.2.4 Aplicações tecnológicas dos óleos microbianos

A produção de SCO apresenta diversas vantagens em relação aos óleos derivados de plantas, principalmente pelas facilidades de cultivo. Entretanto, em função dos altos custos de produção, as aplicações tecnológicas desses óleos são ainda bastante limitadas (THEVENIEAU & NICAUD, 2013).

Dentre as aplicações desses óleos, inúmeros estudos são voltados para seu uso como matéria-prima na produção de biodiesel. Diversos autores, entre eles, Vicente et al. (2009), Subhash e Mohan (2011) e Khot et al. (2012) pesquisaram diferentes microrganismos como, *M. circinelloides*, e *Aspergillus terreus*, e encontraram resultados satisfatórios tanto na composição dos óleos produzidos, quanto nas características do biodiesel gerados por eles. Nem todos os óleos microbianos são adequados para a produção de biodiesel, pois eles precisam conter quantidades satisfatórias de triacilgliceróis (VICENTE et al., 2009). Segundo Xu et al. (2012), a composição de óleos produzidos por diferentes microrganismos e espécies, é similar a de óleos vegetais, pois possuem principalmente os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. A produção de biodiesel a partir destes óleos levou a um produto de características semelhantes aos

produzidos por óleos vegetais e que pode possuir até algumas propriedades melhoradas, como baixa viscosidade e maior octanagem, dependendo do óleo empregado.

Além do emprego dos SCO como material de partida para o biodiesel, outra aplicação em evidência é a produção de lipídios com altos teores de AGPIs de interesse médico e dietéticos (PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011a). Segundo Akpınar-Bayazit (2014) dos AGPIs comercializados, apenas três, foram ou são produzidos por microrganismos. O ácido  $\gamma$ -linolênico foi produzido pela espécie *M. circinelloides*, e os ácidos araquidônico e docosahexaenóico são produzidos por fungos do gênero *Mortierella* spp. A produção de  $\gamma$ -linolênico por fungos filamentosos ganhou novamente interesse com a descoberta de propriedades anticancerígenas deste ácido. Já os ácidos, araquidônico e docosahexaenóico, os quais estão presentes no leite materno, são indispensáveis para o desenvolvimento dos bebês. A produção destes últimos por SCO é de grande interesse, uma vez que não há nenhum óleo vegetal que seja fonte alternativa desses ácidos graxos (FAKAS et al., 2009b).

Seraphim e Aggelis (2011b) apontaram o uso de lipídios produzidos por leveduras na síntese de substituintes da manteiga de cacau. A manteiga de cacau possui uma composição característica e interessante que é raramente encontrada na natureza, por conter quantidades quase iguais de ácidos palmítico, esteárico e oleico. Os altos preços desta matéria-prima impulsionaram pesquisas com microrganismos, as quais buscavam óleos de semelhante composição. Um processo para a produção dos substituintes da manteiga chegou a ser desenvolvido, utilizando soro de leite como fonte de carbono, mas não foi lançado em função da queda no preço da manteiga de cacau. Entretanto, sua crescente utilização na indústria de alimentos, com destaque para a produção de chocolate, e de cosméticos, pode aumentar a demanda por esta matéria-prima, fazendo necessária sua produção por SCO (FAKAS et al., 2009b).

Uma característica interessante apresentada pelos óleos microbianos é a sua correlação com as condições de cultivo. Um determinado microrganismo pode produzir óleos de composição e propriedades distintas, dependendo do meio em que é cultivado. Deste modo, tais óleos são passíveis de

manipulações para que atinjam proporções de ácidos graxos específicas e, até mesmo, raras, como a da manteiga de cacau (TAKAHASHI et al., 2013).

### **2.3 Fungos filamentosos**

O reino *Fungi* foi criado em 1969 para classificar os fungos, até então pertencentes ao reino *Plantae*. Apesar de terem sido considerados vegetais por um longo período de tempo, os fungos possuem peculiaridades que os diferenciam. Ao contrário das plantas os fungos não sintetizam clorofila, não possuem celulose na parede celular e armazenam glicogênio como substância de reserva ao invés de amido (GOMPertz et al., 2005).

Os fungos são seres eucariotos, heterotróficos, uni ou multicelulares, e aeróbios ou anaeróbios facultativos. Eles se dividem morfologicamente entre leveduriformes (leveduras) e filamentosos (bolores e fungos multicelulares). As colônias leveduriformes são constituídas de organismos unicelulares de forma esférica ou oval, que possuem aspecto cremoso ou pastoso e reproduzem-se por brotamento (CARVALHO, 2010).

As colônias filamentosas são multicelulares e formadas por vários filamentos tubulares unidos densamente, chamados de hifas. As hifas podem ser septadas ou não e quando unidas formam um micélio. O micélio vegetativo é aquele que cresce dentro do substrato e além de possuir função estrutural, é responsável por absorver os nutrientes do meio. Já o micélio que se desenvolve fora do substrato é conhecido como micélio aéreo. Este último tem papel importante na reprodução e identificação morfológica das diferentes espécies. Os fungos filamentosos podem apresentar aspecto aveludado, algodinoso e pulverulento, além de diferentes colorações (GOMPertz et al., 2005; RAVEN et al., 1996).

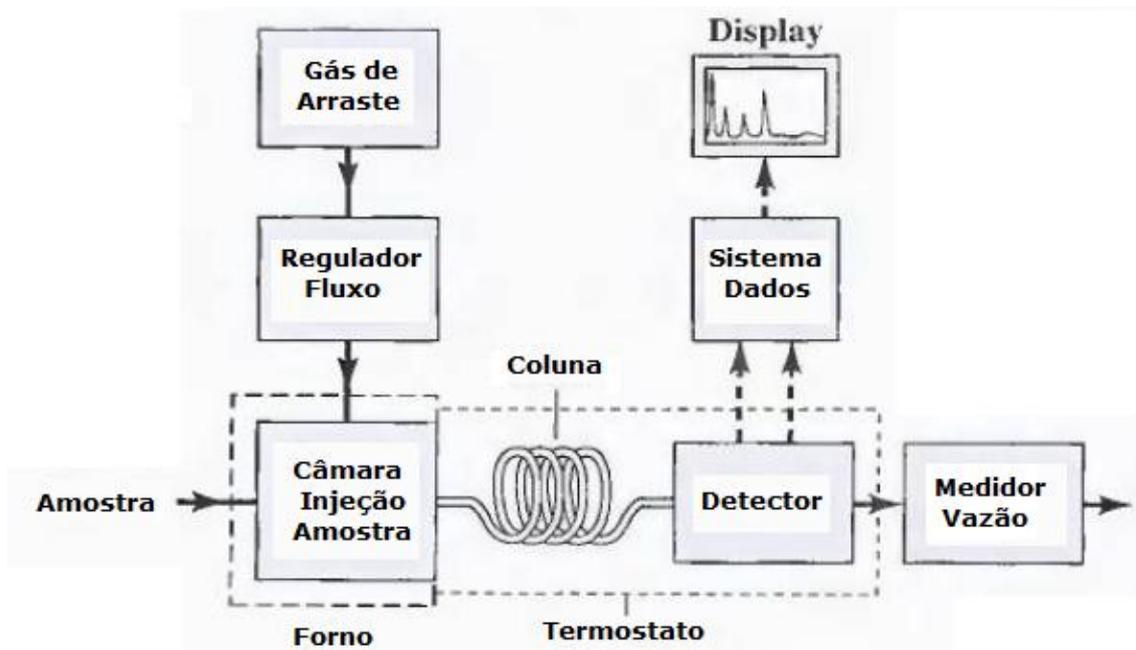
O metabolismo dos fungos filamentosos atrai cada vez atenção, muito em função das aplicações industriais dos metabólitos secundários por eles produzidos. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, e futuramente de outras substâncias de similar interesse, como cefalosporinas, ácido micofenólico e estatinas aumentou as pesquisas por compostos bioativos. Atualmente, estes compostos são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de agroquímicos (TAKAHASHI et al., 2013).

A utilização de fungos filamentosos na indústria alimentícia pode ser vista, por exemplo, na produção dos queijos Camembert e Roquefort, na qual fungos do gênero *Penicillium* conferem a estes queijos propriedades características. Já a espécie *Aspergillus niger*, é responsável pela produção de grande parte do ácido cítrico consumido mundialmente, o qual além de conferir acidez e sabor aos alimentos é empregado em diversos setores industriais, como na indústria de cosméticos. O gênero *Aspergillus* é também utilizado na produção da enzima amilase, que está presente na produção de amido de milho e de glicose, a partir do amido (RAVEN et al., 1996).

#### **2.4 Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID)**

Anteriormente as análises, no preparo da amostra, os óleos são hidrolisados, para obtenção dos ácidos graxos livres. Durante a hidrólise dos lipídios, a mistura se divide em duas fases, uma contendo os ácidos graxos livres, e a outra com os componentes apolares e não-hidrolizáveis. Após a separação dos ácidos graxos, estes são metilados e convertidos em ésteres metílicos, os quais possuem menor massa molecular e são apolares, para então serem analisados (CHRISTIE, 1989).

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) é uma técnica de separação, no qual os componentes de uma mistura são vaporizados e injetados em uma coluna cromatográfica (Figura 4). Esta coluna possui uma fase estacionária (líquida ou sólida) que retém a mistura. À medida que um gás eluente (fase móvel) passa por essa coluna, os componentes da amostra vão se separando seguindo uma ordem de afinidade crescente com a fase móvel. Os componentes da mistura então, à medida que chegam ao fim da coluna são coletados por um detector (SKOOG et al., 2004).



**Figura 4 - Esquema simplificado de um cromatógrafo gasoso, com as principais partes indicadas. Figura adaptada de Skoog et al. (2004).**

A alta sensibilidade do detector de ionização de chamas (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), além de sua capacidade de detectar compostos que possuem carbono e de alto peso molecular, fazem deste detector o mais usado em análises de cromatografia gasosa. Este detector mede, em função do calor gerado, os íons produzidos na chama. A chama é circundada por um eletrodo cilíndrico, e alimentada por pequenos jatos de hidrogênio. Entre estes jatos uma alta voltagem é aplicada e a corrente resultante, depois de amplificada, alimenta um sistema de aquisição de dados. Normalmente são utilizados três gases, sendo o gás hidrogênio na combustão, hélio ou nitrogênio como gás de arraste e oxigênio ou ar como agente de combustão. A injeção destes gases é feita por três cilindros distintos, que estão acoplados a um regulador de fluxo preciso. Para garantir que os solutos não condensem nos tubos, o detector é termostaticado em um forno separado (SCOTT, 2003).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Fungos filamentosos utilizados**

As espécies de fungos filamentosos utilizadas neste trabalho, foram cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As sete espécies utilizadas: *Absidia cylindrospora* (Ac), *Mucor plumbeus* (Mp), *Paecilomyces lilacinus* (Pl), *Penicillium citrinum* (Pc), *Penicillium janthinellum* (Pj), *Rhizopus oryzae* (Ro) e *Syncephalastrum racemosum* (KHOT et al.) são mantidas refrigeradas (4 °C) em tubos contendo o meio de cultivo sólido batata dextrose (PDA, do inglês *Potato Dextrose Agar*).

### **3.2 Cultivo dos fungos por fermentação submersa**

Antes da preparação do inóculo, as sete espécies escolhidas foram cultivadas em tubos contendo o meio sólido inclinado PDA (Himedia), em temperatura ambiente por 10 dias. Após este período, preparou-se inóculo.

#### **3.2.1 Preparo do inóculo**

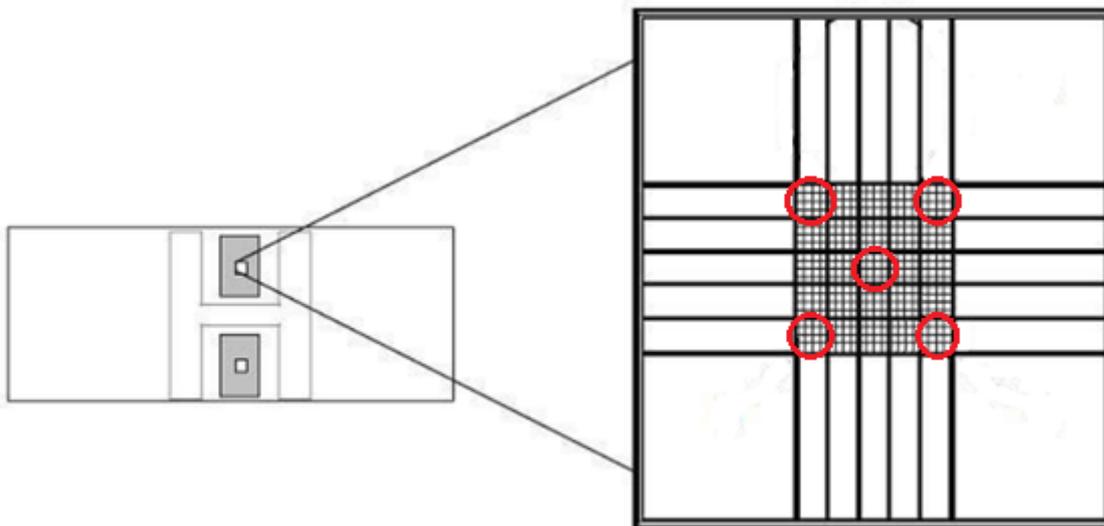
Para preparar a suspensão de esporos, foram adicionados a cada um dos sete tubos, contendo os fungos previamente cultivados, aproximadamente 5 mL de água estéril. Com o auxílio de uma alça de platina, as colônias foram raspadas provocando a liberação de esporos na água até a turbidez da mesma. A água utilizada foi retirada de sete frascos tipo Erlenmeyer, contendo inicialmente 50 mL de água destilada estéril.

Após a coleta dos esporos, as suspensões presentes nos tubos voltaram para os Erlenmeyers, previamente identificados, que foram agitados vigorosamente. Antes de se inocular os esporos, foi feita a contagem dos mesmos.

#### **3.2.2 Padronização do inóculo**

O inóculo foi padronizado em uma concentração de  $10^7$  esporos por mL. Para realizar a padronização as contagens da quantidade de esporos por mililitro presente em cada suspensão foram feitas em câmara de Neubauer (Boeco Germany), que consiste em uma placa de vidro contendo duas áreas de contagem. Na Figura 5, é possível observar que cada área é dividida em

nove quadrados maiores, sendo o quadrante central subdividido em 25 quadrados, e cada um desses 25 quadrados subdivididos em 16 quadrados.



**Figura 5 - Câmara de Neubauer utilizada na contagem de esporos.**

**Figura adaptada de (VICCINI, 2004).**

Para se realizar a contagem, uma gota da suspensão, previamente homogeneizada, foi colocada na câmara sobre uma das áreas de contagem. Em seguida, o sistema foi coberto por uma lamínula e colocado sob um microscópio ótico (Olympus – CX40). Com o auxílio de uma objetiva de 40 x foi feita a contagem dos esporos presentes nos quadrados circunscritos de vermelho na Figura 5. Os valores encontrados foram somados e o total multiplicado por 5, para estimar a quantidade de esporos presente no quadrado maior central. Este resultado foi ainda multiplicado por um fator de correção de  $10^5$  e então forneceu o número de esporos por mL da suspensão analisada. Como a concentração de esporos, inicialmente estipulada, foi da ordem de  $10^7$  esporos/mL, as suspensões com concentrações superiores foram diluídas e às inferiores foram adicionados mais esporos. Após cada operação a contagem dos esporos foi refeita (VICCINI, 2004).

### 3.2.3 Cultivo em fermentação submersa

As suspensões, após terem suas concentrações de esporos ajustadas, foram inoculadas em meio de cultura líquido contendo glicose (20 g/L) como fonte de carbono, extrato de levedura (1 g/L) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,5 g/L) como fontes de nitrogênio, além de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,2 g/L). Para tanto, 1

mL do inoculo foi adicionado a um frasco tipo Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de cultura previamente esterilizado. Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm em agitador orbital (Biosan), e à temperatura ambiente por seis dias (adaptado de XIA et al. 2011).

### **3.3 Extração dos óleos**

Ao final do período de incubação, 15 mL de hexano foram adicionados a cada frasco e estes mantidos em agitação por mais 10 min. Em seguida, os micélios foram separados do meio de cultura por filtração a vácuo. Os meios de cultura, juntamente com o hexano, foram retornados aos respectivos frascos e os papéis de filtro contendo os micélios foram colocados em diferentes Erlenmeyers. A cada um destes foram adicionados 45 mL de hexano.

A extração dos óleos presentes nos meios de culturas foi feita em um funil de separação, enquanto os óleos dos micélios foram extraídos por meio do contato com o hexano, promovido por agitação em agitador orbital durante 24 h. Ao final de cada processo de extração, o excesso de hexano foi recuperado por rotaevaporação e o restante transferido para frascos de penicilina previamente identificados e pesados.

#### **3.3.1 Determinação das massas de óleo produzidas e biomassas fúngicas**

Os extratos hexânicos, tanto dos meios quanto dos micélios, foram deixados na capela por 24 h para a evaporação do hexano restante. Após este período, os frascos foram novamente pesados até massa constante, e a massa dos óleos determinada pela diferença nas massas dos frascos.

Após serem separados do hexano, os micélios juntamente com os papéis de filtro, de massas pré-determinadas, foram transferidos para placas de Petri e secos em estufa à 60 °C até a eliminação da água em excesso. Após a secagem, a biomassa dos fungos foi determinada pela pesagem dos micélios.

### **3.4 Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama**

#### **3.4.1 Preparo das amostras**

As amostras dos óleos foram hidrolisadas e metiladas. Para tanto, foram adicionados a tubos criogênicos de 2 mL aproximadamente 10 mg dos óleos e 100 µL de uma solução 95 % etanol e 5 % hidróxido de potássio 1 mol/L. Os tubos foram agitados em vórtex durante 10 s, e depois colocados em um forno micro-ondas (Panasonic Piccolo) por 5 min à 80 W de potência. Após o resfriamento, foram adicionados as tubos 400 µL de ácido clorídrico (20 %), uma pequena quantidade de NaCl e 600 µL de acetato de etila.

Os tubos foram novamente agitados em vórtex por 10 s e após um tempo de repouso de 5 min, onde ocorreu a separação de fases, 300 µL foram retirados da fase orgânica (fase superior), colocados em tubos tipo Eppendorf e secos por evaporação (adaptado de CHRISTIE, 1989).

Seguinte a evaporação do solvente da fase orgânica, ocorreu a metilação dos ácidos graxos livres pela adição de 100 µL de BF<sub>3</sub> / metanol (14 %) e aquecimento por 10 min em banho-maria a uma temperatura de 60 °C. Após este processo, as amostras foram diluídas em metanol seguindo a proporção de 1 mL de metanol para cada 25 mg de amostras e então analisadas pelo equipamento de cromatografia gasosa.

#### **3.4.2 Análise por GC-FID**

As análises foram feitas no Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent) com detecção por ionização de chamas e os resultados coletados pelo programa de aquisição de dados EZChrom Elite Compact (Agilent). A coluna utilizada foi a HPInnowax (Agilent) 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm com rampa de temperatura de 100 °C, 0 min, 7 °C/min até 2240 °C. O injetor (split de 1/30) estava a uma temperatura de 250°C e detector a 260°C. O gás hidrogênio foi empregado como gás de arraste (3 mL/min) e volume de injeção foi de 1 µL. Os picos foram identificados por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME C14-C22 (Supelco cat no 18917).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultivo dos fungos

Todas as espécies testadas neste trabalho apresentaram crescimento na forma de grânulos (Figuras 6a, 6b e 6c), o qual foi proporcionado pela agitação constante e aeração dos meios de cultivo. Este tipo de crescimento é considerado ideal por Xia e colaboradores (2011), pois facilita a separação dos microrganismos do meio de cultura e favorece o cultivo de altas concentrações de células. Ainda de acordo com os autores, enquanto os grânulos de fungos filamentosos podem ser separados por filtração (Figura 6d), a separação de microalgas e leveduras requer técnicas de centrifugação de alto valor, tornando a produção em larga escala de SCO ainda mais inviável do ponto de vista econômico.

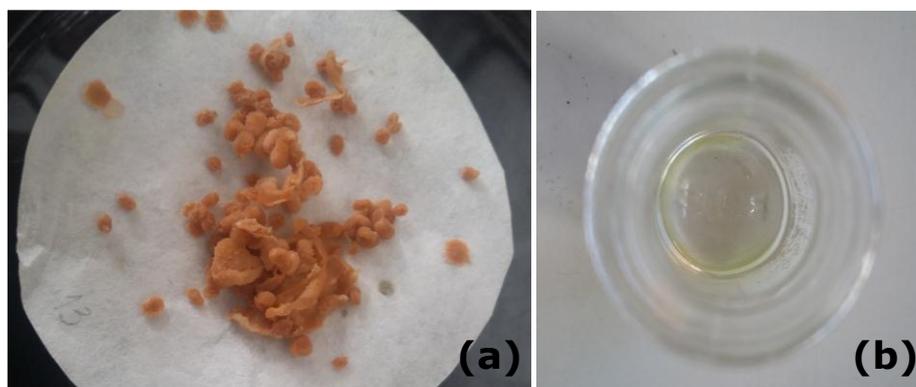
O crescimento dos fungos está exemplificado na Figura 6 pela espécie *P. janthinellum*, a qual apresentou a maior biomassa.



**Figura 6 – Crescimento em grânulos da espécie *Penicillium janthinellum*. (a) após 24 horas de agitação; (b) após 6 dias; (c) detalhe da forma dos micélios; (d) separação dos micélios por filtração a vácuo.**

## 4.2 Avaliação do crescimento e da produção de óleo

As quantidades dos micélios, após serem secos em estufa (Figura 7a), dos extratos hexânicos dos óleos dos micélios e dos meios de cultivo, após serem secos por evaporação na capela (Figura 7b), podem ser vistas na Tabela 3. Os valores são dados em gramas por litro de meio de cultivo.



**Figura 7 - (a) micélios da espécie *Penicillium janthinellum*, após serem secos em estufa. (b) visão superior de um frasco de penicilina contendo o óleo extraído dos micélios da espécie *Rhizopus oryzae*.**

**Tabela 3 - Massa seca das células e dos óleos extraídos dos micélios e dos meios de cultivo.**

<b>Espécie</b>	<b>Massa fúngica seca (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quantidade de óleo Intracelular (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quantidade de óleo Extracelular (g L<sup>-1</sup>)</b>
<i>A. cylindrospora</i>	5,05 ± 0,12	0,32 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<i>M. plumbeus</i>	2,65 ± 0,08	0,40 ± 0,03	0,22 ± 0,02
<i>P. lilacinus</i>	2,87 ± 0,38	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,02
<i>P. citrinum</i>	5,11 ± 0,15	0,03 ± 0,01	0,015 ± 0,0003
<i>P. janthinellum</i>	8,83 ± 0, 53	0,02 ± 0,003	0,005 ± 0,007
<i>R. oryzae</i>	7,68 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,012 ± 0,002
<i>S. racemosum</i>	4,26 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,03

A partir dos resultados presentes na Tabela 3, foi possível observar que a espécie *P. janthinellum* apresentou o maior crescimento, mas produziu a menor quantidade de óleo intra e extracelular. Em contrapartida, o fungo *M. plumbeus* foi o que teve a menor massa seca de micélios, mas o que produziu a maior quantidade de óleo intracelular.

Resultados semelhantes de biomassa foram encontrados por Khot et al. (2012), os quais, ao analisarem cinco fungos isolados de áreas de mangues na costa oeste da Índia, obtiveram crescimentos de 4,1 a 6,44 g L<sup>-1</sup>. As condições de fermentação empregadas foram agitação a 120 rpm, temperatura de 30 °C por 72 h. A glicose foi empregada como fonte de carbono na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> e as fontes de nitrogênio foram extrato de levedura (1,5 g L<sup>-1</sup>) e NH<sub>4</sub>Cl (0,5 g L<sup>-1</sup>). Entretanto, duas técnicas de ruptura das células foram utilizadas para a extração dos óleos, o que resultou em quantidades diferentes de óleo em por cada técnica. A ruptura mecânica das células proporcionou valores de lipídios de 0,47 a 0,99 g L<sup>-1</sup>, enquanto a quebra por nitrogênio líquido levou a rendimentos maiores, os quais variaram de 1,07 a 2,98 g L<sup>-1</sup>. Neste trabalho, nenhum procedimento de ruptura das células foi empregado, o que pode justificar as quantidades inferiores de óleo obtidas.

Em outro estudo, Tauk-Tornisielo e colaboradores (2007), avaliando a produção de ácidos graxos por quatro linhagens da espécie *Mucor hiemalis* em culturas contendo óleos vegetais ou carboidratos como substratos, encontraram uma grande variação dos valores de biomassa. Os fungos foram cultivados a 25 °C por 72 h e agitação contínua à 150 rpm, e posteriormente sem agitação por 48 h a 12 °C. Em meios contendo frutose, galactose, maltose, entre outros carboidratos como substrato, a biomassa variou de 0,4 a 24,0 g L<sup>-1</sup>, sendo a maioria dos valores próximos aos descritos na Tabela 3, como 2,3, 3,6, 5,1 e 7,9 g L<sup>-1</sup>. Entretanto, quando os autores utilizaram óleos vegetais, como soja, palma e girassol, os valores de biomassa foram consideravelmente maiores, variando de 25,6 a 91,5 g L<sup>-1</sup>. Estes resultados mostram a influência do substrato no crescimento das células.

As espécies *M. plumbeus* e *R. oryzae*, testadas neste trabalho, juntamente com mais 9 outras espécies, foram alvo da pesquisa de Zheng et al. (2012).

Visando avaliar a viabilidade da produção de biodiesel por fungos filamentosos a partir de hidrolisados da palha de trigo como fonte de carbono, foi feita uma pré-seleção dos fungos. Nesta primeira etapa, utilizando meios de cultivo com glicose e xilose, além de agitação de 200 rpm a 28 °C, *M. plumbeus* apresentou crescimento igual a 4,8 e 5,9 g L<sup>-1</sup> em cada meio, respectivamente. Já o crescimento da espécie *R. oryzae* foi bem semelhante em ambos os meios (3,2 e 3,3 g L<sup>-1</sup>). As quantidades de óleo intracelular produzidas foram maiores do que as encontrada (Tabela 3) e variaram de 0,66 a 1,09 g L<sup>-1</sup>.

Após a determinação das quantidades de biomassa e massas de óleos intra e extracelulares, foi possível calcular o acúmulo de óleos pelas espécies. As porcentagens de óleo que cada espécie acumulou com relação ao seu peso seco estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4 – Quantidades acumuladas de lipídios intra e extracelular.**

<b>Espécie</b>	<b>Quantidade de lipídios Intracelular (%)</b>	<b>Quantidade de lipídios Extracelular (%)</b>
<i>A. cylindrospora</i>	5,90 ± 0,15	0,58 ± 0,21
<i>M. plumbeus</i>	13,18 ± 0,85	7,67 ± 0,82
<i>P. lilacinus</i>	4,22 ± 0,72	5,98 ± 0,55
<i>P. citrinum</i>	0,60 ± 0,19	0,298 ± 0,006
<i>P. janthinellum</i>	0,23 ± 0,04	0,06 ± 0,08
<i>R. oryzae</i>	4,36 ± 0,50	0,16 ± 0,03
<i>S. racemosum</i>	6,97 ± 0,68	5,88 ± 0,56

Avaliando os valores contidos na Tabela 4, tem-se que, na condição testada, nenhuma das espécies acumulou mais de 20 % de sua massa seca em lipídios, sendo consideradas não-oleaginosas. Entretanto, a espécie *M. plumbeus* apresentou acúmulo expressivo de aproximadamente 13 % de óleo intracelular.

A razão C/N do meio de cultivo utilizado pode ser uma possível causa do baixo acúmulo de lipídios. Zheng et al. (2012), utilizando meio contendo concentrações maiores da fonte de carbono (30 g L<sup>-1</sup>, ao invés de 20 g L<sup>-1</sup>) e concentrações menores da fonte de nitrogênio (extrato de levedura 0,5 g L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>) obtiveram acúmulos maiores para as espécies *M. plumbeus* e *R. oryzae*. Em seus estudos estas espécies acumularam 20,6 % e 34,8 % de óleo, respectivamente, quando a glicose foi empregada como fonte de carbono. Em meio contendo xilose esses valores caíram para 16,6 e 20,0 %.

Valores semelhantes aos descritos na Tabela 4, foram encontrados por Tauk-Tornisielo et al. (2007), os quais utilizaram meio de cultura contendo 2 % de carboidratos (20 g L<sup>-1</sup>) e 1 % de extrato de levedura (10 g L<sup>-1</sup>). A baixa razão C/N empregada levou a acúmulos que variaram de 0,0 a 15,8 % de lipídios. As linhagens de *M. hiemalis* estudadas apresentaram acúmulos de 4,3, 5,3, 6,1, 6,4, 7,9, 11,6, 14,6 %, entre outros próximos aos encontrados neste trabalho.

Os acúmulos de lipídios apresentados pelas espécies *A. cylindrospora*, *P. lilacinus*, *R. oryzae* e *S. racemosum* foram próximos e variaram de 4,22 a 6,97 %. Quantidades de lipídios acumuladas, em estudos prévios, por estes gêneros foram descritas por Weete (1974). O autor reuniu, em seu livro sobre a bioquímica dos lipídios produzidos por fungos, porcentagens de acúmulo de óleo encontradas em diversas pesquisas. O gênero *Absidia* apresentou acúmulos de 2,3 a 30,4 %, enquanto o do gênero *Paecilomyces* foi igual a 6,4 % e do *Syncephalastrum sp.* foi de 12,1 a 12,9 %.

As espécies *P. citrinum* e *P. janthinellum* apresentaram os menores acúmulos de lipídios, sendo estes inferiores a 1 %. O baixo rendimento destas espécies pode ser um indicativo que este não é um gênero cuja produção de óleo se sobressaia dentre as demais aplicações. No livro de Weete (1974) estão descritas 18 espécies do gênero *Penicillium*, das quais apenas sete apresentaram acúmulo de lipídios superior a 20 %. O maior acúmulo foi obtido pela espécie *Penicillium lilacinum* e foi igual a 47,3 %. A espécie *P. citrinum* também foi descrita por ter acumulado 18,1 % de lipídios. Este acúmulo foi superior ao encontrado neste trabalho, entretanto não o suficiente para que a espécie seja considerada oleaginosa.

Em outro estudo da produção de óleo pelas espécies *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti*, feito por Lomascolo et al. (1994), as espécies acumularam de 9,1 a 19,4 % de óleo em meio de cultivo contendo glicose. Apesar dos valores maiores em relação aos descritos na Tabela 4, estas espécies não se mostraram oleaginosas.

Os acúmulos superiores, obtidos por diferentes pesquisadores, reforçam a influência exercida pela composição do meio de cultivo na produção de lipídios. Um exemplo desta influência pode ser visto no trabalho de Fakas et al. (2009a), os quais, buscando avaliar fontes alternativas de carbono, testaram diferentes razões C/N em diferentes tempos de cultivo e obtiveram resultados bastante variados. A espécie *Mortierella isabellina*, por exemplo, em meio contendo xilose, acumulou, em 96 h, 39,6 % de óleo na razão C/N igual a 78. Quando esta razão foi aumentada para 285, este acúmulo subiu para 47,5 % num mesmo período de tempo. Entretanto, na mesma razão de 285, o acúmulo de óleo passou de 47,5 % para 65,5 % quando seu tempo de cultivo foi de 216 h.

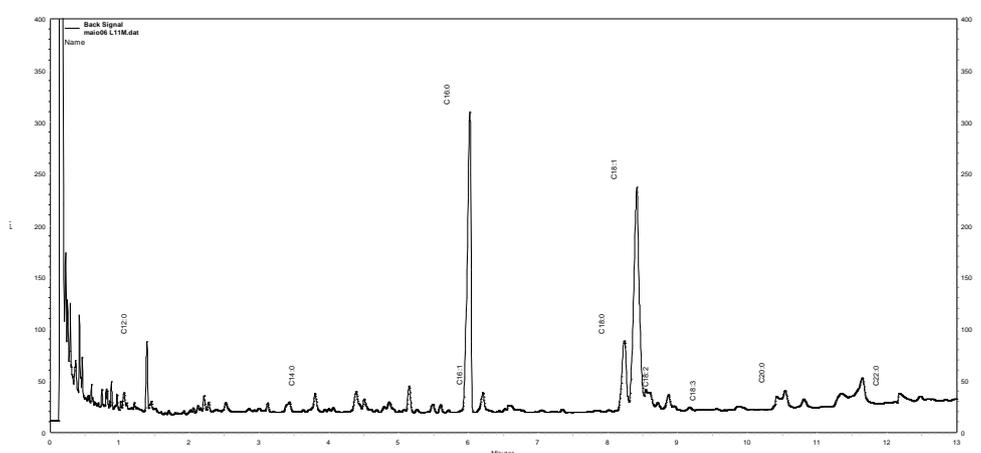
Além da razão C/N e do tempo de cultivo, o pH do meio de cultura também exerce grande influência na quantidade de lipídios produzida e na forma dos micélios, como comprovado por Xia et al. (2011). Em seus estudos, os autores observaram que somente com o pH inicial do meio igual a 3, a espécie *Mucor circinelloides* foi capaz de crescer na fórmula de grânulos. Foi também neste pH que o fungo testado acumulou a maior quantidade de lipídios (30,87 %). Já no meio de pH inicial igual a 4, o acúmulo caiu para 16,78 %.

Com relação à produção de óleo extracelular por fungos filamentosos, nenhum estudo recente comparando as quantidades de óleo intra e extracelular foi encontrado na literatura. Em uma revisão sobre os lipídios extracelulares produzidos por leveduras, Stodola e colaboradores (1967), afirmaram que diversas leveduras produzem quantidades apreciáveis de lipídios extracelulares, entretanto, estes se diferenciam quimicamente dos intracelulares, já que estes são ricos em ácidos acético, 3-hidroxihexadecanoico e 3-hidroxiocadecanoico, além dos álcoois, manitol, arabinitol e xilitol.

Apesar das quantidades de óleo extracelular obtidas terem sido inferiores a 7,67 %, o estudo destes lipídios é interessante, pois estes demandam um processo de extração mais simplificado e, se obtidos em maior quantidade podem tornar a produção de SCO economicamente mais viável.

### 4.3 Perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos

A análise por cromatografia gasosa forneceu cromatogramas contendo diversos picos (Figura 8), os quais foram associados a diferentes ácidos graxos, por meio da comparação de seus tempos de retenção com o de padrões. As proporções de cada ácido graxo foram calculadas a partir da área do pico gerado por cada um, e estas podem ser vistas na Tabela 5 para os óleos intracelulares e na Tabela 6 para os extracelulares.



**Figura 8 – Exemplo do cromatograma obtido, após a análise por GC-FID, pela espécie *A. cylindrospora*.**

**Tabela 5 – Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos intracelulares, obtidas por GC-FID.**

% de ácido graxo dos óleos Intracelulares	Espécies						
	<i>Ac</i>	<i>Mp</i>	<i>Pl</i>	<i>Pc</i>	<i>Pj</i>	<i>Ro</i>	<i>Sr</i>
<b>Láurico C12:0</b>	3,12	*	*	1,97	4,80	0,53	*
<b>Mirístico C14:0</b>	1,68	3,81	0,70	1,66	1,00	1,84	1,34
<b>Palmítico C16:0</b>	23,91	21,13	12,69	24,01	29,24	12,00	21,51

Continua

**Tabela 5 – Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos intracelulares, obtidas por GC-FID.**

<b>Palmitoleico C16:1</b>	1,97	3,19	2,80	2,01	0,83	1,55	2,50
<b>Estearico C18:0</b>	7,22	7,60	3,70	4,54	18,45	5,40	5,66
<b>Oleico C18:1</b>	31,17	22,39	3,36	10,47	14,64	11,91	33,12
<b>Linoleico C18:2</b>	2,01	1,76	1,29	23,33	1,15	1,76	3,12
<b>Linolênico C18:3</b>	0,39	*	*	0,71	0,38	0	*
<b>Araquídico C20:0</b>	3,39	3,03	3,28	0	0	4,53	2,81
<b>Behênico C22:0</b>	1,78	0,88	1,00	0	0	0,21	0,57
<b>NI</b>	23,36	29,47	71,17	31,29	29,50	60,25	29,47

\* Ácidos graxos não identificados para essas espécies; NI - % não identificada pela técnica.

Nas condições de cultivo utilizada neste trabalho, os óleos intracelulares produzidos pelas espécies testadas, apresentaram concentrações similares de alguns ácidos graxos. As frações dos ácidos láurico, mirístico, palmitoleico, linolênico, araquídico e behênico foram inferiores a 5 % para todas as espécies. A maior porcentagem obtida destes ácidos foi a de ácido láurico, 4,80 %, pela espécie *P. janthinellum*. Ambas as espécies do gênero *Penicillium* apresentaram ausência dos ácidos araquídico e lignocérico em seus óleos. Já o óleo produzido por *R. oryzae* não apresentou quantidades significativas de ácido linolênico.

Os ácidos palmítico, estearico, oleico e linoleico, ao contrário dos descritos acima, apresentaram proporções superiores, chegando a 33,12 %, de ácido oleico com a espécie *S. racemosum*. A espécie *P. citrinum* destacou-se pela quantidade de ácido linoleico em seu óleo, 23,33 %, consideravelmente superior que a das demais espécies, as quais obtiveram 1,15 a 3,12 %.

Zheng et al. (2012), ao determinar o perfil de ácidos graxos do óleo produzido pela espécie *R. oryzae*, em meio contendo glicose, encontraram frações distintas às descritas na Tabela 5. Somente o ácido palmítico esteve em menor quantidade em seu óleo, aproximadamente 5 %, quando

comparado à fração de 12 % obtida neste trabalho. Os demais ácidos determinados pelo autor, esteárico ( $\approx 15$  %), oleico ( $\approx 43$  %), linoleico ( $\approx 12$  %) e  $\gamma$ -linolênico ( $\approx 20$  %) apresentaram proporções consideravelmente superiores. Apesar de utilizar a mesma fonte de carbono, Zheng e colaboradores adotaram uma razão C/N maior, que como discutido anteriormente pode ter influenciado nas diferenças encontradas.

As frações não identificadas dos óleos foram relativamente grandes, principalmente para as espécies *R. oryzae* (60,25 %) e *P. lilacinus* (71,17 %), indicando que o padrão de ácidos graxos utilizado, Supelco® FAME Mix C14-C22, não foi ideal para os óleos obtidos neste trabalho. Deste modo, a utilização de um padrão de AG mais abrangente como o Supelco® 37 Component FAME Mix seria interessante. Este padrão vai de ácidos graxos C4 até C24, e inclui diversos AG poli-insaturados de importantes aplicações, como os ácidos, araquidônico e docosahexaenóico (FAKAS et al., 2009b). Estas frações podem conter quantidades significativas desses AGPIs ou de outros AG de alto valor agregado, e dificultam uma avaliação mais ampla do potencial dos óleos obtidos.

**Tabela 6 - Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos extracelulares, obtidas por GC-FID.**

% de ácido graxo dos óleos Extracelulares	Espécies						
	<i>Ac</i>	<i>Mp</i>	<i>Pl</i>	<i>Pc</i>	<i>Pj</i>	<i>Ro</i>	<i>Sr</i>
<b>Láurico C12:0</b>	0	4,02	2,89	4,50	5,04	1,70	0
<b>Mirístico C14:0</b>	1,68	5,72	1,60	2,48	1,66	1,41	0
<b>Palmítico C16:0</b>	30,80	24,51	10,76	22,90	17,73	12,50	27,38
<b>Palmitoleico C16:1</b>	2,348	8,58	27,32	1,75	1,59	3,05	7,23
<b>Esteárico C18:0</b>	16,30	4,79	3,30	5,05	8,36	8,38	1,94
<b>Oleico C18:1</b>	20,00	15,90	7,09	39,92	23,54	10,66	28,73

Continua

**Tabela 6 - Proporção dos ácidos graxos presentes nos óleos extracelulares, obtidas por GC-FID.**

<b>Linoleico C18:2</b>	3,89	1,02	0	1,55	1,72	9,84	2,23
<b>Linolênico C18:3</b>	0,68	0	0,31	0,27	0,62	0,70	0
<b>Araquídico C20:0</b>	0,67	0	0	0	0	2,79	0
<b>Behênico C22:0</b>	4,73	0	0	0	1,85	0	0
<b>NI</b>	18,89	33,84	46,74	21,58	37,89	48,98	32,50

NI - % não identificada pela técnica.

Os resultados encontrados para os óleos extracelulares se assemelham aos discutidos para os intracelulares, pois porcentagens próximas de ácidos láurico, mirístico, linoleico, linolênico, araquídico e behênico, foram encontradas para a maioria das espécies. Entretanto, para estes óleos as proporções desses ácidos foram ligeiramente maiores e chegou a um máximo de 9,84 % de ácido linoleico, obtida pela espécie *R. oryzae*.

As maiores frações foram dos ácidos palmítico, palmitoleico, estearico e oleico, sendo a maior porcentagem obtida a de ácido oleico pela espécie *P. citrinum*. A espécie *P. lilacinus* destacou-se pela produção de ácido palmitoleico, 27,32 %, consideravelmente superior que a das demais espécies, as quais foram de 1,59 a 8,58 %.

Após analisar os valores contidos nas Tabelas 5 e 6 é possível perceber que as espécies apresentaram perfis de ácidos graxos semelhantes entre os óleos intra e extracelulares. A espécie que apresentou maior variação entre estes óleos foi a *P. citrinum* com uma variação de 29,4 % do ácido oleico e 21,8 % do ácido linoleico. Assim como nos óleos intracelulares, as frações não identificadas nestes óleos foram significativas (18,89 a 48,98 %) fazendo necessário que as análises destes também sejam refeitas e comparadas com um padrão de AG mais amplo.

A Tabela 7 contém as frações gerais de ácidos saturados e insaturados obtidas por cada espécie. Deste modo, a análise geral dos óleos obtidos por cada espécie é facilitada.

**Tabela 7 - Frações de ácidos saturados e insaturados obtidas por cada espécie.**

	% Ácidos Graxos	Espécies						
		<i>Ac</i>	<i>Mp</i>	<i>Pl</i>	<i>Pc</i>	<i>Pj</i>	<i>Ro</i>	<i>Sr</i>
<b>Intracelular</b>	Saturados	41,09	36,45	21,37	32,19	53,50	24,53	31,90
	Insaturados	35,55	27,33	7,45	36,52	17,00	15,22	38,75
	Monoinsaturados	33,14	25,55	6,16	12,48	15,47	13,46	35,63
	Polinsaturados	2,41	1,76	1,29	24,04	1,53	1,76	3,12
<b>Extracelular</b>	Saturados	54,18	39,03	18,55	34,92	34,65	26,78	29,32
	Insaturados	26,92	25,48	34,72	43,49	27,48	24,26	38,18
	Monoinsaturados	22,35	24,46	34,41	41,67	25,13	13,71	35,95
	Polinsaturados	4,57	1,02	0,31	1,82	2,34	10,54	2,23

Os fungos que produziram óleos intracelulares com quantidades de ácidos graxos insaturados superiores aos saturados foram *S. racemosum* e *P. citrinum*. Estes acumularam 38,75 e 36,52 % de AG insaturados, respectivamente. Já para os óleos extracelulares, além das espécies acima citadas, *P. lilacinus* também obteve teor de AG insaturados superior as de saturados. O ácido palmítico foi, para a maioria das espécies, o que mais contribuiu com a fração saturada. Já a fração monoinsaturada é composta majoritariamente parte pelo ácido oleico. A espécie *P. janthinellum* apresentou o óleo intracelular com o maior teor de ácidos graxos saturados (53,50 %), enquanto para os óleos extracelulares *A. cylindrospora* foi o que obteve a maior fração de AG saturados (54,18 %).

A composição de óleos vegetais como oliva, algodão, girassol, milho, soja e amendoim, se difere das encontradas neste trabalho, principalmente em função das quantidades de ácidos oleico e linoleico. Na maioria destes óleos vegetais, estes ácidos somados chegam a 80 % da composição do óleo (ZAMBIAZI et al., 2007), enquanto para as espécies testadas, esta soma não ultrapassou 40 %.

## 5. CONCLUSÕES

Ao fim deste trabalho foi possível determinar que as condições de cultivo empregadas não foram favoráveis à síntese e acúmulo de lipídios, pelas espécies estudadas. Uma provável causa destes valores inferiores a 20 % é a razão C/N do meio de cultura escolhido, pois em estudos feitos por diversos autores empregando razões superiores, fungos de espécies ou gêneros iguais ao utilizados neste trabalho foram descritos como oleaginosos. Outros fatores como temperatura e pH, os quais não foram controlados, podem ter influenciado também no desempenho dos fungos avaliados.

A maioria das espécies estudadas forneceu óleos intra e extracelulares com perfis de ácidos graxos semelhantes e, com quantidades de ácidos graxos saturados superiores a de insaturados. A espécie *P. citrinum* destacou-se pela produção do ácido linoleico, em seu óleo intracelular, consideravelmente superior que a das demais espécies. As frações não identificadas de cada óleo foram significativas e podem conter quantidades interessantes de ácidos graxos de alto valor agregado, fazendo necessária a sua análise.

Para dar continuidade aos estudos iniciados neste trabalho, sugere-se testes variando a razão C/N do meio de cultivo para verificar a interferência desta variável nos acúmulos de lipídios e a maceração dos micélios para uma melhor extração dos óleos. Após a determinação da melhor razão, variáveis como pH, temperatura e tempo de cultivo devem ser avaliadas a fim de se determinar as melhores condições para a produção de lipídios por estas espécies. Além disso, a utilização de um padrão de ácidos graxos mais abrangente se faz necessária, para que a possível presença de outros AG poli-insaturados seja detectada.

## 6. REFERÊNCIAS

ABU-ELREESH, G.; ABD-EL-HALEEM, D. Promising oleaginous filamentous fungi as biodiesel feed stocks: Screening and identification **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 576-582, 2014.

AKI, T.; NAGAHATA, Y.; ISHIHARA, K.; TANAKA, Y.; MORINAGA, T.; HIGASHIYAMA, K.; AKIMOTO, K.; FUJIKAWA, S.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SUZUKI, O. Production of Arachidonic Acid by Filamentous Fungus, *Mortierella alliacea* Strain YN-15. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 6, p. 599-604, 2001.

AKPINAR-BAYIZIT, A. Fungal Lipids: The Biochemistry of Lipid Accumulation. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, p. 409-414, 2014.

ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. D. Tecnologia de Alimentos - Aplicações. 2015. Disponível em: <  
[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000gc8yujq302wx5ok01dx9lcxpd47zs.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000gc8yujq302wx5ok01dx9lcxpd47zs.html) >. Acesso em: 20 abr. 2015.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Prog Lipid Res**, v. 48, n. 6, p. 375-387, Nov 2009a.

BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 692-696, Jun 2009b.

CARVALHO, I. T. D. **Microbiologia Básica**. Recife: EDUFRPE, 2010.

CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids**. The Oily Press Ltd, 1989.

CHRISTOPHE, G.; KUMAR, V.; NOUAILLE, R.; GAUDET, G.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Recent Developments in Microbial Oils Production: a Possible Alternative to Vegetable Oils for Biodiesel Without Competition with Human Food? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 29-46, 2012.

EL-FADALY, H. A.; EL-NAGGAR, N. E.-A.; MARWAN, E.-D. M. Single Cell Oil Production by an Oleaginous Yeast Strain in a Low Cost Cultivation Medium. **Research Journal of Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 301-313, 2009.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1693-1704, 1983.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573-580, 2009a.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Biochemistry and Biotechnology of Single Cell Oil. In: ROUSSOS, S., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., AUGUR, C. (Ed.). **New horizons**

- in Biotechnology**. New Delhi: AsiaTech Publishers Inc., 2009b. cap. 5, p.52-75.
- FRITSCHÉ, U. R.; HÜNECKE, K.; HERMANN, A.; SCHULZE, F.; WIEGMANN, K. **Sustainability Standards for Bioenergy** WWF Germany. 2006.
- GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.
- GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Biologia dos Fungos. In: TRABULSI, L. R. e ALTHERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- GONÇALVES, F. A.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 476207, 2014.
- GUNSTONE, F. D. (Ed.) **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses**. Oxford: Blackwell Publishing, 2002.
- GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid Biochemistry** 5ed. Blackwell Science, 2002.
- KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A.; CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11, 2012.
- LIANG, M.-H.; JIANG, J.-G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Prog Lipid Res**, 2013.
- LOMASCOLO, A.; DUBREUCQ, E.; PERRIER, V.; GALZY, P.; GRIMAUD, J. Mycelial Lipid Composition of Three *Penicillium* Strains. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2160-2167, 1994.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- MURPHY, D. J. **The status of industrial vegetable oils from genetically modified plants**. European Chemicals Agency. 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NUNES, S. P. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. **Boletim Eletrônico DESER**, n. 159, 2007.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewables substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronical Journal of Biotechnology**, v. 10, p.425-435, 2007.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011a.

- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1052-1073, 2011b.
- PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 6, p. 1047-1050, 2002.
- \_\_\_\_\_. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for *Single Cell Oil* production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, Nov 2004.
- RATLEDGE, C.; WYNN, J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advanced Applied Microbiology**, v. 51, p. 1-51, 2002.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- ROSILLO-CALLE, F.; PELKMANS, L.; WALTER, A. **A Global Overview of Vegetable Oils, with Reference to Biodiesel**. IEA Bioenergy 2009.
- ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; LEONARDI, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. In: STOYTCHIEVA, M. e MONTERO, G. (Ed.). **Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies**: InTech, 2011. cap. 4, p.71 - 92.
- SCOTT, R. P. W. **Gas chromatography detectors**. Chrom-Ed Book Serie, 2003. 38-48.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 8 ed. Thomson-Brooks/Cole, 2004.
- STODOLA, F. H.; DEINEMA, M. H.; SPENCER, J. F. T. Extracellular Lipids of Yeasts. **Bacteriological Reviews**, v. 31, n. 3, p. 194-213, 1967.
- SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 19, p. 9286-9290, 2011.
- TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. D. A. P.; GOMES, D. C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 773-789 2013.
- TAUK-TORNISIELO, S. M.; VIEIRA, J. M.; CECÍLIA, M.; CARNEIRO, V. S.; GOVONE, J. S. Fatty acid production by four strains of *Mucor hiemalis* grown in plant oil and soluble carbohydrates. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 15, p. 1840-1847, 2007.
- THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds & fats Crops and Lipids Journal**, v. 20, n. 6, p. 603-610, 2013.

- VICCINI, G. **Otimização da Produção de Esporos do Fungo *Clonostachys Rosea* – Um Biopesticida para a Cultura do Morangueiro**. 2004. (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.
- WEETE, J. **Fungal Lipid Biochemistry**. 1 ed. New York: Plenum Press, 1974.
- XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p. 15, 2011.
- XU, J.; DU, W.; ZHAO, X.; ZHANG, G.; LIU, D. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 1, p. 65-77, 2012.
- ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. **Fatty acid composition of vegetable oils and fats** Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. Curitiba. 2007.
- ZHENG, Y.; YU, X.; ZENG, J.; CHEN, S. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, 2012.