



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NÍVEL DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS
(PUFAs) POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 EM
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA

RECIFE

2011

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS
(PUFAs) POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 EM
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas** da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**.

Orientador: **Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki**

Co-orientador: **Prof^a Dr^a Kaoru Okada**

RECIFE

Março, 2011

Silva, Grayce Kelli Barbosa da

Produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) por *Cunninghamella elegans* UCP 542 em substratos alternativos/ Grayce Kelli Barbosa da Silva. – Recife: O Autor, 2011.

92 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Kaoru Okada

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia

1. Ácidos graxos 2. Lípidios 3. Glicerina I. Título.

572.57

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-202

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (PUFAs)
POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 EM SUBSTRATOS
ALTERNATIVOS**

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação do mestrado de

GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA** como

Recife, 03 de Março de 2011

Profa. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP
Orientador

Profa. Dr^a Thaysa Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal da Paraíba - UFPB
Membro externo

Profa. Dr^a Norma Buarque Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco -UFPE
Membro interno

Aos meus pais, José Benedito e Bernadete José, minha irmã Gabriela Kássia, meu esposo Alberes Ferreira, por toda ternura, afeto e cumplicidade que dividimos e a minha vó materna Raimunda Maria (in memoriam) carinhosamente, dedico este trabalho.

“A aprendizagem se realiza através da conduta ativa do aluno, que aprende mediante o que ele faz e não o que faz o professor”.

Ralph W. Tyler.

AGRADECIMENTOS

Ó Deus agradeço profundamente pelos desafios impostos em minha vida. Agradeço pelo preparo realizado por Ti antes de ingressar no curso. Agradeço pelas dificuldades encontradas e pelas experiências vividas durante cada etapa do trabalho. Senhor ofereço este trabalho para que possa, a partir dele, surgir novas idéias e novos desafios a serem vencidos a fim de proporcionar o bem a toda criatura por Ti criada, pelo fruto de Seu trabalho. Amém.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, símbolo de inteligência, pela amizade, ensinamentos e extrema dedicação, e por acreditar no meu trabalho e na minha vontade de aprender.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Kaoru Okada, símbolo de sabedoria, pela extrema dedicação e atenção, além dos seus ensinamentos científicos, por passar tranquilidade e segurança.

À Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia, Coordenadora do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que me deu a oportunidade, dando votos de confiança para a realização deste trabalho.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

À minha família, que acompanhou minha batalha diariamente, pelo apoio, incentivo e compreensão das minhas ausências.

Aos colegas Graduandos, Mestrandos e Doutorandos da UFPE e UNICAP pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos e aprendizado.

Aos alunos do PIBIC, Secretária e Técnicos do NPCIAMB pela paciência e apoio.

Aos que fazem parte da Secretaria da Pós-graduação pela atenção e gentileza no atendimento prestado durante o curso.

A todos que de alguma forma estarão lembrando desta etapa da minha vida,

Agradeço

SUMÁRIO

	PAG.
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
CAPÍTULO 1	XV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 GERAL.....	6
2.2 ESPECÍFICOS.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 Lipídeos	7
3.1.1 Metodologia para extração dos lipídeos	8
3.2 Os ácidos Graxos.....	10
3.2.1 Metodologias para identificação dos ácidos graxos.....	13
3.3 Ácido gama-linolênico (ômega 6)	13
3.3.1 A Importância Médica Ácido gama-linolênico GLA.....	17
3.4 Ácidos graxos polinsaturados em microrganismos	23
3.5 Ácido Araquidônico.....	35

3.5.1 Rotas oxidativas do Ácido Araquidônico.....	37
3.6 Ácido Linoleico.....	37
3.6.1 Metabolismo	38
3.7 <i>Cunninghamella elegans</i>	40
3.8 Substratos	41
3.8.1 Milhocina	41
3.8.2 Glicerina	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPITULO 2	58
Resumo.....	60
Introdução	62
Material e métodos.....	65
Microrganismo e condição de manutenção	65
Substratos	65
Esporulação e crescimento radial	65
Produção dos lipídeos.....	66
Determinação do pH.....	66
Extração e determinação dos lipídeos totais	66
Caracterização dos ácidos graxos	67
Planejamento fatorial completo de 2 ²	68
Resultados e discussão	69
Perfis de crescimento radial de <i>C.elegans</i> UCP 542	69
Produção de biomassa e lipídeos totais	73

Composições de ácidos graxos de <i>C.elegans</i> UCP 542 obtidos por cromatografia gasosa	77
Conclusões	82
Agradecimentos	83
Referências Bibliográficas	83

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Pág.

Tabela 1. Exemplos de ácidos graxos insaturados de cadeia linear..... 11**Tabela 2.** Metabolismo de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 16**Tabela 3.** Mecanismos propostos para efeitos dos ácidos graxos ômega 6 e ácidos graxos saturados nos níveis dos lipídeos plasmáticos 19**Tabela 4.** Composição de Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina 41**Tabela 5.** Composição química da glicerina bruta 44

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^2 68

Tabela 2. Matriz codificada de planejamento fatorial completo 2^268

Tabela 3. Crescimento Radial *C.elegans*UCP 542 em Hesseltine e Anderson e Hesseltine e Anderson modificado (glicerina).....69

Tabela 4. Crescimento Radial *C.elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson e Hesseltine e Anderson modificado (glicerina com acréscimo de 6% milhocina).....70

Tabela 5. Crescimento de *C. elegans* UCP 542(biomassa g/L), produção de lipídeos (%) e pH no Hesseltine e Anderson, Hesseltine e Anderson modificado (glicerina e glicerina com acréscimo de 6% milhocina), após 96hs de fermentação.....74

Tabela 6. Composições de ácidos graxos de *C.elegans* UCP 542 cultivada nos meio Hesseltine e Anderson, Hesseltine e Anderson modificado pelas substituições de glicose por glicerina e glicerina com acréscimo de 6% milhocina, obtidos por cromatografia gasosa.....78

LISTA DE FIGURAS

Pág.

CAPÍTULO 1

Figura 1. Prímula <i>Oenothera biennis</i>	14
Figura 2. Estrutura molecular do Ácido gama-linolênico	15
Figura 3. Estrutura química de uma prostaglandina E1 (PGE1).....	17
Figura 4. <i>Spirulina platensis</i>	24
Figura 5. <i>Spirulina</i> sob a forma de pó desidratado	25
Figura 6. Principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos	27
Figura 7. A estrutura química do ácido araquidônico	35
Figura 8. A estrutura química do ácido linoléico	37
Figura 9. Metabolismo do ácido linoleico (LA)	39
Figura 10. Características Microscópicas <i>Cunninghamella elegans</i>	40
Figura 11. Etapas principais da produção de biodiesel.....	43

CAPÍTULO 2

Figura 1. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para o crescimento radial de *C.elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) após cinco dias de crescimento.....71

Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para o crescimento radial de *C.elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson modificado (glicerina com acréscimo de 6% de milhocina) após cinco dias de crescimento.....71

Figura 3. Características Morfológicas e Microscópicas de *C.elegans* UCP 54273

Figura 4. Perfil de ácidos graxos de *C. elegans* UCP 542 cultivada em Hesseltine e Anderson (A), Hesseltine e Anderson modificados por glicerina (B) e glicerina com acréscimo 6% de milhocina (C), obtidos por cromatografia gasosa.....77

CAPÍTULO I

RESUMO

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales são conhecidos por possuírem elevadas concentrações de ácidos graxos da família ômega 6. Neste sentido, foi investigada a produção de ácidos graxos poliinsaturados–PUFAs por *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Ordem Mucorales), utilizando glicerina e milhocina como substratos alternativos, visando à minimização dos custos de produção. Os estudos foram realizados empregando-se um planejamento fatorial 2², tendo como variável resposta crescimento radial e morfologia, produção de biomassa, lipídeos totais e ácidos graxos. A partir dos resultados obtidos observou-se que a glicerina e a milhocina não influenciou na estrutura morfológica da *C. elegans*, no entanto, estatisticamente estas fontes influenciaram no crescimento radial. O pH influenciou na produção de biomassa e de lipídeos. O ensaio 4 (7,9ml/L de glicerina, e 0,2g asparagina) e o ensaio 4 (7,9ml/L de glicerina, 0,2g asparagina e 6% de milhocina) apresentaram maior produção de biomassa (1,7g/L) e (2,5g/L) e lipídeos totais (8,0%) e (8,0%), respectivamente. A glicerina e a milhocina aumentaram a produção do ácido palmitico em 100 e 560 vezes a produção do ácido Linoléico, e reduziram a concentração do ácido Oléico e do ácido Gama-linolênico. Portanto, os rejeitos agroindustriais (glicerina e milhocina) mostraram que podem ser fontes alternativas de carbono e nitrogênio, a fim de propiciar a produção de insumos biotecnológicos de elevado valor agregados e de baixo custo.

Palavras – chaves: ácidos graxos poliinsaturados, micro-organismos oleaginosos, rejeitos agroindustriais.

ABSTRACT

The Mucorales fungi are known to have high concentrations of fatty acids of omega 6. In this sense, we investigated the production of polyunsaturated fatty acids, PUFAs by *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Order Mucorales) using glycerin and corn steep liquor as alternative substrates, in order to minimize production costs. The studies were performed employing a 22 factorial design, with the response variable morphology and radial growth, biomass production, total lipids and fatty acids. The results obtained showed that the glycerin and corn steep liquor did not affect the morphological structure of *C. elegans*, however, statistically these sources influence the radial growth. The pH influenced the production of biomass and lipids. Trial 4 (7.9 ml / L glycerol, and 0.2 g asparagine) and trial 4 (7.9 ml / L glycerol, 0.2 g asparagine and 6% corn steep liquor) produced more biomass (1.7 g / L) (2.5 g / L) and total lipid (8.0%) and (8.0%), respectively. The glycerin and corn steep liquor increased the production of palmitic acid in 100 and 560 times the production of linoleic acid, and reduced the concentration of oleic acid and gamma-linolenic acid. Therefore, the agro-industrial waste (glycerine and corn steep liquor) showed that may be sources of carbon and nitrogen in order to facilitate the production of biotechnological inputs of high value-added and low cost.

Key - words: polyunsaturated fatty acids, oleaginous micro-organisms, agro-industrial wastes

1. INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são componentes essenciais para a dieta humana, os quais desempenham diferentes papéis no organismo como reserva de energia, de fosfolipídios e de esteróis. Estes contêm ácidos graxos essenciais que não são produzidos pelos mamíferos precisam estar presentes na dieta, auxiliando no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K pelo intestino, além de conferir sabor aos alimentos (BELITZ e GROSH, 1992).

Os ácidos graxos (AG) são constituintes estruturais das membranas celulares, realizam funções energéticas e de reservas metabólicas, além de participar da formação dos hormônios e sais biliares. Dentro da diversidade dos AG, existem os não essenciais, sintetizados pelo organismo, e os essenciais que devem ser adicionados à dieta, os quais são denominados de ácido gama linolênico (ω -3) e ácido linoléico (ω -6) (VALENZUELA, 2003).

O termo ácido graxo poliinsaturado (AGPI) refere-se aos ácidos graxos cujas moléculas possuem duas ou mais duplas ligações. A denominação ω ou n diferencia os ácidos graxos em relação à posição da primeira dupla ligação contada a partir do carbono ômega (grupo metil no final da molécula) (SANT'ANA, 2004). Assim, os ácidos graxos essenciais das famílias Omega 3 e Omega 6 possuem de dezoito a vinte e quatro átomos de carbonos, com insaturações promovidas por enzimas denominadas desaturases e elongases (KENNEDY, 1993).

Uma dieta rica em ácidos graxos insaturados (AGI) modifica o perfil lipídico reduzindo os níveis plasmáticos das proteínas transportadoras dos lipídeos, destacando-se: "Very Low Density Lipoproteins" (VLDL); "Low Density Lipoprotein" (LDL) e "High Density Lipoprotein" (HDL), estando associadas à redução do risco de aterosclerose e doenças coronárias (RIBEIRO e BURKET, 1989).

Estudos realizados por Colin et al., 2003 indicam que o decréscimo de ácidos graxos poliinsaturados no plasma, induzem ao aumento das incidências de depressão. Baixa concentração de colesterol no plasma, contudo, pode causar perturbações bioquímicas, como a ativação do sistema inflamatório, resultando em aumento de citoquinas pro-inflamatórias e eicosanóides no sangue.

As principais fontes dos ácidos graxos n-3 são os peixes, óleo de peixe, linhaça, nozes e as folhas verdes escuras. Ácidos graxos n-3 de cadeia longa, principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (HARDMAN, 2004; SALA-VILA et al., 2008). Ácidos graxos n-6 compõem principalmente os óleos vegetais e sementes, como milho, girassol, soja, entre outros. (HARDMAN, 2004; SANT'ANA, 2004).

Ácidos graxos insaturados, como ácido gama-linolênico (AGL), ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (AEP) e ácido docosahexaenóico (ADH) são obtidos principalmente, a partir de óleo de primula (*Oenothera biennis*, *O. lamarckiana*) (WARD, 1995), óleo de borragem (*Borago officinalis*) (GÓMEZ e OSSA, 2002), óleo da semente de groselha preta (*Ribes nigrum*) (GILL e VALIVETY, 1997), óleos de linhaça e oliva (NUERNBERG et al., 2005).

A composição de ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais, causando moderadas modificações nos níveis de AGL, que geralmente é encontrado esterificado ao glicerol na forma de triacilglicerol (CARVALHO, 1994).

Estudos antropológicos e nutricionais indicam que a dieta humana foi alterada nos últimos 10.000 anos com maiores mudanças durante os últimos 150 anos (RIEDIGER et al., 2009). Com a industrialização e desenvolvimento da tecnologia na extração de óleos vegetais, houve aumento das calorias a partir das gorduras, principalmente do tipo saturadas e AGPI n-6 (SIMOPOULOS, 1999, 2006). O estudo evolutivo da dieta humana mostrou que nossos ancestrais apresentava menor quantidade de gorduras saturadas e uma ingestão balanceada de ácidos graxos essenciais, com a razão n-6: n-3 de aproximadamente 1:1 (SIMOPOULOS, 2006).

Atualmente, a população ocidental ingere grandes quantidades de AGPI n-6 e tem uma dieta deficiente em AGPI n-3, com a razão n-6:n-3 de aproximadamente 15:1, podendo chegar até 20:1 em alguns países (FUNAHASHI, 2008). Esta relação pode levar a uma produção desbalanceada de eicosanóides, o que tem sido associado ao desenvolvimento de inúmeras patologias inflamatórias (SIMOPOULOS, 2006; RIEDIGER et al., 2009).

Com o avanço da biotecnologia industrial em todas as áreas do conhecimento, novas alternativas de produção de moléculas de interesse farmacêutico e nutricional enriquecendo alimentos tornando-os mais saudáveis foram desenvolvidas e organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos são utilizados. A produção de óleos microbianos vem contribuindo muito para o entendimento dos mecanismos bioquímicos de produção e acumulação de lipídios em células microbianas denominadas “single cell oil” (HAAL e RATLEDGE, 1977; GILL et al., 1977; VEGA et al., 1988).

Dentre os micro-organismos testados, algumas espécies de leveduras e de fungos filamentosos foram selecionadas e classificadas como espécies oleaginosas. Dentre as leveduras, *Apiotrichum curvatum*, *Candida sp.* (HAAL e RATLEDGE, 1977; VEGA et al., 1988) foram estudadas e otimizadas para a produção de óleos microbianos em biorreatores.

Pesquisas demonstraram que os fungos filamentosos possuem um importante papel em uma gama de processos biotecnológicos, em particular, por serem produtores de grande variedade de enzimas e metabólitos como antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentares (JAY, 2000). Baseando-se neste conhecimento biotecnológico, diversos trabalhos mencionaram modificações genéticas para esses microrganismos, afim de que a produção de seus metabólitos fosse otimizada, tornando-os definitivamente viáveis à produção em escala industrial (IWASHITA, 2002).

No entanto, os fungos filamentosos da ordem Mucorales são os mais intensamente estudados, para a produção de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente, *Mortierella alpina*, *M. elongata*, *M. isabelina* (CHAUDHURI et al., 1998; XIAN et al., 2003; ZHU et al., 2006), *Cunninghamella echinulata* (GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006), *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis* (WYNN et al., 2001; SILVA et al., 2003; AHMED et al., 2006; JEENNOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006), foram aplicadas em diferentes parâmetros de crescimento envolvendo meios de cultivo alternativos.

A comercialização de óleos microbianos ricos em AGI teve como pioneiros Japão e Inglaterra (CARVALHO, 1994). Algumas patentes foram desenvolvidas utilizando fungos, como *Pythium ultimum*, *Rhizopus arrhizus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* e *Mortierella alpina*, utilizando processos em sistema líquido onde estes micro-organismos foram

cultivados sob diferentes condições de estresse, nutrientes, pH, relação C:N, adição de íons de cobre, zinco e ferro e processos envolvendo produção de enzimas desaturases e sua caracterização (HERBERT e KEITH, 1989; O'BRIEN et al., 1993; BIJL et al., 2001).

Os resíduos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos, apresentam uma grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (URSIN, et al., 2006).

A redução da poluição ambiental e o aquecimento do planeta têm estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos intensificando, portanto, a busca por combustíveis alternativos ao petróleo, como por exemplo, o biodiesel (RIVALDI et al., 2007).

O principal subproduto gerado na produção do biodiesel é o glicerol, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (RIVALDI et al., 2007). Em 2013, a adição de biodiesel ao combustível de petróleo deverá alcançar 5% do volume total de diesel utilizado (ANP, 2007) acelerando assim, a produção de biodiesel no Brasil com um excedente de 150 mil ton/ano de glicerina. A glicerina é uma matéria prima de alto valor agregado e possui inúmeras aplicações industriais, como aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica.

A utilização de resíduos industriais como a glicerina, em processos biotecnológicos, tem sido uma alternativa para evitar problemas ambientais derivados da acumulação de glicerina, bem como a rentabilidade da produção de biodiesel e, principalmente, a industrialização de cosméticos, fármacos e produtos alimentícios (MCCOY, 2006).

Por sua vez, a milhocina é um produto gerado durante o processo de maceração do milho por via úmida. É considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos torna-se essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos (SILVEIRA, 2001).

Estudos relacionados à viabilidade econômica para a produção de AGI merecem mais atenção, pois o emprego de subprodutos industriais como

substrato para o cultivo de fungos filamentosos pode diminuir os custos de produção e reduzir gastos de energia para a execução do processo (MCCOY, 2006). Neste sentido, foi investigado a produção dos ácidos graxos poliinsaturados –PUFAs por *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Ordem Mucorales), utilizando glicerina e milhocina como substratos alternativos em meio de cultura, visando a minimização dos custos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a produção de ácidos graxos poliinsaturados-PUFAs por *Cunninghamella elegans* UCP 542 em meios sintéticos para Mucorales e modificado pela utilização da glicerina e milhocina como substratos alternativos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Acompanhar as fases de crescimento da linhagem de *Cunninghamella elegans* UCP 542 no meio sintético para Mucorales sólido e modificado utilizando glicerina e milhocina com glicerina, como substratos alternativos;
- Avaliar a produção dos ácidos graxos poliinsaturados a partir dos meios sintético para Mucorales, modificado utilizando glicerina e milhocina com glicerina, como substratos alternativos;
- Avaliar a partir do meio selecionado a influência da concentração de glicerina e milhocina, temperatura e pH na produção dos ácidos graxos poliinsaturados, empregando planejamento fracionário;
- Extrair, isolar e caracterizar ácidos graxos poliinsaturados;
- Propor a formulação de um novo meio de produção empregando glicerina e milhocina como substratos alternativos de baixo custo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lipídeos

O termo lipídio, tradicionalmente, tem sido usado para descrever uma variedade de compostos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, que têm em comum a solubilidade em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol (CHRISTIE, 1982).

Muitos lipídios contêm glicerol, que podem ser esterificados com uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos e formar, respectivamente, monoglicerídios, diglicerídios ou triglicerídios. Os lipídios podem estar combinados na natureza com outros compostos, tais como: proteínas, aminoácidos ou polissacarídeos. Geralmente os triglicerídios e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídios produzidos por fungos. (KATES, 1982).

Os lipídios são classificados como simples, quando são constituídos por ácidos graxos e alcoóis; como componentes, quando são constituídos por outros grupos na molécula, além de ácidos graxos e álcoois os lipídios derivados são as substâncias obtidas por hidrólise dos lipídios simples e compostos (BOBBIO, 1992). Os ácidos graxos podem estar ligados ao glicerol, bases de cadeias longas esfingolipídios, ácidos fosfóricos (fosfolipídios), açúcares ou outros componentes, considerados mais complexos (CHRISTIE, 1982).

Os lipídios constituem o material de reserva em animais, plantas e micro-organismos, sendo que, no caso dos eucariontes, os triglicerídeos são os principais responsáveis por este papel. São também constituintes da membrana celular, como os fosfolipídios, participando dos processos fotossintéticos e também, de outros processos geradores de energia (RATLEDGE, WILKINSON, 1988).

As vias de biossíntese de lipídios em micro-organismos são equivalentes àquelas encontradas em animais e plantas, os micro-organismos realizam a síntese de seus compostos celulares com grande velocidade e

consequentemente respondem a mudanças ambientais da mesma forma (RATLEDGE, WTLKINISON, 1988).

Nos micro-organismos, os lipídios são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualidade e quantidade de lipídios variam de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento (RATLEDGE, WTLKINISON, 1988).

Estes compostos possuem funções imprescindíveis para o bom funcionamento do organismo tais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares. Na dieta humana, os lipídios são responsáveis por liberarem a maior parte da energia necessária para a manutenção das vias metabólicas (cerca de 9 kcal/g), fornecendo duas vezes mais energia que outras fontes como carboidratos e proteínas. Outras funções atribuídas aos lipídios são: vitaminas lipossolúveis A, D, E e K; mediadores celulares como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas; isolamento térmico de animais e o de conferir sabores diversos aos alimentos (OYAMA et al., 2001).

Porém, diversas complicações na saúde humana são atribuídas ao consumo exagerado de lipídios que vem ocorrendo nas últimas cinco décadas, como resultado da mudança dos hábitos alimentares da população, elevando assim a incidência de acidentes coronários, acidentes vasculares cerebrais, aumento do colesterol LDL e de algumas formas de câncer (VALSTA et al., 2005).

3.1.1 Metodologias para Extração de Lipídeos

Um método clássico de extração de lipídios é o método de Soxhle (1879) que utiliza hexano como solvente. Este método tem como desvantagem prolongado tempo de exposição ao calor, que pode causar degradação térmica e devido ao grande volume de solvente utilizado. Outros métodos de extração, conhecidos como métodos de extração a frio quando comparados ao método

de Soxhlet (1879), envolvem a utilização de ao menos dois tipos de solventes (FOLCH et al., 1957; BLIGH, DYER, 1959; HARA, RADIN, 1978).

O método descrito por Hara e Radin (1978), utilizando n-hexano – isopropanol – água, foi analisado para a extração de lipídios de amostras de vegetal e animal, sendo que otimizações do mesmo podem torná-lo aplicável para a extração de lipídios, substituindo os solventes altamente tóxicos. Os dois métodos, o de Folch et al., (1957) e o de Bligh e Dyer (1959) utilizam clorofórmio e metanol para a extração de lipídios em amostras vegetal e animal, porém em proporções diferentes. Apesar da toxidez destes solventes, tais métodos têm sido os mais utilizados em trabalhos envolvendo extração da fração lipídica de micro-organismos. Isso devido ao alto teor de lipídios extraído da biomassa e pela capacidade que os sistemas testados apresentaram em extrair eficientemente os lipídios polares de membranas celulares (STREDANSKY et al., 2000; SOMASHEKAR et al., 2002; JANG et al., 2005).

O processo de extração, na obtenção de lipídios de micro-organismos, é uma etapa importante que deve ser completa e sem o aparecimento de ácidos graxos livres durante o processo. Os micro-organismos possuem uma grande quantidade de ácidos graxos livres na porção lipídica, e estes materiais são extremamente tóxicos e sua presença indica que lipases e fosfatases estão ativas. A extração de lipídios de micro-organismos exige a ruptura celular que pode ser realizada através de processos químicos, físicos ou bioquímicos. Um fator determinante que deve ser levado em consideração no processo de extração é a escolha dos solventes. Na maioria dos casos é usada uma mistura de solventes visando maior eficiência de extração.

Uma extração efetiva dos lipídios da biomassa é realizada com células fisiologicamente ativas, pois células cultivadas há muitos dias ou que estejam na fase estacionária de crescimento podem se degenerar, pois neste estado pode ocorrer autólise parcial de lipídios e de outros constituintes celulares. Quando proteínas ou carboidratos são utilizados ou degradados o conteúdo lipídico celular aumenta. Pela mesma razão, as células para análise não devem esperar muito tempo após serem separadas. Poucas horas na temperatura ambiente podem provocar mudanças na composição dos lipídios das células,

como também, amostras deixadas sob refrigeração por doze horas podem apresentar mudanças significativas na composição celular (CHRISTIE, 1982).

Durante a etapa de extração deve ser levado em consideração alguns fatores importantes para a manutenção da estrutura química dos lipídios extraídos, de modo que haja uma eficiência no aproveitamento dos lipídios analisados. Um dos pontos a se destacar é a presença de insaturações na cadeia de carbono. Quanto maior for o número de insaturações maior será a probabilidade de ocorrer peroxidações, reações estas que uma vez iniciadas são autocatalíticas. Neste caso os solventes deverão ser destilados antes de sua utilização e neles adicionados substâncias antioxidantes e o processo de extração deve ser realizado em atmosfera de nitrogênio, para prevenir tais reações (CHRISTIE, 1982).

3.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos correspondem a uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH . Podem possuir de 4 a 36 átomos de carbonos e nenhuma ramificação. Os mais comumente encontrados são os que apresentam 16 e 18 átomos de carbonos. Na natureza, os ácidos graxos são encontrados na forma saturada constituída apenas de ligações simples e cadeias planas, ou nas formas insaturadas constituídas por uma ou mais dupla ligações podendo apresentar uma curva em sua cadeia carbônica. As ligações duplas são sempre separadas por um grupo metileno ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) e possuem um sistema de classificação simplificado indicando o número de átomos de carbonos, número de ligações duplas e a localização das mesmas (Tabela 1) (NELSON, COX, 2011).

A presença de ácidos graxos saturados e insaturados na membrana citoplasmática dos organismos tem fundamental importância quanto à determinação da fluidez, para compostos presentes na região externa à membrana, contudo, adaptando-se ao meio circundante.

Tabela 1. Exemplos de ácidos graxos insaturados de cadeia linear

Nome Sistemático	Nomenclatura usual	Abreviação
Ácido cis-hexadec-9-enóico	Ácido palmitoléico	16:1 (ω 7)
Ácido cis-octadec-9-enóico	Ácido Oléico	18:1 (ω 9)
Ácido 9,12 – octadecatrienóico	Ácido linoleico	18:2 (ω 6)
Ácido 9,12,15 – octadecatrienóico	Ácido alfa-linoléico	18:3 (ω 3)
Ácido 6,9,12 – octadecatrienóico	Ácido gama linolênico	18:3 (ω 6)
Ácido 8,11,14- icosatrienóico	Ácido homo-gama-linolênico	20:3 (ω 6)
Ácido 5,8,11,14- icosatetraenóico	Ácido araquidônico	20:4 (ω 6)

Fonte: NELSON e COX, 2011.

Os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que possuem mais de uma dupla ligação e estão subdivididos em famílias de acordo com sua derivação biosintética (CHRISTIE, 1982; NELSON e COX, 2011).

Os ácidos graxos (AG) são constituintes estruturais das membranas celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares (VALENZUELA, e NIETO, 2003).

Dentro da diversidade dos AG, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses AG cuja biossíntese é inadequada são denominados ácidos graxos essenciais (AGE): ácido linolênico (ω -3) e ácido linoléico (ω -6). Para suprir a demanda orgânica, os mesmos devem estar em quantidades suficientes na alimentação. Vários estudos apontam que sua utilização traz benefícios para a saúde humana, prevenindo enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunológicas e favorecendo o desenvolvimento cerebral e da retina (GONZÁLES, 2002).

O ω -6 e o ω -3 são considerados precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPCL): Ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA), e ácido docosahexaenóico (DHA).

O ácido araquidônico (série ω -6) tem grande importância nos primeiros meses de vida, sendo constituinte de estruturas celulares e precursores de mediadores inflamatórios (GONZÁLES, 2002).

O DHA (série w-3) é considerado o AGPICL mais importante no desenvolvimento neonatal e juntamente com o AA são os principais componentes dos AG cerebrais. Nos últimos anos, diversos estudos têm investigado a importância dos AGPICL na alimentação do recém-nascido para obter o máximo potencial de desenvolvimento neurológico. Portanto, eles são considerados nutrientes fundamentais para o perfeito desenvolvimento cerebral e visual do bebê antes e após o nascimento (GURR, 1992).

Os ácidos graxos essenciais são componentes estruturais importantes de todas as membranas, tanto revestindo uma célula quanto no seu interior. A composição lipídica da dieta e o adequado consumo de ácidos graxos do tipo *cis* estão diretamente relacionados à composição da membrana celular, uma vez que esses ácidos atuam como elementos de comunicação entre as células, sendo precursores de certas prostaglandinas (PGE), além de controlarem o nível de colesterol e favorecerem a permeabilidade da pele. (GURR, 1992).

Os ácidos graxos insaturados são encontrados, como já assinalamos, em grande percentual nos óleos e gorduras de certas sementes e algumas gorduras animais. O nome vitamina F foi aplicado a uma mistura de ácidos graxos não-saturados, incluindo o linoléico, o linolênico e o araquidônico, considerados essenciais para o rato e apenas o ácido linolênico para o homem (GURR, 1992).

Os ácidos graxos, principalmente na forma de fosfolipídios, são encontrados entre os vários elementos que compõem as células do sistema imunológico, apresentando os linfócitos e macrófagos alto teor de ácido araquidônico (W-6). Este ácido, presente na membrana celular, após estimulação por mitógenos, linfocinas e antígenos, atua sobre diversas fases da resposta imunológicas através da produção de prostaglandinas e leucotrienos, que atuam como potentes mediadores inflamatórios (GURR, 1992).

Os monócitos e os macrófagos produzem PGE-2, que aumenta após traumatismos, queimaduras, câncer, salientando-se que dietas ricas em ácido araquidônico, acarretam seu aumento nas células do sistema imunológico, o que resulta em aumento imunossupressor. O emprego de dietas ricas em ácido graxo W-3 em pequena quantidade altera a composição de ácidos graxos nas células do sistema imunológico, o que reduz a produção de eicosanóides W-6.

Sabe-se que a eficiência depende em parte do equilíbrio entre produção de substâncias eicosanóides derivadas do W-6 e dos W-3, sendo que estes inibem as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico e eicosanóides W-6 (GURR, 1992).

3.2.1 Metodologias para Identificação dos Ácidos Graxos

A composição de ácidos graxos é mais comumente determinada através de análises por cromatografia gasosa, a qual requer modificações dos ácidos graxos através de derivação química, convertendo-os moléculas mais voláteis, os ésteres metílicos de ácidos graxos, também designados de forma abreviada por FAMES, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters* (CHRISTIE, 1982; EMBLEY, WAIT 1994).

A análise direta dos ácidos graxos pode ser realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência, e a confirmação das estruturas através de procedimentos espectroscópicos e de degradação química (CHRISTIE, 1982).

Deste modo, os ácidos graxos essenciais insaturados na forma *cis* têm efeito protetor quando disponíveis em concentrações normais no organismo (GURR, 1992).

Para Arts, Ackman e Holub (2001), os ácidos graxos estão ligados à chave dos processos fisiológicos e bioquímicos, sendo dessa forma, parte integral do funcionamento próprio dos ecossistemas. Os organismos aquáticos têm sido e continuam a ser nossa fonte primária e existe uma crescente evidência de que os ácidos graxos essenciais sejam uma potente base do processo evolutivo, estando, desta forma, ligados diretamente à compleição orgânica, e indiretamente, com a genética.

3.3 Ácido gama-linolênico (ômega 6)

O ácido gama-linolênico (GLA) é um ácido graxo essencial ômega-6 encontrado primariamente em óleos vegetais com destaque para a prímula nome da planta da espécie *Oenothera biennis*, nativa da América do Norte, atinge em torno de 1 metro de altura e produz flores amarelas. (Figura 1).



Figura 1. Flor de Prímula *Oenothera biennis*

Fonte: wikipedia

O óleo de prímula vem sendo estudado para tratar de diversos problemas de saúde, entre eles destaca-se seu uso para aliviar os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM) nas mulheres apesar de que a maioria dos estudos não comprova a eficiência do óleo de prímula no alívio dos sintomas da TPM.

Outras indicações para seu uso (via oral) incluem casos de eczema e outras irritações da pele, sendo que diversos estudos comprovam a eficiência do óleo de prímula nessas situações. É vendido como um suplemento dietético para tratar problemas com inflamações e doenças auto-imunes. A eficácia de tal uso é discutida. No século XVII, ela foi introduzida na Europa e veio a se tornar um medicamento popular, recebendo o nome de "cura tudo do rei".

Em 1919, HEIDUSCHKA e LÜFT extraíram o óleo de sementes de prímula e descreveram um incomum ácido linolênico.

No entanto, existem diversas fontes onde o ômega 6 é encontrado tais como:

- Aves de capoeira;
- Abacate;
- Ovos;
- Leite;
- Lula;
- Peixes de água quente;
- Cereais;

- Assados;
- Nozes;
- A maioria dos óleos vegetais;
- Óleo de borragem;
- Óleo de semente de groselha;
- Óleo de linhaça;
- Óleo de cânhamo;
- Óleo de soja;
- Óleo de algodão;
- Óleo de semente de girassol;
- Óleo de milho;
- Óleo de açafrão;
- Sementes de abóbora;
- Micro-organismos;
- Algas.

A composição de ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais fazendo com que ocorram moderadas modificações de níveis de ácido gama linolênico (CARVALHO, 1994).

Na literatura em fisiologia, GLA é designado como 18:3(ω -6) e quimicamente, GLA é um ácido carboxílico com uma cadeia de 18 carbonos e três ligações duplas cis; a primeira ligação dupla é localizada no sexto carbono a contar da terminação ômega $C_{18}H_{30}O_2$ (Figura 2).



Figura 2. Estrutura molecular do Ácido gama-linolênico

Fonte: wikipedia

É também chamado de ácido gama linolênico. É um isômero do ácido alfa-linolênico, o qual é o ácido graxo ômega 3 encontrado na semente de linho. Embora haja formas alfa- e gama- de ácido linolênico, não há forma beta. Uma foi identificada, mas foi excluída por ser um resultado do processo analítico original (SILVA, 1996). O ácido linoléico da serie ômega 6 e ácido α linolênico da serie Ômega 3 quando ingeridos na dieta são metabolizados por uma série de enzimas desaturases (introdução de uma dupla ligação) e elongases (introdução de dois átomos de carbono), originando diversos metabólitos como (Tabela 2). O ácido gama linolênico é um metabolito do ácido linoléico e o primeiro intermediário na conversão do ácido araquidônico (CARVALHO, 1994).

O processo de conversão endógeno do ácido linoleico facilmente encontrado em óleos vegetais, como açafrão, milho e soja para ácido gama linolênico pela 6-desaturase parece ser uma etapa essencial à obtenção deste composto. Entretanto a taxa de conversão é relativamente baixa em humanos já que a enzima m-desaturase é facilmente inibida frente à diferentes fatores (SILVA, 1996).

Tabela 2. Metabolismo de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6

Família ômega 6	Enzimas	Família ômega 3
Linoléico (18:2)		α -linoléico (18:3)
↓	$\Delta 6$ -dessaturase	↓
γ – linolênico 9 (18:3)		Octadecatrienóico (18:4)
↓	Elongase	↓
Dihomo- γ -linolênico(20:3)		Eioctadecatrienóico (20:4)
↓	$\Delta 5$ -dessaturase	↓
Araquidônico(20:4)		Eioctadecatrienóico (20:5)
↓	Elongase	↓
Adrenico (22:4)		Docosapentaenóico(22:5)
↓	$\Delta 4$ -dessaturase	↓
Docosapentaenóico(22:5)		Docosapentaenóico(22:6)

Fonte: CARVALHO, 1994

O corpo humano produz GLA do ácido linoléico. Esta reação é catalisada por Δ^6 -dessaturase (D6D), uma enzima que permite a criação de ligações duplas sobre o 6° carbono contando-se do grupo carboxila terminal. Acido linoleico é suficientemente consumido na maioria das dietas, de fontes abundantes tal como óleos de frituras e carnes (SILVA, 1996).

De acordo com HORROBIN, 1992 a gordura do leite humano, a maior fonte de ácido gama linolênico animal contém em média 100-400 mg/l de ácido gama linolênico. Enquanto que a gordura bruta de vaca, porco e galinha contém; 60,4; 20,9 e 77,6 mg respectivamente. Em geral, as fontes alimentares convencionais que poderiam suprir este ácido graxo via direta apresentam escasso conteúdo de ácido gama-linolênico.

Entretanto, uma falta de GLA pode ocorrer quando há a redução da eficiência da conversão de D6D (por exemplo, porque pessoas crescem quando mais velhas ou quando houver deficiências dietéticas específicas) ou nos estados de doenças onde há um consumo excessivo de metabólitos de GLA (CARVALHO, 1994).

3.3.1 Importância Médica do Ácido Graxo gama linolênico-GLA

O ácido gama linolênico-GLA é um ácido graxo essencial, possuindo várias funções importantes, dentre elas, a formação de prostaglandina E1 (Figura 3.).

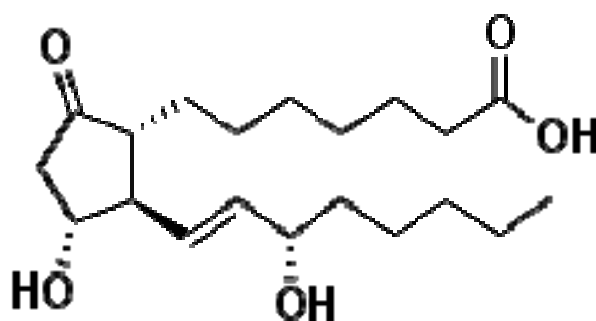


Figura 3. Estrutura química de uma prostaglandina E1 (PGE1).

Fonte: GONZÁLEZ, 2003

Uma prostaglandina é qualquer membro do grupo de componentes dos lipídeos que são derivados enzimaticamente dos ácidos graxos e têm importantes funções no organismo de um animal. Toda prostaglandina contém 20 átomos de carbono, incluindo um anel de 5 carbonos. Elas são mediadoras e possuem uma série de fortes efeitos fisiológicos, embora tecnicamente sejam hormônios, elas raramente são classificadas como tais (BELLENGER-GERMAIN, 2002). As prostaglandinas causam uma maior permeabilidade capilar, atraindo células como macrófagos especializadas na fagocitose de restos celulares resultantes durante o processo inflamatório. São substâncias que agem como hormônios locais, são ácidos graxos produzidos por quase todas as células do corpo (GONZÁLEZ, 2003).

Sua ação varia de acordo com a célula alvo, sendo sua vida útil muito curta. Sua síntese e liberação no endométrio feminino são regulados pelo estrógeno que estimula a síntese de prostaglandina e progesterona que inibe a liberação de prostaglandinas. Na gravidez o excesso de estrógeno, aumenta a concentração de prostaglandinas provocando a contração do endométrio e por consequência a expulsão do feto (SILVA, 1996).

O GLA tem recebido considerável atenção nos últimos anos devido aos efeitos benéficos relatados no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (HORNYCH et al., 2002), diabetes (SURESH, 2003), eczema atópico (GOOL et al., 2003), alcoolismo (MEEHAN et al., 1995), síndrome pré-menstrual (GIRMAN et al., 2003), tratamento da hipertensão e agente antitumoral (BAKSHI et al., 2003). Para este ácido também foi relatada ação hipocolesterolêmica, sendo capaz de diminuir os níveis de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) colesterol (FUKUSHIMA et al., 1996).

O GLA reduz a perda de água através da pele e aumenta a tolerância à exposição dos raios ultra-violeta. É encontrado em quantidades pequenas, porém importantes, no leite materno. O fato constitui mais um argumento a favor do aleitamento materno, sabendo-se, além disso, que a restrição da ingestão de gorduras para crianças pode reduzir o crescimento e a acuidade visual e limitar o desenvolvimento mental (CARVALHO, 1994).

Os ácidos ômega 6 ajudam a manter os ossos fortes e saudáveis no nosso corpo. Quando o nosso corpo é deficiente em ômega 6, esta falta pode resultar numa perda óssea e uma condição de saúde conhecida como osteoporose. Além disso, os ossos precisam de cálcio para se manterem fortes e manterem a sua densidade. A deficiência de ácidos graxos essenciais, nos seres humanos, resulta em condições anormais da pele, tais como dermatites, escamações e ressecamentos; redução na regeneração dos tecidos e aumento da suscetibilidade a infecções.

A versão de KRIS-ETHERTON et al., 1998 descreve trabalhos de diversos pesquisadores sobre o efeito dos níveis de lipídeos no plasma, variando as quantidades de ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos da série ômega 6 e colesterol nas dietas. Os mecanismos propostos pelos tais ácidos ômega 6 diminuíram e ácidos graxos saturados aumentaram o colesterol total do plasma e estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Mecanismos propostos para efeitos dos ácidos graxos ômega 6 e ácidos graxos saturados nos níveis dos lipídeos plasmáticos.

Ácidos graxos Ômega 6

- aumentaram os esteróis fecais e a excreção de sais biliares
- Induzem troca na composição de LDL e outras lipoproteínas
- diminuem VLDL hepático e síntese de HDL

Ácidos graxos saturados

- diminuem a síntese hepática e a atividade de LDL receptor

Ácidos graxos saturados e colesterol

- Diminuem a síntese hepática e a atividade LDL receptor
- Induzem trocas na composição de VLDL e HDL

A presença dos ácidos graxos das serie ômega no corpo humano em especial nos tecidos em desenvolvimento é dependente da quantidade e do tipo de lipídeos da dieta, da atividade das enzimas desnaturases responsáveis pela síntese dos metabólitos e ao processo de oxidação e acilação do 18:3 ômega 3 e 18:3 ômega 6 (CARVALHO, 1994).

MIKAHAILIDJS et al., 1986 apud SILVA 1996 relataram o efeito de inibição da agregação plaquetária e aumento da produção de PGE1 pela administração direta de ácido gama linolênico em indivíduos saudáveis comparados a indivíduos diabéticos. Nestes, houve redução do nível de PGE1 originada das plaquetas, devido à hiperatividade plaquetária detectada em indivíduos diabéticos dependentes de insulina.

Sugano 1986 apud Carvalho 1994 compararam a eficácia dos ácidos graxos essenciais em reduzir o nível de colesterol plasmático de ratos. Os ratos foram testados com óleo de prímula (contendo 72% de ácido linoleico e 9% de ácido gama linolênico), óleo de açafrão (contendo 75% de ácido linoleico) e óleo de soja (contendo 54% de ácido linoleico e 10% de ácido alfa linolênico com dieta rica em colesterol. Os resultados demonstraram que a nível de colesterol sérico dos grupos que receberam óleo de prímula era consideravelmente menor que os demais grupos.

Schalin-Karrila et al., 1987 apud Silva, 1996 utilizaram o óleo de prímula (45 mg de ácido gama-linolênico na cápsula de “Efamol”) em pacientes com eczema atópico observando a alteração do quadro clínico, a composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos do plasma e o nível de eicosanóides circulantes. Após 12 semanas de tratamento, com a ingestão de 4 cápsulas diárias, foi observado uma significativa redução na severidade e grau de inflamação, ressecamento da pele e coceira observados em pacientes eczematosos tratados com “Efamol” quando comparado ao grupo placebo. O tratamento causou elevação no nível de ácido gama linolênico nos fosfolípídeos do plasma.

A partir da década de 1970, pelos estudos de DYERBERG et al., 1975, os AGPI despertaram interesse, pois revelaram que populações que ingerem dietas ricas em peixes têm baixa incidência de doenças cardíacas coronarianas e infarto do miocárdio.

Desde então, inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que o AGPI n-3 estão envolvidos na redução da inflamação e participam na prevenção de certas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, colites ulcerativas e desordens de pele. (CHÊNE et al., 2007; SANKARAN et al., 2007; FUNAHASHI; 2008, SALA-VILA et al., 2008). Além dos benefícios na prevenção e no desenvolvimento do câncer (CHÊNE et al., 2007; TROMBETTA et al., 2007; NAGAO e YANAGITA, 2008; TANAKA et al., 2008). Estes achados levaram aos profissionais de saúde a encorajar a população em geral a aumentar o consumo de n-3 (RIEDIGER et al., 2009).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os ácidos graxos n-3 podem reduzir a geração de prostaglandinas, derivadas do ácido araquidônico, e outros mediadores, seguido de estímulo inflamatório (CHÊNE et al., 2007 REN e CHUNG, 2007; CHAPKIN, et al., 2008; MASSARO et al., 2008).

Pesquisas evidenciam que ácidos graxos podem alterar a transcrição de genes específicos. Alguns dos efeitos transcricionais dos AGPI parecem ser mediados pelos eicosanóides, porém outras vias independentes também podem ser utilizadas (CALDER, 2006; SIMOPOULOS, 2006).

Sugere-se que a presença de altas concentrações de AGPI n-3 ou mudanças na razão entre n-3, podem modular a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório. Isto ocorre através de ações diretas em vias de sinalização, na ativação de um ou mais fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NFkB) e receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs) (NASROLLAHZADEH, 2008; WEAVER, 2009).

Os mecanismos que tentam explicar, em parte, os efeitos antiinflamatórios do EPA e DHA, estão relacionados com a diminuição da expressão de vários genes, incluindo NFkB, citocinas pró-inflamatórias e genes

envolvidos na síntese de eicosanóides, como a enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) (BOUWENS, 2009; CHAPKIN, 2009).

Estudos demonstraram que ácidos graxos poliinsaturados e certos produtos de sua oxidação, são capazes de se ligar e ativar os receptores pela proliferação de peroxissomos (PPARs), que são receptores nucleares que regulam a expressão de genes alvos, relacionados com o metabolismo lipídico, homeostase da glicose nos processos inflamatórios (CHÊNE et al., 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que os ligantes destes receptores podem ser efetivos na redução do crescimento e invasividade em várias linhagens celulares tumorais (NASROLLAHZADEH, 2008).

Apesar de aparentemente não haver especificidade entre os AGPI, sugere-se que estes receptores nucleares podem contribuir com as propriedades anticancerígenas atribuídas ao DHA em conjunto com outros mecanismos mediados por ele (SIDDIQUI et al., 2008).

Tem sido demonstrado que o ácido α -linolênico (ALA), EPA ou DHA reduzem a expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina (IL-1 β) em condrócitos bovinos. Similarmente, camundongos suplementados com óleo de peixe apresentam diminuição na quantidade de mRNA de inúmeras citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, and TNF α nos rins, baço e macrófagos peritoneais. Experimentos em humanos saudáveis com dieta controlada e suplementados com óleo de peixe EPA (775 mg EPA/dia) sugerem que alterações nas razões de AGPI n-6 e n-3 provavelmente influenciam nas respostas inflamatórias. Esta capacidade deve-se em parte pela capacidade destes ácidos graxos ou de seus metabólitos regular a expressão de genes relacionados com a transdução de sinal que possam bloquear a expressão de citocinas em nível transcricional (WEAVER, 2009).

3.4 Ácidos graxos poliinsaturados em micro-organismos

Micro-organismos com grande potencial para o acúmulo de lipídeos são algas, leveduras e fungos filamentosos (CARVALHO, 1994). Em 1982, Ratledge relatou o potencial comercial destes micro-organismos, assim como o conteúdo dos lipídeos e ácidos graxos.

As leveduras e fungos são os mais estudados devido a sua habilidade em produzir lipídeos em condições de laboratório. Algumas espécies de levedura são capazes de produzir 30 a 70% de lipídeos, como por exemplo, a *Lipomyces* (CARVALHO, 1994). Apesar da contribuição dos micro-organismos para a indústria de óleo ser praticamente negligenciada, existem várias razões em seu favor, como descrito por Wellbaum (2006):

- Os óleos microbianos têm a vantagem de possuir somente ácidos graxos poliinsaturados, diferentemente dos óleos de plantas e de animais que possuem além dos insaturados, os ácidos graxos saturados.
- Ácidos graxos poliinsaturados microbianos são os tipos de óleos com maior valor comercial, preferíveis ao óleo de soja, girassol dentre outros de menor qualidade.
- Suas taxas de crescimento extremamente altas e em uma variedade enorme de substratos permitem a utilização de matérias primas baratas ou mesmo a custo zero na formulação de meios de cultura.
- A produção de óleo pode ser feita ao longo do ano inteiro, pois não há dependência sazonal ou climática.
- As fontes microbianas podem suprir ácidos graxos poliinsaturados de alto grau de pureza e com qualidade controlada.
- A manipulação de genes para a otimização da produção, bem como os mutantes são de controle e monitoramento bem mais fácil do que os organismos mais complexos, como plantas e animais dispostos no ambiente.
- Além disso, os micro-organismos podem usar glicerina como fonte de carbono para produzir proteínas, vitaminas, antioxidantes, com ausência de elementos traço, e outros contaminantes, portanto, pode ainda, ser usados como macro e micronutrientes, tanto no processo de produção, como na formulação de algum produto final com fins farmacêuticos e/ou alimentícios.

A produção industrial a partir de micro-organismos tem vantagem sobre outras fontes de óleos, pois não necessita de grandes extensões de terra agriculturáveis e de enormes quantidades de água. As instalações poderiam estar dispostas em qualquer área com dimensões modestas, mesmo para produzir grandes quantidades de óleo, sem prejudicar o habitat natural e ou causar algum impacto ambiental. Entretanto, para que esse tipo de produção possa ser economicamente viável, deve-se identificar um óleo ou óleos, que não sejam extraídos de plantas e que tenham alto valor comercial, para que possa cobrir os custos de sua produção (WELLBAUM, 2006). O estudo de micro-organismos para a produção de lipídios é alternativa para a substituição de fontes convencionais de óleos e gorduras. Uma vez que estes lipídios apresentam composição semelhante aos óleos vegetais, poderiam ser empregados para fins alimentares, combustíveis alternativos, bem como na produção de compostos específicos de uso limitado, como produtos farmacêuticos (CELLIGOI, 1993).

O ácido gama linolênico (ômega 6) é encontrado em bactérias por exemplo a *Spirulina*, assim chamada por causa de sua forma espiral, que pertence à família de cianobactérias ou azul-esverdeada. Existem cerca de 1 500 espécies de algas e 36 espécies são comestíveis (COHEN, et al., 1993). As principais espécies atualmente disponíveis no mercado é a *Spirulina platensis* é cultivado principalmente na Califórnia e Havaí. (Figura 4.).

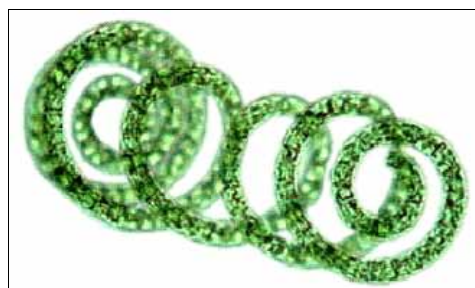


Figura 4. *Spirulina platensis*

Fonte: Wikipedia

No comércio, *Spirulina* é sob a forma de um azul-verde em pó desidratado (Figura 5.).



Figura 5. *Spirulina* sob a forma de pó desidratado

Fonte: wikipedia

Spirulina contém uma grande riqueza de nutrientes em um volume muito pequeno. Alguns dos principais. E o seu conteúdo pode variar dependendo da sua origem. *Spirulina* contém ácido gama-linolênico, uma substância que pertence à família do ômega-6. Ele contém uma quantidade significativa de ácido gama-linolênico (de 40 mg a 50 mg / 5 g) (COHEN, Z. et al., 1993).

Os fungos são organismos muito versáteis no que diz respeito às condições ambientais, entre os produtores de ácidos graxos, destacam-se os Zygomycetes, considerando o rápido crescimento e a habilidade de utilizar diferentes substratos, demonstrando alto potencial biotecnológico na produção de moléculas de alto valor agregado. Contudo, suas atividades metabólicas podem ser alteradas em resposta a variações das condições físicas e químicas de um ambiente (AINSWORTH, 1973; ALEXOPOULOS et al., 1996; BAIJAL e MEHRETRA, 1980; CARLILE e WATKINSON, 1996; GARRAWAY e EVANS, 1984; GRIFFIN, 1994; DOMSCH et al., 1980).

Na síntese de ácidos graxos por fungos atuam fatores ambientais, como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Estes fatores quando controlados podem acarretar maior acréscimo desses compostos na biomassa fúngica.

Os lipídeos ocorrem em fungos como constituintes da parede celular, material de reserva e em alguns casos como compostos extracelulares. A proporção de lipídeos de membrana e material de reserva e os tipos de lipídeos encontrados em fungos são determinados pelas condições de crescimento e fase de desenvolvimento.

Segundo Ratledge (1996), as principais classes de micro-organismos utilizados para a produção de lipídios, considerados micro-organismos oleaginosos, são as leveduras e os fungos filamentosos; estes podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídios. Em seus estudos, SHAW, 1965 analisou ácidos graxos de 31 espécies de fungos, pertencentes às classes Oomycetes, Zigomycetes, Ascomycetes e Basidiomycetes e detectou a presença do ácido gama linôlenico, somente nos representantes da ordem Mucorales apresentou maior quantidade deste ácido graxo.

A ordem Mucorales, classe Zigomycetes, Reino Fungi, possui representantes caracterizados por apresentarem propagação assexuada através de esporângios: estrutura em forma de saco onde são produzidos os esporos, geralmente em grande quantidade. Organismos com poucos, ou mesmo com esporo único, podem também ser encontrados, sendo que no caso destes últimos, as estruturas passam a ser chamada de esporangiólos, uma forma reduzida do esporângio (GUERRERO e SILVEIRA, 1996).

A reprodução sexuada é por meio de zigósporos. São cosmopolitas sapróbios, alguns poucos são parasitas facultativos de animais e plantas (HAWKSWORTH et al., 1995 apud SILVA 1996). Os principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos são da espécies de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cunninghamella* (CARVALHO, 1994) Figura 6.

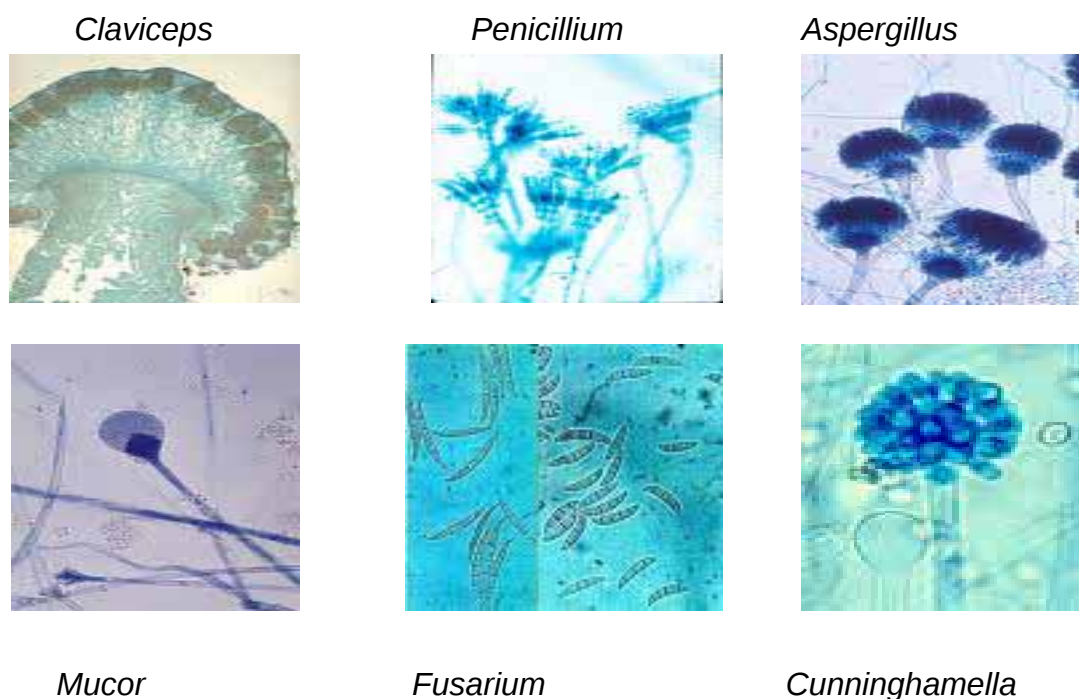


Figura 6. Principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos

Fonte: HAWKSWORTH et al., 1995

Ellenbogen e Aronson, (1969) analisaram a composição de ácidos graxos dos fungos marinhos, *Trausiochyrium roseum*, *Tniochyium aureirni*, *Sehlzochyrium aggregaium* e *Dermocyslldium sp.* de água fresca. Estes micro-organismos apresentaram uma característica diferente dos demais fungos analisados. Mostraram-se capazes de sintetizar ácidos graxos das rotas ômega 3 e ômega 6.

Shaw, 1966 apud Carvalho 1994 investigou a presença do ácido gama linolênico nos fungos *Cunninghamella blaketeana* e *Rhizopus arizopus*. A composição qualitativa de ácidos graxos dos fungos foi muito similar, diferindo na porcentagem de ácido gama linolênico. *Cunninghamella blakesleana* apresentou 13,9% de ácido gama linolênico em relação aos ácidos graxos totais; o dobro da porcentagem presente em *Rhizopus*, quando incubados à temperatura de 30°C por 7 dias. A temperatura de incubação causou significativas mudanças nestas porcentagens, resultando numa diminuição para 8,5% de ácido gRGHama linolênico. O tempo de incubação causou pequenas flutuações a composição de ácidos graxos, caracterizado por um pequeno aumento do ácido linoleico e diminuição do ácido oleíco.

Shin e Shin, 1988 estudaram a produção de ácido gama linolênico em 15 linhagens de fungos Mucorales com o objetivo de isolar aquele que melhor apresentasse crescimento celular e conteúdo lipídico. O fungo F13-354, isolado do solo da Coréia e identificado como *Mucor sp.* produziu 29,9% de lipídeos totais por peso seco de biomassa e um conteúdo de 16,8% de ácido gama-linolênico em relação aos ácidos graxos totais da composição.

Representantes do gênero *Mucor* possuem 25% do seu conteúdo celular na forma de lipídeos e, devido a isto, são designados como fungos oleaginosos (RATLEDGE, 1982). São também grandes produtores de ácido gama linolênico (TORLANOVA et al., 1992), este ácido graxo são nutricional e farmacologicamente importantes por serem necessários as membranas celulares e precursores de substâncias biologicamente ativas, tais como as prostaglandinas.

Kendrick e Ratledge, 1992 Apud Carvalho, (1994) estudaram o fungo oleaginoso *Eniomophora* objetivando aumentar a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua constituição. As porcentagens de ácidos graxos poliinsaturados da rota ômega 6, como ácido araquidônico e ácido gama linolênico se mostraram superiores aos valores encontrados de ácidos graxos da rota ômega.

A porcentagem relativa de ácido gama-linolênico foi de 1,5% em relação aos ácidos graxos totais da constituição dos lipídeos neutros e 4,8% dos ácidos graxos totais presentes nos lipídeos polares quando incubado à temperatura de 24°C, O aumento da insaturação dos lipídeos à temperatura de 24°C quando comparado a 30°C ocorreu principalmente devido ao aumento do nível de ácido araquidônico, ácido gama-linolênico e ácido linoleico.

Letourneau et al., 1976 apud Carvalho, 1994 analisaram qualitativamente e quantitativamente a composição de ácidos graxos da parede celular de *Chocomphora circonbitarum* utilizando métodos microquímicos, espectrofotometria infra-vermelho e difração em raio X. As análises químicas da parede celular revelaram a presença de quitina (17%), quitosana (polímeros de glicosamina, 28,4%), açúcares neutros (7,2%), proteínas (8,2%) e lipídeos (13,8%). A extração dos lipídeos da parede celular do fungo liofilizado com os

solventes clorofórmio-metanol resultou 12,8% de lipídeos totais, no qual contém 6,6% de ácido gama linolênico em relação aos ácidos graxos totais da constituição.

Em 2001, Serrano et al., demonstraram que o conteúdo de lipídeo diminui quando aumenta a concentração de etanol, contudo, existe um maior aumento dos ácidos insaturados. A conclusão mais importante deste estudo está relacionada com o aumento da produção do ácido graxo insaturado como produto final, em particular ao ácido gama linolênico, um composto biologicamente ativo.

Gema et al., 2002 descrevem fontes de GLA provenientes de fungos oleaginosos *Mucor javanicus*, *Cunninghamella*, *Absidia* e uma nova cepa isolada de *Cunninghamella echinulata* cultivadas em glicose produzindo quantidades cerca de 50mg de lipídeos da biomassa em meios com alta relação de carbono e nitrogênio.

Recentemente, Papanikolaou et al., 2009 descrevem uma possibilidade de valorização da glicerina, co-produto do biodiesel na produção de lipídeos por fungo da Ordem Mucorales, *Mortierella isabellina* ATHUM 2935, utilizando um meio com limitação de nitrogênio, porém quando foi utilizado 100g/L da glicerina foi observado uma acumulação cerca de 51% peso seco de lipídeos.

A porcentagem relativa de AGL de várias espécies de zigomicetos foi analisada e em algumas espécies a composição variou de 34,8 a 61,9% do total dos ácidos graxos, dentre as que mais se destacaram encontram-se *Circinella simplex* CBS 142.35, *Mucor indicus* ATCC 4855, *Syzygites megalocarpus* ATCC 18025 e *Zygorhynchus moelleri* UAMH 1556 contendo 42,0; 34,8; 61,9 e 42,0%, respectivamente (WEETE et al., 1998).

Os fungos filamentosos, contudo, apresentam produções de lipídios desejáveis devido ao fato de apresentarem altos teores de lipídios contendo composição não usual de ácidos graxos tanto de cadeias curtas, quanto de cadeias longas (HANSSON e DOSTÁLEK, 1988).

O óleo contendo AGL pode ser extraído de sementes de prímlula (*Oenothera biennis* e/ou *O. lamarckiana*), de sementes de borragem (*Borago*

officinalis) e de sementes de groselha preta (*Ribes nigrum*). Contudo, a produtividade de AGL de sementes é extremamente baixa, variando de 9% no óleo de prímula a 19% nos óleos de borragem e groselha preta (HORROBIN, 1992), devido ao longo período da cultura e a enorme área requerida para o plantio, mas o AGL pode ser também sintetizado por fungos da ordem Mucorales (SHAW, 1965), como o óleo extraído de *Mucor javanicus* comercializado no Reino Unido ou de outros fungos ainda não investigados.

Mucor mucedo, *Mucor plumbeus*, *Mortierella ramanniana* e *Rhizopus arrhizus* foram cultivados em meio de cultura contendo maltose, lactose, glicose, amido solúvel e acetato de sódio como única fonte de carbono. Comparando-se a produção de lipídios e a composição dos ácidos graxos das espécies testadas, observou-se que a glicose e a maltose proporcionaram lipídios com grande proporção de ácidos graxos saturados enquanto que a lactose, o glicerol e o amido acarretaram lipídios insaturados com um alto teor de AGL (SAJBIDOR et al., 1988).

O acúmulo de lipídios, a composição de ácidos graxos e a produção de AGL foram investigados em 28 linhagens de fungos pertencentes aos Mucorales. O teor lipídico variou de 5% a 30% da biomassa seca e a porcentagem de AGL no total do lipídio intracelular situou-se na faixa de 2,5% a 15,4% (p/p). As melhores produções de AGL na biomassa, foram encontradas em *Mucor mucedo* CCF-1384 (28,4 mg.g⁻¹) e *Cunninghamella echinulata* CCF-103 (25,1 mg.g⁻¹) (CERTÍK et al., 1993).

A influência de doze fontes individuais de carbono e seis de nitrogênio sobre o crescimento, conteúdo de lipídios e composição de ácidos graxos foi investigada em *Mucor mucedo* CCF-1384. O melhor crescimento foi observado em maltose e o rendimento da produção de lipídios diminuiu na seguinte ordem: maltose, amido hidrolisado, glicose, glicerol, xilose, etanol, amido, sacarose, frutose, lactose, metanol e galactose. Os substratos com N orgânico foram mais benéficos para o crescimento do que as fontes inorgânicas. As análises dos ácidos graxos mostraram acumulação preferencial de ácido oléico e linoléico apesar das fontes de N e C utilizadas,

e ainda, a natureza do substrato afetou particularmente o conteúdo de AGL (CERTÍK et al., 1993).

A porcentagem de lipídios totais na biomassa seca obtida com *M. ramosissimus* após 3 dias de incubação (8,1% p/p) foi menor do que as obtidas por TORLANOVA et al., (1992) com *Mucor* após 3 dias (19,3% p/p) e por CARVALHO (1994) com *Mucor* sp. LB-54 após 5 dias de incubação (20,7%).

Kendrick e Ratledge (1992) relataram que os fungos *Thraustochytrium aureum* e *Saprolegnia parasítica* contêm cerca de 10% p/p de lipídios totais na biomassa seca, enquanto que as espécies *Conidiobolus nanodes*, *Entomorphthora exitalis* e *Mortierella alpina-peyron*, conhecidas como oleaginosas, contêm acima de 20% de lipídios totais na biomassa (25,7%, 24,6% e 37,7% p/p, respectivamente).

Em 2001, Serrano et al., sugerem que em Mucorales o aumento da produção do ácido graxo insaturado, em particular ao ácido gama linolênico (18:3 omega 6), um composto biologicamente ativo, está relacionado com a fase de crescimento dos fungos e a fonte de carbono.

Chaudhuri et al., (1998) estudaram *M. elongata* SC208 utilizando os meios de cultivos tomate dextrose, glicose e mostarda em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Concluíram que nas melhores condições de cultivo, utilizando mostarda, produziu-se 23,2 g.L⁻¹ de biomassa seca, 63,7 mg.g⁻¹ de lipídeos totais e 33,2% de AA. Higashiyama et al. (1997) estudaram a produção de AA, cultivando *M. alpina* em fermentador industrial. Nesse estudo obtiveram 50,6 g.L⁻¹ de biomassa produzida, 24,2 g.L⁻¹ de lipídeos totais e 10,9 g.L⁻¹ de AA, com aumento de 45,0% do conteúdo de ácidos graxos totais com oito dias de cultivo.

Carvalho et al., (1999) estudaram a linhagem *Mucor* sp. LB-54 adicionando glicose ao meio de cultivo e na temperatura de 28° C por 144 horas e 12° C durante 72 horas. Observaram que a produção de biomassa foi de 6,3 g.L⁻¹, a produção de lipídios foi de 1,6 g.L⁻¹ (25,1%) e produção de AGL foi de 74,1 mg.L⁻¹ (19,40%), mostrando o efeito da diminuição da temperatura durante o período de cultivo.

Eroshin et al., (2000), durante o cultivo de *Mortirela alpina* em meios contendo uréia como fonte de nitrogênio sob cultivo contínuo, mostraram a especificidade de produção de crescimento e produção de AA em $0,03 \text{ h}^{-1}$. Nesse estudo foi observada produção de biomassa de $15,6 \text{ g.L}^{-1}$, porcentagem de lipídios na biomassa seca de 12,8%, produção de AA de $19,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (32,0% dos lipídeos totais e 4,1% da biomassa seca).

Somashekar et al., (2002) estudaram a produção de AGL utilizando diferentes fontes de nitrogênio, carboidratos e óleo de gergelim em cultivo submerso. Observaram que o KNO_3 foi a melhor fonte de nitrogênio para induzir a produção de lipídeos totais (32,0% em seis dias). Concluíram que o melhor indutor para a produção de AGL foi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o qual foi obtido 16,3% contra 13,8% para KNO_3 .

Papanikolaou et al., (2004) estudaram a produção de AGL utilizando altas concentrações de açúcar e controlando a relação de C:N no meio de cultivo utilizando *M. isabelina*. Observaram a produção de biomassa de $35,9 \text{ g.L}^{-1}$, acumulação de lipídios de $0,2 \text{ g.g}^{-1}$ de glicose e produção de $801,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGL e 19 mg de AGL. g^{-1} de biomassa.

Jang et al., (2005), utilizando *Mortirella alpina*, estudaram o efeito da adição de 1% de óleo de soja ao meio de cultivo utilizando glicose e amido solúvel como fontes de carbono. Avaliaram também a produção de AGI da família w-6. Concluíram que a adição de amido solúvel (60 g.L^{-1}) foi mais eficiente para produção de AA ($3750,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e 55,01%) e, a adição de 80 g.L^{-1} , foi melhor para produção de AEP ($36,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e 0,57%). A produção de biomassa para ambas as concentrações, porém, foi de $23,0 \text{ g.L}^{-1}$ e a produção de ácidos graxos totais de 6819,1 e 6451,7 mg.L^{-1} , respectivamente.

Ahmed et al., (2006) estudaram várias linhagens de fungos filamentosos para produção de AGL utilizando cultivo submerso com glicose e extrato de levedura como meio de cultivo. Concluíram que a linhagem *Mucor* sp. RRL001 foi a melhor produtora de biomassa ($13,4 \text{ g.L}^{-1}$), maior acumuladora de lipídeos totais ($5,8 \text{ g.L}^{-1}$) e produtora de AGL ($431,2 \text{ mg.L}^{-1}$). A porcentagem de AGL nos lipídeos totais foi menor para outras linhagens (9,1%).

Zhu et al., (2006) estudaram a produção de AA em sistema alimentado controlando o tempo de cultivo, o consumo de glicose, a produção e a acumulação de lipídios na biomassa. Observaram que as melhores condições de cultivo para produção de AA foram adições de glicose de 20 g.L⁻¹ dia e de 1,5 g.L⁻¹ dia de nitrato. A glicose residual foi de 1,0 g.L⁻¹ após o cultivo. A produção de biomassa foi de 37,0 g.L⁻¹ e produção de lipídios na biomassa de 14,2 g.L⁻¹ (38,4%). A produção de AA foi de 7,7 g.L⁻¹ (54,5%), sendo o experimento realizado com 192 horas de

cultivo. A determinação da composição de AGI em cultivos utilizando substratos

sólidos não pode seguir os mesmos parâmetros utilizados para a determinação desses em cultivos submersos. Isto devido à presença de ácidos graxos nos substratos utilizados para os cultivos, que devem ser considerados antes da realização do experimento (EMELYANOVA, 1996).

Estudo realizado por esse autor utilizando *C. japonica* em substratos trigo, cevada, milho e arroz, demonstrou que, consideráveis diferenças na composição inicial de ácidos graxos foram observadas em todos os substratos, juntamente com redução do peso final do substrato cultivado. A quantificação do perfil de AGI foi realizada a partir da extração dos lipídeos totais do substrato cultivado (substrato + biomassa fúngica). No estudo, foi observado incremento de 33,0% de AL e de 22,9% de AGL, no substrato milho suplementado com peptona. Concluiu-se que a composição de AGI não foi dependente do substrato no qual o fungo foi cultivado.

Stredansky et al., (2000) estudaram o efeito do crescimento de *T. elegans* em polpa de maçã incrementada com óleo de amendoim e rotação de 0,5 rpm ou aeração constante de 100 mL.min⁻¹, por 192 horas de cultivo a 24° C. Os resultados desse estudo, quando analisado o efeito da extração do substrato úmido e seco foram a obtenção do óleo na massa seca de 21,2%; conteúdo de AGL nos ácidos graxos totais de 9,1% (p/p), conteúdo de AGL em substrato úmido de 3,5 g.Kg⁻¹ e obtenção de AGL em substrato seco de 8,8 g.Kg⁻¹. Concluíram que esta técnica é aplicável para o enriquecimento de subprodutos com AGL a partir de óleos fúngicos, utilizando resíduos de indústrias alimentícias podendo-se comparar com o cultivo submerso.

Conti et al., (2001) estudaram a produção de AGL utilizando várias linhagens da ordem Mucorales e os substratos como cevada, milho, trigo e arroz. Avaliaram o efeito da temperatura, umidade, composição do substrato e estudos preliminares em escala piloto. Observaram que a melhor produção de AGL ocorreu utilizando-se semente de malte, cevada e óleo de amendoim (5:15:0,5) com o fungo *Cunninghamella elegans* CCF 1318 em temperatura de 21° C e umidade do meio de 66,7%, por 168 horas. Nestas condições, obteve-se 15,9% de óleo no substrato cultivado, 13,4 mg.g⁻¹ de AGL no substrato seco o que corresponde a 13,8%.

Gema et al., (2002) utilizaram casca de laranja cultivado com *C. echinulata* para a produção de AGL, destinando-o à produção de ração animal. No experimento, ocorreu incremento de 0,5 g.Kg⁻¹ (NH₄)₂SO₄ + 10 g.Kg⁻¹ de glicose, sob temperatura de incubação de 28° C, houve produção de 12,6 mg.10g⁻¹ de AGL do substrato seco, correspondendo a 5,6% do AGL no óleo total que correspondeu a 22,3 mg.g⁻¹ do peso seco do substrato.

Iluyemi et al., (2006) estudaram o efeito do crescimento de cinco linhagens de fungos filamentosos em torta de sementes de palma, com objetivo de avaliar as mudanças na composição de carboidratos, aminoácidos, proteínas e ácidos graxos no substrato. Observou-se que o aumento de proteína do substrato utilizando *T. longibrachiatum* foi de 79,4%, com aumento real de proteínas de 45,7%. O conteúdo de aminoácidos foi de 0,49 g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com metionina, 0,41 g.100 g⁻¹ do substrato enriquecido com lisina, 3,5 g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com cisteína e 1,4g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com isoleucina. Quanto ao conteúdo de hemicelulose e celulose, houve decréscimo de 48,7% com decréscimo real de 57,2% da hemicelulose utilizando *A. niger* e decréscimo 56,5% da celulose, com decréscimo real de 64,7% utilizando *T. longibrachiatum*. Quanto ao conteúdo de ácidos graxos, foi observado aumento tanto de ácidos graxos saturados como insaturados. Em todas as linhagens, portanto, utilizadas no experimento, foi observado decréscimo no conteúdo de ácido mirístico. O maior aumento dentre os ácidos graxos foi observado entre o AO (40%). No conteúdo de AL o aumento foi de 25,6% e no conteúdo de AGL o incremento foi de 0,6%. Concluíram que o processo de cultivo em substratos sólidos utilizando torta de

sementes de palma melhora os valores nutricionais do substrato podendo ser utilizado como ingrediente para alimentação animal.

Certik et al., (2006) utilizaram dez linhagens de fungos filamentosos dentre eles *Thamnidium*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Mortierella* e *Rhizopus*. Em estudo preliminar, foi realizada a triagem da melhor linhagem para produção de AGL em cultivo submerso, utilizando cevada e flocos de aveia. Observaram que a melhor linhagem para produção e acumulação de lipídios foi *M. isabelina* CCF-14 e CCF-127 (10,4 e 2,8% do bioproduto). A melhor produtora de AGL foi *T. elegans* CCF-1465, a qual foi obtida 4,82 g.Kg⁻¹ de bioproduto (6,6%). A linhagem foi utilizada para os cultivo em substrato solido utilizando vinte e oito formas de substratos. Os melhores substratos foram farelo de trigo + sementes de malte (3:1), flocos de sementes de trigo + sementes de malte (3:1) e milho + sementes de malte (3:1). Nestes substratos foram encontrados 4,96 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (14,3%), 7,23 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (13,1%) e 6,5 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (12,7%). Concluíram que o enriquecimento de substratos a base de cereais com AGL utilizando fungos filamentosos deve-se criar novas perspectivas para o enriquecimento nutricional com AGI devendo esta técnica ser focada para estudos em grandes escalas, desenvolvendo-se modelos de produção em biorreatores.

3.5 Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo essencial, da família dos omega-6, formado por uma cadeia de 20 carbonos com quatro duplas ligações (ácido eicosatetraenóico) nas posições 5, 8, 11 e 14 é, portanto, o ácido 20:4. A presença das ligações duplas faz com que esta molécula tenha vários sítios que podem ser oxidados, permitindo a formação de diferentes lipídios com atividades biológicas distintas (Figura 7.).



Figura 7. Estrutura química do ácido araquidônico

Fonte: wikipedia

Ácido araquidônico (conhecido como AA) é um ácido graxo essencial que é normalmente alocado nas membranas celulares e é responsável por sinalizar mudanças adaptativas em resposta ao stress e outros estímulos. É um nutriente anabólico e regulador de síntese proteica.

O ácido araquidônico está presente nas membranas das células corporais, e é o precursor da produção de eicosanóides. É um dos ácidos graxos essenciais, que precisam ser obtidos via alimentação pela maioria dos mamíferos. Alguns deles possuem pequena capacidade de converter o ácido linoléico em ácido araquidônico, ou não conseguem fazê-lo, e por isso é essencial que o obtenham na dieta (DATENBLATT, 2007).

O ácido araquidônico que provém diretamente de fontes dietéticas ou sintetizado a partir do ácido linoleico é o principal componente das membranas fosfolipídicas celulares, ocupando a posição 2-acil dos fosfolipídios. Sob a ação de diversos estímulos, a fosfolipase A-2 libera o ácido araquidônico necessário à síntese dos eicosanóides e, através da ciclogênase, sofre conversão nas plaquetas a tromboxane 2, que exerce potente ação vasoconstritora e agregante (GURR, 1992).

São poucas as substâncias que têm despertado interesse, sob o ponto de vista biológico, como as prostaglandinas e produtos relacionados ao metabolismo do ácido araquidônico, pois as prostaglandinas e produtos relacionados são denominados eicosanóides por serem derivados de ácidos graxos essenciais de 20 átomos de carbono, contendo três, quatro ou cinco duplas ligaduras, como o ácido eicosatrienóico e o ácido eicosapentaenóico (GURR, 1992).

O ácido araquidônico constitui no homem o mais abundante precursor igualmente derivado do ácido linoléico da dieta, sendo esterificado como um componente dos fosfolipídios ou moldado em combinação com outros lipídios complexos. Sua concentração em estado livre é baixa e a biossíntese dos eicosanóides depende primariamente de sua liberação dos locais de armazenamento por várias acil-hidrolases. Após esterificação, sofre incorporação pela membrana celular pela acetilcoenzima A-sintetase, é

armazenado como fosfatidilcolina ou fosfatidilinositol, e alterações mecânicas ou químicas da membrana celular ativam a enzima fosfolipase A-2, liberando araquidonato, ou sofre rápida metabolização através de uma das duas vias (GURR, 1992).

3.5.1 Rotas oxidativas do AA

As principais rotas oxidativas enzimáticas do ácido araquidônico são:

- Via lipo-oxigenase (LOX), cujos principais produtos são os leucotrienos, HETE, HPETE e as lipoxinas;
- Via ciclooxygenase (COX), cujos principais produtos são as prostaglandinas e os tromboxanos.

Estas rotas enzimáticas não atuam sobre o AA esterificado. O AA livre é obtido por meio da ação de fosfolipases sobre fosfolípidos de membranas de células, liberando então o AA não-esterificado. (GURR, 1992).

3.6 Ácido Linoleico

Na literatura fisiológica, é chamado 18:02 (n -6). Quimicamente, o ácido linoleico é um ácido carboxílico com uma cadeia de carbono-18 e dois cis duplas ligações, a primeira ligação dupla está localizada no sexto carbono a partir do final de metila (Figura 8.).

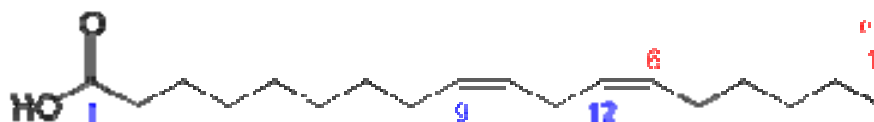


Figura 8. A estrutura química do ácido linoleico

Fonte: wikipedia

O ácido linoleico é um dos dois ácidos graxos essenciais que os seres humanos e outros animais deve ingerir para uma boa saúde, pois o organismo necessita deles para vários processos biológicos, mas não consegue sintetizá-los a partir de outros componentes alimentares (GURR, 1992).

O ácido linoléico (LA) é um poli-insaturados de ácidos graxos utilizados na biossíntese de ácido araquidônico (AA) e, portanto, algumas prostaglandinas. Pode ser encontrado nos lipídios de membranas celulares. Ele é abundante em muitos óleos vegetais, compreendendo mais de metade (em peso) de sementes de papoula, cártamo, girassol e óleos de milho. (GURR, 1992).

O ácido linoleico é um ácido graxo essencial que deve ser consumido para a boa saúde. A falta de ácido linoleico e outros $n-6$ ácidos graxos na dieta faz com que o cabelo seco, queda de cabelo, e má cicatrização de feridas (BURR, 1930).

3.6.1 Metabolismo

O primeiro passo no metabolismo do ácido linoleico (LA) é realizado por Δ^6 dessaturase, que converte em LA ácido gama linolênico (GLA) (Figura 9.).

Linoleic Acid Metabolism

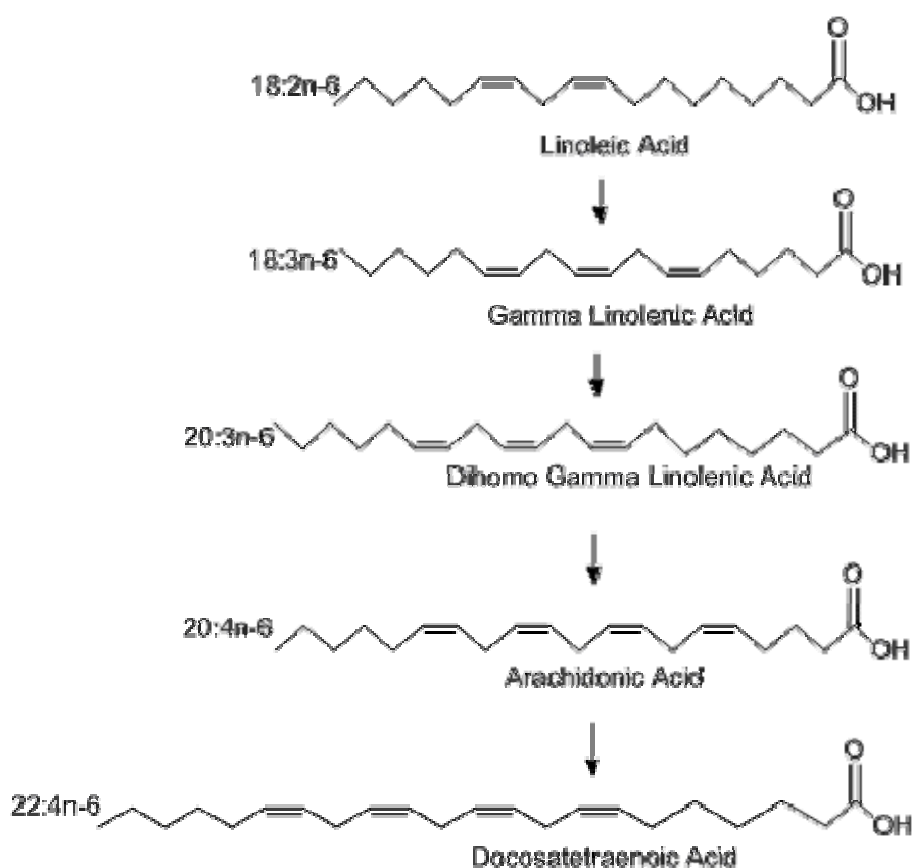


Figura 9. Metabolismo do ácido linoleico (LA)

Fonte: ROUX et al., 1994

Há evidências sugerindo que a criança falta Δ^6 dessaturase própria, e deve adquiri-lo através do leite materno. (ROUX et al., 1994).

GLA é convertido em ácido gama-linolênico dihomô (DGLA), que por sua vez é convertido em ácido araquidônico (AA). Um dos possíveis destinos da AA é para ser transformado em um grupo de metabólitos chamados eicosanóides, uma classe de hormônios parácrinos. Eicosanóides são apenas produzidos a partir de AA e tendem a ser pró-inflamatórias. Por exemplo, tanto Thromboxane e leucotrieno são vasoconstritores e eicosanóides.

Outro efeito clínico importante é que o metabolismo produtos oxidados do ácido linolênico, como o ácido 9-hidroxiocetadecanoico e também foram mostrados para ativar TRPV1, a capsaicina dos receptores e através desta pôde jogar um papel importante na hiperalgesia.

3.7 *Cunninghamella elegans*

A *Cunninghamella elegans* pertence à ordem Mucolares, classe Zigomycetes, filo fungi que possui representantes caracterizados por apresentarem propagação assexual através de esporângios: estrutura em forma de saco onde são produzidos os esporos, geralmente em grande quantidade. Organismos com poucos, menos ou com esporo único, podem também ser encontrados, no caso destes últimos, as estruturas passam a ser chamadas de esporangióolos, uma forma reduzida do esporângio (GUERRERO & SILVERA, 1996).

A reprodução sexual é por meio de zigósporos. São cosmopolitas sapróbios, alguns poucos são parasitas facultativos de animais e plantas (HAWKSWORTH et al., 1995). O fungo sapróbio *Cunninghamella elegans* é caracterizado por apresentar esporangióforos com ramificação verticilada ou pseudoverticilada (Figura 10).

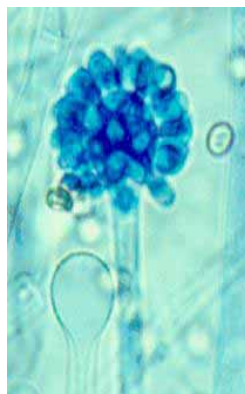


Figura 10. Características Microscópicas *Cunninghamella elegans*

Fonte: HAWKSWORTH et al., 1995

Segundo Ratledge (1982) os ramos e os esporangióforos terminam em vesículas globosas que podem ser lisas ou rugosas devido a presença, sobre toda sua superfície, de dentículos que sustentam esporos e os representantes deste gênero, juntamente com alguns outros fungos Mucorales, são fungos oleaginosos.

3.8 Substratos

3.8.1 Milhocina

A Milhocina é um produto gerado durante o processo de maceração por via úmida do milho. É considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos (SILVEIRA, 2001).

O microrganismo, quando crescido em meio contendo milhocina, produz ainda mais exopolímeros, o que facilita muito a adesão das células microbianas à semente de milho. De acordo com Silveira (2001), a água de maceração do milho pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados. A milhocina, entretanto, é de difícil conservação e seu uso, dependente do valor do produto a ser obtido (Tabela 4).

Tabela 4. Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina

Aminoácidos (%)		Vitaminas (mg/Kg)		Minerais (mg/ Kg)		(%)
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio		0,14
Argniina	3,68	Cholina	3.500,0	Cobre	15,0	-
Á aspártico	5,82	Inositol	6000,0	Ferro	100,0	-
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0	-
Ac gutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês	-	0,60
Triptófano		Riboflavina	6,0	Potássio	-	2,80
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio	-	0,10
Histidina	3,72	Ácido Pantotêmico	15	Fósforo	-	1,18
Isoleucina	3,07	-	-	Selênio	0,3	-
Leucina	8,28	-	-	Zinco	60,0	-
Lisina	4,75	-	-	Enxofre		0,60

Fonte: Silveira, 2001 (-) Não determinado

3.8.2 Glicerina

A glicerina, também designada de glicerol ou 1,2,3-propanotriol, é um álcool alifático trivalente de fórmula molecular $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. É um líquido viscoso, incolor, doce (aspecto xaroposo) e higroscópico ao ar. É miscível com a água e com álcool, mas insolúvel nalguns solventes orgânicos como hidrocarbonetos, éteres e acetato de etila (YONG et al., 2001).

Esta se encontra muito espalhada na Natureza sob a forma de ésteres dos ácidos graxos, denominados glicerídeos, que são os constituintes fundamentais das gorduras e dos óleos. A glicerina obtém-se como produto secundário na saponificação das gorduras, que quimicamente são ésteres dos ácidos carboxílicos superiores (fabrica de sabões, estearina, ácido oléico).

A glicerina aplica-se, sobretudo na obtenção de resinas alquídicas por reação com ácidos dibásicos, usadas em revestimentos. Aplica-se também em preparações farmacêuticas e cosméticas, no tratamento do tabaco antes de ser elaborado de modo a evitar a sua fragmentação, na indústria alimentar no fabrico de xaropes e gelados, como lubrificante, como solvente, como anticongelante, como plastificante nos artigos de borracha e para a obtenção da nitroglicerina e da dinamite. A esterificação da glicerina com ácido nítrico origina o trinitrato de glicerol, mais conhecido por trinitroglicerina, que é um poderoso explosivo usado no fabrico da dinamite (ITO et al., 2005).

As previsões para 2013, com a introdução do B5 (adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel), é que seja gerado um excedente de 150 mil ton/ano de glicerina. Entretanto, esse produto apresenta baixo valor comercial devido a impurezas, que se constituem principalmente de óleos graxos não esterificados, sabões dos ácidos graxos, pigmentos, traços de álcool, resíduos do catalisador. Estudos têm sido realizados para a purificação da glicerina proveniente da produção do biodiesel, obtendo-se glicerol com 98% de pureza e baixo teor de sódio 0,011% (ITO et al., 2005).

Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores (YONG et al., 2001). No entanto, os tratamentos

de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol a ser descartado no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais. A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005). O processo atual de produção de biodiesel envolve, de forma geral, as etapas apresentadas na Figura 8.



Figura 11. Etapas principais da produção de biodiesel

Fonte: ITO et al., 2005

Algumas aplicações biotecnológicas têm sido dadas à glicerina obtida como subproduto do biodiesel, como por exemplo, a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 (Imandi et al., 2007). Entretanto, outra possível alternativa é utilizar a glicerina como substrato para o crescimento de leveduras oleaginosas, que possuem pelo menos 20% do seu peso composto de lipídeos (Ashby et al., 2006).

Segundo Felizardo (2003), o glicerol (1,2,3-propanotriol) pode ser encontrado em todas as gorduras e óleos e é um intermediário importante no metabolismo dos seres vivos. O termo glicerol aplica-se geralmente ao composto puro, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95%, ou mais, de glicerol na sua composição. A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou

purificada. São comercializados dois tipos de glicerina natural. O primeiro apresenta 80% de glicerol, enquanto o segundo de 88 a 91% de glicerol. Quanto à glicerina purificada é classificada em glicerina técnica (99.5% de glicerol) ou glicerina farmacêutica (86% ou 99.5% de glicerol).

A glicerina é muito utilizada na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Dentre as características físico-químicas do glicerol destacam-se as propriedades de ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (Lopes et al.,1999).

Na Tabela 5 abaixo é apresentado a composição da glicerina bruta

Tabela 5. Composição química da glicerina bruta

Composição	(%)
Glicerol Total	86,95
Metanol	0,028
Ph	5,33
Umidade	9,22
Proteína Bruta	0,41
Gordura	0,12
Cinzas	3,19
Sódio	1,26
Cloro	1,86
Potássio	<0,005

Fonte: www.kicchemicals.com

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.U.; SINGH, S.K.; PANDEY, A.; KANJILAL, S.; PRASAD, R.B.N. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (2), 283-287, 2006.

AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. The Fungi An Advanced treatise, v. 1. **Academic Press**, New York, USA, 1973.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W & BLACKWELL M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons. 869 pp., 1996.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>. Acesso em: 02 de junho de 2009.

ARTS, M. T.; ACKMAN, R. G.; HOLUB, B. J. Essential fatty acids in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 58, n. 1, p. 122-137, 2001.

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. **Biomacromolecules**, 6, 2106, 2006.

BAIJAL, U.; MEHROTRA, B. S. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. **Sydowia**, 33, 1-13. 1980. y, v. 107, p. 99- 107, 1976.

BAKSHI, A.; MUKHERJEE, D.; BAKSHI, A.; BANERJI, A.K. DAS, U.N. Gama-linolenic acid therapy of human gliomas. **Nutrition**, v.19, n.4 , p.305-309, 2003.

BELLENGER-GERMAIN, S.B.; POISSON, J.P.; NARCE, M. Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats. **Lipids**, v.37, n.6, p.561-567, 2002.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos: lípidios. Cap. 2, 2ª. Ed., 175-269, 1992.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification.

Canadian Journal Biochemistry Physiology, Toronto, 37 (8), 911-917, 1959

BRENNER, R. R. Biosynthesis and interconversion of essential fatty acids. In: A. L. Willis. Handbook of eicosanoids: prostaglandins and related lipids, v. 1, **Chemical and biochemical aspects**, part A, Florida (USA): CRC Press,. p. 99-117, 1987.

BIJL, H.L.; WOLF, J.H.; SCHAAP, A.; VISSER, J.M.J. Microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurized biomass. US Patent no. 5340594. 2001. **Review Microbiological**, Philadelphia, 20, 285-328, 1994.

BOUWENS, M.; REST, O.; DELLSCHAFT, N.; BROMHAAR, M.G.; GROOT, L.; GELEIJNSE, J.M.; MULLER, M.; AFMAN, L.A. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 1-10, 2009.

BUARRAJ, M.C.; SDEPANIAN, V.L.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. Terapia nutricional na doença inflamatória intestinal. **The Eletronic J. of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, 8 (4), 2004. Disponível em: <http://www.egastroped.com.br/deco4/indexdec04.htm>. Acesso em: 08/01/2011.

BURR, G. O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produtec by the rigid exclusion of fat fromthe diet. **Journal of Biological Chemistry**, 82: 345-367, 1929.

BUTOLO, J.E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. 2001, Campinas-SP. Campinas-SP: CBNA, 2001, p.295-305.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.75,n.3, p.197-202, 2006.

CARLILE, M. & WATKINSON, S.C. The fungi: structures and identification. London. **Academic Press**, 1996.

CARVALHO, O. P. **Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de Mucor SP e estudo das condições de fermentação**. Dissertação de mestrado engenharia de alimentos, Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade estadual de Campinas. Campinas, 1994.

CELLIGOI, M. A. P. C. **Produção de triglicérides, fosfolipídios e esteróis por leveduras isoladas de diferentes nichos ecológicos**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1993.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cerals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Techonology Biotechnology**, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 2, 394-400, 2009.

COHEN, Z., SIANGDUNG, W., TANTICHAROENM. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **J. appl. Phyc.** 5: 109-115, 1993.

COLIN, A.; REGGERS, J.; CASTRONOVO, V.; ANSSEAU, M. Lipids, depression and suicide. **Encephale**, Paris, 29 (1), 49-58, 2003.

CONTI, E.; STREDANSKY, M.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals. **Bioresource Technology**, Essex, 76, 283-286, 2001.

CHAPKIN, R.S.; SEO, J.; McMURRAY, D.N.; LUPTON, J.R. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, p. 14-23, 2008.

CHAUDHURI, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of mustard meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella alengata* SC-208. **JAOCS**, Chicago, 75 (8), 1998.

CHÊNE, G.; DUBOURDEAU, M.; BALARD, P.; ESCOUBET-LOZACH, L.; ORFILA, C.; BERRY, A.; BERNAD, J.; ARIES, M.F.; CHARVERON, M.; PIPY, B. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPAR γ activation in human keratinocyte HaCaT cells. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1771, n. 5, p.576-589, 2007.

CHRISTIE, W.W. Analysis of complex lipid. **Lipid Analysis**, 2 ed., New York: Pergamon, p.107-134, 1982.

DATENBLATT, F. Ácido araquidônico, **Bei Acros**, abgerufen, 2007.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. Vol 1., 159p., 1980.

DYERBERG, J.; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acids composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 28, p. 958-966, 1975.

EMBLEY, T.M. & WAIT, R. Structural lipids of Eubacteria. In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. **Chichester: John Wiley and Sons Ltd.** p. 121-161, 1994.

ELLENBOGEN, B.B. & ARONSON, S.A. Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi: possible phylogenetic significance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 29: 805-811, 1969.

EMELYANOVA, E. γ -linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, 31 (5), 431-434, 1996.

FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Compositional shifts in lipids fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 40, 1321- 1327, 2007.

FELIZARDO, P.M.G. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEOS USADOS DE FRITURA. Relatório de estágio submetido ao Departamento de Engenharia Química para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Química do Instituto Superior Técnico. Outubro de 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, Maryland, 226, p. 497- 509, 1957.

FUNAHASHI, H. Opposing Effects of n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Pancreatic Cancer Growth. **Pancreas**. v. 36, p. 353-362, 2008.

FUKUSHIMA, M.; AKIBA, S.; NAKANO, M. Comparative hypocholesterolemic effects of six vegetables oils in cholesterol-fed rat. **Lipids**, v.31, n.4, p.415-419, 1996.

GAETE, M.G, ATALAH, E.S. Niveles de LC-PUFA n-3 en la leche materna después de incentivar el consumo de alimentos marinos. **Rev Chil Pediatr**. 2003; 74: 158-65.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Vitamins and growth factors. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. (Ed.). **Fungal Nutrition & Physiology**. New York: John Willey, p. 171-212, 1984.

GUERRERO, R.T. & SILVEIRA, R.M. B. **Glossorário ilustrado de Fungos**. p. 93 Porto Alegre: ed. Universidade/UFRGS, 1996.

GEMA, H.; KAVADIA A.; DIMOU, D.; TSAGOU, V.; AGGELI, M. E G. Produção de ácido gama-linolênico por *Cunninghamella echinulata* cultivadas em glicose e casca de laranja. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, 58: 303-307, 2002.

GOOL, C.J.A.W.; THIJS, C.; HENQUET, C.J.M.; HOUWELINGEN, A.C.; DAGNELIE, P.C.; SCHRANDER, J.; MENHEERE, P.P.C.A.; BRANDT, P.A. γ -Linolenic acid supplementation for prophylaxis of atopic dermatitis a randomized controlled trial in infants at high familial risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.4, p.943-951, 2003.

GONZÁLES, M.I. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. **Interciencia**, 27: 128-36, 2002.

GIRMAN, A.; LEE, R.; KLIGLER, B. An integrative medicine approach premenstrual syndrome. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.188, v.5 Suppl, p.S56-65, 2003.

GONZÁLEZ, F.H. SILVA, S.C. Bioquímica Clínica de Lipídios - As prostaglandinas. In: **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 76-77.

GRAHAM, T.O.; KANDIL, H.M. Nutritional factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinical Nutrition American**, 31, 203-218, 2002.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York, Willey-Liss, 1994.

GÓMEZ, A.M.; OSSA, E.M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, 88, 103-109, 2002.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and application. **Trends Biotechnology**, Cambridge, 15, 401-409, 1997.

GURR, M. I. **Role of fats in food and nutrition**. 2 ed. London: Elsevier Applied Science, 1992.

HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, New York, 33 (3), 577-584, 1977.

HANSSON, L. e DOSTALEK, M. Effect of culture conditiond on mycelial growth and production of gama-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. **Appleid Microbiology and Biotechnonology**. 28: 240-246, 1988.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, 90 (1), 420-426, 1978.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. **Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p. 3427S-3430S, 2004.

HASSAN, S.A. I. Standart methods to test the side effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Work Group "Pesticides and Benefital Organisms". **EPPO Bull.**, Oxford, v. 15, p. 214-255, 1985.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; STJTFON, U.C. & PEGLEK., D.N. Ainsworth & Bisbys Dictionary of the Fungi. 616 p., 8th Ed. Wallingford; **CAB international**, 1995.

HERBERT, R.A.; KEITH, S.M. Microbiological production of essential fatty acids. United States **Efamol** 4851343. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4851343.html> . Acesso em: 15/12/2010

HORROBIN, D.F.; HUANG, Y.S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease. **J. Cardiol.**, 17:241-255, 1987.

HORNYCH, A.; ORAVEC, S.; GIRAULT, F.; FORETTE, B.; HORROBIN, D.F. The effect of gamma-linolenic acid on plasma and membrane lipids and renal prostaglandin synthesis in older subjects. **Bratislavske Lekarske Listy**, v.103, n.3, p.101-7, 2002.

IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. The nomenclature of lipids. **Biochemical Journal**, 171(1): 21- 35, 1978.

ILUYEMI, F.B.; HANAFI, M.M.; RADZIAH, O.; KAMARUDIN, M.S. Fungal solid state culture of palm kernel cake. **Bioresource Technology**, Essex, 97 (3), 447-482, 2006.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. ; **J. Biosci. Bioeng.** 2005.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1367 – 1372, 2007.

IWASHITA, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bond β - glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokio, 1938-1946, 2002.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpine* by substrate fermentation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, 41, 41-48, 2000.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland. 6ªed., p. 635. Chapter 7: Fermentation and Fermented Dairy Food. pp, 113-130, 2000.

JEENNOR, S.; LAOTENG, K.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. **FEMS Microbiology**. Amsterdam, 259, 60-66, 2006.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. American Heart Association. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, n. 21, p. 2747-2757, 2002.

KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polysaturated acids. **Lipids**. p. 15-20, 1992.

KENNEDY, M.J.; READER, S.L.; DAVIES, R.J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology Bioengineering*, New York, 42, 625-634, 1993.

LAIDLAW, M.; HOLUB, B.J. Effects of supplementation with fish oil-derived n-3 fatty acids and γ -linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.1, p.37-42, 2003.

LETOURNEAU, D. R.; DEVEN, J.M.; MONOCHA, M.S. Structure and composition of the cell wall of *Choanephora cucurbitarium*. **Canada Journal of Microbiology**, v. 22, p. 486-494, 1976.

LÓPES, F.D; REVILLA, J.L.G; MUNILLA, M.H. *Glicerol*. In: Manual dos Derivados da Cana de Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, Resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, pp. 393-397, 1999.

MASSARO, M.; SCODITTI.; CARLUCCIO, M.A.; MONTINARI, M.R.; CATERINA, R. Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: nutrigenomic effects as an explanation for anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of fish and fish oils. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v.1,p.4-23, 2008.

MAYES, P.A. **Biossíntese de Ácidos Graxos**. Bioquímica. 7.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, cap. 23, p.209-216.

MEEHAN, E.; BEAUGÉ, F.; CHOQUART, D.; LEONARD, B.E. Influence of an n-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on the development of tolerance during chronic ethanol administration in rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.19, n.6, p.1441-6, 1995.

MIKAHAILIDIS, D.P.; KTRTLAND, S.; BARRADAS, M.A.; DANDONA, P. Dihomcigammalinolenic acid inhibits platelet aggregation and stimulates platelet prostaglandin E1 production in healthy subjects but not in insulin dependent diabetics. **Progress in Lipid Research**. 25 303-304, 1986.

MCCOY, M. Glycerin Surplus - Plants are closing, and new uses for the chemical are being found. **Chemical & Engineering News**. v. 84, n.6, p.7, fev, 2006. Disponível em <http://pubs.acs.org/cen/news/84/i06/8406notw3.html?print>. Acesso em 22 set 2006.

NASROLLAHZADEH, J. The influence of feeding linoleic, gamma-linolenic and docosahexaenoic acid rich oils on rat brain tumor fatty acids composition and fatty acid binding protein 7 mRNA expression. **Lipids in Health and Disease**, v.7, p. 34-45, 2008.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipids Research**, v.47, p. 127-146, 2008.

NELSON, J.G. Isolation and purification of lipids from biological matrices. IN: PERKINS, E.G. (Ed.) **Analyses of fats, oils and lipoproteins**. Champaign: American Oil Chemists' Society (AOCS), cap. 2, 20-59, 1991.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** - 5a. ed. São Paulo, Sarvier, 2011.

NUERNBERG, K.; FISCHER, K.; NUERNBERG, G.; KUECHENMEISTER, U.; KLOSOWSKA, D.; ELIMINOWSKA-WENDA, G.; FIEDLER, I.; ENDER, K. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, Barking, 70, 63-74, 2005.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica** O'BRIEN, D.J.; STINSON, E.E.; WESSINGER, E.W.; SOMKUTI, G.A. Production of eicoseapentaenoic acid from filamentous fungi utilizing lactose as a primary carbon source. US Patent no. 5246842. 1993. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/5246842.html>. Acesso em: 16/01/2011.

OYAMA, L.M.; ESTADELLA, D.; SILVA, M.S.; SILVA, M.H.G.G.; NASCIMENTO, C.M.O. Metabolismo lipídico. IN: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Editora Medsi, Rio de Janeiro, RJ, p. 81-88, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2009.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.45, n.5, p.575-579, 1996.

REN, J.; CHUNG, S.H. Anti-inflammatory effect of r-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-KB and mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 5073-5080, 2007.

RIBEIRO, L.G.T.; BURKETT, S.L. Efeitos cardiovasculares dos ácidos graxos omega 3: sua importância na prevenção da aterosclerose e da doença coronária. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, São Paulo, 52 (4), 217-225, 1989.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A.V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 5, p. 1374-1.380, 2007.

RIEDIGER, N.D.; OTHMAN, R.A.; SUH, M. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, p.668-679, 2009.

SALA-VILA, A; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, p.1432-1450, 2008.

SANT'ANA, L.S. Biochemical mechanisms involved in the Omega fatty acids digestion, absorption and metabolism. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, n. 4, p.211-216, 2004.

SANKARAN, D.; LU, J; OGBORN, M.R.; AUKEMA, H.M. COX-2 expression in cystic kidneys is dependent on dietary n-3 fatty acid composition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n.12, p. 806-812, 2007.

SAJBIDOR, J.; CERTIK, M. DOBRONOVA, S. Influence of diferente carbono sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. **Biotechnonology Letters**. 10(5): 347-350, 1988.

SERRANO, I.; ROSEIRO J. Ethanol-induced dimorphism and lipid composition changes in *Mucor fragilis* CCM1 142. **Lett Appl Microbiol.** v. 33,n.1, p.89-93, 2001.

SCHALIN-KARRILA, M.; MATULA, L.; JANSEN, C.T.; UOTILA, P. Evening primrose oil the treatment of atopic eczema : effect on clinical status, plasma phospholipids fatty acid and circulating Nod prostaglandins. **British Journal & of Dermatology**, 117: 11-19, 1987.

SIDDIQUI, R.A.; HARVEYA, K.; STILLWELL, W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.153, p. 47-56, 2008.

SILVA, M. **Caracterização de Mucorales (Zigomicetos) através da análise de ácidos graxos**. Dissertação de mestrado, engenharia de alimentos, Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade estadual de Campinas. Campinas, 1996.

SILVA, T.L.; PINHEIRO, H.M.; ROSEIRO, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 32 (7), 880-888, 2003.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 55: 442-445, 2001.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 560,n. 70 5, p. 60S-9S, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.60, n. 9, p. 502-507, 2006.

SOMASHEKAR, D.; VENMKATESHWARAN, G.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. **Process Biochemistry**, London, **38**, 1719-1724, 2002.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Stuttgart, 232 (5), 461-465, 1879.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; SALARIS, A. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 26, 304-307, 2000.

SUGANO, M.; ISHIDA, T.; YOSHIDA, K.; TANAKA, K.; NIWA, M.; ARIMA, M.; MORITA, A. Effects armload our containing linolenic acid on blood cholesterol and eicosanoid levies rats. **Agricultural and Biological Chemistry** , 50(10): 2483-2491, 1986.

SUMNER, J. L. & MORGAN, E.D. The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi order Mucorales. **Journal of General Microbiology**. 59: 215-221, 1969.

SHAW, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and lthe significance of lthe gama-linolenic acid component. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p.325-331, 1966.

SHIN, Y. C. & SHIN, H.K. Screening of gama linolenic acid-producing fungi. **Korean Journal Food Scienc and Technology**, p. 724-731, 1998.

SPECHER, H. Biochemistry of essential fatty acids. **Progress in Lipid Research**. v. 20, p. 217-225. 1981.

SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM, H. L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 33, n. 1, p. 76-77,2003.

TANAKA, Y.; GOTO, K.; MATSUMOTO, Y.; UEOKA, R. Remarkably high inhibitory effects of docosahexaenoic acid incorporated into hybrid liposomes on the growth of tumor cells along with apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p.264- 271, 2008.

TEIXEIRA, A.S. O QUE É PUFA OMEGA3? DISPONÍVEL NO SITE WWW.OVOSENRIQUECIDOS.COM.BR> CONSULTADO EM 22-05-2009.

TORLANOVA, B.O.; KONOVA, L.V.;FUNTIKOVA, N.S.; BABANOVA, N.K.; KATOMINA, A. A. & MYYAKINA, L.S. Influence of the conditions of culturing of Mucor fungi, treatmente of biomass and extraction ability on the production of lipidis containing gama linolecic acid. **Applied Biochemistry and Microbiology**, p. 28, 1992.

TROMBETTA, A.; MAGGIORA, M.; MARTINASSO, G.; COTOGNI, P.; CANUTO, R.A.; MUZIO, G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, p. 239-250, 2007.

URSIN, V.M.; VOELKER, T.; FROMAN, B. Fatty acid desaturases from fungi. United states Technology 20060156435. 2006. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/20060156435.html>. Acesso em: 16/11/2010.

VALENZUELA, A.B, NIETO, S.K. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Rev Chil Pediatr**. 74:149-57, 2003.

VALENZUELA, A. B. **Importância nutricional dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA Ômega-3): o benefício da suplementação com estes ácidos graxos.** Disponível em: <<http://www.scielo.cl/scielo.php> >. Acesso em: dezembro 2009.

VALSTA, L.M.; TAPANAINEN, H.; MÄNNISTÖ, S. Meat fats in nutrition. **Meat Science**, Barking, 70, 525-530, 2005.

VEGA, E.Z.; GLATZ, B.A.; HAMMOND, E.G. Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. **Applied Environmental Microbiology**, New York, 54 (3), 748-752, 1988.

WAHLE, K. W. T; JAMES, W. P.T. Isomeric fatty acids and human health. **European Journal Clinical Nutritional**, v. 47, n. 12, p. 828-839, 1993.

WARD, O. Microbial production of long-chain PUFAs. **Informatives**, Columbus, 6, 683- 688, 1995.

WEAVER, K.L. Effect of Dietary Fatty Acids on Inflammatory Gene Expression in Healthy Humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, n. 23, p. 400-407, 2009.

WELLBAUM, C. **Produção de ácidos graxos por linhagens de *mucor* spp. Isoladas de solo de área de Cerrado município de Corumbataí, Estado de São Paulo.** (Tese de doutorado), UNESP, 70p., 2006.

WEETE, S.; SHAW, R. The Polynsaturated fatty acids of microorganisms. **Advances in Lipid Reserarch**. 4:107-174, 1991.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, New York, 147, 2857-2864, 2001.

YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. **Oil Palm Res.**13, 2001.

YAQOOB, P.; PALA, HS; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipids and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal Clinical Investigations**, Oxford, 30, 260-274, 2000.

XIAN, M.; NIE, J.; MEN, Q.; LIU, J.; ZHOU, C.; KANG, Y.; ZHEN, K. production of γ -linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabelina*. **Letters Applied Microbiology**, London, 36, 182-185, 2003.

ZHU, M.; YU, L.J.; LI, W.; ZHOU, P.P.; LI, C.Y. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 38, 735-740, 2006.

CAPÍTULO II

Artigo I

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS-PUFAs
POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 EM SUBSTRATOS
ALTERNATIVOS DE BAIXO CUSTO**

* Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

Enzyme and Microbial Technology

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS-PUFAS POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS DE BAIXO CUSTO

Grayce Kelli Barbosa da Silva, Kaoru Okada, Galba Maria de Campos Takaki*

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil.

Os ácidos graxos (AG) são constituintes estruturais das membranas celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares. Vários estudos apontam que sua utilização traz benefícios para a saúde humana, prevenindo enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunológicas. Os fungos filamentosos da ordem Mucorales são conhecidos por possuírem elevadas concentrações de ácidos graxos da família ômega 6. Neste sentido, foi investigada a produção de ácidos graxos poliinsaturados-PUFAs por *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Ordem Mucorales), utilizando glicerina e milhocina como substratos alternativos, visando à minimização dos custos de produção. Os estudos foram realizados empregando-se dois planejamentos fatoriais 2², tendo como variável resposta crescimento radial e morfologia, produção de biomassa, lipídeos totais e ácidos graxos. A partir dos resultados obtidos observou-se que a glicerina e a milhocina não influenciaram na estrutura morfológica da *C. elegans*, no entanto, estatisticamente estas fontes influenciaram o crescimento radial. O pH influenciou na produção de biomassa e de lipídeos. O ensaio 4 (7,9ml/L de glicerina, e 0,2g asparagina) do planejamento 1 e o ensaio 4 (7,9ml/L de glicerina, 0,2g asparagina e 6% de milhocina) do planejamento 2 apresentaram maior produção de biomassa 1,7g/L e 2,5g/L e lipídeos totais 8,0% e 8,0%, respectivamente. A glicerina e a milhocina aumentaram a produção do ácido palmítico em 100 e 560 vezes a produção do ácido linoléico, e reduziram a concentração do ácido oléico e do ácido gama-linolênico. Portanto, os rejeitos agroindustriais, glicerina e milhocina mostraram que podem ser fontes alternativas de carbono e nitrogênio, a fim de propiciar a produção de insumos biotecnológicos de elevado valor agregados de baixo custo.

Palavras – chaves: lipídeos, milhocina, glicerina, micro-organismos

ABSTRACT

Fatty acids (FA) are structural constituents of cell membranes, play functions and energy metabolic reserves, besides forming hormones and bile salts. Several studies suggest that its use is beneficial to human health, preventing cardiovascular disease, colon cancer, immune disorders. Filamentous fungi of the order Mucorales are known to have high concentrations of fatty acids of omega 6. In this sense, we investigated the production of polyunsaturated fatty acids, PUFAs by *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Order Mucorales) using glycerin and corn steep liquor as alternative substrates, in order to minimize production costs. The studies were conducted using two 2² factorial design, with the response variable morphology and radial growth, biomass production, total lipids and fatty acids. The results obtained showed that the glycerin and corn steep liquor did not influence the morphological structure of *C. elegans*, however, statistically these sources influenced the radial growth. The pH influenced the production of biomass and lipids. Trial 4 (7.9 ml / L glycerol, and 0.2 g asparagine) planning and testing a four (7.9 ml / L glycerol, 0.2 g asparagine and 6% corn steep liquor) planning 2 produced more biomass 1.7 g / L and 2.5 g / L and total lipids 8.0% and 8.0% respectively. The glycerin and corn steep liquor increased the production of palmitic acid in 100 and 560 times the production of linoleic acid, and reduced the concentration of oleic acid and gamma-linolenic acid. Therefore, agro-industrial wastes, glycerin and corn steep liquor can be shown that alternative sources of carbon and nitrogen in order to facilitate the production of biotechnological inputs of high value-added low cost.

Key - words: lipids, corn steep liquor, glycerin, micro-organisms

INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são componentes essenciais para a dieta humana, os quais desempenham diferentes papéis no organismo humano como reserva de energia, de fosfolipídios e de esteróis. Estes contêm ácidos graxos essenciais que não são produzidos por mamíferos, mas precisam estar presentes na dieta, auxiliando no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K pelo intestino além de, conferir sabor aos alimentos (BELITZ e GROSH, 1992).

Os ácidos graxos (AG) são constituintes estruturais das membranas celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares. Dentro da diversidade dos AG, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses AG cuja biossíntese é inadequada são denominados ácidos graxos essenciais (AGE): ácido linolênico (w-3) e ácido linoléico (w-6). Para suprir a demanda orgânica, os mesmos devem estar em quantidades suficientes na alimentação (VALENZUELA, 2003).

Ácidos graxos essenciais das famílias Omega 3 e Omega 6 possuem de dezoito a vinte e quatro átomos de carbonos com insaturações promovidas por enzimas denominadas desaturases e elongases. Esses ácidos possuem várias funções importantes, dentre elas, a formação da prostaglandina E1 (KENNEDY, 1993).

A prescrição de AGI para pacientes que sofrem de doença de Crohn promove melhora clínica moderada (GRAHAM et al., 2002; BUARRAJ et al., 2004).

Estudos realizados por Colin et al., 2003 indicam que o decréscimo de ácidos graxos poliinsaturados no plasma aumentou as incidências de depressão e comportamento suicida em pacientes que apresentaram baixa concentração de colesterol no plasma, tendo outras perturbações bioquímicas como na ativação do sistema inflamatório, resultando em aumento de citocinas pro-inflamatórias e eicosanóides no sangue.

Ácidos graxos insaturados, como ácido gama-linolênico (AGL), ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (AEP) e ácido docosahexaenóico (ADH), são obtidos principalmente a partir de óleo de peixe de água fria

(YAQOOB et al., 2000), óleo de primula (*Oenothera biennis*, *O. lamarckiana*) (WARD, 1995), óleo de borragem (*Borago officinalis*) (GÓMEZ e OSSA, 2002), óleo da semente de groselha preta (*Ribes nigrum*) (GILL e VALIVETY, 1997) e óleo de linhaça e oliva (NUERNBERG et al., 2005).

A composição de ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais, causando moderadas modificações nos níveis de AGL, que geralmente é encontrado esterificado ao glicerol na forma de triacilglicerol (CARVALHO, 1994).

Com o avanço da biotecnologia industrial em todas as áreas do conhecimento, novas alternativas de produção de moléculas de interesse farmacêutico e nutricional enriquecendo alimentos tornando-os mais saudáveis foram desenvolvidas e organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram testados para produção de óleos microbianos estes estudos contribuíram para o entendimento dos mecanismos bioquímicos de produção e acumulação de lipídios em células microbianas denominadas “single cell oil” (HAAL e RATLEDGE, 1977; GILL et al., 1977; VEGA et al., 1988).

Dentre os microrganismos testados, algumas espécies de leveduras e de fungos filamentosos foram selecionadas e classificadas como espécies oleaginosas. Dentre as leveduras, *Apiotrichum curvatum*, *Candida sp.* (HAAL e RATLEDGE, 1977; VEGA et al., 1988) foram estudadas e otimizadas para a produção de óleos microbianos em biorreatores.

No entanto, os fungos filamentosos da ordem Mucorales são os mais intensamente estudados, para a produção de ácidos graxos poliinsaturados dos quais, *Mortierella alpina*, *M. elongata*, *M. isabelina* (CHAUDHURI et al., 1998; XIAN et al., 2003; ZHU et al., 2006), *Cunninghamella echinulata* (GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006), *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis* (WYNN et al., 2001; SILVA et al., 2003; AHMED et al., 2006; JEENNOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006), foram aplicadas em diferentes parâmetros de crescimento envolvendo meios de cultivo alternativos.

A comercialização de óleos microbianos ricos em AGI teve como pioneiros Japão e Inglaterra (CARVALHO, 1994).

Algumas patentes foram desenvolvidas utilizando fungos, como *Pythium ultimum*, *Rhizopus arrhizus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis*

cinera e *Mortierella alpina*, utilizando processos em sistema líquido onde estes microrganismos foram cultivados sob diferentes condições de estresse, nutrientes, pH, relação C:N, adição de íons de cobre, zinco e ferro e processos envolvendo produção de enzimas desaturases e sua caracterização (HERBERT e KEITH, 1989; O'BRIEN et al., 1993; BIJL et al., 2001; URSIN, et al., 2006).

Os resíduos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos, apresentam uma grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

A redução da poluição ambiental e o aquecimento do planeta têm estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos intensificando, portanto, a busca por combustíveis alternativos ao petróleo, como por exemplo, o biodiesel (RIVALDI et al., 2007).

O principal subproduto gerado na produção do biodiesel é o glicerol, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (RIVALDI et al., 2007). Em 2013, a adição de biodiesel ao combustível de petróleo deverá alcançar 5% do volume total de diesel utilizado (ANP, 2007) acelerando assim, a produção de biodiesel no Brasil com um excedente de 150 mil ton/ano de glicerina. A glicerina é uma matéria prima de alto valor agregado e possui inúmeras aplicações industriais, como aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica.

A utilização de resíduos industriais como a glicerina, em processos biotecnológicos, tem sido uma alternativa para evitar problemas ambientais derivados da acumulação de glicerina, bem como a rentabilidade da produção de biodiesel e, principalmente, a industrialização de cosméticos, fármacos e produtos alimentícios (MCCOY, 2006).

Por sua vez, a milhocina é um produto gerado durante o processo de maceração do milho por via úmida. É considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os microrganismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos (SILVEIRA, 2001).

Estudos relacionados à viabilidade econômica para a produção de AGI merecem mais atenção, pois o emprego de subprodutos industriais como substrato para o cultivo de fungos filamentosos pode diminuir os custos de produção e reduzir gastos de energia para a execução do processo (MCCOY, 2006).

Neste sentido, foi investigada a produção dos ácidos graxos poliinsaturados–PUFAs por *Cunninghamella elegans* UCP 542 (Ordem Mucorales), utilizando glicerina e milhocina como substratos alternativos, visando à minimização dos custos do meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICRORGANISMO E CONDIÇÃO DE MANUTENÇÃO

Os estudos foram realizados com a amostra de *Cunninghamella elegans* UCP 542, isolada de sedimento de manguezal do rio Formoso, PE, pertencente à Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, mantida em meio Batata-Dextrose-Ágar, à 5°C.

SUBSTRATOS

Os substratos utilizados foram à glicerina (subproduto da produção do biodiesel) fornecida pelo CETENE/PE e milhocina (resíduo da indústria de beneficiamento do milho) cedida pela indústria Corn.

ESPORULAÇÃO E CRESCIMENTO RADIAL

A linhagem de *C. elegans* UCP 542 foi crescida em placas de Petri de 9cm contendo o meio Yeast Malt Agar (extrato de malte 3g, extrato de levedura 3g, peptona 5g, glicose 10g e agar 20g/L de água destilada, pH5,8), incubadas a 28°C por 5 dias. Para esse estudo foram utilizados dois planejamentos fatoriais 2². Após esse período, discos de 6 mm de diâmetro foram removidos da cultura jovem e transferidos para os placas de Petri que Hesseltine e Anderson [glicose 40g, asparagina 2g, fosfato monopotássico 0,1g, sulfato de magnésio 0,25g e cloridrato de tiamina 0,5 mg e agar 20g/L de água destilada, pH6,0],

Hesseltine e Anderson modificado pela substituição de glicose por glicerina e Hesseltine (Planejamento 1) e Anderson modificado pela substituição de glicose por glicerina com acréscimo de 6% de milhocina (Planejamento 2). Foi realizada uma conversão entre a densidade da glicerina $1,26 \text{ g cm}^{-3}$ e massa da glicose 40g a fim de se obter o volume de glicerina em ml/L.

As placas foram incubadas a 28°C para acompanhamento diário do diâmetro e das características morfológicas e microscópicas da colônia por um período de 5 dias.

PRODUÇÃO DOS LIPÍDEOS

Frascos de Erlenmeyers de 250mL com capacidade 100mL dos meios de cultura, de acordo com dois planejamentos fatoriais 2^2 , foram inoculados com uma suspensão de 10^7 esporângios por mL coletados do meio YMA. Os frascos foram incubados a 28°C , a 150 rpm por 5 dias. Ao final da fermentação os frascos foram retirados, centrifugados a $5.000g$ por 20 min. Do sobrenadante foi determinado o pH. A biomassa obtida foi lavada com água deionizada gelada, congelada e liofilizada, sendo mantida em dessecador até peso constante para determinação da biomassa. O material celular foi submetido à extração de lipídeos e ácidos graxos.

DETERMINAÇÃO DO pH

O pH das amostras coletadas foram determinadas por potenciometria a partir do meio livre de células.

EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por Manocha et al., 1980. 1,0 g da biomassa liofilizada foram submetidas à extração sucessivas de lipídeos por três vezes, usando clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 15 minutos, posteriormente homogeneizado por 24 horas, após cada troca de solvente. Os extratos foram reunidos e evaporados até a secar no rotoevaporador. Em seguida 1 a 2mL

de hexano, foi utilizado para recuperar os lipídeos, que depois foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e mantidos no dessecador até peso constante. A quantidade de lipídeos presentes da biomassa foi determinada por método gravimétrico.

Cálculo: % de lipídeos totais = peso seco dos lipídeos em gramas(g)/peso da amostra (g) x 100.

CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Para realização da caracterização dos ácidos graxos os micélios foram colocados em tubos de ensaio com tampa, suspensos em 3 mL de uma solução (trifluoreto-metano-boron) a 14% e 3ml de benzeno, incubados a 60°C, “over-night”. Ácidos graxos foram convertidos a ésteres de metil de acordo com o método de Dunlan e Perry apud Durham e Kloos, (1978). Após a incubação, 4 mL de água destilada foram adicionados e extraídos os ácidos graxos, a mistura foi centrifugada a 5000g a 4°C. O benzeno foi separado por centrifugação, removido e evaporado com nitrogênio. O metil ésteres de ácidos graxos foram suspensos em hexano e analisados em cromatografia a gás (CG). As análises foram realizadas em um gás Cromatógrafo Trace GC Ultra, equipado com coluna capilar Carbowax HP-20M (25m x 0,32 mm x 0,3 µm). Temperatura inicial da coluna 40° C, mantido por 1 minuto. Aumentada para 150°C a 55°C por minuto. Em seguida aumentada para 220 a 1,7°C por minuto. A temperatura do detector é mantida em 220°C e a do injetor 200°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio mantido em fluxo constante a 1mL por minuto. O volume de amostra injetado foi de 1µL, em modo split de 1 para 20. O padrão utilizado para identificação é o F.A.M.E. Mix C4-C24 SUPELCO (código 18919). Quantidades relativas de metil ésteres foram calculados pela integração das áreas de picos.

PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE 2²

Foi utilizado um planejamento experimental, que compreende um fatorial 2², com os níveis + 1 e - 1 e 4 pontos centrais (nível zero). Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações glicerina, asparagina e milhocina foi utilizado o software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft®. Ver (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2²

Variável		Nível		
Independente		-1	0	+1
glicerina	(ml/L)	32,00	55,50	79,00
asparagina	(g/L)	2,00	3,00	4,00

Constante: sulfato de magnésio 0,25g/L e Tiamina 0,5mg/L ; pH6,0, 6% de milhocina, Temperatura 28°C.

Tabela 2. Matriz codificada de planejamento fatorial completo 2². Fatores: Glicerina, Asparagina tendo como variável resposta o crescimento radial, produção de lipídeos e produção de ácidos graxos polinsaturados- PUFAs.

Ensaio	Glicerina	Asparagina
1	-1	-1
2	- 1	+1
3	+1	+1
4	+1	- 1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

*Fixo: Agitação e Tempo

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CRESCIMENTO RADIAL DE *Cunninghamella elegans* UCP 542

O perfil de crescimento de *C. elegans* UCP 542 durante 96 horas realizados utilizando glicerina, asparagina e 6% de milho de milho de milho através dos planejamentos fatoriais completo 2^2 estão apresentadas nas tabelas 3 e 4. Observou-se que o crescimento é influenciado pela concentração de glicerina e asparagina, o menor crescimento em relação a condição sem modificação ao planejamento 1 foi no ensaio 3 (7,9ml/L de glicerina e 0,4g asparagina) média de diâmetro de 0,85cm ocorrendo assim uma repressão de seu crescimento, já nas condições 5, 6, 7 e 8 (5,5m/L de glicerina e 0,3g asparagina) e 1(3,2m/L e 0,2g asparagina) foram as que apresentaram crescimento significativamente das demais numa média de 2,7 cm de diâmetro e a condição sem a modificação apresentou uma média de 4,9cm.

Tabela 3. Crescimento Radial de *C. elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson e Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) - Planejamento 1

Condições	Diâmetro das colônias (cm) e Tempo (h)			
	24	48	72	96
1	0,3	3,0	3,6	4,2
2	0,3	3,0	3,6	3,8
3	0,2	0,4	1,2	1,6
4	0,6	2,2	3,0	3,6
5	0,4	2,2	4,2	5,4
6	0,6	2,4	4,4	5,2
7	0,2	1,4	5,0	5,3
8	0,2	0,8	4,6	5,2
Hesseltine e Anderson	1,8	5,4	6,0	6,6

O crescimento micelial do fungo, durante um período de tempo, pode ser traduzido por uma curva sigmoidal típica, com várias fases com propriedades fisiológicas típicas (MONTINI et al., 2006). A medida deste crescimento pode

ser feita de diferentes formas, tais como crescimento radial, vigor, velocidade de crescimento e massa do micélio. Em condições experimentais, o uso de meio de cultura sólido para avaliação do crescimento de fungos é considerado adequado pois, na natureza, os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos, tais como resíduos vegetais e animais, ou no solo (BONONI et al., 1999).

No planejamento 2 observou-se menor crescimento da colônia no ensaio 3 (7,9ml/L de glicerina e 0,4g asparagina) apresentando média de 0,39cm diâmetro, nas condições 5, 6, 7 e 8 (5,5m/L de glicerina e 0,3 asparagina + 6% de milhocina) foram as que apresentaram maior crescimento das demais numa média de 4,2 cm de diâmetro e apresentando valores muito próximos a condição sem modificação (Tabela 4).

Tabela 4. Crescimento Radial *C. elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson e Hesseltine e Anderson modificado (glicerina com acréscimo 6% de milhocina) - Planejamento 2

Condições	Diâmetro das colônias (cm) e Tempo (h)			
	24	48	72	96
1	1,2	5,0	6,0	6,4
2	0,4	3,4	4,2	5,2
3	0	0	0,4	1,0
4	1,4	4,0	4,6	5,2
5	1,0	4,2	5,8	6,0
6	0,8	4,4	5,6	6,2
7	1,0	3,4	6,0	6,4
8	1,0	3,4	5,4	5,8
Hesseltine e Anderson	1,8	5,4	6,0	6,6

Almeida (2007) constatou que o crescimento micelial de *M. circinelloides* ocupou toda a superfície do substrato (rico em farelo de trigo) em 48 horas de cultivo. Savoie et al., (1995) recomendam o uso de um meio de cultura de composição semelhante a do substrato de cultivo. Este meio de cultura tem

sido o de extrato de composto (MINHONI et al., 2005). A influência das características físicas e químicas dos substratos, no crescimento micelial de linhagens fúngicas, tem sido enfatizada em estudos recentes (SALES-CAMPOS et al., 2008; DONINI et al., 2006; ÖZÇELİK; PEKSEN, 2007), assim como as diferenças de crescimento micelial entre linhagens fúngicas cultivadas em um mesmo tipo de substrato e nas mesmas condições de cultivo (ANDRADE et al., 2007; SILVA et al., 2005).

Os resultados expressos no Diagrama de Pareto contendo os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p , com as seguintes variáveis independentes: glicerina, asparagina assim como suas associações, influenciou no crescimento radial, embora que apresentado em efeito negativo, sendo que a glicerina foi à variável independente mais relevante para o crescimento radial com o meio modificado (glicerina) – planejamento 1, enquanto, para o meio modificado (glicerina + 6% de milhocina) – planejamento 2 foram à glicerina e asparagina as variáveis independentes mais relevantes para crescimento, por ambas estarem acima dos valores de p (Figura 1 e 2).

Figura 1. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para o crescimento radial de *C.elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) após cinco dias de crescimento – Planejamento 1

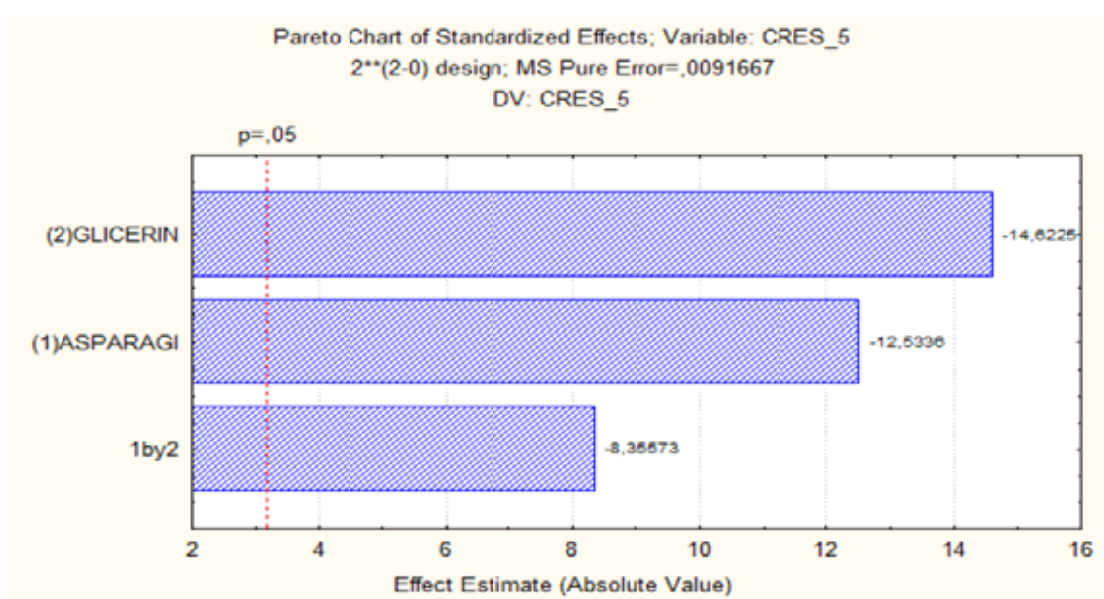
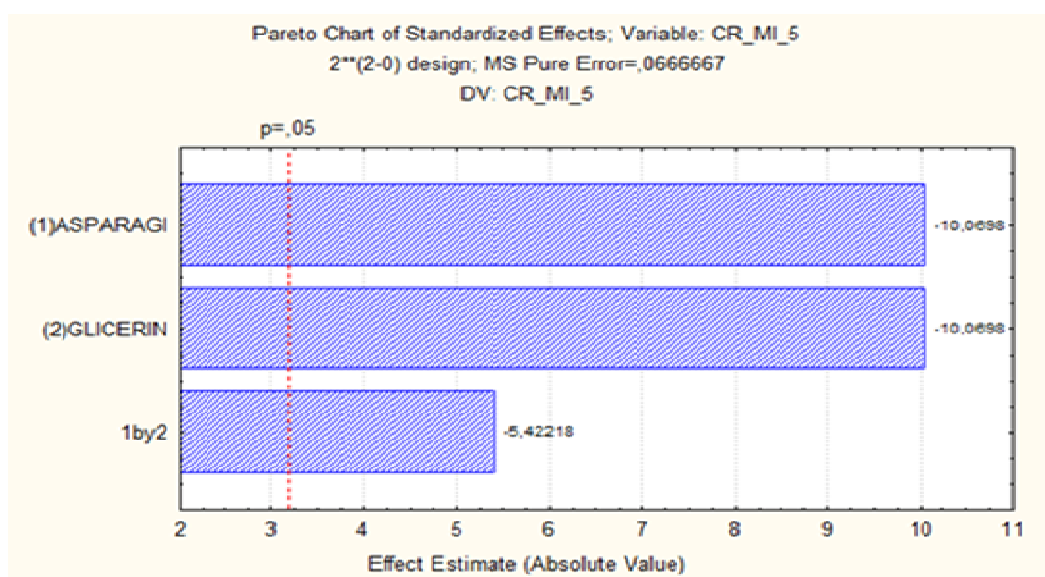


Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para o crescimento radial de *C.elegans* UCP 542 em Hesseltine e Anderson modificado (glicerina com acréscimo de 6% de milhocina) após cinco dias de crescimento – Planejamento 2



A glicerina e a milhocina não influenciaram na estrutura morfológica e microscópica da *C.elegans* (Figura 3.).

Fungos da ordem Mucorales apresentam os ramos e os esporangióforos terminando em vesículas globosas que podem ser lisas ou rugosas devido a presença, sobre toda sua superfície de dentículos que sustentam esporos (SUMMER e MORGAN, 1969).

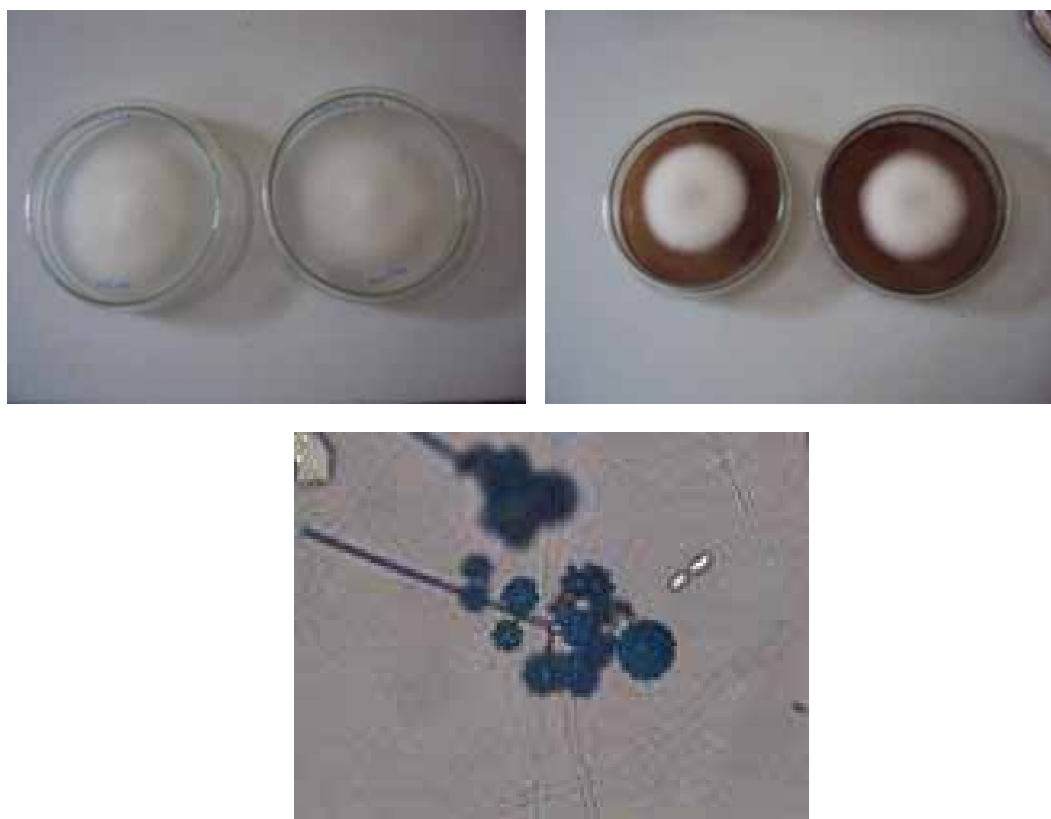


Figura 3. Características Morfológicas e Microscópicas de *C.elegans* UCP 542

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LÍPIDEOS TOTAIS

A produção de biomassa e lipídeos totais por *C.elegans* UCP 542 realizadas utilizando glicerina, asparagina e 6% de milhocina através de um planejamento fatorial completo 2^2 estão apresentadas na tabela 5. Para os ensaios com Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) – planejamento 1 o ensaio 4 (7,9ml/L de glicerina e 0,2g asparagina) foi que apresentou a maior produção de biomassa (1,7g/L), e o ensaio 2 (3,2ml/L de glicerina e 0,4g asparagina) foi o que apresentou menor produção (0,70g/L). Para as condições Hesseltine e Anderson modificado (glicerina + 6% de milhocina) - planejamento 2, os ensaios 4 (7,9 ml/L e 0,2 asparagina), 6 e 7 (5,5ml/L de glicerina e 0,3g de asparagina) foram que apresentaram maior produção de biomassa (2,5g/L) e (2,0g/L) respectivamente e o ensaio 1 (3,2ml/L e 0,2g asparagina) foi que apresentou menor produção (1,0g/L). Esses valores de biomassa máximos

para ambas as substituições foram o dobro dos valores encontrados para Hesseltine e Anderson que foi de 0,5g/L.

Tabela 5. Crescimento de *C. elegans* UCP 542 (biomassa g/L), produção de lipídeos (%) e pH no Hesseltine e Anderson e Hesseltine e Anderson modificado (glicerina e glicerina com acréscimo de 6% milhocina), após 96hs de fermentação – planejamento 1 e 2.

Ensaio	Hesseltine modificado (Glicerina)			Hesseltine modificado (Glicerina + Milhocina)		
	pH	Biomassa (g/L)	Lipídeos totais (%)	pH	Biomassa (g/L)	Lipídeos totais (%)
1	6,7	1,2	4,0	7,7	1,0	6,0
2	6,9	0,7	1,0	7,3	1,6	1,0
3	6,6	1,2	1,0	6,2	1,0	5,0
4	6,0	1,7	8,0	5,6	2,5	8,0
5	6,0	1,3	4,0	7,0	1,7	5,0
6	6,0	1,3	1,0	7,1	2,0	3,0
7	6,0	1,0	1,0	7,2	2,0	3,0
8	6,0	1,1	2,0	7,4	1,7	3,0
Hesseltine e Anderson	4,5	0,5	5,0	4,5	0,5	5,0

O pH inicial do experimento foi numa faixa de 6,0-6,5, no ensaio 4 do Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) – planejamento 1 continuou no final do experimento com o pH de 6,0. Para os ensaios Hesseltine e Anderson modificado (glicerina + milhocina 6%) – planejamento 2 o pH variou de 5,6 a 7,4, tornando-o o meio neutro. No entanto para Hesseltine e Anderson sem modificação o pH teve um decréscimo de 6,0 para 4,5 tornando o meio ácido, influenciando na produção de biomassa e lipídeos.

O valor do pH inicial do meio de cultura tem sido usado numa faixa de 6,0-7,0 para produção de lipídeos por diferentes espécies de Mucorales (SAJBIUOR et al., 1988).

Os resultados obtidos para os lipídios totais variaram de 1,0% a 8,0%. Os maiores valores de lipídeos foram as com os ensaios quatro (8,0%) tanto no meio Hesseltine e Anderson modificado (glicerina) - planejamento 1 e quanto no modificado (glicerina com acréscimo 6% de milhocina) – planejamento 2 um valor significativamente maior de lipídeos totais com que foi obtido com Hesseltine e Anderson apresentando quase o dobro de teor de lipídeos totais.

Os fungos filamentosos, contudo, apresentam produções de lipídios desejáveis devido ao fato de apresentarem altos teores de lipídios contendo composição não usual de ácidos graxos tanto de cadeias curtas, quanto de cadeias longas (HANSSON e DOSTÁLEK, 1988).

A ordem Mucorales, classe Zigomicetos, Reino Fungi, possui representantes caracterizados por apresentarem propagação assexual através de esporângios: estrutura em forma de saco onde são produzidos os esporos, geralmente em grande quantidade. Organismos com poucos, ou mesmo com esporo único, podem também ser encontrados, sendo que no caso destes últimos, as estruturas passam a ser chamada de esporangiólos, uma forma reduzida do esporângio (GUERRERO e SILVEIRA, 1996).

Os principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos são das espécies de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cunninghamella* (CARVALHO, 1994). Os fungos filamentosos, contudo, apresentam produções de lipídios desejáveis devido ao fato de apresentarem altos teores de lipídios contendo composição não usual de ácidos graxos tanto de cadeias curtas, quanto de cadeias longas (HANSSON, DOSTÁLEK, 1988).

A ordem Mucorales, classe Zigomicetos, Reino Fungi, possui representantes caracterizados por apresentarem propagação assexual através de esporângios: estrutura em forma de saco onde são produzidos os esporos, geralmente em grande quantidade. Organismos com poucos, ou mesmo com

esporo único, podem também ser encontrados, sendo que no caso destes últimos, as estruturas passam a ser chamada de esporangiólos, uma forma reduzida do esporângio (GUERRERO e SILVEIRA, 1996). A reprodução sexual é por meio de zigósporos. São cosmopolitas sapróbios, alguns poucos são parasitas facultativos de animais e plantas (HAWKSWORTH et al., 1995 apud SILVA 1996).

Os principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos são da espécie de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cunninghamella* (CARVALHO, 1994).

Guerrero e Silveira 1996 relataram que o conteúdo de lipídeos totais de *Mucor sp.* (KCTC 8405P) aumentou significativamente com o aumento do pH inicial do meio de cultura. Em condições mais alcalinas (pH 8 e 9) o crescimento do fungo seria acompanhado pela formação de extensa área miceliar.

Baseando-se nos resultados reportados por Sumner e Morgan (1969) que o conteúdo de lipídios é maior no micélio vegetativo do que sobre na forma de esporos, os autores concluíram que o alto conteúdo de lipídeos obtido era condições mais alcalinas seria devido ao grau de quantidade de micélio formado por unidade de biomassa seca.

A porcentagem de lipídios totais na biomassa seca obtida com *M. ramosissimus* após 3 dias de incubação (8,1% p/p) foi menor do que as obtidas por Torlanova et al., (1992) com *Mucor* após 3 dias (19,3% p/p) e por Carvalho (1994) com *Mucor sp.* (LB-54) após 5 dias de incubação (20,7%).

As condições 4 do planejamento 1 e 2 que apresentaram os maiores teores de lipídeos totais e a condição Hesseltine e Anderson sem modificação foram submetidos à extração de ácidos graxos para verificação de seus respectivos perfis.

COMPOSIÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DE *C. elegans* UCP 542 OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

A figura 4 ilustra o perfil da composição de ácidos graxos de *C. elegans* UCP 542 quando submetida às condições de cultivo e incubação nos meio

Hesseltine e Anderson (A), Hesseltine e Anderson modificado glicerina (B) – planejamento 1 e glicerina com acréscimo 6% de milhocina (C) – planejamento 2.

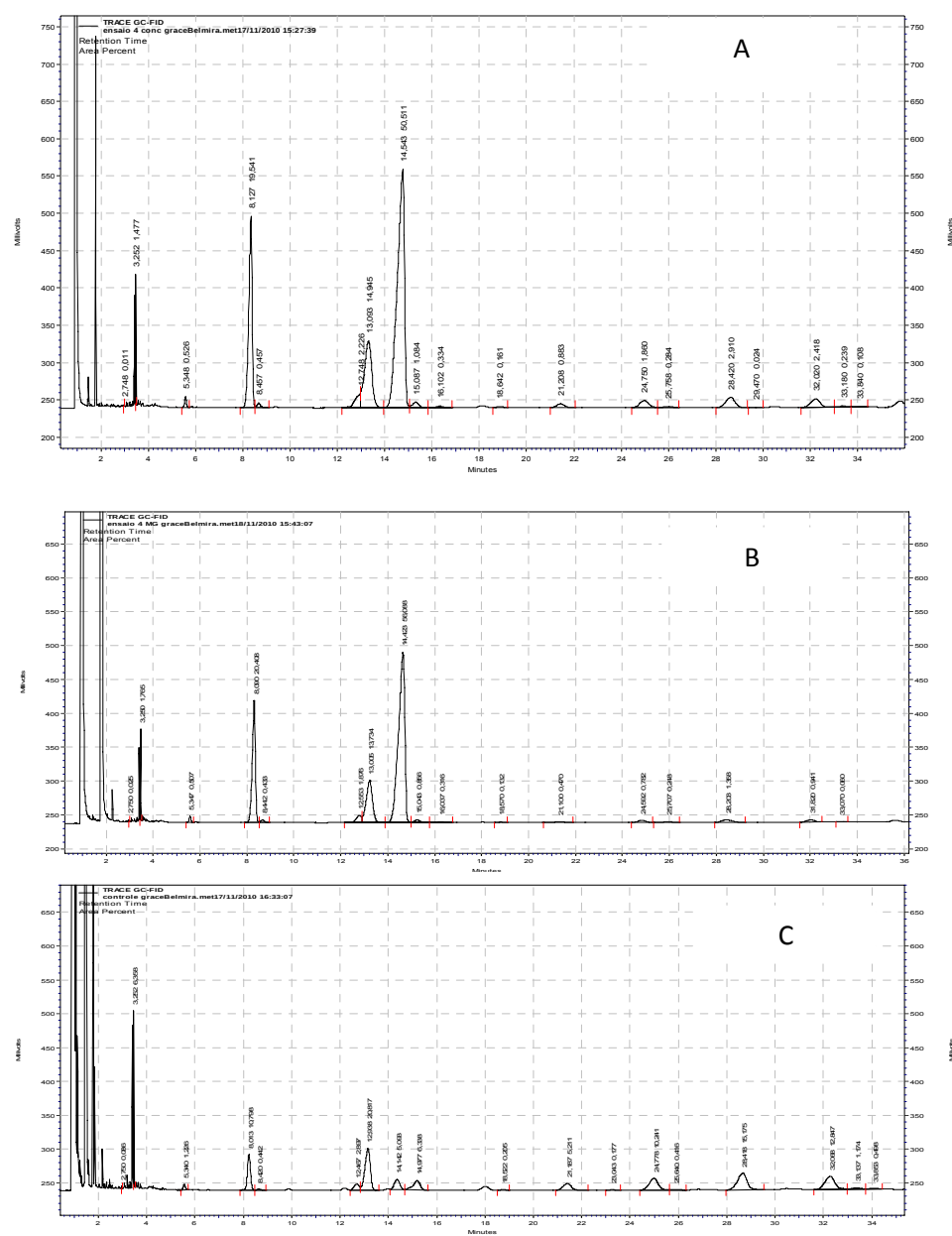


Figura 4. Perfil de ácidos graxos de *C. elegans* UCP 542 cultivada em Hesseltine e Anderson (A), Hesseltine e Anderson modificados por glicerina (B) e glicerina com acréscimo 6% de milhocina (C), obtidos por cromatografia gasosa.

Tabela 6. Composições de ácidos graxos de *C. elegans* UCP 542 cultivada em Hesseltine e Anderson, Hesseltine e Anderson modificados glicerina – planejamento 1 e glicerina com acréscimo de milhocina 6% - planejamento 2, obtidos por cromatografia gasosa.

Ácidos graxos	Meios de Cultivo		
	Hesseltine e Anderson	Hesseltine modificado (Glicerina)	Hesseltine modificado (Glicerina + Milhocina 6%)
Palmítico	10,7%	19,54%	20,40%
Oléico	20,8%	14,94%	13,73%
Linoléico	5,09%	50,52%	56,08%
Gama-linolênico	6,33%	1,08%	0,85%
Araquidônico	0,17%	-	-

Atraves dos resultados da Tabela 6 pode-se verificar que a glicerina e a milhocina aumenta 100 vezes a produção do ácido palmitico, pois o mesmo apresentou valores de 10,79% no meio Hesseltine e Anderson, 19,54% no meio Hesseltine modificado (Glicerina) – planejamento 1 e 20,40% no meio Hesseltine modificado (Glicerina + Milhocina 6%) – planejamento 2.

E que usando a milhocina 6% com a glicerina – planejamento 2 diminui a concentração do ácido oléico de 20,81% para o controle a 13,73%.

Pode-se verificar que a glicerina e a milhocina aumenta significativamente para 560 vezes a produção do ácido linoléico de 5,09%, para 50,52%, 56,08% no meio Hesseltine modificado (glicerina) – planejamento 1, Hesseltine modificado (glicerina + milhocina 6%) – planejamento 2, respectivamente.

Já para o para Gama-linolênico a milhocina 6% com a glicerina - planejamento 2 diminui a concentração de 6,33% para o meio Hesseltine e Anderson para 0,85% .

O ácido Araquidônico deixa de aparecer quando se usa que a glicerina e a milhocina- planejamento 2, observando que o mesmo já se apresenta em pouca quantidade no meio Hesseltine e Anderson apresentando porcentagem de 0,17%.

As fontes de nitrogênio (asparagina) e as de carbono (glicerina e milhocina 6%) resultaram em maior produção de ácidos graxos poliinsaturados (palmítico e linoleico).

Ellenbogen e Aronson, 1969 analisaram a composição de ácidos graxos dos fungos marinhos, *Trausiochyrium roseum*, *Tniochyium aureirni*, *Sehlzochyrium aggregaium* e *Dermocyslldium sp.* de água fresca. Estes microrganismos apresentaram uma característica diferente dos demais fungos analisados. Mostraram-se capazes de sintetizar ácidos graxos das rotas ômega 3 e ômega 6. A porcentagem de ácido gama linolênico foi de aproximadamenete 1,4% em relação aos ácidos graxos totais encontrados em *Fyctochyirium punclalum*.

Shaw, 1966 apud Carvalho 1994 investigou a presença do ácido gama linolênico nos fungos Phycomycete *Cunninghamella blaketeana* e *Rhizopus arizopus*. A composição qualitativa de ácidos graxos dos fungos foi muito similar, diferindo na porcentagem de ácido gama linolênico. *Cunnighamella blakesleana* apresentou 13,9% de ácido gama linolênico em relação aos ácidos graxos totais; o dobro da porcentagem presente em *Rhizopus*, quando incubados à temperatura de 30°C por 7dias. A temperatura de incubação causou significativas mudanças nestas porcentagens, resultando numa diminuição para 8,5% de ácido gama linolênico. O tempo de incubação causou pequenas flutuações a composição de ácidos graxos, caracterizado por um pequeno aumento do ácido linoleico e diminuição do ácido oleíco.

Shin e Shin, em 1988 estudaram a produção de ácido gama linolênico em 15 linhagens de fungos Mucorales com o objetivo de isolar aquele que melhor apresentasse crescimento celular e conteúdo lipídico. O fungo F13-354, isolado do solo da Coréia e identificado como *Mucor sp.* produziu 29,9% de lipídeos totais por peso seco de biomassa e um conteúdo de 16,8% de ácido gama-linolênico em relação aos ácidos graxos totais da composição.

Kendrick e Ratledge, 1992 apud Carvalho, 1994 estudaram o fungo oleaginoso *Eniomophora* objetivando aumentar a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua constituição as porcentagens de ácidos graxos poliinsaturados da rota ômega 6 como ácido araquidônico e ácido gama linolênico se mostraram superiores aos valores encontrados de ácidos graxos da rota ômega 3. A porcentagem relativa de ácido gama-linolênico foi de 1,5% em relação aos ácidos graxos totais da constituição dos lipídeos neutros e 4,8% dos ácidos graxos totais presentes nos lipídeos polares quando incubado à temperatura de 24°C, O aumento da insaturação dos lipídeos à temperatura de 24°C quando comparado à 30°C ocorreu principalmente devido ao aumento do nível de ácido araquidônico, ácido gama-linolênico e ácido linoleico.

Letourneau et al., 1976 apud Carvalho, 1994 analisaram qualitativamente e quantitativamente a composição de ácidos graxos da parede celular de *Chocomephora circonbitarum* utilizando métodos microquímicos, espectrofotometria infra-vermelho e difração em raio X. As análises químicas da parede celular revelaram a presença de quitina (17%), quitosana (polímeros de glicosamina, 28,4%), açúcares neutros (7,2%), proteínas (8,2%) e lipídeos (13,8%). A extração dos lipídeos da parede celular do fungo liofilizado com os solventes clorofórmio-metanol resultou 12,8% de lipídeos totais, no qual contém 6,6% de ácido gama linolênico em relação aos ácidos graxos totais da constituição.

Chaudhuri et al., (1998) estudaram *M. elongata* SC208 utilizando os meios de cultivos tomate dextrose, glicose e mostarda em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Concluíram que nas melhores condições de cultivo, utilizando mostarda, produziu-se 23,2 g.L⁻¹ de biomassa seca, 63,7 mg.g⁻¹ de LT e 33,2% de AA.

Higashiyama et al., (1997) estudaram a produção de AA, cultivando *M. alpina* em fermentador industrial. Nesse estudo obtiveram 50,6 g.L⁻¹ de biomassa produzida, 24,2 g.L⁻¹ de LT e 10,9 g.L⁻¹ de AA, com aumento de 45,0% do conteúdo de ácidos graxos totais com oito dias de cultivo.

Carvalho et al., (1994) estudaram a linhagem *Mucor* sp. LB-54 adicionando glicose ao meio de cultivo e na temperatura de 28° C por 144 horas e 12°C durante 72 horas. Observaram que a produção de biomassa foi de 6,3 g.L⁻¹, a produção de lipídios foi de 1,6 g.L⁻¹ (25,1%) e produção de AGL foi de 74,1 mg.L⁻¹ (19,40%), mostrando o efeito da diminuição da temperatura durante o período de cultivo.

Gema et al., 2002 descreve fontes de GLA provenientes de fungos oleaginosos são *Mucor javanicus*, *Cunninghamella*, *Absidia* e uma nova cepa isolada de *Cunninghamella echinulata* cultivadas em glicose produzindo quantidades cerca de 50mg de lipídeos da biomassa em meios com alta relação de carbono e nitrogênio.

Em Almeida, 2007 foi confirmado que as cepas de ordem mucorales não foram eficientes na produção de ácido araquidônico (AA), mas eles produziram quantidades relativamente grandes de γ do ácido linolênico (GLA). Nos resultados encontrados, apesar da produção AA menor em relação ao ABL, a concentração de AA depende da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, soja, gergelim, óleos de palma e extrato de malte. Na literatura ele foi citado que, em *circinelloides M* culturas, outros autores não observaram a produção de GLA.

Recentemente, Papanikolaou et al., 2009 descrevem uma possibilidade de valorização da glicerina, co-produto do biodiesel na produção de lipídeos por fungo da Ordem Mucorales, *Mortierella isabellina* (ATHUM 2935), utilizando um meio com limitação de nitrogênio, porém quando foi utilizado 100g/L da glicerina foi observado uma acumulação cerca de 51% peso seco de lipídeos.

Estudo comparativo com culturas agitada e estática mostrou que a aeração em cultura agitada promoveu maior produção de biomassa e acúmulo de lipídios totais (LT) (10,6 g.L⁻¹ e 40,4%, respectivamente) comparado com a cultura estática as diferenças encontradas nas formas de cultivo refletiram na composição de AGI e possibilitaram a aplicação de linhagens selecionadas na obtenção de ácidos graxos de maior interesse na indústria, como substituintes das gorduras animal e vegetal (AGGELIS et al., 1997).

Nemec et al., (1997) observaram que a produção de biomassa, lipídios e ácidos graxos não são proporcionais às taxas de produção de biomassa e LT, sendo observado que o maior valor de ácido linolênico (17,5%) foi encontrado no maior valor de LT; enquanto que o maior valor de AL (58,4%) foi encontrado no menor valor de LT, com valores semelhantes de biomassa produzida.

A porcentagem relativa de AGL de várias espécies de zigomicetos foi analisada e em algumas espécies a composição variou de 34,8 a 61,9% do total dos ácidos graxos, dentre as que mais se destacaram encontram-se *Circinella simplex* (CBS 142.35), *Mucor indicus* (ATCC 4855), *Syzygites megalocarpus* (ATCC 18025) e *Zygorhynchus moelleri* (UAMH 1556) contendo 42,0; 34,8; 61,9 e 42,0%, respectivamente (WEETE et al., 1998).

CONCLUSÕES

- A glicerina e milhocina influenciam significativamente no crescimento radial de *C.elegans* UCP 542 embora apresentem efeito negativo como comprovado estatisticamente;
- A glicerina e a milhocina não influenciam na morfologia da *C.elegans* UCP 542;
- O pH influencia na produção de biomassa e de lipídeos;
- A glicerina e a milhocina aumentam a produção do ácido palmitico;
- A milhocina com a glicerina diminui a concentração do ácido oléico.
- A glicerina e a milhocina aumentam a produção do ácido linoléico;
- A concentração do ácido gama-linolênico é reduzida quando se usa a milhocina com a glicerina;
- O ácido araquidônico deixa de aparecer quando se usa que a glicerina e a milhocina;
- Desta forma, os rejeitos agroindustriais (glicerina e milhocina) podem ser uma fonte alternativa de carbono, a fim de propiciar a produção de insumos biotecnológicos de elevado valor agregados de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE) e Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Estamos gratos ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) laboratórios, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELIS, G.; PAPADIOTIS, G.; KOMAITIS, M. Microbial fatty acid specificity. **Folia Microbiologica**, Praha, 42 (2), 117-120, 1997.
- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. The Fungi An Advanced treatise, v. 1. **Academic Press**, New York, USA, 1973.
- ANDRADE, M. C. N.; SILVA, J. H.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2008.
- AHMED, S.U.; SINGH, S.K.; PANDEY, A.; KANJILAL, S.; PRASAD, R.B.N. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (2), 283-287, 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W & BLACKWELL M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons. 869 pp., 1996.
- ALMEIDA, A.F. Cultivo de *Mucor circinelloides* em substratos líquidos e Sólido para Produção de ácidos graxos insaturados. Instituto de Biociências, UNESP. 107p, 2007.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>. Acesso em: 02 de junho de 2009.
- BAIJAL, U.; MEHROTRA, B. S. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. **Sydowia**, 33, 1-13. 1980. y, v. 107, p. 99- 107, 1976.
- BAKSHI, A.; MUKHERJEE, D.; BAKSHI, A.; BANERJI, A.K. DAS, U.N. Gama-linolenic acid therapy of human gliomas. **Nutrition**, v.19, n.4 , p.305-309, 2003.

BELLENGER-GERMAIN, S.B.; POISSON, J.P.; NARCE, M. Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats. **Lipids**, v.37, n.6, p.561-567, 2002.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos: lípidios. Cap. 2, 2ª. Ed., 175-269, 1992.

BRENNER, R. R. Biosynthesis and interconversion of essential fatty acids. In: A. L. Willis. Handbook of eicosanoids: prostaglandins and related lipids, v. 1, **Chemical and biochemical aspects**, part A, Florida (USA): CRC Press,. p. 99-117, 1987.

BURR, G. O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **Journal of Biological Chemistry**, 82: 345-367, 1929.

BUARRAJ, M.C.; SDEPANIAN, V.L.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. Terapia nutricional na doença inflamatória intestinal. **The Electronic J. of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, 8 (4), 2004. Disponível em: <http://www.egastroped.com.br/deco4/indexdec04.htm>. Acesso em: 08/01/2011.

BIJL, H.L.; WOLF, J.H.; SCHAAP, A.; VISSER, J.M.J. Microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurized biomass. US Patent no. 5340594. 2001. **Review Microbiological**, Philadelphia, 20, 285-328, 1994.

CARLILE, M. & WATKINSON, S.C. The fungi: structures and identification. London. **Academic Press**, 1996.

CARVALHO, O. P. **Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de Mucor SP e estudo das condições de fermentação**. Dissertação de mestrado engenharia de alimentos, Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade estadual de Campinas. Campinas, 1994.

CELLIGOI, M. A. P. C. **Produção de triglicérides, fosfolípidios e esteróis por leveduras isoladas de diferentes nichos ecológicos**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1993.

COHEN, Z., SIANGDUNG, W., TANTICHARONM. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **J. appl. Phyc.** 5: 109-115, 1993.

COLIN, A.; REGGERS, J.; CASTRONOVO, V.; ANSSEAU, M. Lipids, depression and suicide. **Encephale**, Paris, 29 (1), 49-58, 2003.

CHAUDHURI, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of mustard meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella alengata* SC- 208. **JAOCs**, Chicago, 75 (8), 1998.

CHRISTIE, W.W. Analysis of complex lipid. **Lipid Analysis**, 2 ed., New York: Pergamon, p.107-134, 1982.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 2, 394-400, 2009.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. Vol 1., 159p., 1980.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus spp.* sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DURHAM, D. R. & KLOOS, W. E. Comparative study of the total cellular fatty acid of *Staphylococcus species* of human origin. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 28:223-228. 1978.

EMBLEY, T.M. & WAIT, R. Structural lipids of Eubacteria. In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. **Chichester: John Wiley and Sons Ltd.** p. 121-161, 1994.

ELLENBOGEN, B.B. & ARONSON, S.A. Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi: possible phylogenetic significance. **Comparative Biochemical and Physiology**, 29: 805-811, 1969.

FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Compositional shifts in lipids fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 40, 1321- 1327, 2007

FUKUSHIMA, M.; AKIBA, S.; NAKANO, M. Comparative hypocholesterolemic effects of six vegetable oils in cholesterol-fed rat. **Lipids**, v.31, n.4, p.415-419, 1996.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Vitamins and growth factors. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. (Ed.). **Fungal Nutrition & Physiology**. New York: John Willey, p. 171-212, 1984.

GUERRERO, R.T. & SILVEIRA, R.M. B. **Glossorário ilustrado de Fungos**. p. 93 Porto Alegre: ed. Universidade/UFRGS, 1996.

GEMA, H.; KAVADIA A.; DIMOU, D.; TSAGOU, V.; AGGELI, M. E G. Produção de ácido gama-linolênico por *Cunninghamella echinulata* cultivadas em glicose e casca de laranja. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, 58: 303-307, 2002.

GOOL, C.J.A.W.; THIJS, C.; HENQUET, C.J.M.; HOUWELINGEN, A.C.; DAGNELIE, P.C.; SCHRANDER, J.; MENHEERE, P.P.C.A.; BRANDT, P.A. y-Linolenic acid supplementation for prophylaxis of atopic dermatitis a randomized controlled trial in infants at high familial risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.4, p.943-951, 2003.

GÓMEZ, A.M.; OSSA, E.M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, 88, 103-109, 2002.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and application. **Trends Biotechnology**, Cambridge, 15, 401-409, 1997.

GIRMAN, A.; LEE, R.; KLIGLER, B. An integrative medicine approach premenstrual syndrome. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.188, v.5 Suppl, p.S56-65, 2003.

GONZÁLEZ, F.H. SILVA, S.C. Bioquímica Clínica de Lipídios - As prostaglandinas. In: **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 76-77.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York, Willey-Liss, 1994.

GRAHAM, T.O.; KANDIL, H.M. Nutritional factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinical Nutrition American**, 31, 203-218, 2002

HASSAN, S.A. I. Standart methods to test the side effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Work Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **EPPO Bull.**, Oxford, v. 15, p. 214-255, 1985.

HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, New York, 33 (3), 577-584, 1977.

HANSSON, L. & DOSTALEK, M. Effect of culture conditiond on mycelial growth and production of gama-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. **Appleid Microbiology and Biotechonology**. 28: 240-246, 1988.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; STJTFFON, U.C. & PEGLEK., D.N. Ainsworth & Bisbys Dictionary of the Fungi. 616 p., 8th Ed. Wallingford; **CAB international**, 1995.

HERBERT, R.A.; KEITH, S.M. Microbiological production of essential fatty acids. United States **Efamol** 4851343. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4851343.html> . Acesso em: 15/12/2010

HIGASHIYAMA, K.; YAGUCHI, T.; AKIMOTO, K.; FUJIKAWA, S.; SHIMIZU, S. Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **JAACS**, Chicago, 75 (11), 1501-1505, 1998.

HORROBIN, D.F.; HUANG, Y.S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease. **J. Cardiol.**, 17:241-255, 1987.

HORNYCH, A.; ORAVEC, S.; GIRAULT, F.; FORETTE, B.; HORROBIN, D.F. The effect of gamma-linolenic acid on plasma and membrane lipids and renal prostaglandin synthesis in older subjects. **Bratislavske Lekarske Listy**, v.103, n.3, p.101-7, 2002.

IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. The nomenclature of lipids. **Biochemical Journal**, 171(1): 21- 35, 1978.

JEENNOR, S.; LAOTENG, K.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. **FEMS Microbiology**. Amsterdam, 259, 60-66, 2006.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. American Heart Association. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, n. 21, p. 2747-2757, 2002.

KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polysaturated acids. **Lipids**. p. 15-20, 1992.

KENNEDY, M. J., READER, S. L., DAVIES, R. J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*. v.42, p 625-34, 1993.

LAIDLAW, M.; HOLUB, B.J. Effects of supplementation with fish oil–derived n-3 fatty acids and γ-linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.1, p.37-42, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, 725p, Salvier, 1988.

LETOURNEAU, D. R.; DEVEN, J.M.; MONOCHA, M.S. Structure and composition of the cell wall of *Choanephora cucurbitarium*. **Canada Journal of Microbiology**, v. 22, p. 486-494, 1976.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **J. gen. Microbiol.** Sabouraudia, v. 117:147-154, 1980.

MEEHAN, E.; BEAUGÉ, F.; CHOQUART, D.; LEONARD, B.E. Influence of an n-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on the development of tolerance during chronic ethanol administration in rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.19, n.6, p.1441-6, 1995.

MIKAHAILIDIS, D.P.; KTRTLAND, S.; BARRADAS, M.A.; DANDONA, P. Dihomcigammalinolenic acid inhibits platelet aggregation and stimulates platelet prostaglandin E1 production in healthy subjects but not in insulin dependent diabetics. **Progress in Lipid Research**. 25 303-304, 1986.

MINHONI, M. T. A.; KOPYTOWSKI FILHO, J.; ANDRADE, M. C. N. **Cultivo de *Agaricus blazei* Murrillss. Heinemann**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2005.

MONTINI, R. M. C.; PASSO, J. R. S.; EIRA, A. F. Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 90-95, 2006.

MCCOY, M. Glycerin Surplus - Plants are closing, and new uses for the chemical are being found. **Chemical & Engineering News**. v. 84, n.6, p.7, fev, 2006. Disponível em <<http://pubs.acs.org/cen/news/84/i06/8406notw3.html?print>>. Acesso em 22 set 2008.

NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, 149, 201-205, 1997.

ÖZÇELİK, E.; PEKSEN, A. Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2652-2658, 2007.

NUERNBERG, K.; FISCHER, K.; NUERNBERG, G.; KUECHENMEISTER, U.; KLOSOWSKA, D.; ELIMINOWSKA-WENDA, G.; FIEDLER, I.; ENDER, K. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, Barking, 70, 63-74, 2005.

O'BRIEN, D.J.; STINSON, E.E.; WESSINGER, E.W.; SOMKUTI, G.A. Production of eicoseapentaenoic acid from filamentous fungi utilizing lactose as a primary carbon source. US Patent no. 5246842. 1993. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/5246842.html>. Acesso em: 16/01/2011.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2009.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F.; JESUS, M. A.; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 11, p. 1633-1635, 2008.

SAVOIE, J. M.; CESBRON, V.; DELPECH, P. Induction of polyphenol-oxidasas in the mycelium of *Lentinula edodes*. In: ELLIOT, T. J. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkmam, 1995. p. 787-793.

SAJBIDOR, J.; CERTIK, M. DOBRONOVA, S. Influence of diferente carbono sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. **Biotechnonology Letters**. 10(5): 347-350, 1988.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.45, n.5, p.575-579, 1996.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.45, n.5, p.575-579, 1982.

RIBEIRO, L.G.T.; BURKETT, S.L. Efeitos cardiovasculares dos ácidos graxos omega 3: sua importância na prevenção da aterosclerose e da doença coronária. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, São Paulo, 52 (4), 217-225, 1989.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A.V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 5, p. 1374-1.380, 2007.

SERRANO, I.; ROSEIRO J. Ethanol-induced dimorphism and lipid composition changes in *Mucor fragilis* CCMI 142. **Lett Appl Microbiol**. v. 33,n.1, p.89-93, 2001.

SCHALIN-KARRILA, M.; MATULA, L.; JANSEN, C.T.; UOTILA, P. Evening primrose oil the treatment of atopic eczema : effect on clinical status, plasma phospholipids fatty acid and circulating Nod prostaglandins. **British Journal & of Dermatology**, 117: 11-19, 1987.

SILVA, M. **Caracterização de Mucorales (Zigomicetos) através da análise de ácidos graxos**. Dissertação de mestrado, engenharia de alimentos, Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade estadual de Campinas. Campinas, 2005.

SILVA, T.L.; PINHEIRO, H.M.; ROSEIRO, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 32 (7), 880-888, 2003.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 55: 442-445, 2001.

SUGANO, M.; ISHIDA, T.; YOSHIDA, K.; TANAKA, K.; NIWA, M.; ARIMA, M.; MORITA, A. Effects armload our containing linolenic acid on blood cholesterol and eicosanoid levies rats. **Agricultural and Biological Chemistry** , 50(10): 2483-2491, 1986.

SUMNER, J. L. & MORGAN, E.D. The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi order Mucorales. **Journal of General Microbiology**. 59: 215-221, 1969.

SHAW, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and lthe significance of lthe gama-linolenic acid component. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p.325-331, 1966.

SHIN, Y. C. & SHIN, H.K. Screening of gama linolenic acid-producing fungi. **Korean Journal Food Scienc and Technology**, p. 724-731, 1998.

SPECHER, H. Biochemistry of essential fatty acids. **Progress in Lipid Research**. v. 20, p. 217-225. 1981.

SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM, H. L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 33, n. 1, p. 76-77,2003.

TORLANOVA, B.O.; KONOVA, L.V.;FUNTIKOVA, N.S.; BABANOVA, N.K.; KATOMINA, A. A. & MYYAKINA, L.S. Influence of the conditions of culturing of *Mucor* fungi, treatmente of biomass and extraction ability on the production of lipidis containing gama linolecic acid. **Applied Biochemistry and Microbiology**, p. 28, 1992.

URSIN, V.M.; VOELKER, T.; FROMAN, B. Fatty acid desaturases from fungi. United states Technology 20060156435. 2006. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/20060156435.html>. Acesso em: 16/11/2010.

VALENZUELA, A. B. **Importância nutricional dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA Ômega-3): o benefício da suplementação com estes ácidos graxos.** Disponível em: <<http://www.scielo.cl/scielo.php>>. Acesso em: dezembro 2009.

VEGA, E.Z.; GLATZ, B.A.; HAMMOND, E.G. Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. **Applied Environmental Microbiology**, New York, 54 (3), 748-752, 1988.

WARD, O. Microbial production of long-chain PUFAs. **Informatives**, Columbus, 6, 683- 688, 1995.

WELLBAUM, C. **Produção de ácidos graxos por linhagens de *mucor* spp. Isoladas de solo de área de Cerrado município de Corumbataí, Estado de São Paulo.** (Tese de doutorado), UNESP, 70p., 2006.

WEETE, S.; SHAW, R. The Polynsaturated fatty acids of microorganisms. **Advances in Lipid Reserarch**. 4:107-174, 1991.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, New York, 147, 2857-2864, 2001.

YAQOOB, P.; PALA, HS; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipids and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal Clinical Investigations**, Oxford, 30, 260-274, 2000.

XIAN, M.; NIE, J.; MEN, Q.; LIU, J.; ZHOU, C.; KANG, Y.; ZHEN, K. production of γ -linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabelina*. **Letters Applied Microbiology**, London, 36, 182-185, 2003.

ZHU, M.; YU, L.J.; LI, W.; ZHOU, P.P.; LI, C.Y. Optimization of arachidonic acidproduction by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 38, 735-740, 2006.

ANEXOS