



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR FUNGOS DA ORDEM
MUCORALES EM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO A BASE DE
MILHOCINA E EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE SORVETE.**

Recife

2015

EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR FUNGOS DA ORDEM
MUCORALES EM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO A BASE DE
MILHOCINA E EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE SORVETE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Fungos de Interesse Industrial

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Marcos Antonio Barbosa de Lima.

Recife

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Conceição, Emanuella Maria da

Produção de ácidos graxos por fungos da ordem mucorales em meio de cultura alternativo a base de milhocina e efluente da indústria de sorvete / Emanuella Maria da Conceição. – Recife, 2015.

70 f.: il.

Orientadores: Norma Buarque de Gusmão, Marcos Antônio Barbosa de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências e apêndices

1. Resíduos agrícolas 2. Biodiesel 3. Fungos I. Gusmão, Norma Buarque (orient.) II. Lima, Marcos Antonio Barbosa (coorient.) III. Título.

628.746
493

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-

EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR FUNGOS DA ORDEM
MUCORALES EM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO A BASE DE
MILHOCINA E EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE SORVETE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Fungos de Interesse Industrial

Defendida e aprovada em: 27 de Fevereiro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda.
Instituto Técnico de Sergipe - ITS

Prof. Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima
Universidade do Minho - Portugal

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e aos meus irmãos, Maria da Conceição Neto, Brenda Maria Gama da Silva e José Brenno Gama da Silva, por todo amor que expressam por mim, a caminhada não teria sentido sem o apoio de vocês; dedico todo meu amor e minha gratidão.

Aos meus eternos amigos, Andressa dos Anjos, Adriana Ferreira de Souza, Patrícia Macedo, Flávia Arruda por estar sempre presente compartilhando todos os momentos da minha vida, em especial aos caros colegas Marcos Luna e Luiz Araújo pela colaboração prestada.

A minha orientadora Professora Norma Buarque de Gusmão e meu co-orientador Professor Marcos Antonio Barbosa de Lima pelos ensinamentos, pela oportunidade, e principalmente pela paciência durante toda essa jornada. Meus sinceros agradecimentos, respeito e minha eterna dívida.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI: Pérsio Alexandre, Erik Jonne, Raul Filipe pelos momentos de descontração e trabalho.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE em especial a Esteban Espinosa Vidal e Jona Silva pelo seu empenho nas análises dos dados.

A CAPES pelo financiamento da minha bolsa de mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, ao LAMAI pelas instalações do laboratório e a Universidade Federal de Pernambuco.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir mais um degrau de uma grande escada da minha vida.

De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Façamos da interrupção um caminho novo. Da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Sabino.

RESUMO

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso de resíduos agroindustriais como meio de cultura alternativo e de baixo custo para o desenvolvimento de micro-organismos uma vez que possuem grande quantidade de matéria orgânica. Bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biomoléculas com alto valor agregado. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar o reaproveitamento do efluente da produção de sorvete e do resíduo milhocina como substrato de crescimento e produção de biomassa, lipídios e ácidos graxos por dez espécies de fungos da Ordem Mucorales. Para tanto foram estudadas a velocidade de crescimento radial, esporulação e a morfologia das colônias dos fungos cultivados nos meios a base de resíduos e para mucorales – SMM, nas concentrações de 5, 10 e 15%. Posteriormente foi investigada a produção de biomassa, lipídeos e ácidos graxos pelos Mucorales em meios experimentais. Verificou-se que a velocidade de crescimento radial no meio com contendo milhocina foi tão eficiente quanto no SMM. As espécies *Fennellomyces heterothallicus* e *Rhizopus arrhizus* apresentaram velocidade de crescimento radial de 33% e 28% maior do que no meio controle. Enquanto no meio a base de resíduo de sorvete cresceram apenas os fungos *R. arrhizus* e *R. stolonifer*. Alguns dos micro-organismos apresentaram alterações no verso e reservo das colônias. O meio a base de milhocina favoreceu um aumento da esporulação, com destaque para a espécie *Fennellomyces heterothallicus* a qual apresentou um aumento de 95,6% na esporulação em comparação ao controle. Por outro lado, observou-se que todas as espécies de fungos produziram mais biomassa no meio com milhocina a 5% do em relação ao meio controle. Quanto à produção de lipídeos, os micro-organismos apresentaram a maior porcentagem de produção no cultivo em resíduo de sorvete liofilizado. Os resultados cromatográficos mostraram uma produção similar de ácidos graxos saturados e insaturados: ácido palmítico (C16: 0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e γ -linolênico (C18:3), tanto para os meios de cultura alternativos como no meio controle. Portanto, os meios de cultura alternativos e de baixo custo a base de resíduo de sorvete e milhocina são uma opção viável para a produção de biomassa fúngica rica em lipídios e ácidos graxos saturados e insaturados.

Palavras-chave: Resíduos Agroindustriais. Lipídeos. Biotratamento. Biodiesel. Fungos oleaginosos.

ABSTRACT

In recent years, there is growing interest in the use of agro-industrial waste as alternative culture and low cost for the development of micro-organisms as they have lots of organic matter. Bioprocesses have been developed using agricultural residues as substrates for the production of biomolecules with high added value. Therefore, this study aimed to evaluate the reuse of effluent from the ice cream production and corn steep liquor residue as growth substrate and biomass, lipids and fatty acids for ten species of fungi of the Mucorales order. Therefore, we studied the radial growth rate, sporulation and colony morphology of the fungi grown on media based waste and Mucorales - SMM at concentrations of 5, 10 and 15%. Subsequently we investigated the production of biomass, lipids and fatty acids Mucorales by experimental means. It has been found that the radial growth rate in medium containing corn steep liquor was in as efficient as the SMM. The *Fennellomyces heterothallicus* *arrhizus* and *Rhizopus* species showed radial growth rate of 33% and 28% higher than in the control medium. While in the middle of the ice cream residue base grew only fungi *R. arrhizus* and *R. stolonifer*. Some of the micro-organisms showed changes in verse and reserve the colonies. The medium to corn steep liquor base favored increased sporulation, especially the kind *Fennellomyces heterothallicus* which increased by 95.6% in sporulation compared to the control. Moreover, it was observed that all fungal species produced more biomass in medium with 5% of corn steep liquor compared to the medium control. As for the production of lipids, microorganisms had the highest percentage of production in the cultivation of freeze-dried ice cream residue. The chromatographic results showed a similar production of saturated and unsaturated fatty acids: palmitic acid (C16: 0), stearic acid (C18: 0), oleic acid (C18: 1), linoleic acid (C18: 2) and γ -linolenic (C18: 3) for both alternative culture media as in the control medium. Therefore, alternative culture media and cost to the residue ice cream base and corn steep liquor are a viable option for the production of fungal biomass rich in lipids and saturated and unsaturated fatty acids.

Keywords: Agroindustrial waste. Lipids. Biotreatment. Biodiesel. Oleaginous fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Biossíntese de lipídeos.....	28
Figura 2- Vista geral dos tanques de decantação Estação de Tratamentos de Resíduos da Sorveteria Zeca's.....	33
Figura 3- Biomassa crescida nos meios de cultura alternativos e controle.....	34
Figura 4- Colônia de <i>Cunninghamella elegans</i> crescidas em meio de cultura alternativo.....	40
Figura 5- Colônia de <i>Cunninghamella elegans</i> crescidas em meio de cultura SMM.....	40
Figura 6- Colônia de <i>Rhizopus arrhizus</i> crescida em meio de cultura alternativo.....	41
Figura 7- Colônia de <i>R. arrhizus</i> em meio de cultura composto por Efluente de Sorvete.....	41
Figura 8- Colônia de <i>R. arrhizus</i> em meio de cultura SMM.....	41
Figura 9- Colônia de <i>Rhizopus stolonifer</i> crescida em meio de cultura alternativo.....	42
Figura 10- Colônia de <i>R. stolonifer</i> em meio de cultura composto por Efluente de Sorvete.....	42
Figura 11- Colônia de <i>R. stolonifer</i> em meio de cultura composto por SMM.....	42
Figura 12- Colônia de <i>Syncephalastrum racemosum</i> crescida em meio de cultura alternativo.....	43
Figura 13- Colônia de <i>Syncephalastrum racemosum</i> crescidas em meio de cultura SMM.....	43
Figura 14- Produção de biomassa das espécies de Mucorales cultivadas em meio controle e efluente de sorvete.....	44
Figura 15- Produção de biomassa das espécies de Mucorales cultivadas em meio controle e resíduo de milhocina.....	45
Figura 16- Percentual da produção de lipídeos totais das espécies de Mucorales cultivados em meio controle e efluente de sorvete.....	46
Figura 17- Percentual da produção de lipídeos totais das espécies de Mucorales cultivados em meio controle e milhocina.....	47

LISTA DE TABELA

Tabela 01 – Relação dos Mucorales utilizados no estudo.....	33
Tabela 02 – Velocidade de Crescimento Radial.....	39
Tabela 03 – Esporulação das espécies de Mucorales	40
Tabela 04 - Rendimento de produtividade de biomassa e lipídeo dos Mucorales.....	48
Tabela 05 - Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Rhizopus arrhizus</i>	50
Tabela 06 - Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Cunninghamella echinulata</i> ...	51
Tabela 07 - Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Rhizopus stolonifer</i>	52
Tabela 08 -Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Cunninghamella phaeospora</i> ..	53
Tabela09 - Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Cunninghamella elegans</i>	53
Tabela 10 - Composição em porcentagem dos ácidos graxos do fungo: <i>Mucor hiemalis</i>	55
Tabela 11 - Perfil dos Ácidos graxos identificados no efluente de sorvete.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 RESÍDUO AGROINDUSTRIAL	17
2.1.1 Composição Química Dos Resíduos Agroindustriais	18
2.1.2 Efluente Da Industrial De Sorvete	19
2.1.3 Milhocina	21
2.2 LIPÍDEOS	22
2.2.1 Ácidos Graxos	24
2.3 MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS	26
2.3.1 Ordem Mucorales	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 MICRO-ORGANISMOS	32
3.2 REJEITOS AGROINDUSTRIAIS	32
3.3 MEIO DE CULTURA	33
3.4 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO	34
3.4.1 Crescimento Micelial Radial	34
3.4.2 Determinação Da Esporulação Das Colônias	34
3.5 MACROMORFOLOGIA	35
3.6 PRODUÇÃO DE BIOMASSA	35
3.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS TOTAIS	36
3.7.1 Metilação E Determinação Dos Ácidos Graxos	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL	37
4.2 ESPORULAÇÃO EM MEIOS A BASE DE RESÍDUOS	38
4.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS	40
4.4 PRODUÇÃO DE BIOMASSA	44
4.5 PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS	46
4.5.1 Produção Dos Ácidos Graxos	48
4.6 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO EFLUENTE DE SORVETE	55
5 CONCLUSÕES	57

REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>RHIZOPUS ARRHIZUS</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	68
APÊNDICE B - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>CUNNINGHAMELLA ECHINULATA</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	69
APÊNDICE C - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>RHIZOPUS STOLONIFER</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	70
APÊNDICE D - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>CUNNINGHAMELLA PHACOSPORA</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	71
APÊNDICE E - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>CUNNINGHAMELLA ELEGANS</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	72
APÊNDICE F - CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE <i>MUCOR HIEMALIS</i> CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H	73

1 INTRODUÇÃO

A mecanização permitiu a otimização do processo produtivo, mas, por outro lado, foi responsável pela produção de uma quantidade até então inimaginada de resíduos, e esse parece ter sido o grande problema da indústria desde o seu nascimento no século XVIII. O termo resíduo tem sido utilizado de modo a definir os materiais não aproveitados em atividades humanas, podendo ser provenientes de indústrias, comércios, hospitais e residências. Em sentido amplo, abrange não apenas os componentes sólidos, como também efluentes líquidos e emissões atmosféricas (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000). Por conseguinte, atualmente os resíduos são um grande problema ambiental, sanitário e econômico devido às despesas relacionadas à descontaminação das áreas por ele afetadas sendo, portanto premente a busca por uma destinação adequada aos resíduos (PÉLIZER et al., 2007).

Por outro lado, esse tipo de material, apesar de não mais retornar à sua cadeia produtiva de origem, pode novamente assumir o status de matéria-prima, uma vez que pode ainda conter muitas substâncias de alto valor comercial (LAUFENBERG et al., 2003). Diante desse cenário, muitas pesquisas científicas estudam alternativas de aproveitamento de resíduos industriais, como por exemplo, a sua utilização como substrato ou meio de cultivo para produção de biomoléculas de valor comercial por micro-organismos, especialmente os fungos (DEMAIN et al., 2008).

As biomoléculas consistem em grupo de compostos químicos que são sintetizados nos organismos vivos, participando de sua estrutura e funcionamento. Em sua maioria, são compostos orgânicos, formados basicamente por C, N, O e H. As principais classes de biomoléculas orgânicas conhecidas são: proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, que por suas grandes dimensões, são denominadas macromoléculas. Dar-se um destaque aos lipídeos, sendo a molécula alvo do presente trabalho.

Os lipídios apresentam importantes funções biológicas, sendo facilmente encontráveis na natureza, por vezes em associação com outras biomoléculas, tais como proteínas e carboidratos, além de outros grupos, como radicais fosfato, formando os fosfolipídios, principal componente das membranas celulares, em virtude de sua natureza anfipática. É necessária, para a manutenção da saúde humana, a ingestão de pelo menos dois ácidos graxos ditos essenciais: o ácido linoleico (encontrado em vegetais e óleos de fígado de peixe) e o

ácido araquidônico (também encontrado nos óleos de fígado de peixe, além de na gema do ovo, fígado e tecidos renais).

Os micro-organismos, por sua vez, tem a capacidade de sintetizar diferentes ácidos graxos empregados em seu desenvolvimento (BURTON; ENGELKIRK, 1998; LIU; JIN, 2008). Sendo assim, o uso de micro-organismos oleaginosos vem sendo apresentado como uma fonte de óleos e gorduras de baixo custo. Os micro-organismos oleaginosos são definidos como aqueles que apresentam um conteúdo lipídico acima de 20%. Existem diversas variedades, tais como microalgas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os teores de lipídios variam entre 16 a 77% para microalgas, 18 até valores superiores a 40% para bactérias, entre 50 e 70% para leveduras e 50 a 85% para os fungos filamentosos (MENG et al., 2009; RATLEDGE, 2002 e 2004). Adicionalmente, os fungos filamentosos apresentam produção 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).

Além do mais, os micro-organismos como fontes de óleos apresentam várias vantagens em relação às fontes vegetais e animais tradicionais (WELLBAUM, 2006):

- Os óleos microbianos têm a vantagem de possuir somente ácidos graxos poli-insaturados, diferentemente dos óleos de plantas e de animais que possuem além dos insaturados, os ácidos graxos saturados;
- Ácidos graxos poli-insaturados microbianos são óleos com maior valor comercial;
- Taxas de crescimento extremamente altas em uma grande variedade de substratos, possibilitando o uso de matérias primas econômicas, até mesmo de custo zero na formulação de meios de cultura;
- A produção de óleo pode ser feita ao longo do ano inteiro, sem dependência sazonal ou climática;
- As fontes microbianas podem oferecer a produção de ácidos graxos poli-insaturados, com alto grau de pureza, mais concentrados e com qualidade controlada;
- O potencial enzimático dos micro-organismos permite ainda a produção simultânea de óleos e outros produtos de interesse industrial;

- 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;
- 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 do produto, sem prejudicar o habitat natural e ou causar impacto ambiental.

Estudos envolvendo a viabilidade da produção dos ácidos graxos por fungos filamentosos em escala industrial envolvem vários fatores tais como: tempo, quantidade de lipídeo obtido e rendimento do produto final, e principalmente com baixo custo de produção (CERTIK et al., 2006).

Parâmetros como o balanço entre nitrogênio e carbono em meios de cultivo pré-definidos se fazem necessários, pela própria fisiologia do microrganismo. Porém, este aspecto pode tornar-se um sério problema, pois se o processo não for bem controlado, acarretará em uma maior adição de nutrientes em seu processo de produção, diminuindo a viabilidade para o escalonamento industrial. Assim observou-se que em baixas concentrações nitrogênio e alta de carbono os microrganismos produzem maior quantidade de óleo (KENNEDY et al. 1993).

Apesar da importância, pouco se sabe sobre os detalhes da biossíntese de ácidos graxos em organismos oleaginosos. Estudos pioneiros sobre a fisiologia vêm tentando explicar como funciona o mecanismo de acumulação de lipídeos a partir de glicose através do ATP (reação citrato liase). ATP: citrato liase é uma enzima que cataliza a clivagem de citrato na presença de ATP para CoA e acetil-CoA (RATLEDGE & WYNN, 2002).

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales têm sido empregados amplamente na produção de ácidos graxos (KOMAITIS et al. 2001; MAMATHA et al. 2008). Tais micro-organismos oleaginosos apresentam-se como uma excelente alternativa biotecnológica para a produção de lipídios tendo em vista seu rápido crescimento e adaptação as mais diferentes condições e substratos (ALEXOPOULOS et al., 1996; CARLILE & WATKINSON, 1996; MENG et al., 2009).

Alguns dos gêneros da ordem Mucorales, vem se destacando por apresentar em algumas espécies 86% de lipídeos poliinsaturados em sua biomassa total, correspondendo principalmente aos seguintes ácidos graxos: ácido palmítico, ácidos oléicos e linolênicos. Estes ácidos são sintetizados por fungos de forma bastante simples, tendo em vista sua própria

forma de armazenamento de substâncias de reserva, podendo variar com fatores nutricionais e ambientais, tais como: fontes de carbono, nitrogênio, temperatura e pH. Sobretudo estes fatores quando controlados contribuem para um aumento desses compostos na biomassa fúngica (RUEGGE, 2001).

Sendo assim, a busca por micro-organismos que acumulem altos teores de lipídios, em particular ácidos graxos insaturados, a partir do reaproveitamento de resíduos agroindustriais, torna-se um caminho biotecnológico promissor para o desenvolvimento sustentável de processos e produtos economicamente competitivos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Selecionar fungos oleaginosos da ordem Mucorales e investigar a produção de ácidos graxos em meios de culturas a base de resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características de crescimento dos fungos filamentosos da ordem Mucorales em meio à base de milhocina e resíduo de sorvete;
- Investigar a produção de biomassa dos fungos filamentosos da ordem Mucorales em meio à base de milhocina e resíduo de sorvete;
- Analisar a produção de lipídios totais pelos fungos filamentosos da ordem Mucorales em meio à base de milhocina e resíduo de sorvete;
- Determinar as taxas de produção de lipídios no meio à base de milhocina e resíduo de sorvete;
- Selecionar as espécies testadas de fungos filamentosos que apresentarem as maiores taxas de produção de lipídios;
- Determinar o perfil dos ácidos graxos produzidos pelas espécies de fungos filamentosos selecionados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. O resíduo depois de gerado necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (GONÇALVES et al., 2010). A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Os órgãos fiscalizadores têm se mobilizado e constantes revisões têm ocorrido em ações emergenciais ligadas a resíduos, tais como o RDC 306/04, resolução da ANVISA (Brasil, 2004) e a Resolução 388/05 do CONAMA (Brasil, 2005) que classificam e propõem tratamentos, forma de manipulação e descarte dos resíduos de serviço da saúde e atualmente o Decreto 7.404 de 23/12/2010, regulamenta a Lei 12.305/2010- Política Nacional de Resíduos Sólidos que cria o Comitê Interministerial da Política e o Comitê Orientador para implementação dos Sistemas de Logísticas de Reserva. A política Nacional de Resíduos Sólidos estabelece princípios, objetivos, instrumentos e diretrizes para a gestão e gerenciamento dos resíduos sólidos, as responsabilidades dos geradores, do poder público e dos consumidores.

A produção excessiva de resíduos industriais, além dos potenciais problemas ambientais, refletem perdas tanto de matérias-primas, quanto de energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Muitos dos tratamentos utilizados para o tratamento de resíduos, não os eliminam realmente, apenas os transferem para outro meio (PELIZER et al., 2007). Por outro lado, esse tipo de material, apesar de não mais retornar à sua cadeia produtiva de origem, pode novamente assumir o *status* de matéria-prima, uma vez que pode ainda conter muitas substâncias de alto valor comercial (LAUFENBERG et al., 2003).

Um dos principais empecilhos para a utilização dos resíduos, é a dificuldade em atribuir valor ao rejeito, posto que ainda persista a ideia de que o mesmo é lixo. Por ser o fim

de um dado processo produtivo, por vezes é esquecida a sua aplicabilidade na obtenção de outros bens (MATOS & SCHALCH, 2000). O aproveitamento de resíduos em atividades variadas tem sido estimulado, pois tem implicações positivas tanto no setor ambiental, através da minimização de impactos, quanto no socioeconômico, via valorização de novas matérias-primas e geração de renda (DAMASCENO et al., 2003).

O Brasil destaca-se pela alta produtividade de recursos renováveis, tais como: produtos agrícolas e florestais, apresentando dessa forma considerável potencial para a implementação de atividades relacionadas à reutilização de resíduos (WOIECHOWSKI, 2001).

O aproveitamento daquilo que seria material de descarte, possibilita um planejamento adequado e isenta a todas, pequenas, médias e grandes empresas, dos problemas futuros advindos da má gestão dos seus resíduos. As vantagens ambientais e sanitárias são indubitáveis, e desta forma, o aproveitamento dos resíduos agroindustriais resume em sua essência o conceito de sustentabilidade (OLIVEIRA et al., 2012).

2.1.1 Composição Química de Resíduos Agroindustriais

Estima-se que metade da produção de vegetais destinados aos processos agrícolas e industriais não são bem aproveitados pelo homem, gerando grandes quantidades de resíduos como palhas, folhas, madeiras, óleos, corantes, sementes, polpas, cascas e dentre outros materiais são gerados ao fim de processo produtivo e a grande questão ainda persiste: que destino dar a estes materiais de modo que não prejudiquem o meio ambiente? Em especial no atinente aos resíduos de origem agroindustrial é importante ressaltar o fato de que apresentam grandes quantidades de matéria orgânica, a qual é mensurada através da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é a quantidade de oxigênio necessária para que haja a estabilização da matéria orgânica (CARIOCA & ARORA, 1984).

Segundo Laufenberg et al. (2003) Os resíduos podem apresentar substâncias de alto valor. Se o resíduo for empregado numa tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Todos esses resíduos são normalmente dispensados no solo, originando grandes problemas de poluição e representando uma perda significativa de biomassa e nutrientes.

Os avanços na área da biotecnologia, principalmente relacionadas à tecnologia das fermentações, criaram uma oportunidade para o aproveitamento desses resíduos, como subprodutos, pois os mesmos fornecem uma ampla gama de substratos alternativos para o

desenvolvimento de micro-organismos em diferentes processos biotecnológicos, consequentemente favorecendo o meio ambiente, uma vez que se podem evitar possíveis impactos ambientais e implantação de indústrias secundárias (PANDEY et al. 2001). Segundo Meneghetti e Domingues (2008) subprodutos são aqueles provenientes de um processamento industrial, onde se pode produzir um novo produto a partir deste. Uma maior utilização é limitada pela falta de conhecimento da composição química, viabilidade econômica e garantia de segurança alimentar e ambiental dos subprodutos industriais.

De acordo com Santos et al. (2009) para a síntese de produtos desejáveis, é importante a escolha adequada da fonte de carbono, sendo os resíduos agroindustriais os mais pesquisados, porque são geralmente mais baratos abundantes e apresentam composição rica em material orgânico.

2.1.2 Efluente da Indústria de Sorvete

De acordo com fontes históricas o sorvete foi inventado pelos chineses há mais de 3000 anos, que misturaram neve com frutas. A grande revolução no mundo dos sorvetes ou também chamado de gelado, aconteceu com Marco Polo, que trouxe do Oriente para a Itália, em 1292, o segredo do preparo de sorvetes usando técnicas especiais. Atualmente o maior produtor mundial do gelado são os norte-americanos. No Brasil, o sorvete ficou conhecido em 1834, quando dois comerciantes cariocas compraram 217 toneladas de gelo, vindas em um navio norte-americano, e começaram a fabricar sorvetes com frutas brasileiras. Na época, não havia como conservar o sorvete gelado e, por isso, tinha que ser tomado logo após o seu preparo. Um anúncio avisava a hora exata da fabricação. O primeiro anúncio apareceu em São Paulo, no dia 4 de Janeiro de 1878, lia-se: “Sorvetes- todos os dias às 15 horas, na Rua Direita, nº44”. (disponível em: http://www.abis.com.br/institucional_historia.html)

O Sorvete é um sistema coloidal composto por uma emulsão constituída de gotículas de gordura, de proteínas, de bolhas de ar e de cristais de gelo dispersos numa fase aquosa, representada por uma solução concentrada de sacarose. Além disso, pode conter outros ingredientes como emulsificantes e estabilizantes (Clarke, 2005; Gilles, Greenley, Sutcliffe, 2006; Santos, 2009). As fórmulas convencionais de sorvete contêm uma alta concentração de sacarose e gorduras, os quais estão relacionados com a textura, consistência e sabor do produto (Castro, Franco, 2002; Mesich, 2006). Do ponto de vista nutricional, o sorvete é considerado um alimento completo e de alto valor nutritivo, pois fornece proteínas,

carboidratos, lipídios, vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, E e K, Cálcio, Fósforo, e outros minerais (Maia et al., 2008).

O efluente de sorvete é caracterizado por apresentar; detergentes (hidróxido de sódio, metassilicato de sódio), desinfetantes (hipoclorito de sódio, clorexidina, compostos quaternários de amônio), os compostos associados ao leite, como gorduras, proteínas e carboidratos contribuem para a composição dos efluentes das indústrias de laticínios. Além disso, dependendo da linha de produção, o efluente pode conter pedaços de frutas, essências, e outros produtos que podem contribuir com o aumento da matéria orgânica, sendo claramente perceptível a extrema variação das características físico-químicas desse tipo de efluente (ALBERTON, 2009).

Lipídios contidos em efluentes, em especial os da indústria de laticínios, são causadores de grandes danos ao meio ambiente, pois formam filmes oleosos nas superfícies dos corpos de água, impedindo a passagem dos raios solares e a difusão do oxigênio do ar, promovendo a mortandade dos seres vivos que se encontram nesse meio. Sua fração é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres e, junto a outros nutrientes, constituem os principais compostos orgânicos de águas residuárias dessas indústrias (MENDES et al., 2004).

2.1.3 Milhocina

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho, que apresenta grande quantidade de nitrogênio e aminoácidos, entre outros nutrientes. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico à quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é utilizada principalmente como suplemento alimentar na fabricação de ração de ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas de moscas das frutas e fontes de nutrientes para micro-organismos em processo de fermentação industrial, visando a produção de subprodutos de importância comercial. (AMARTEY & LEUNG 2000; FONTES et al. 2008; DOMINGOS 2009).

Porém uma desvantagem econômica da milhocina é sua variável composição, que pode depender da condição e qualidade do grão de milho e do processamento, o que pode inviabilizar a utilização tornando-se um processo caro (DOMINGOS, 2009).

De acordo com os estudos Ligget & Koffler (1998), as características físico- químicas da milhocina correspondem a uma variação de pH de 3,5 a 4,1, a concentração de nitrogênio está entre 3,8 % a 40,5 % no efluente bruto, os teores de açúcares (glicose) e ácido láctico são bastante variados, normalmente os teores de açúcares não ultrapassam 5 % e os de ácido láctico estão entre 5 – 15 %, devido a já estarem em processo de fermentação nessa faixa de pH. A quantidade de matéria orgânica presente pode ser elevada, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias.

Correlacionando o autor mencionado acima, para Akhtar (1998), na composição da milhocina estudada em base seca, o pH apresentava-se em 3,9, 40,8% de proteínas; ácido láctico correspondendo a 16%; açúcares redutores 12,8%; compostos variados a 30,4%.

Muitos desconhecem, mas a milhocina é usada na cultura de micro-organismos de onde se extraem a penicilina, a estreptomicina e outras drogas similares. (DOMINGOS, 2009).

Vários estudos foram realizados na tentativa de reutilização da milhocina, como por exemplo, nutriente para fermentação por bacilos, onde os açúcares e outros subprodutos servem de alimento, garantindo um bom rendimento do processo, diminuindo os custos de tratamento e reduzindo a quantidade de matéria orgânica no efluente final (AMARTEY & LEUNG 2000).

A seguir citam-se outros autores que utilizaram a milhocina nos seus estudos como fonte nutritiva para cultivo de micro-organismos. Para produção de cogumelos comestíveis (LOSS 2009); a milhocina como um dos substratos na produção de *Lecanicillium lacanii*, fungo utilizado no controle de pragas agrícolas (MACHADO et al. 2009); na produção de biosurfactante, onde a milhocina possui resultados positivos como fonte de nitrogênio para as leveduras (FONTES, et. al. 2008); e também na produção de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus*, o uso de milhocina se tornou bastante promissor (SILVA 2007).

2.2. LIPÍDEOS

A palavra lipídio derivado vocábulo grego *lipos*, que quer dizer gordura. Os lipídios constituem um grupo heterogêneo de compostos de origem biológica insolúveis em água, porém que apresentam a capacidade de se solubilizar em solventes apolares tais como: hexano, benzeno, clorofórmio, dentre outros. Diferentemente de proteínas e carboidratos, facilmente reconhecíveis por sua estrutura, os lipídios apresentam considerável diversidade estrutural, tais como as cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos e dos terpenoides, ou a conformação em múltiplos anéis aromáticos dos esteroides (SOLOMONS & FRYLE, 2006; ALBERTS et al., 2010).

Os lipídios apresentam importantes funções biológicas, sendo facilmente encontrados na natureza, por vezes, em associação com outras biomoléculas, tais como proteínas e carboidratos, além de outros grupos, como radicais fosfato, formando os fosfolipídios, principal componente das membranas celulares, em virtude de sua natureza anfipática. Outra associação comum é estabelecida entre os lipídios e o glicerol formando os ésteres de gliceróis, dos quais, o mais popular é indubitavelmente o triacilglicerol, encontrado na forma de gotículas em células animais e vegetais, apresentando a função de reserva energética (ALBERTS et al., 2010).

Inúmeras outras funções são atribuídas aos lipídios, tais como controle metabólico, sob a forma de hormônios esteroides e prostaglandinas, alteração nas propriedades ativas de superfície e solubilização, tais como os biosurfactantes, os sais biliares e as lipases; isolamento elétrico em células nervosas (esfingolipídeos), pigmentação (carotenoides), vitaminas (A, D, E e K) e óleos essenciais (isoprenoides) (BURTON & ENGELKIRK, 1998; McGARRY, 2002; SOLOMONS & FRYLE, 2006).

É necessária, para a manutenção da saúde humana, a ingestão de pelo menos dois ácidos graxos ditos essenciais: o ácido linoleico (encontrado em vegetais e óleos de fígado de

peixe) e o ácido aracdônico (também encontrado nos óleos de fígado de peixe, além de na gema do ovo, fígado e tecidos renais). Os micro-organismos, por sua vez, tem a capacidade de sintetizar diferentes ácidos graxos empregados em seu desenvolvimento (BURTON & ENGELKIRK, 1998).

As funções dos lipídios nos fungos são tão variadas quanto à diversidade dessas substâncias. Em esporos, aparentam estar vinculados à resistência, evitando a dessecação e o ataque microbiano (GRIFFIN, 1994).

De modo geral, a quantidade e a composição dos lipídios de natureza fúngica são determinadas pela constituição genética de cada espécie, sendo fortemente influenciadas pela composição do meio. A relação entre os níveis de carbono e nitrogênio no substrato devem ser criteriosamente calculadas. Identifica-se maior produtividade quando a taxa de carbono no meio é elevada em contraposição a baixíssimas taxas de nitrogênio (SANCHOLLE & LÖSEL, 1995).

Fungos que tenham a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios são ditos oleaginosos. No mínimo cerca de 20% da biomassa de fungo oleaginoso é composta por lipídios (SANCHOLLE & LÖSEL, 1995). Muitos dos trabalhos desenvolvidos no atinente a obtenção de lipídios de natureza fúngica, abordam espécies de leveduras, tais como: *Rhodotorula glutinis* (GRANGER et al., 1992;), *Apiotrichum curvatum* (PARK et al., 1990), dentre outras.

A enzima citrato liase foi apontada por Ratledge e Gilbert (1985) como um indicador para o potencial em acumular lipídios em leveduras, todavia, apesar de ser ativa também nos fungos filamentosos, neste grupo seu papel ainda não foi completamente esclarecido (SANCHOLE & LÖSEL, 1995).

Embora as leveduras pareçam ser dominantes, em termos literários, na produção de lipídios, os fungos filamentosos também apresentam considerável potencial, especialmente em virtude de apresentarem elevados teores de lipídios contendo composições pouco usuais de ácidos graxos, quer de cadeias longas ou curtas (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988). Além disso, os fungos filamentosos são capazes de utilizar uma gama ainda maior de substratos para a produção de lipídios que as leveduras (SANCHOLLE & LÖSEL, 1995).

2.2.1 Ácidos Graxos

Os Ácidos Graxos Essenciais compõem uma classe de moléculas que não podem ser produzidas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases. Tradicionalmente os ácidos graxos essenciais são obtidos na dieta humana através de vegetais e animais, entretanto como óleos e gorduras dessas origens têm alguns problemas como mau sabor e odor e fornecimento de colesterol em excesso, a produção microbiana desses ácidos graxos essenciais biologicamente ativos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois são mais desejáveis para serem utilizados como aditivos alimentares. Os ácidos graxos essenciais como o linoléico (LA, 18:2 ω -6) e alfa-linolênico (ALA, ω -3) são sintetizados, exclusivamente pelo reino vegetal. (Somashekara *et al.*, 2002; Pompéia, 2002; Vaz *et al.*, 2006)

Contudo, ao serem ingeridos os mamíferos os modificam, de forma a suprir sua carência. Essas modificações podem ser alongamentos da cadeia, insaturações e descarboxilações dos pares carbônicos da cadeia originando os Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Longa, como por exemplo, o ácido eicosapentanóico (EPA – 20:5, ω -3) e docosahexaenoico (DHA - 22:6, ω -3) produtos do metabolismo do ALA e o ácido araquidônico (ARA - 20:4, ω -6) do metabolismo do LA. (Hirayama, *et al.*, 2006).

O ARA, EPA e DHA são precursores da síntese de eicosanoides. Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa produzidos pelos precursores ômega 6 (AG, ω -6) são mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária. Os ácidos da série ω -3 atuam no processo antiinflamatório e não inibem o sistema imune. (Hirayama, *et al.*, 2006; Lunn, *et al.*, 2006). O cérebro é particularmente rico em ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico. Estes últimos estão envolvidos no desenvolvimento das funções neurais e da retina, e a dieta dos mesmos podem assim ser benéfica para bebês poderem alcançar memória melhorada e acuidade visual. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. (O'brien, *et al.*, 1965). Por isso esses ácidos graxos e seus derivados são importantes alvos de estudos farmacêuticos (Uequiza, 2000).

Os Ácidos Graxos Poliinsaturados constituem um grande grupo de ácidos graxos que contêm uma molécula de cadeia carbônica longa que incluem ω -3 e ω -6. Omega, ' ω ' é a posição da primeira ligação dupla quando contados a partir da extremidade metil terminal e o número '3' ou '6' refere-se ao número de átomos de carbono existentes até a ocorrência da primeira dupla ligação a partir do carbono Omega, que é o ultimo carbono da cadeia

carboxílica. Quando a primeira ocorrência de ligações duplas ocorre a partir da extremidade carboxílica, o delta (Δ) é usado para indicar esta posição. A estrutura molecular dos ácidos graxos é constituída geralmente por um número par de átomos de carbono (4 a 24) com diversas saturações (Lozac'h, 1986).

Na primeira inspeção, a via biosintética de ácidos graxos na maioria dos micro-organismos produtores de óleos é a mesma que é encontrada em espécies não produtoras. Há, no entanto, uma diferença fundamental entre estes organismos.

A fim de alcançar a acumulação lipídica em um micro-organismo, é necessário cultivá-lo em um meio com excesso de substrato de carbono e uma quantidade limitante de nitrogênio. Assim, quando o organismo cresce, rapidamente é consumido o nitrogênio, mas ele continua a assimilar a fonte de carbono (usualmente glicose ou outra fonte alternativa). Esta é então canalizada diretamente para a síntese lipídica, resultando em acumulação de triacilgliceróis no interior da célula, como gotículas de óleo discretas. A acumulação de óleo pode chegar a mais de 70% da biomassa celular, mas não em todas as espécies produtoras. Nos micro-organismos não-produtores, por definição, não se acumulam lipídeos. Quando colocados no meio de crescimento com limitação de nitrogênio, estes organismos tendem a cessar a proliferação celular adicional, caso contrário, a via é desviada para a síntese de polissacarídeos diferentes, incluindo glicogênio e glucanos variados, etc. A acumulação de óleo neste caso, além de um nível muito pequeno (usualmente menos de 10% da biomassa), não ocorre. Por isso a capacidade de acumular grandes quantidades de óleos deve estar fora da via convencional de biossíntese de ácidos graxos, visto que está maquinaria são comuns a todos os micro-organismos. Então para que o acúmulo ocorra provavelmente ele deve possuir a capacidade de produzir um fornecimento contínuo de Acetil-CoA diretamente no citosol da célula como precursor necessário para a síntese de ácidos graxos, além de produzir uma quantidade suficiente de NADPH como redutor essencial utilizado na biossíntese. A formação de acetil-CoA em micro-organismos produtores tem sido atribuída à presença da ATP: citrato liase, que parece não ocorrer na maioria das espécies de que não acumulam óleos.

2.3 MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS

Os óleos microbianos, comumente denominados óleos de células simples (SCO), os quais são lipídios produzidos por micro-organismos oleaginosos, têm sido de interesse potencial para vários pesquisadores nas últimas décadas devido às suas diversas aplicações, como em aditivos alimentares, farmacêuticos, combustíveis e ingredientes de alimentos para a aquicultura. Tradicionalmente, os micro-organismos, que incluem bactérias, leveduras, fungos e microalgas, os quais podem acumular mais de 20% de lipídios do seu peso seco, podendo chegar a capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico, são considerados micro-organismos oleaginosos (SZCZESNA-ANTCZAK 2006; LIU & ZHAO 2007; ROSSI et al. 2011; ZHENG, et al. 2012).

Dentre das espécies de micro-organismos oleaginosos, as representantes mais estudadas de bactérias são a *Arthobacter sp.*, *Bacillus alcalophilus*, *Gordona sp.* e *Rhodococcus opacus*, e de micro-algas, *Chlorella vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*, *C. sorokiniana*, *Nannocloropsis sp* e *Niczschia sp* (ILLMAN et al., 2000; CHISTI , 2006; GOUDA et al., 2008; MENG et al., 2009).

Além desses micro-organismos citados estão as leveduras e fungos filamentosos destacando-se os gêneros: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus* e *Lypomyces* como representantes das leveduras e *Cunninghamella echinulata*, *Umbelopsis isabelina* e *Mucor circinelloides* como representantes de fungos filamentosos mais investigado (LI et al. 2008; ZHAO et al. 2008; ROSSI et al. 2009; VICENTE et al. 2009; MACHADO JUNIOR 2010; AGEITOS et al. 2011).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam composição similar e valor energético aos óleos vegetais e animais, mas como produtores de lipídeos os micro-organismos não competem por recursos alimentares, especialmente se a fonte de carbono for de baixo custo, como matérias-primas, subprodutos e excedentes, apresenta grande rapidez de geração, e sua produção não é sujeita a variações climáticas e sazonais cíclicas, requer menor área de produção e melhor controle da produção e do produto (MACHADO JUNIOR 2010; ROSSI et al., 2011).

De acordo com Moore-Landecker, (1996) os triacilgliceróis e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos. Os ácidos graxos produzidos por fungos oleaginosos podem abranger até 88% da fração lipídica. Os mais abundantes contêm C16 e C18 átomos. Os ácidos insaturados tais como: oléico e linoléico imperam sobre os ácidos saturados.

Os lipídeos são importantes componentes de fungos, tanto em termos de estrutura e constituição da membrana, retículo endoplasmático e das membranas de várias organelas; substâncias de reserva, principalmente em forma de triglicerídeos; são componentes de hormônios, como anteridiol, ácidos trispóricos e sirenina; utilizados como fonte de energia e fonte de carbono; componentes da parede celular e do envoltório de esporos. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídios para o desenvolvimento, esporulação e germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos nestes micro-organismos. O teor de lipídios em esporos de fungos diversos varia de 5 a 17% de peso seco, mas esporos de algumas espécies, tais como ferrugens contêm até 35% de lipídios. Os principais fatores que influenciam o grau de produção de lipídios são a natureza e percentagem de carbono (C) e nitrogênio (N), conforme fontes de nutrientes no meio. Os principais componentes destes lipídios são geralmente triacilglicerídios e glicerofosfolipídios (fosfolipídios), que podem ser acompanhadas de esteróis e ésteres, ácidos graxos, esfingolipídios, hidrocarbonetos, etc. Os ácidos graxos podem variar de C12 a C24 de comprimento da cadeia. Ácido palmítico C16 normalmente é o ácido graxo saturado e oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) são os principais ácidos graxos insaturados (PUTZKE & PUTZKE 2004; PUPIN, et al. 2000; GAO, et al. 2013).

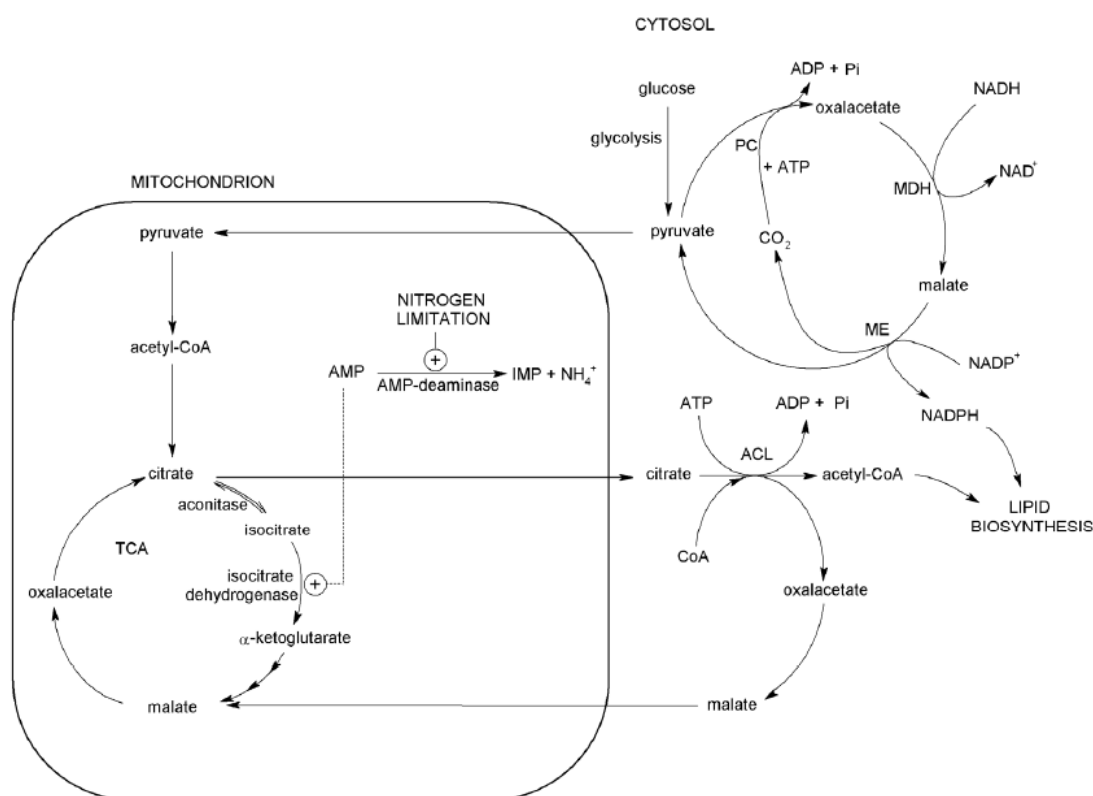
Várias espécies de leveduras e fungos filamentosos têm a capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de triacilgliceróis dentro das suas células, até 70% do peso da biomassa, fato promissor para a produção de biodiesel de terceira geração, além da exploração do ácido docosahexaenóico (DHA), ácido gama-linolênico (GLA), ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido araquidônico (ARA), além de outros lipídeos especiais de importância farmacêutica e alimentícia (RATLEDGE & WINN 2002; LIU et al. 2008; ROSSI et al. 2011)

Segundo Putzke (2004), as propriedades antifúngicas dos óleos produzidos por fungos têm sido estudadas há muitos anos, cita Clark (1899) como um dos pioneiros e relata os resultados mais tarde de Kitajima & Kawamura (1931) em que os lipídeos compostos por ácidos graxos insaturados inibem mais que os saturados.

A via bioquímica da biossíntese de lipídeos não é muito diferente entre organismos eucarióticos e não difere em fungos oleaginosos e não oleaginosos. A capacidade de acumular quantidades elevadas de lipídeos depende principalmente na regulação da via biossintética e o fornecimento dos precursores (por exemplo, acetil-CoA, a malonil-CoA, e glicerol-3-fosfato) e o co-factor NADPH. (ROSSI et al. 2011; KOHLWEIN 2010).

Segundo Rossi et al. (2011) a acumulação de lipídeos nas leveduras e fungos filamentosos oleaginosos tem sido demonstrado que ocorrem quando um nutriente no meio (por exemplo, a fonte de nitrogênio ou o fósforo) torna-se limitada e a fonte de carbono está presente em excesso, sendo assim a limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para induzir a lipogênese. Vorapreeda. et al, 2012) sugerem que a enzima, ATP: citrato liase (ACL) podem desempenhar um papel para dirigir o excesso de carbono para ser armazenada como lipídeos, em vez de hidratos de carbono. Há vários estudos publicados em o fósforo, magnésio, zinco, chumbo ou ferro limitação à acumulação de lipídeos nos modelo leveduras oleaginosas (HALL & RATLEDGE 1977; BEOPOULOS et al. 2009; WU et al. 2010). Porém a limitação de nitrogênio ainda é a forma mais eficiente de limitação de nutrientes para a indução da lipogênese (Figura 1).

Figura 1 - Biossíntese de lipídeos devido ao excesso de citrato como uma consequência da limitação de nitrogênio.



Fonte: Adaptado de Ratledge, 2004.

Existem vários métodos de extração de lipídeos, porém algumas amostras requerem cuidados especiais para obtenção dos lipídeos, pois alguns fatores podem influenciar a qualidade final da fração lipídica (DELABIO et al., 2012). Segundo os mesmos autores o procedimento de Soxhlet, no qual o tecido é submetido à extração em um aparelho de vidro, com refluxo de solvente por muitas horas, devem ser evitados, já que favorecem as reações de peroxidação e de hidrólise, o que compromete a quantificação de componentes lipídicos ou não. Um dos procedimentos de extração que supera algumas dificuldades é a metodologia Bligh & Dyer (1959), uma versão simplificada do procedimento clássico usando clorofórmio-metanol proposto por Folch et al. (1957) , adaptado por Manocha et al. (1970) e BRUM et al. (2004).

2.3.1 Ordem Mucorales

É a maior ordem dos Zygomycota (um filo não aceito na nova classificação, pois é polifilético), e hoje é classificado entre os Mucoromycotina (Hibbett *et al.*, 2007), um subfilo de fungos com 325 espécies conhecidas (Kirk *et al.*, 2008), da qual 90 são registradas no Brasil (Santiago, 2012). Estes fungos são caracterizados pela produção, durante a reprodução sexual, de zigosporos, que são esporos pigmentados de paredes espessas, em geral resistentes a condições estressantes. Mas frequentemente estes fungos se reproduzem assexuadamente, formando pequenos, esporangiósporos, hialinos, que também são responsáveis pela disseminação de espécies. O micélio é grosseiro, cenocítico e ricamente ramificado no qual vai afinando para pontos mais finos. Em culturas mais velhas, septos podem aparecer. Segmentos de micélio de paredes espessas (clamidósporos) podem ser cortados por tais septos (Webster & Weber, 2007). São principalmente sapróbios e são abundantes no solo, em fezes e em matéria orgânica em contato com o solo. Eles podem desempenhar um papel importante na colonização precoce de substratos. Por vezes, no entanto, podem comportar-se como agentes patogênicos fracos de tecidos moles de plantas, por exemplo, *Rhizopus stolonifer* pode causar podridão de batata-doce ou frutas, como maçãs, tomates e morangos (Samson *et al.*, 2002). Algumas espécies são parasitas de outros fungos, enquanto outros causam doenças em animais, incluindo o homem, especialmente os doentes que sofrem de diabetes, leucemia e câncer. Espécies de *Rhizopus* e *Mucor* são relatadas a partir de lesões humanas, e estes gêneros juntamente com espécies de *Absidia* também podem infectar animais domésticos (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Zycha e colaboradores (1969) deram uma explicação geral da taxonomia dos Mucorales, incluindo chaves para gêneros e espécies. Benny e colaboradores (2001) reconheceram 13 famílias e 57 gêneros. A classificação e identificação são baseadas em grande parte na morfologia do anamorfo. No entanto, a comparação de sequências de DNA indica que várias famílias e até mesmo alguns gêneros maiores são polifiléticos, o que significa que o esquema de classificação tradicional em nível de família é artificial (O'Donnell *et al.*, 2001).

O conhecimento da diversidade dos Mucorales é precário, especialmente em países com uma grande diversidade como o Brasil, onde as mudanças ambientais rápidas fazem o reconhecimento da biota uma questão mais urgente. No Brasil, esse grupo de fungos, principalmente, tem sido estudado nos Estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco e São Paulo

(Upadhyay, 1969; Lira, 1971; Viriato e Trufem, 1985; Alves *et al.*, 2002; Santiago e Souza-Motta, 2006). A região da Caatinga pernambucana é parte da diversidade biológica ainda pouco explorada no Brasil e, devido a características ambientais próprias, apresentam organismos resistentes a condições extremas (Sena *et al.*, 2006).

Na área de biorremediação, embora tenha sido menos frequentes comparado aos estudos com os basidiomycetes, os Mucorales tem se destacado na metabolização de um grande número de compostos, especialmente por desmetilação e oxidação, como a *Cunninghamella elegans* e *Umbelopsis isabellina* de corantes têxteis como mecanismo de bioabsorção pelo micélio (CHA *et al.* 2001; YANG *et al.* 2003; BERGSTEN-TORRALBA *et al.* 2009). Em estudo realizado por Ambrósio & Campos-Takaki (2004) *Cunninghamella elegans* apresentou capacidade de descolorir três corantes “azo” reativos (vermelho, preto e orange II) muito utilizados na indústria têxtil.

Por outro lado, muitos fungos mucoráceos são empregados nos processos de biotransformação (Kieslich, 1997). Além disso, muitas espécies são oleaginosas, isto é, eles são capazes de sintetizar e acumular lipídios para mais de 20% de sua biomassa seca. Pelo fato desses lipídios, principalmente triacilglicerol, poderem ser enriquecidos em ácidos graxos poliinsaturados, os membros oleaginosos dos Mucorales são de grande interesse biotecnológico.

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Mortierella sp.*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são mais intensamente estudados para a produção de ácidos graxos poliinsaturados. Os fungos filamentosos *Mortierella sp.* e *Cunninghamella echinulata*, são conhecidos por acumularem naturalmente elevadas concentrações do ácido gama linolênico, um ácido graxo essencial, possuindo várias funções importantes, dentre elas, a formação de prostaglandina. Seu uso é recomendado no tratamento de: tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e na pressão sanguínea alta. Este ácido vem sendo extraído de plantas, principalmente, prímula, mas determinados micro-organismos podem ser bons produtores, o que acarretaria algumas facilidades, como o não uso de grandes áreas de plantio. (SHAW 1965; KENNEDY, 1993; WYNN *et al.* 2001; SILVA *et al.* 2003; AHMED *et al.* 2006; JEENOR *et al.* 2006; CERTIK *et al.* 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas 10 espécies de fungos filamentosos da ordem Mucorales isoladas de solo da caatinga e mantidas no banco de cultura (UCP) do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco registrado na Rede de Micro-organismos do Norte e Nordeste - RENEBRA e na World Federation for Culture Collection - WFCC.

Tabela 1. Relação dos Mucorales utilizados no estudo.

Registro da UCP	Espécies
SIS 28	<i>Fennellomyces heterothallicus</i>
SIS 30	<i>Rhizopus arrhizus</i>
SIS 34	<i>Cunninghamella echinulata</i>
SIS 35	<i>Rhizopus stolonifer</i>
SIS 36	<i>Absidia cylindrospora</i>
SIS 37	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
SIS 38	<i>Cunninghamella phaeospora</i>
SIS 40	<i>Lichtheimia blakesleeana</i>
SIS 41	<i>Cunninghamella elegans</i>
SIS 45	<i>Mucor hiemalis</i>

3.2 REJEITOS AGROINDUSTRIAIS

Foram utilizados a *milhocina* procedente do beneficiamento do milho, cedido pela empresa Corn Products Brasil e o *efluente de sorvete* proveniente das lavagens das formas para produção de sorvetes, cedido pela Sorveteria Zeca's. A coleta do material orgânico foi realizada no tanque de decantação (Figura 2) da Estação de Tratamento de Efluentes, e em seguida o material foi acondicionado e transportado ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 2. Vista geral dos tanques de decantação (A), detalhe do tanque de coleta (B) da Estação de Tratamentos de Resíduos da Sorveteria Zeca's.



Fonte: A Autora, 2014

3.3 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura “Synthetic Medium for Mucorales – SMM” descrito por Hesseltine & Anderson (1957) foi utilizado como meio controle para o crescimento dos fungos durante o experimento. A composição do meio SMM é apresentada a seguir:

D-Glicose.....	40g
Asparagina.....	2g
Fosfato de potássio monobásico.....	0,5g
Sulfato de magnésio 7H ₂ O.....	0,25g
Cloridrato de Tiamina.....	0,5mg
Água destilada.....	1000ml
pH.....	6,0

Composição dos meios de cultura alternativos de baixo custo:

A- 5%, 10% e 15% de efluente de sorvete úmido em água destilada, pH 3,0;

B- 5%, 10% e 15% de efluente de sorvete liofilizado em água destilada, pH 3,0;

C- 5%, 10% e 15% de milhocina em água destilada, pH 4,5.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO

3.4.1 Crescimento Micelial Radial

Foi realizado um pré-inóculo em BDA (Batata Dextrose Agar) com os fungos escolhidos e incubados em BDO a 30°C por 5 dias. Posteriormente, dessas placas, foram retiradas discos de micélio de 8 mm e transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios de cultura alternativos: A- resíduo de sorvete úmido, B- resíduo de sorvete liofilizado e C- milhocina. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C por 120 h. Em intervalos de tempo de 24 h após a incubação, o crescimento micelial radial foi medido e o resultado expresso em milímetros (mm). Os experimentos foram realizados em triplicata e controle consistiu do crescimento micelial radial dos fungos em meio SMM. A velocidade de crescimento radial foi determinada pela declividade da reta obtida por regressão linear, conforme a Equação (1).

$$R(t) = a + V_{cr} \cdot t \quad (1)$$

Em que:

$r(t)$ é o raio da colônia (mm);

a é a constante da regressão linear,

V_{cr} é a velocidade de crescimento radial (mm.h⁻¹);

t é o tempo de cultivo (h).

3.4.2 Determinação da Esporulação das Colônias

A produção de esporos foi avaliada segundo Barbosa et al. (2002). Para tanto, escolheram-se, ao acaso, três placas de cada tratamento, retirando-se de cada uma, com auxílio de um furador, três discos de 8 mm de diâmetro, sendo um da região central, outro da região mediana e outro da região periférica das colônias. Os discos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo 10 ml de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p/v) e solução de Tween 80 (0,1% v/v). Após vigorosa agitação dos tubos, procedeu-se à contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

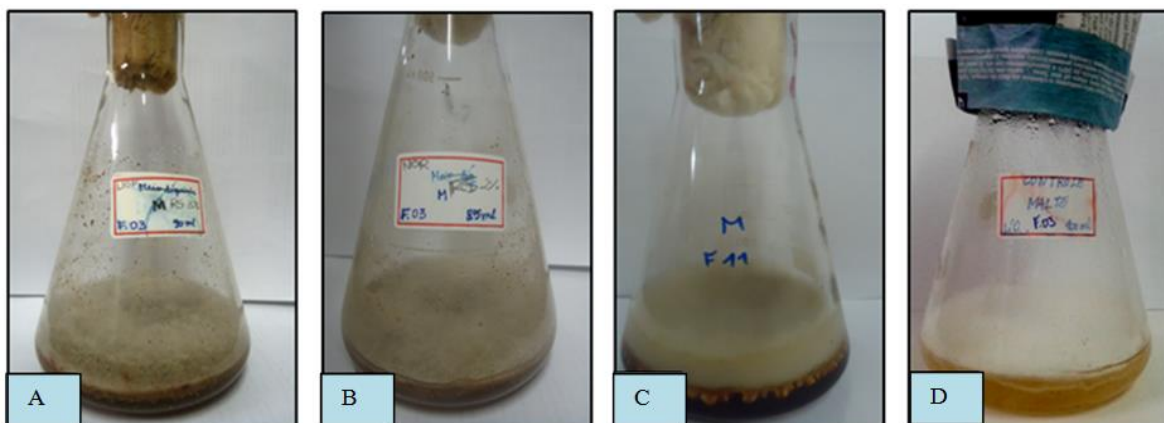
3.5 MACROMORFOLOGIA

Após o período de incubação dos fungos filamentosos foram observadas as características macroscópicas das colônias, tais como; tamanho, bordas, pigmentação, textura, cor da superfície, cor do reverso e formação de zonas.

3.6 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os fungos foram cultivadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio de cultura BDA mais cloranfenicol, durante 5 dias a 30°C (+2°C). Após esse período foram retirados aproximadamente 5 discos de cultura, com diâmetro de 8 mm, transferidos para os frascos de Erlenmeyer de 250 mL, sendo o primeiro contendo 100 ml de meio SMM, segundo com 100 ml de meio teste A (5% de efluente de sorvete úmido), terceiro com 100ml do meio alternativo B (5 % efluente de sorvete liofilizado) e o terceiro com 100 ml do meio teste C (5% do resíduo de milhocina). Todo o experimento foi realizado em triplicata. Os frascos inoculados foram incubados a 30°C por 5 dias em condições estáticas. Após este período a biomassa foi separada do líquido metabólico por filtração, lavada 3 vezes com água destilada esterelizada, submetida a liofilização e mantida em dessecador a vácuo até peso constante para determinação da biomassa seca. O valor final obtido correspondeu à média aritmética de três réplicas. Logo em seguida, as amostras foram submetidas aos estudos de extração de lipídeos e caracterização de ácidos graxos.

Figura 3. Biomassa crescida nos meios de cultura alternativos e controle. A- Efluente de Sorvete Liofilizado, B- Efluente de Sorvete Úmido, C- Resíduo de Milhocina e D- SMM.



Fonte: A Autora, 2014

3.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS TOTAIS

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por Manocha et al. (1980). 1,0 g de biomassa liofilizada foi submetida a extrações sucessivas com clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material submetido à agitação em vortex por 15 minutos e em seguida mantido a temperatura de 5°C. O sobrenadante foi separado da biomassa por centrifugação a 5000g, por 10 minutos e a biomassa submetida a uma nova extração. Os sobrenadantes contendo os extratos foram reunidos e evaporados no rota-evaporador. As respostas para produção de lipídeos foram calculadas em termo de concentração de lipídeos (g L^{-1}) ou lipídeos totais (%).

$$\text{Rendimento percentual de lipídeos totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)}}{\text{biomassa seca(g)}} \cdot 100$$

3.7.1 Metilação e Determinação dos Ácidos Graxos

A caracterização dos ácidos graxos foi baseada na metodologia de Dunlap e Perry (1967) apud Durham e Kloos (1978). Para extração, 10 mg de biomassa seca foi adicionada em tubos de ensaio com tampa de rosca, suspensos em 3 ml da solução trifluoreto-metano-boro a 14% e 3ml de benzeno, sendo este último removido e evaporado em atmosfera de nitrogênio. Os ácidos graxos convertidos em ésteres de metil foram suspensos em n-hexano. Foi utilizado um cromatógrafo modelo Agilent Technologies-7890A com injetor automático (Central Analítica - CETENE), equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano), 30m x 0,25mm. A temperatura do forno da coluna teve a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 150°C por 4 minutos; aumentando numa razão de $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até chegar a 250°C, assim permanecendo por 20 minutos. A temperatura do detector e do injetor foi de 280°C, usando o hélio ($1\text{cm}^3\text{min}^{-1}$) como gás de arraste. Os ésteres metílicos foram identificados pela comparação com tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma Aldrich) e quantificados por normalização de áreas por meio do *software* do equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL

A velocidade de crescimento radial dos fungos estudados foi avaliada para comparar a eficiência de crescimento nos diferentes meios alternativos e controle. Os valores do crescimento radial expressos em mm/h estão apresentados na Tabela 2. Esse dado é importante para se estabelecer um menor tempo de cultivo aos micro-organismos que apresentaram maior velocidade de crescimento radial. Os fungos cultivados no meio de cultura a base de Milhocina exibiram uma velocidade de crescimento radial bem similar nas concentrações testadas 5%, 10% e 15%, apresentando velocidade média de 0,6780mm/h, 0,6396mm/h e 0,6277mm/h respectivamente. O fungo *Rhizopus stolonifer* apresentou a maior velocidade de crescimento radial no meio alternativo de milhocina (5%) equivalente a 1,675mm/h, a qual foi igual à velocidade no meio controle (SMM). Já as espécies *Fennellomyces heterothallicus* e *Rhizopus arrhizus* apresentaram velocidade de crescimento radial 33% e 28% maior do que no meio controle.

Enquanto que no meio de cultura composto por Efluente Sorvete Úmido ou Liofilizado houve formação de colônia apenas na concentração de 5%. As espécies *R. arrhizus* e *R. stolonifer* foram as que melhor se adaptaram ao meio com Efluente de Sorvete mostrando uma velocidade média de 0,4187 mm/h e 0,4947 mm/h respectivamente (figuras 7-10).

Estes resultados estão em consonância com Silva 2007, que obteve resultados significativos no crescimento de *Rhizopus arrhizus* com a utilização da milhocina como substrato. Outros estudos utilizando meios alternativos como o de Janet et al. (2014), os quais demonstraram que meios formulados com casca de inhame, cenoura, batata doce e batata irlandesa propiciaram crescimento radial similar ou superior ao meio de cultura Sabouraud (controle). Além disso, Essien et al. (2005), demonstraram também que o fungo mucorales *Mucor hiemalis* é capaz de crescer bem em meio de cultura formulado com casca de banana.

Segundo Alberton et al (2009), efluentes de sorvete apresentam detergentes (hidróxido de sódio, metassilicato de sódio), desinfetantes (hipoclorito de sódio, clorexidina, compostos quaternários de amônio), componentes que podem inibir o crescimento de micro-organismos, principalmente em altas concentrações, como verificado neste estudo.

Estudos microbiológicos dependem da habilidade de manter e crescer micro-organismos em condições artificiais utilizando meios de cultura adequados que ofereçam condições favoráveis (Domsch and Anderson, 1980).

Nossos resultados sugerem que o meio formulado com milhocina proporcionou aos fungos mucorales condições de crescimento similares ao meio tradicional (controle) o que pode está relacionado a uma adequação deste resíduo às exigências nutricionais dos fungos.

Tabela 2. Velocidade de Crescimento Radial (mm/h) durante 120h de cultivo a 30° C nos meios alternativos A (EF. Úmido), B (EF. Lio), C (Milhocina) e SMM (controle).

Mucorales	MEIOS DE CULTURA					
	SMM	EF. ÚMIDO 5%	EF. LIO 5%	MILHOCINA		
				5%	10%	15%
<i>F.heterothallicus</i>	0,4188 ± 0,1	-	-	0,5583 ± 0,1	0,4187 ± 0,0	0,3353 ± 0,1
<i>R. arrhizus</i>	1,1 ± 0,0	0,4186 ± 0,2	0,4187 ± 0,2	1,4142 ± 0,3	1,3958 ± 0,2	1,391 ± 0,3
<i>C. echinulata</i>	0,5583 ± 0,1	0,0864±0,0	0,0870 ±0,0	0,4187 ± 0,1	0,335 ± 0,0	0,329 ± 0,1
<i>R. stolonifer</i>	1,675±0,0	0,4930±0,1	0,4947±0,0	1,675 ± 0,0	1,545 ± 0,1	1,524 ± 0,1
<i>A. cylindrospora</i>	0,5583± 0,1	-	-	0,4187 ± 0,1	0,4174 ± 0,1	0,4167 ± 0,1
<i>S. racemosum</i>	0,4188 ± 0,1	0,1531 ± 0	0,1840± 1	0,338 ± 0	0,335 ± 0	0,335 ± 0
<i>C. phaeospora</i>	0,5680± 0,2	0,1819±0	0,1698 ± 0,1	0,5583 ± 0	0,5546 ± 1	0,5523 ± 0
<i>L. blakesleeana</i>	0,5473±0,1	-	-	0,4187 ± 0	0,4183 ± 0,0	0,4172 ± 0,0
<i>C. elegans</i>	0,5793 ± 0,1	0,2812±0,1	0,2986± 0,1	0,5617 ± 0,1	0,5583 ± 0,1	0,5583 ± 0,1
<i>M. hiemalis</i>	0,5717± 0,1	0,0356± 0	0,0360± 0,0	0,4190 ± 0,0	0,4187 ±0,0	0,4187 ± 0,0

(-) sem crescimento Fonte: Dados da pesquisa

4.2 ESPORULAÇÃO EM MEIOS A BASE DE RESÍDUOS

Os resultados da esporulação mostram uma diferença de comportamento entre as espécies nos meios alternativos e controle (Tabela 3). Pode-se observar que todas as espécies cultivadas em milhocina nas concentrações de 5%, 10% e 15% esporularam melhor do que nos meios com resíduo de sorvete. No entanto, observamos que na concentração 5% os fungos apresentaram maior esporulação, embora não haja diferença significativa em relação às concentrações 10 e 15%. Em paralelo, a esporulação de todas as espécies testadas foi significativamente reduzida quando cultivadas nos meios a base de resíduo de sorvete.

Por outro lado, as espécies *Fennellomyces heterothallicus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Absidia cylindrospora* e *Syncephalastrum racemosum* cultivadas em milhocina esporularam mais do que no meio controle. Com destaque para a espécie *Fennellomyces heterothallicus* a qual apresentou um aumento de 95,6% na esporulação quando cultivada em milhocina em relação ao meio controle. Já as espécies *Mucor hiemalis*, *Lichthemia blakesleena* e *Cunninghamella echinulata* apresentaram um padrão de esporulação similar quando cultivadas nos meios milhocina e meio controle. Os resultados sugerem que o meio alternativo a base de milhocina favoreceu a esporulação da maioria das espécies em relação ao meio controle.

Nossos resultados corroboram o trabalho de Machado et al. (2009) que observaram bom crescimento e esporulação de cepas de *Lecanicillium lecanii* em vários meios de cultura formulados com resíduos e subprodutos agroindustriais, incluindo a milhocina.

Tabela 3. Esporulação das espécies de Mucorales estudadas (nº de conídios x 10⁵ / mL) no 10º dia de cultivo nos meios SMM (controle), A (EF. ÚMIDO), B (EF. LIO) e C (Milhocina).

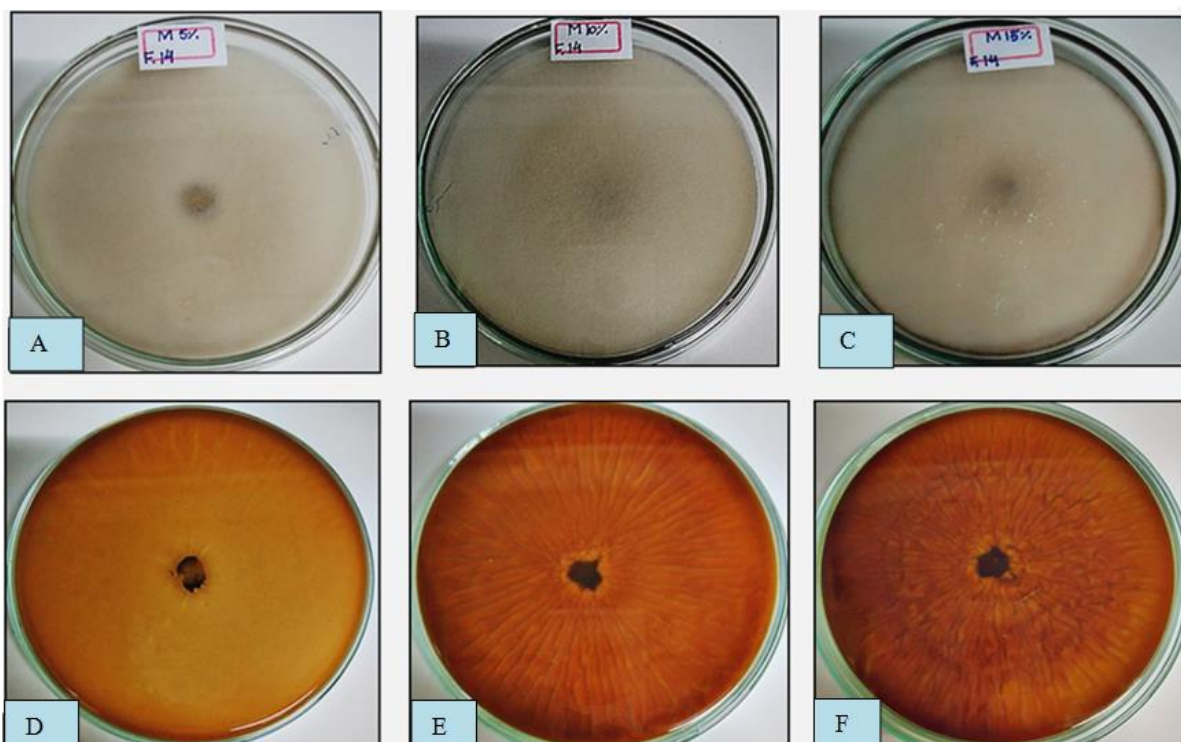
Mucorales	MEIO DE CULTURA					
	SMM	EF. ÚMIDO	EF. LIO	MILHOCINA		
				5%	10%	15%
<i>F.heterothallicus</i>	34,5	--	--	67,5	61,12	59,10
<i>R. arrhizus</i>	86,4	0,02	0,03	97,0	95,3	95,4
<i>C. echinulata</i>	16,1	0,01	0,01	13,5	12,1	12,0
<i>R. stolonifer</i>	30,3	0,02	0,01	40,9	40,1	38,3
<i>A. cylindrospora</i>	18,2	--	--	32,1	28,0	28,2
<i>S. racemosum</i>	35,2	0,01	0,01	45,2	42,3	42,1
<i>C. phaeospora</i>	38,2	0,03	0,03	20,5	21,2	18,3
<i>L. blakesleena</i>	35,7	--	--	27,8	24,2	24,8
<i>C. elegans</i>	64,2	0,03	0,01	30,1	30,0	29,5
<i>M. hiemalis</i>	17,2	0,01	0,02	10,3	9,8	10,0

(-) sem crescimento Fonte: Dados da Pesquisa.

4.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS

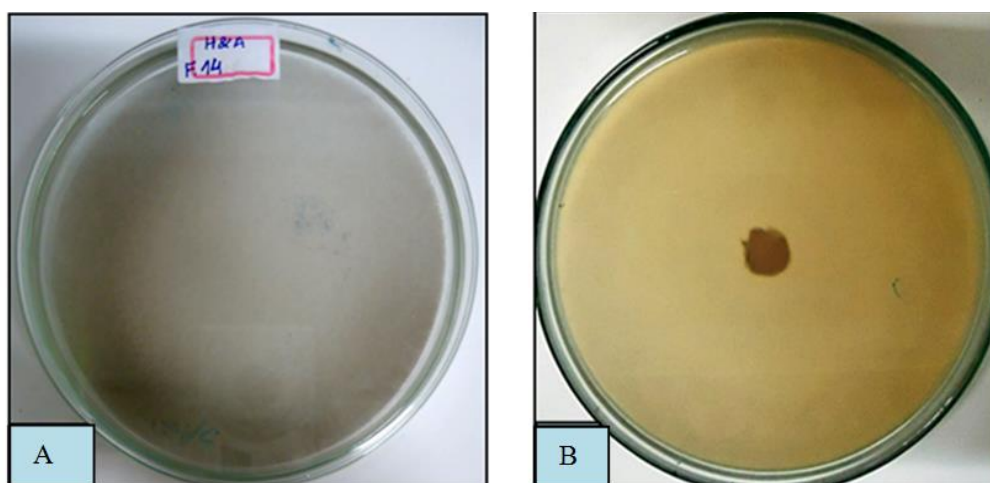
Foram observadas algumas alterações morfológicas nas colônias de algumas espécies crescidas em resíduo de milhocina, tais como, coloração: branca, acinzentada, branca levemente acinzentada com apiculamento ou fortemente acinzentada (verso) e relevo: leve ou com profundas crateras (reverso), (Figuras 4-13). Apenas *Absidia cylindrospora* e *Lichtheimia blakesleeana* não apresentaram alterações macroscópicas no meio com Milhocina.

Figura 4. Colônia de *Cunninghamella elegans* crescidas em meio de cultura, composto por resíduo de milhocina nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Verifica-se que os versos apresentam-se com a cor variando de branco a acinzentada (A-C) e os reversos exibem leves a profundas crateras (D-F).



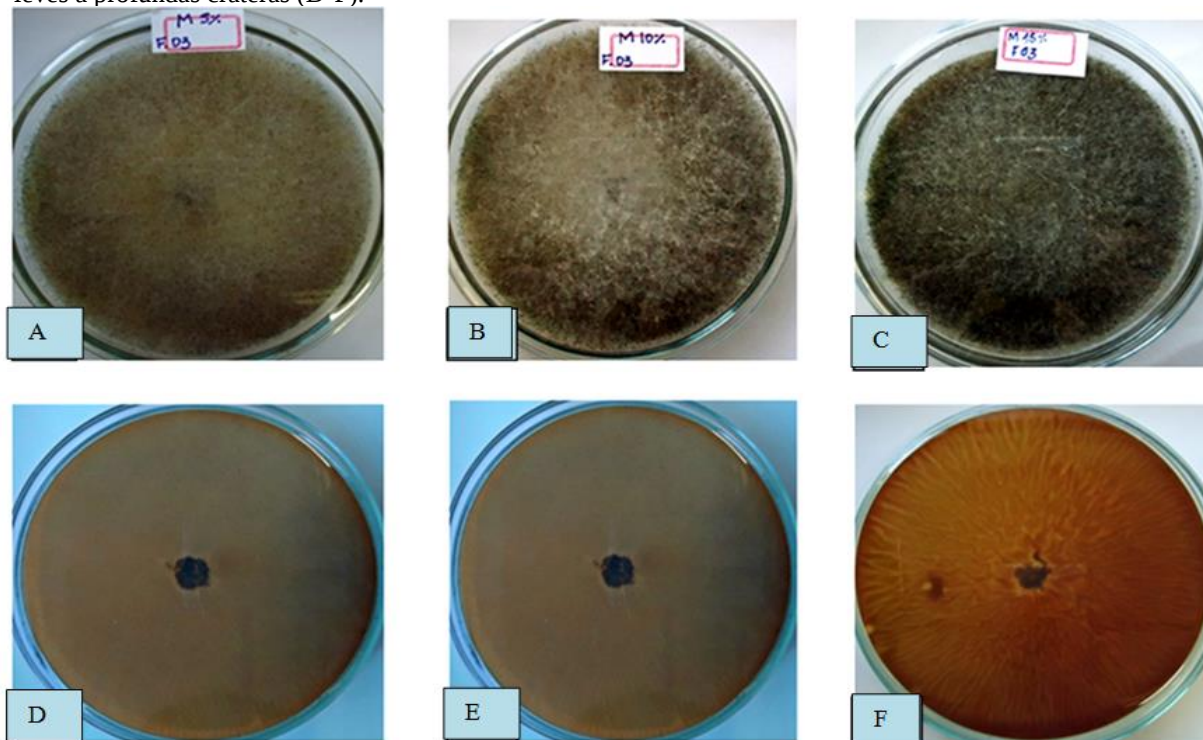
Fonte: A Autora, 2014

Figura 5. Colônia de *Cunninghamella elegans* crescidas em meio de cultura SMM. Verifica-se que o verso apresenta-se com cor acinzentada (A) e o reverso sem crateras (B).



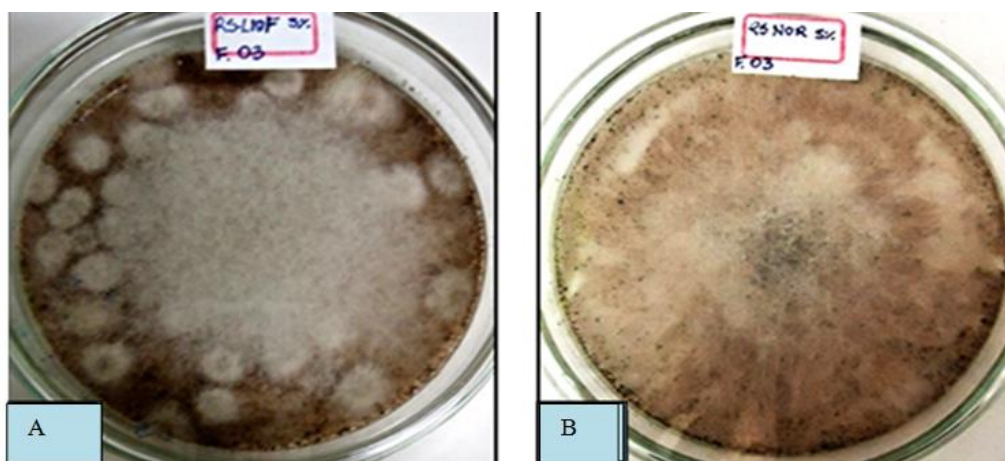
Fonte: A Autora, 2014

Figura 6. Colônia de *Rhizopus arrhizus* crescida em meio de cultura, composto por resíduo de milhocina 5%, 10% e 15%. Observa-se que os versos apresentam-se fortemente acinzentado (A-C) e os reversos com leves a profundas crateras (D-F).



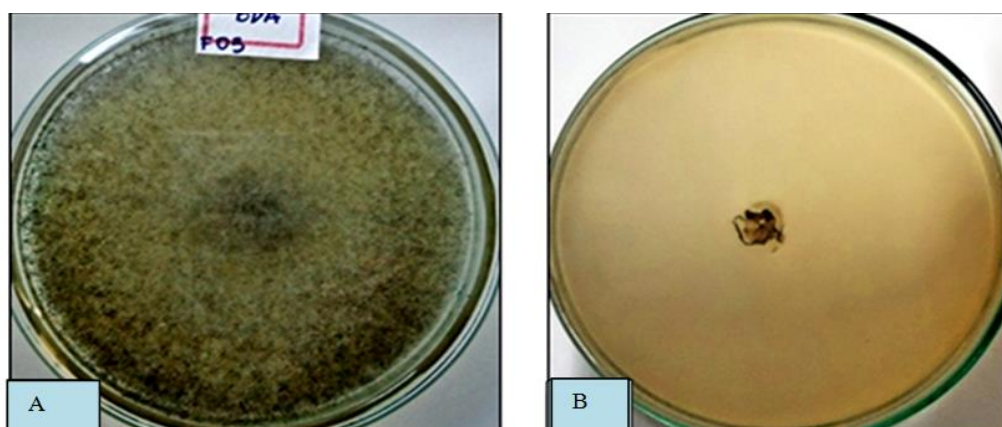
Fonte: A Autora, 2014

Figura 7. Colônia de *R. arrhizus* em meio de cultura composto por Efluente de Sorvete Liofilizado 5% (A) e Efluente de Sorvete Úmido 5% (B), nota-se que ambos versos apresentam-se brancos e apiculados.



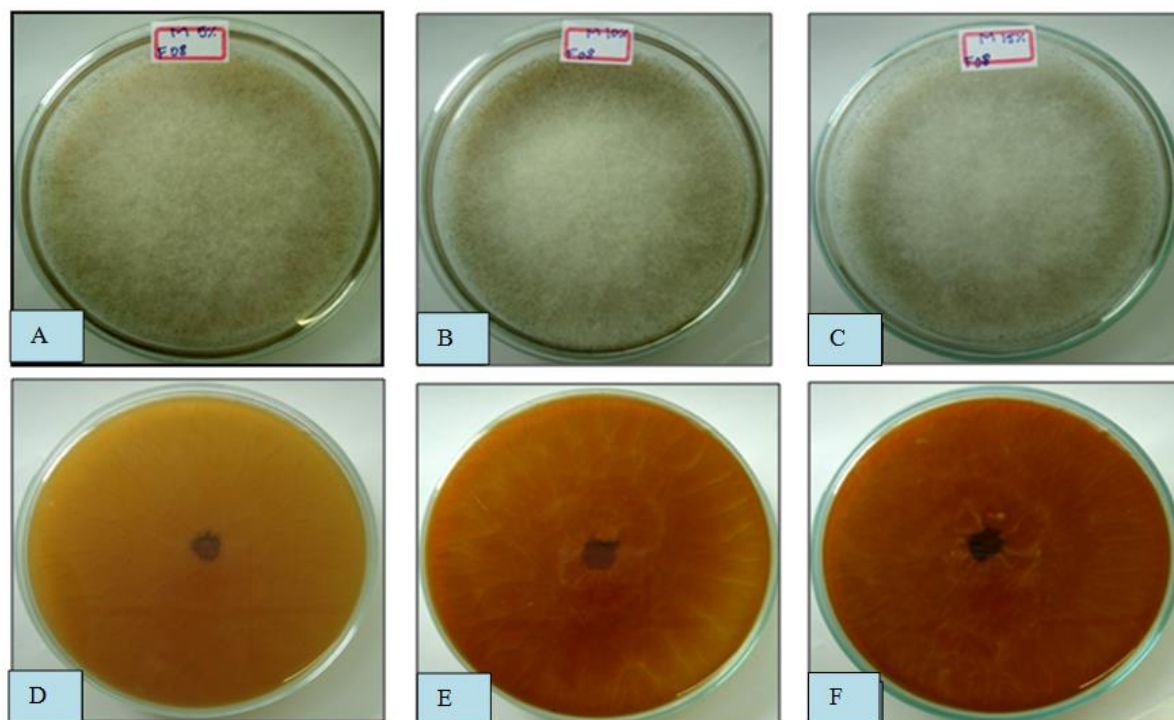
Fonte: A Autora, 2014

Figura 8. Colônia de *R. arrhizus* em meio de cultura SMM, observa-se que o verso encontra-se acinzentado (A) e reverso sem cratera (B).



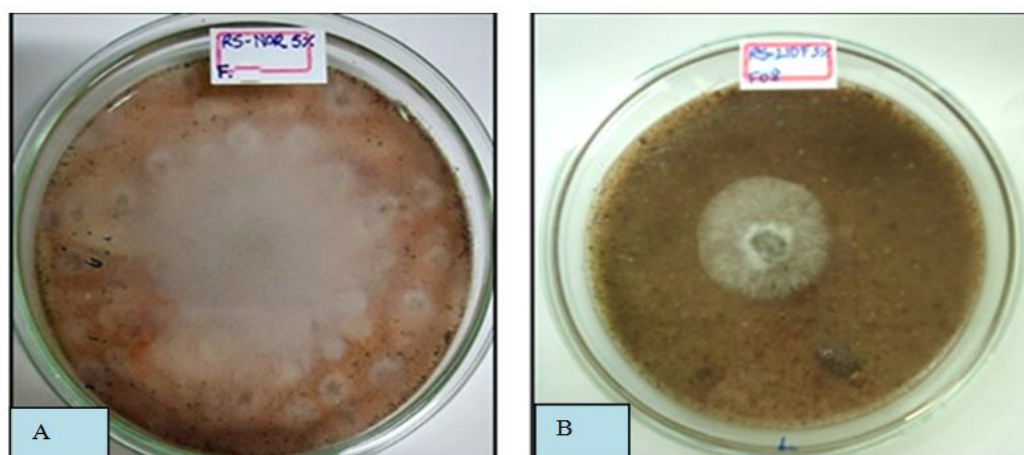
Fonte: A Autora, 2014

Figura 09. Colônia de *Rhizopus stolonifer* crescida em meio de cultura, composto por resíduo de milhocina 5%, 10% e 15%. Observa-se que os versos exibem cores de fortemente acinzentada (A-C) e os reversos com leves crateras (D-F).



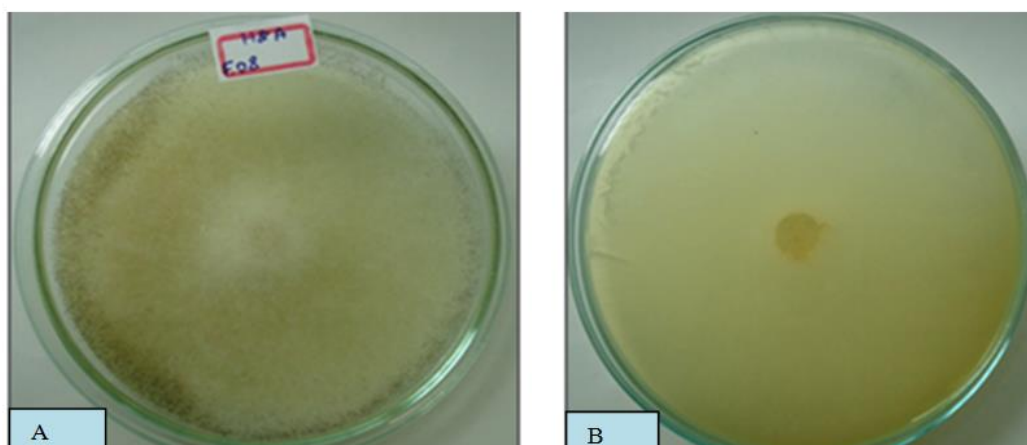
Fonte : A Autora, 2014

Liofilizado 5% (A) e Efluente de Sorvete Úmido 5% (B), nota-se que ambos versos apresentam-se brancos e apiculados.



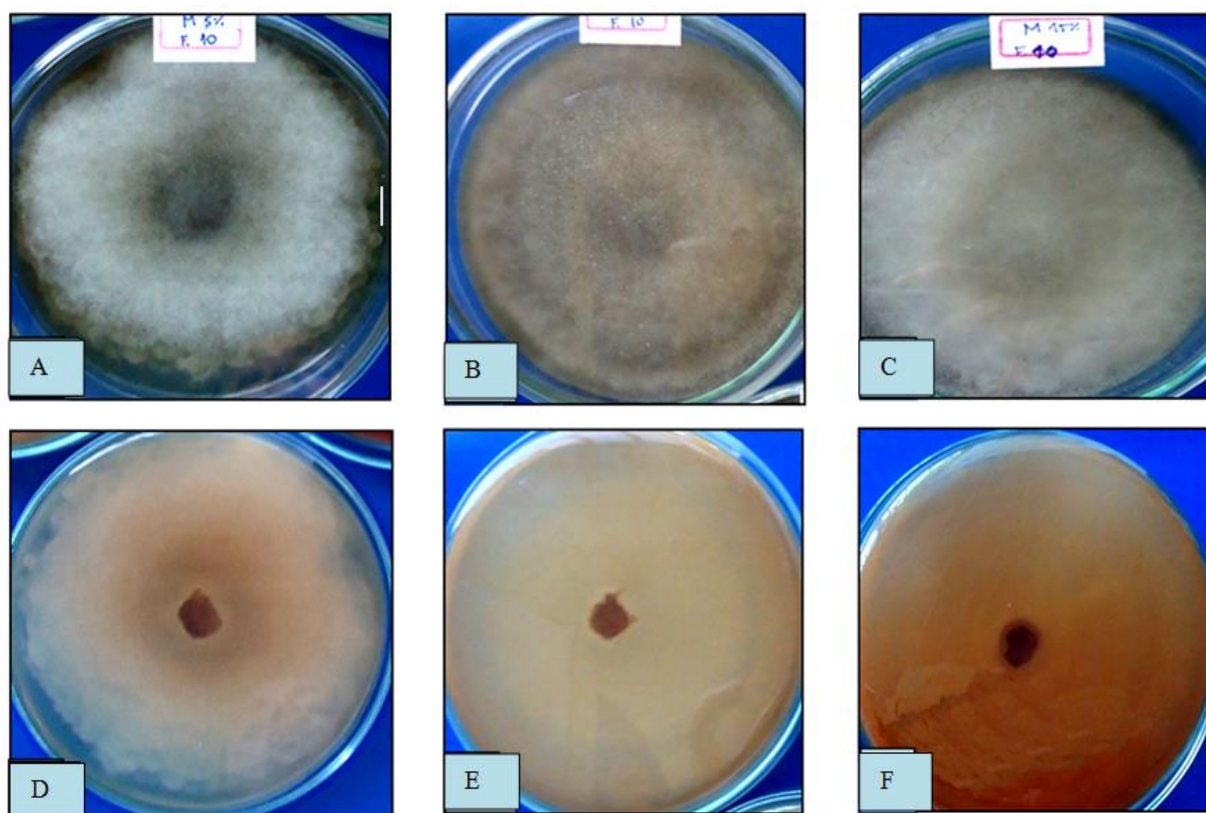
Fonte : A Autora, 2014

Figura 11. Colônia de *R. stolonifer* em meio de cultura composto por SMM, observa-se o verso branco levemente acinzentado (A) e reverso sem formação de crateras (B).



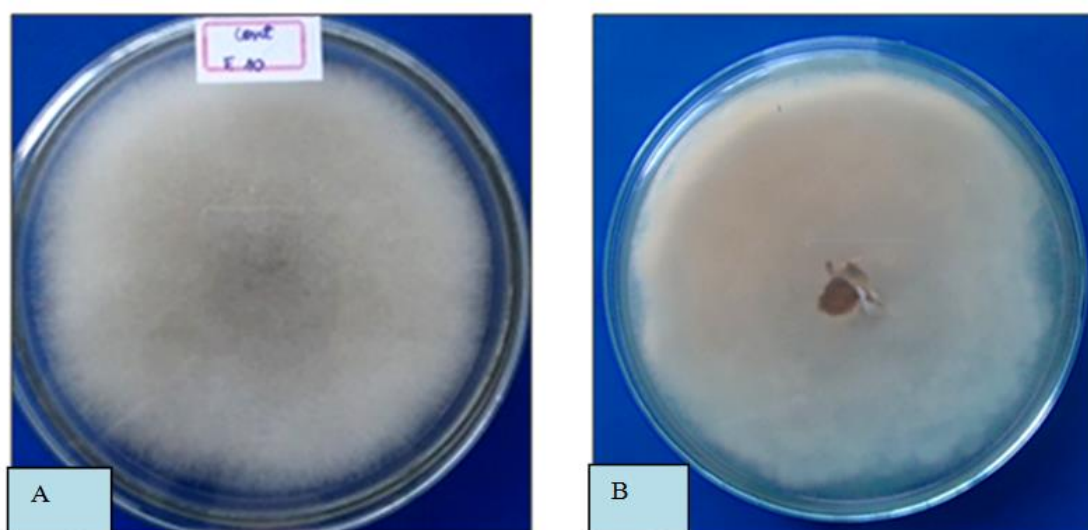
Fonte :A Autora, 2014

Figura 12. Colônia de *Syncephalastrum racemosum* crescida em meio de cultura composto por resíduo de milhocina 5%,10% e 15%. Percebe-se que os versos apresentam-se acinzentado com zonas concêntricas (A-C) e o reverso sem crateras (D-F).



Fonte: A Autora, 2014

Figura 13. Colônia de *Syncephalastrum racemosum* crescidas em meio de cultura SMM. Nota-se que o verso apresenta uma cor branca levemente acinzentada (A) e o reverso sem cratera (B).



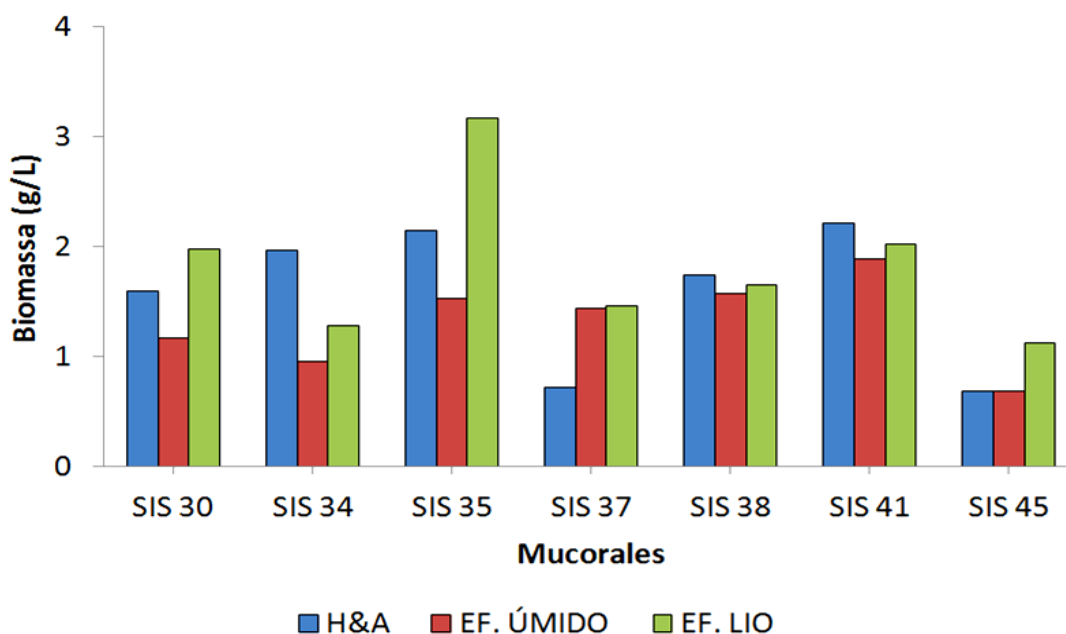
Fonte: A Autora,2014

4.4 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os resultados obtidos para produção de biomassa pelos fungos estudados em meios alternativos são apresentados nas figuras 14 e 15. Observa-se que todas as espécies de fungos produziram mais biomassa no meio com Milhocina a 5% do que no meio controle (SMM). Com destaque para *Mucor hiemalis* que produziu 3 vezes mais biomassa no meio alternativo a base de milhocida do que no controle. Enquanto que no efluente de sorvete liofilizado (5%) verificou-se que apenas as espécies de *Rhizopus arrhizus* (SIS 30), *Rhizopus stolonifer* (SIS 35) e *M. hiemalis* (SIS 45) produziram mais biomassa do que no controle. Os SIS 28, SIS 36 e SIS 40 não se desenvolveram nos meios com Efluentes de Sorvete.

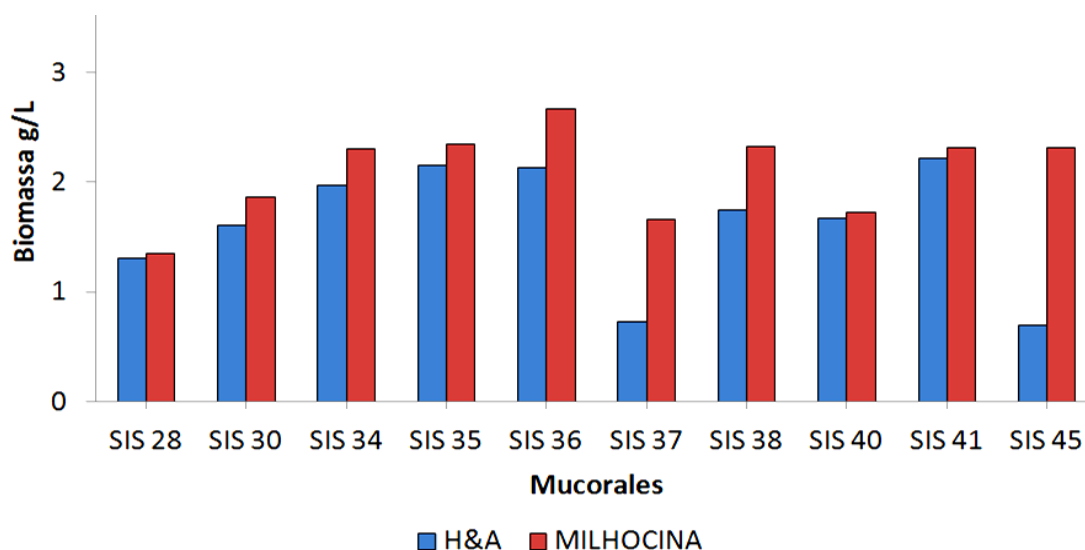
Estes dados estão em conformidade com os achados de Machado et al. (2009) os quais demonstraram que 2 cepas de *Lecanicillium lecanii* produziram mais biomassa quando cultivados em vários meios de cultura formulados com resíduos e subprodutos agroindustriais do que no meio controle.

Figura 14. Produção de biomassa das espécies de Mucorales cultivadas em meio controle Hessaltene & Anderson (H&A) e nos meios alternativos Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO) e Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) após 120h de incubação a 30°C.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15. Produção de biomassa das espécies de Mucorales cultivadas em meio controle Hessaltene & Anderson (H&A) e nos meio alternativo Resíduo de Milhocina após 120h de incubação a 30°C.



Fonte: Dados da pesquisa

No estudo Papanikolaou et al. (2004) em que o fungo *Mortierella sp.*, um fungo da ordem Mucorales, apresentaram crescimento significativo em concentrações de glicose, porém neste estudo o efluente de milho foi mais significativo também.

Silva (2007) relata ocorrência de uma maior produção de biomassa (16,7g/L) do fungo *Rhizopus arrhizus* em 72h, por fermentação submersa, apenas com milhocina a 8%, demonstrando que a milhocina pode funcionar como substrato essencial para o aumento da produção de biomassa.

É observado que o efluente de sorvete liofilizado em comparação ao próprio resíduo úmido, favoreceu a produção de biomassa dos mucorales. O processo de liofilização consiste em um congelamento rápido seguido de uma sublimação da água do resíduo, sem um agente crioprotetor, micro-organismos existentes do resíduo podem ser inibidos, favorecendo o crescimento do micro-organismo em estudo, já que não há competição pelos nutrientes presentes no efluente e as características nutricionais não são alteradas.

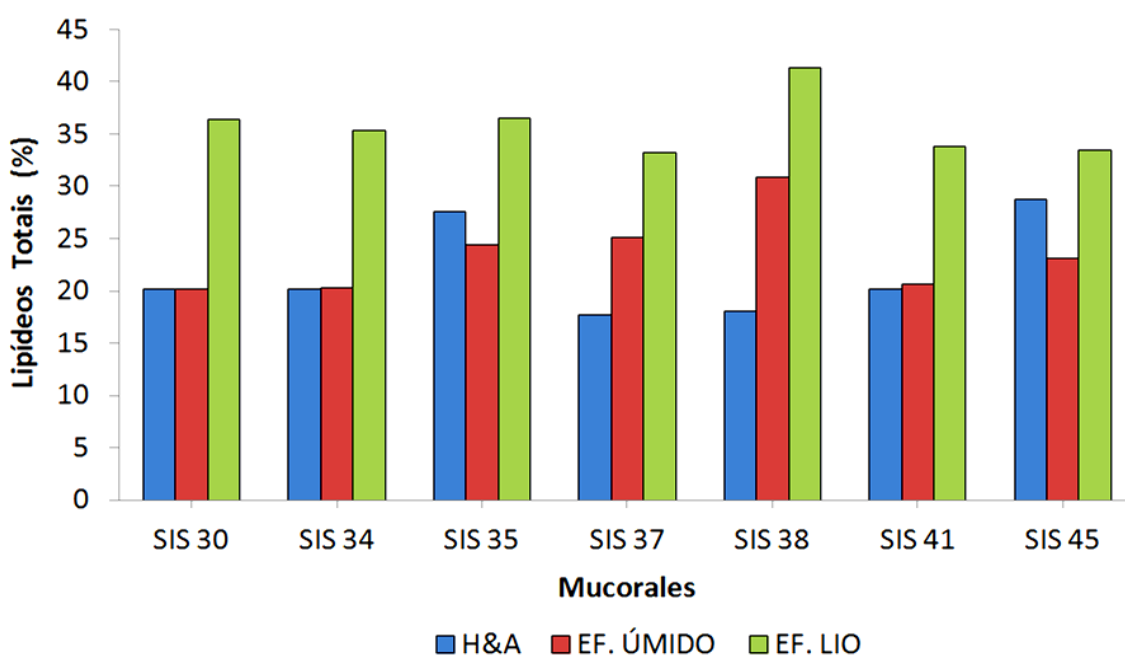
O resíduo de sorvete, além de apresentarem desinfetantes, a composição de ácidos graxos polinsaturados também podem resultar ainda mais a toxidade do meio, já que a remoção de átomos de hidrogênio leva a formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular, sofrendo o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil, este mesmo radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação com a abstração de átomos de hidrogênio

transformando-se em um peróxido lipídico. Os produtos finais (como malondialdeído e 4-hidroxyynonenal) da lipoperoxidação em níveis elevados atuam em processos citotóxicos e genotóxicos (HALLIWELL, 2007). Portanto, os micro-organismos que cresceram neste meio de cultivo possivelmente produziram enzimas antixiodantes significativas para se adaptarem ao substrato.

4.5 PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

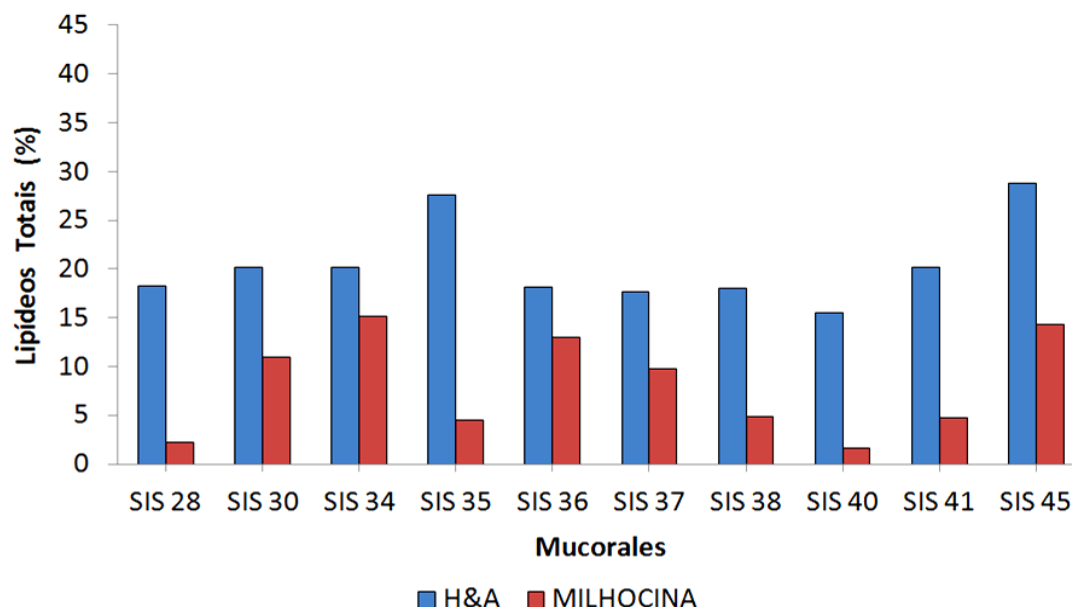
As figuras 16 e 17 a seguir demonstram a porcentagem de lipídeos totais extraída da biomassa seca dos micro-organismos onde se pode verificar que as maiores taxas de lipídeos foram geradas nos cultivos em Efluente Liofilizado e Úmido, seguido do meio sintético, e uma irrisória produção em resíduo de milhocina. Com destaque para os micro-organismos SIS 30, SIS 34, SIS 35 e SIS 38 que apresentaram a maior porcentagem de produção de lipídeos para o cultivo em Efluente Liofilizado, apresentando o seguinte rendimento: *Rhizopus arrhizus* 36,43%, *Cunninghamella echinulata* 35,40%, *Rhizopus stolonifer* 36,50% e *Cunninghamella phaeospora* 41,33%, equivalente ao rendimento lipídico de 0,50 g/L, 0,43 g/L, 1,13 g/L e 0,67 g/L de óleo respectivamente, ver tabela 5.

Figura 16. Percentual da produção de lipídeos totais das espécies de Mucorales cultivados em meio controle Hessaltene & Anderson (H&A) e nos meios alternativos Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO) e Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) em 120h de incubação a 300C.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17. Percentual da produção de lipídeos totais das espécies de Mucorales cultivados em meio controle Hessaltene & Anderson (H&A) e Resíduo de Milhocina em 120h de incubação a 300C.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4. Rendimento de produtividade de biomassa e lipídeo dos Mucorales crescidos em meio controle SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina.

Mucorales	SMM	EF. ÚMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
<i>F.heterothallicus</i>	0.23	-	-	0.03
<i>R. arrhizus</i>	0.30	0.23	0.50	0.20
<i>C. echinulata</i>	0.33	0.20	0.47	0.33
<i>R. stolonifer</i>	0.60	0.37	1.13	0.10
<i>A. cylindrospora</i>	0.37	-	-	0.33
<i>S. racemosum</i>	0.03	0.37	0.43	0.17
<i>C. phaeospora</i>	0.30	0.47	0.67	0.10
<i>L. blakesleeana</i>	0.27	-	-	0.03
<i>C. elegans</i>	0.63	0.37	0.67	0.10
<i>M. hiemalis</i>	0.20	0.17	0.37	0.33

(-) sem crescimento. Fonte: Dados da pesquisa

Como observado, quando os micro-organismos foram submetidos ao resíduo hidrofóbico, apresentaram resultados significativos na produção de lipídeos totais. Segundo Papanikolaou et al., 2002, substâncias hidrofóbicas são geralmente considerados como substratos ideais para a produção microbiana de óleo.

Além do ótimo resultado com cultivo no efluente de sorvete, os fungos estudados, também obtiveram resultados positivos em cultivo com meio composto por glicose. Estudos com *Cunninghamella echinulata* para a produção de ácidos graxos essenciais, demonstraram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para produção de biomassa e de lipídeos (GEMMA et al. 2002).

Os lipídeos intracelulares podem ser acumulados através de duas vias: síntese *de novo*, tendo a acetil-coenzima A (acetil – CoA) e malonil-CoA como precursores, a partir de carboidratos não oleaginosos e sua via biossintética de armazenamento de lipídeos (via Kennedy) e, a via de acumulação *ex novo*, que envolve a captação de ácidos graxos, óleos e TAG do meio de cultura e seu acúmulo em forma não-modificada ou modificada no interior da célula (POLI, 2014). Na via acumulativa *ex novo*, ocorre a hidrólise do substrato hidrofóbico, transporte dos ácidos graxos liberados dentro da célula, onde através destes são remontados em TAG e em frações de esteroil éster (ES) gerando um acúmulo dentro dos corpos lipídicos (BEOPOULOS et al., 2009).

4.5.1 Produção Dos Ácidos Graxos

Foram selecionados para caracterização dos ácidos graxos os fungos que apresentaram rendimento lipídico igual ou superior a 20%. Sendo assim, a análise de perfis dos ácidos graxos deu-se para as seguintes espécies: *Rhizopus arrhizus*, *Cunninghamella echinulata*, *Rhizopus stolonifer*, *Cunninghamella phaeospora*, *Cunninghamella elegans* e *Mucor hiemalis*. Os resultados obtidos para produção de ácidos graxos pelos respectivos fungos cultivados nos meios alternativos e controle podem ser observados nas tabelas 5-11.

Tabela 5. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Rhizopus arrhizus* (SIS 30).

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	27,87%	49,89%	54,44%	28,49%
Ácido esteárico (C18: 0)	27,15%	9,67%	9,98%	34,71%
Ácido oleico (C18: 1)	36,72%	31,78%	28,70%	13,4%
Ácido linoleico (C18: 2)	8,98%	8,64%	6,87%	6,14%
Ácido γ -linoleioco (C18: 3)	--	--	--	--

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

A espécie *Rhizopus arrhizus* (SIS 30) cultivada em meio com glicose (controle) exibiu 55,02% de ácidos graxos saturados, 36,72% de monoinsaturado (ácido oléico) e 8,98% de poliinsaturado (ácido linoleico). No entanto, quando cultivado em efluente de sorvete úmido produziu 59,56% de ácidos graxos saturados, 31,78% de ácido graxo monoinsaturado e 8,64% de ácido graxo poliinsaturado. Adicionalmente, quando cultivado em efluente de sorvete liofilizado, apresentou 64,42% de ácidos graxos saturados, 28,70% de monoinsaturado e 6,87% de ácido poliinsaturado; Por outro lado, no cultivo em milhocina obtiveram-se 63,2 % ácidos graxos saturados, 13,4% de monoinsaturado e 6,14% de pollinsaturados. APÊNDICES A-D.

O perfil de ácidos graxos produzido por *Rhizopus arrhizus* é compatível com a produção de biodiesel uma vez que a presença de aproximadamente 50% de ácidos graxos saturados favorece a qualidade de ignição. Não existe um único ácido graxo que é responsável por toda a propriedade particular do combustível (ISLAM et al., 2013). A presença de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, como o oléico e linoléico, respectivamente é interessante para a produção de biodiesel, pois apresentam pontos de fusão de -5°C para o linoléico e 4°C para o oléico, o que dificulta o congelamento do produto (VIEIRA et al., 2010). Todavia, o perfil de ácidos graxos apresentado quando do cultivo em milhocina não foi favorável à produção de biodiesel, devido ao excesso de ácidos graxos saturados (63,2%) e

pouca produção de monoinsaturado (ácido oleico), o que pode promover o entupimento devido ao congelamento do biocombustível (VIEIRA et al., 2010). No Brasil, as temperaturas são amenas, não apresentando este problema, mas representam um sério problema para regiões climáticas de temperatura baixa e moderada (KNOTHE et al., 2008, ISLAM et al., 2013).

Tabela 6. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Cunninghamella echinulata* (SIS 34) em 120h.

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	30,87%	38,06%	42,05%	28,89%
Ácido esteárico (C18: 0)	41,44%	--	--	--
Ácido oleico (C18: 1)	07,15%	19,39%	19,48%	08,45%
Ácido linoleico (C18: 2)	26,72%	35,56%	35,62%	59,68%
Ácido γ -linolenico (C18: 3)	2,34%	10,01%	6,87%	4,31%

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

O perfil de ácidos graxos produzido pelo fungo *Cunninghamella echinulata*, é promissor para produção dos ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico (C18:2) e ácido γ -linolênico (C18:3). Esta espécie já foi mencionada em vários estudos como bom produtor desses ácidos graxos tendo ultimamente o maior interesse na produção de γ -linolênico (Gemma et al. 2002; Kavadia et al. 2001). Gemma et al. (2002) ao cultivar *C. echinulata* em meio com glicose e cascas de laranjas, verificou que a glicose como fonte de carbono proporcionou maior produção de ácido γ -linolênico do que no meio a base de resíduo. Entretanto, neste estudo a melhor produção do ácido graxo γ -linolênico ocorreu no cultivo em resíduo de sorvete, ao contrario do meio de glicose (controle).

Além da produção de ácidos graxos polinsaturados de importância farmacêutica, o perfil de ácidos graxos, mostra-se similar com o perfil do óleo de soja, principal matéria prima para produção de biodiesel, constituído de ácido linoléico (54,5%) e oléico (22,3%), sendo os

demais saturados. Com exceção do meio de glicose, os meios de cultivo com resíduo apresentaram ácidos graxos saturados aceitáveis para produção de biodiesel.

Tabela 7. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Rhizopus stolonifer* (SIS 35) em 120h.

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	22,73%	19,76%	20,01%	23,98%
Ácido esteárico (C18: 0)	19,15%	--	--	16,41%
Ácido oleico (C18: 1)	23,79%	39,58%	30,08%	14,78%
Ácido linoleico (C18: 2)	31,72%	33,58%	31,28%	25,65%
Ácido γ -linoleioco (C18: 3)	3,72%	10,03%	11,56%	--

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

Assim como a *C. echinulata*, o fungo *Rhizopus stolonifer*, mostra-se promissor na produção de ácidos graxos essenciais. Assim como bom produtor de ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado cuja presença em porcentagem elevadas apresenta maior estabilidade à oxidação em comparação a outros insaturados. Ésteres de ácidos graxos insaturados, especialmente poliinsaturados dificultam o congelamento, devido aos seus pontos de fusão mais baixos, que são desejáveis, mas também reduzem o número de cetano e a estabilidade de oxidação, que é indesejável para o combustível (KNOTHE, 2009).

Tabela 8. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Cunninghamella phaeospora* (SIS 38) em 120h.

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	18,64%	34,74%	38,67%	30,61%
Ácido esteárico (C18: 0)	43,22%	--	--	18,22%
Ácido oleico (C18: 1)	17,18%	18,52%	19,41%	10,18%
Ácido linoleico (C18: 2)	17,56%	36,30%	34,32%	27,18%
Ácido γ -linoleico (C18: 3)	6,65%	11,11%	14,03%	1,65%

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

O perfil apresentado por *C. phaeospora*, mostra-se bastante similar a espécie *C. echinulata*, sendo estes promissores na produção do ácido linoléico e ácido γ -linolênico no cultivo em resíduo de sorvete. Segundo Perini et al. (2010) o ácido linoléico é um ácido graxo essencial na dieta humana, sendo precursor do ácido araquidônico. Já o ácido γ -linolênico é um importante intermediário na biossíntese de prostaglandina biologicamente activo a partir de ácido linoleico (CARVALHO et al, 1999).

Tabela 9. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Cunninghamella elegans* (SIS 41) em 120h.

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	24,78%	47,01%	54,44%	23,54%
Ácido esteárico (C18: 0)	30,36%	11,33%	9,98%	21,29%
Ácido oléico (C18: 1)	33,51%	32,52%	28,70%	28,01%
Ácido linoleico (C18: 2)	09,05%	9,12%	6,87%	4,45%
Ácido γ -linolenico (C18: 3)	--	--	--	--

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

Ao contrário das espécies *C. echinulata* e *C. phaespora*, a espécie *C. elegans* não produziu ácido γ -linolênico em nenhuma das fontes nutricionais. O perfil apresentado mostra-se regular para produção de biodiesel, assim como o *R. arrhizus*, devido a grande quantidade de ácidos graxos saturados. Porém, como já foi mencionado, em países tropicais, o biodiesel produzido por valores significantes de ácidos graxos saturados não representam o problema de entupimento, devido ao clima, e mais, ácidos graxos saturados favorece a qualidade de ignição

Devemos considerar que, embora o óleo de soja seja a principal fonte para produção de biodiesel no Brasil, os ácidos graxos, insaturados particularmente o linoléico e o oléico, e o linolênico são os que se destacam da fração lipídica do óleo de soja, por serem facilmente oxidados, devido o número de insaturações na cadeia carbônica, um fator decisivo para a velocidade da reação. A oxidação causa um aumento da sua viscosidade e em estágios mais avançados, produzem materiais insolúveis que podem entupir os filtros de combustíveis e a elevação da acidez e a presença de hidroxiperoxido, podem ocasionar a corrosão do sistema de injeção (MONEYEM; Van GERPEN, 2001).

O óleo de dendê, por exemplo, apresenta grande vantagem na produção de biodiesel, a alta estabilidade oxidativa, por apresentar teores elevados de ácidos graxos saturados (Barreto et al. 2014). Mas não devemos esquecer, um dos fatores limitantes da utilização de biodiesel com alta presença de ácidos graxos saturados: o ponto de solidificação do biodiesel. O biodiesel de dendê o ponto de solidificação é muito alto, em torno de 15°C positivos (Teixeira et al, 2005).

Tabela 10. Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em SMM, Efluente de Sorvete Úmido (EF. ÚMIDO), Efluente de Sorvete Liofilizado (EF. LIO) e Resíduo de Milhocina, da espécie: *Mucor hiemalis* (SIS 45) em 120h.

ÁCIDOS GRAXOS	Meio de Cultura			
	SMM	EF. UMIDO	EF. LIO	MILHOCINA
Ácido palmítico (C16: 0)	26,05%	31,87%	36,25%	25,70%
Ácido esteárico (C18: 0)	--	--	1,55%	--
Ácido oleico (C18: 1)	63,36%	39,36%	40,55%	31,20%
Ácido linoleico (C18: 2)	10,58%	19,59%	13,61%	20,78%
Ácido γ -linoleioco (C18: 3)	--	09,16%	08,06%	02,30%

(-) não detectado. Fonte: Dados da pesquisa

O perfil de ácidos graxos apresentados pelo microorganismo *Mucor hiemalis*, mostra-se viável para produção de biodisel, tanto cultivado em meio com glicose, como nos resíduos a 5%. Em meio com resíduos, apresentou também potencial na produção de ω -6 (ácido γ -linolênico).

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Mortierella sp.*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são mais intensamente estudados para a produção de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o ácido γ -linolênico (ω -6) (SHAW 1965; KENNEDY 1993; WYNN et al. 2001; AHMED et al. 2006; CERTIK et al. 2006).

Em uma análise geral, o perfil de ácidos graxos apresentados pelos Mucorales estudados, mostra-se similares ao da literatura. Trabalhos anteriores com fungos da ordem Mucorales, como por exemplo *M. circinelloides*, *C. echinulata*, *R.stolonifer*, apresentaram o mesmo perfil de ácidos graxos obtidos neste trabalho, a dominância dos picos alcançados nas análises cromatográficas, do ácido oléico, ácido palmítico e ácido linoléico (PAPANIKOLAOU et al. 2004).

4.6 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO EFLUENTE DE SORVETE

As análises cromatográficas identificaram sete tipos de ácidos graxos tanto para o efluente de sorvete úmido como liofilizado, ver tabela 12.

Tabela 11. Perfil de Ácidos graxos saturados e insaturados identificados no resíduo de sorvete.

Ácido Graxo	Resíduos do sorvete (%)	
	Úmido	Liofilizado
Ácido palmítico C16:0	38,91	42,92
Ácido oleico C18:1	34,41	31,57
Ácido γ -linoleico C18:3	2,88	2,68
Ácido esteárico C18:0	7,60	8,60
Ácido láurico C12:0	5,25	4,55
Ácido mirístico C14:0	3,35	3,10
Ácido linoleico C18:2	7,57	6,48

Fonte: Dados da pesquisa

Pode-se observar que o efluente de sorvete é um resíduo hidrofóbico apresentando altos níveis de ácido palmítico e ácido oléico. A presença de lipídios no resíduo de sorvete está associada ao leite usado na fabricação do sorvete e que por consequência contribuem para a composição do efluente (ALBERTON, 2009). Furtado (2003), afirma que aproximadamente 70% dos ácidos graxos dos triacilgliceróis do leite são saturados, 25% são ácidos graxos monoinsaturados e 5% são poliinsaturados.

Segundo Beopoulos (2009), os fungos, como a *Yarrowia lipolytica* tem desenvolvido mecanismos sofisticados para o uso eficiente de substratos hidrofóbicos. Esses mecanismos são reforçados pelas muitas saliências na superfície da célula, facilitando a absorção de substratos hidrofóbicos a partir do meio (Via de síntese *ex-novo*). Como analisado neste estudo o efluente de soverte influenciou muito no acúmulo de lipídeos pelas espécies de Mucorales estudadas. Ao analisarmos o perfil de ácidos graxos produzidos pelos fungos a partir do efluente de soverte em comparação com os meios hidrofílicos, verificamos que o ácido palmítico foi bastante significativo em *R. arrhizus* (49,89% em resíduo úmido e

54,44% em resíduo liofilizado) e *C. elegans* (47,01% em resíduo úmido e 54,44% em resíduo liofilizado).

A levedura *Y. lipolytica* adaptou-se a utilização de substratos hidrofóbicos pela expressão de genes que codificam biossurfactantes, os quais solubilizam o substrato e assim facilitam o contato célula-substrato e pelo desenvolvimento de mecanismos complexos de transporte para a incorporação destes compostos na célula (BEOPOULOS et al. 2009). Papanikolaou et al. (2002) analisaram o crescimento e absorção de ácidos graxos por *Y. lipolytica* em várias misturas de estearina e óleo de colza hidrolisado. Independentemente do perfil de ácidos graxos presentes no meio, todos os ácidos graxos apresentaram constantes de incorporação semelhantes à captação, com a exceção de C16: 0 (ácido palmítico) e C18: 0 (ácido esteárico) que tinham quantidades inferiores no meio. No entanto, a *Y. lipolytica* quando cultivada em ácidos graxos saturados por si só, as constantes de incorporação de ácido palmítico e ácido esteárico foram significativamente mais elevado

5 CONCLUSÕES

- ❖ A velocidade de crescimento radial dos fungos estudados no meio de cultura a base de Milhocina foi tão eficiente quanto no meio controle (SMM);
- ❖ O meio de cultura alternativo contendo milhocina proporcionou o aumento da esporulação dos fungos;
- ❖ O meio de cultura alternativo constituído por resíduo da produção de sorvete liofilizado propiciou maior acúmulo de lipídios totais por todas as espécies estudadas;
- ❖ O resíduo de sorvete demonstra ser um excelente substrato com potencial de aplicação para produção de lipídeos e ácidos graxos por *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Cunninghamella phaeospora* e *Cunninghamella elegans*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, DAYANE. *Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, p. 20-28, Curitiba, dez. 2009.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C. W. BLACKWELL M. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley, 1996.
- AKI, T; NAGAHATA, Y; ISHIHARA, K; TANAKA, Y; MORINAH, T; HIGASHIYAMA, K; AKIMOTO, K; FUJIKAWA, S; KAWAMOTO, S; SHIGETA, S; ONO, K; SUZUKI, O. *Production of arachidonic acid by filamentous fungus, Mortierella alliacea strain YN-15*. J. Amer Oil Chem Soc. 78: 599-604. 2001.
- ALVES, M.H; TRUFEM, S.F.B; MILANEZ, A.I. *Táxons de Mucor Fresen (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil*. Rev Bras Bot. 25: 147-160. 2002.
- ALBERTON, DAYANE. *Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, p. 20-28, Curitiba, dez. 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre; Artmed, 2004. 1.463p.
- 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, 2006.
- AGEITOS, J. M., VALLEJO, J. A., VEIGA-CRESPO, P., & VILLA, T.G. *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011.
- AKHTAR, M. *An overview of biomechanical pulping research*. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley and Sons. 1998.
- AMARTEY A. LEUNG J. *Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by bacillus stearothermophilus t-13*. Bulletin of the Chemists and Technologists. Londres, 2000.
- BARRETO, A. J. B.; MENDES, D.; JÚNIOR, J. A. F.; SOUZA, J.; COIMBRA, M. D. J. *Estudo da avaliação do biodiesel no óleo diesel*. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. Anais...Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007. 1 CD-ROM
- BELLOU, S; MAKRIA, A; SARRISB, D; MICHOSA, K; RENTOUMIA, P; CELIK, A; PAPANIKOLAO, S; AGGELISA, G. 2014. *The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes*. Journal of Biotechnology. 170: 50-59.

BENNY, G.L. 2001. Zygomycota: Trichomycetes. In *The Mycota VIIA: Systematics and Evolution*, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: Springer-Verlag.

BENNY, G.L; HUMBER, R.A; MORTON, J.B. Zygomycota: Zygomycetes. In *The Mycota VIIA: Systematics and Evolution*, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: Springer-Verlag.2001.

BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation*. Biochimie.Vol. 91 2009.

BOSWELL, K; KOSKELO, E.K; CARL, L; GLAZA, S; HENSEN, D.J; WILLIAMS, K.D. *Preclinical evaluation of single cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docashexaenoic acid*, Food Chem. Toxicol 34: 585–593.1996.

BURTON, G. R. W. & ENGELKIRK, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*. 5ª Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1998. 289 p.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - ANVISA. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Diário Oficial da União. Brasília, 10 de dezembro de 2004.

Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Resolução no 358 de 29 de abril de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005. Diário Oficial da União. Brasília, 04 de maio de 2005.

BURTON, G. R. W. & ENGELKIRK, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*. 5ª Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1998. 289 p.

CASTRO, A.J.P; FRANCO, L.J. *Caracterização do consumo de adoçantes alternativos e produtos dietéticos por indivíduos diabéticos*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, São Paulo, 46 (3): 280-287.2002.

ČERTIK, M; BALTESZOVA, L; ŠAJBIDOR, J. *Lipid formation and γ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil*. Letters in Applied Microbiology. 25: 101–105.1997.

CHENG, M.H; WALKER, T.H; HULBERT, G.J; RAMAN, D.R. *Fungal production of eicosapentaenoic acid and arachidonic acids from industrial waste streams and crude soybean oil*. Bioresource Technol. 67: 101–110.1999.

CHOI, S.Y; RYU, D.D.Y; RHEE, J.S. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. Biotechnology and Bioengineering. 24: 1165–1172. Bononi, V. L. R., Trufem. S. F. B. 1998. (Org.) *Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicação biotecnológicas*. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente. p.181-84.1982.

CLARKE, C. The science of ice cream. *Chemistry and industry*. 24 (19): 22-23.2005

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). Universidade Estadual de Paulista, Instituto de Biociências.2006

CARLILE, M.J., WATKINSON, S.C., 1996. *The Fungi*. Tokyo, Academic Press. p. 385.

CASTRO, L. M. D., GARCÍA-AYUSO, L. E.. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta, Amsterdam*, v. 369, p. 1-10.

CARVALHO, P.O., OLEIVEIRA, J.G. PASTORE, G.M. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* spLB-54 by growth temperature.Rev. Microbiol. São Paulo, 1999.

CARIOCA, J. O. B.; ARORA, H. L. *Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas*. UFC. Fortaleza, 1984.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal Bioscience Bioengineering*, 87 (1), 1-14 1999.

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. 2006.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. *Production of volatile compounds by Geotrichum fragrans using cassava wastewater as substrate*. Process Biochemistry, 39: 411-414, 2003

DEVEN, J. M., MANOCHA, M. S. 1975. *Effect of glutamic acid on the fatty acid and lipid composition of Choanephora cucurbitarum*. Can. J. Microbiol., v.21, n.11, pp.127-133.1975.1975

DU PREEZ, J. C., IMMELMAN, M., KOCK J. L., KILIAN, S. G.1995. *Production of gamma-linolenic acid by Mucor circinelloides and Mucor rouxi with acetic acid as carbon substrate*, Biotechnology Letters. Dordrecht, v17, n.9. pp.933-938.1995

DEMAIN, A. L., ADRIO, J. L. *Contributions of microorganisms to industrial biology*. 2008. Molecular Biotechnology, v. 38, p. 41–455.

DUNLAP, K. R., PERRY J. J. 1967. *Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizingmicroorganisms*. J. Bacteriol. 94:1919-1923.

DOMSCH KH, GAM W, ANDERSON T (1980). *Compendium of soil fungi*. Academic Press Limited Mc Graw-Hill Publishers London. pp. 105-106(1980)

DOMINGOS, M. *Estudo do crescimento de Ceriporiopsis subvermispora em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação*. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena. 2009.

ESSIEN, J.P; AKPAN, E.J.; ESSIEN, E.P. *Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel*. Bioresource Technology, 96: 1451-1456, 2005.

FONTES, G.C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. *Produção de biossurfactante por levedura*. Química Nova. Brasil. 2008

FRINGS, C. S., DUNN, R. T. 1970. *A colorimetric method for determination of serum lipids based on the sulphophospho-vanilin reaction*. American Journal of Clinical Pathology, v.53, n.1, pp.89-91.

GARLIPP, A. B. *Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do banhado grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP*. 1995. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) –72 Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1995.

GRANGER, L.M., PERLOT, P., GOMA, G., & PAREILLEUX, A. *Kinetics of growth and fatty acid production of Rhodotorula glutinis*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 37, No. 1, pp. 13-17, 1992.

GEMMA, H.; KAVADIA, D; DIMOU, V., TSAGOU, M.; KOMAITIS, G.; AGGELIS. *Production of gama-linolênic acid by Cunninghamella echinulata cultivated on glucose and Orange peel*.Appl Microbiol Biotechnol, 2002.

GUILLES, D.C; GREENLEY, K.R; SUTCLIFFE, L.H.. *Esr/spin probe study of ice cream*. Journal of Agricultural and food Chemistry. 54 (14): 4943-4947.2006.

GONÇALVES, M, S et al. Gerenciamento de resíduos sólidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Francisco Beltrão. Revista Brasileira de Ciências Ambientais - Número 15 Março/2010. Disponível em: < http://www.rbciamb.com.br/images/online/RBCIAMB-N15-Mar-2010-Materia07_artigos230.pdf > Acesso em: 13 nov. 2013.

GAO, D.; ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; CHEN, S. *Microbial lipid production from xylose by Mortierella isabellina*.Bioresource Technology. 2013.

HALLIWELL, B. *Biochemistry of oxidative stress*. Biochem. Soc. Trans, 2007, 35, 1147-1150

HIBBETT D.S; BINDER, M; BISCHOFF, J.F; BLACKWELL, M; CANNON, P.F; ERIKSSON, O.E; HUHDORF, S; JAMES, T; KIRK, P.M; LÜCKING, R; LUMBSCH, H.T; LUTZONI, F; MATHENY, P.B; MCLAUGHLIN, D.J; POWELL, M.J; REDHEAD, S; SCHOCH, C.L; SPATAFORA, J.W; STALPERS, J.A; VILGALYS, R; AIME, M.C; APTROOT, A; BAUER, R; BEGEROW, D; BENNY, G.L; CASTLEBURY, L.A; CROUS, P.W; DAI, Y.C; GAMS, W; GEISER, D.M; GRIFFITH, G.W; GUEIDAN, C; HAWKSWORTH, D.L; HESTMARK, G; HOSAKA, K; HUMBER, R.A; HYDE, K.D; IRONSIDE, J.E; KÖLJALG, U; KURTZMAN, C.P; LARSSON, K.H; LICHTWARDT, R; LONGCORE, J; MIADLIKOWSKA, J; MILLER, A; MONCALVO, J.M; MOZLEY-STANDRIDGE, S; OBERWINKLER, F; PARMASTO, E; REEB, V; ROGERS, J.D; ROUX, C; RYVARDEN, L; SAMPAIO, J.P; SCHÜßLER, A; SUGIYAMA, J; THORN, R.G;

TIBELL, L; UNTEREINER, W.A; WALKER, C; WANG, Z; WEIR, A; WEISS, M; WHITE, M.M; WINKA, K; YAO, Y.J; ZHANG, N; 2007 *A higher-level phylogenetic classification of the fungi*. *Mycol Res*. 3: 509-547.

HANSSON, L., DOSTÁLEK, M. . Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Microbiol, Biotechnol.*, v28, n.3, p. 240-6.1988.

HESELTIME, C.W., ANDERSON, R.P. *Microbiological production of carotenoides. Zigospores and carotene produced by interpecific and crosses of Choanephoraceae um liquid media*. *Micology*. v. 49. P. 449-452. 1957.

HAWKSWORTH, D. L., PITT, J.I. 1983. *A new taxonomy for Monascus species based on cultural and microscopic characteristics*. *Australian Journal of Botany* 31: 51-61.

HANSSON, L.; DOSTÁLEK, M. *Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus Mortierella ramanniana*. *Appl. Microb. Biotechnol*. 1988.

HIRAYAMA, K.B; SPERIDIÃO, P.G.L; Fagundes-Neto, U. 2006. *Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa*. *Electr J Pediatr Gastr Nutr Liver Dis*. 10 (3): 1-10.

ISLAM, A.M.; AYOKO, A.G.; BROWN, R.; HEIMANN, K. *Influence of Fatty Acid Struture on Fuel Properties of Algae Derived Biodiesel*. *Procedia Engineering*, Vol.56. 2013
Fornazzari, I.M.; Colaboradores. *Ácido graxo ômega e a saúde humana*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Vol.2. Núm.1. 21-25. 2007.

JANET, I.; ISAAC, O.; MARY, N.; IJEOMA, N. *Utilization of food crop wastes for the formulation of laboratory media used for cultivating soil fungi*. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*, 2(1): 10-14, 2014.

LAUFENBERG, G., 2003. *Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B)practical implementations*. *Bioresource Technology*, 87, pp.167-198.

Lozac'h N. 1986. *Extension of rules A-1.1 and A-2.5 concerning numerical terms used in organic chemical nomenclature*. *Pure Appl Chem*. 58: 1693–1696

LIU, G-Q., JIN, X-C. 2008. *Screening and optimization of microbial lipid production by Thamnidium sp., a novel oleaginous fungus isolated from forest soil*. *Journal of Biotechnology*, v. 136, p. S434,2008.

Lira, N.P. 1971. *Espécies de Absidia do solo do Maranhão*. *Bol Inst Micol Univ Rec*. 657: 1-6.

LUNN J; THEOBALD, H.E. 2006. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr Bull*. 31(3): 178-224

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

KENDRICK, A.; RATLEDGE, C.1990. *Microbial lipid technology: microbial formation of polyunsaturated fatty acids*. Lipid Technology, Bridgwater, v.2.pp.62-66.

KLICH, M.A. *Identification of Common Aspergillus species*. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002

KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERS, J.A. 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi. tenth edition. Wallingford. CABI Publishing.

KOMAITIS, M.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S *Single cell oil (SCO) production byMortierella isabellina grown on high-sugar content media*. BioresourceTechnology. 2001.
KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, J.E. 1992. *Medical Mycology*. Malvern, USA: Lea and Febiger.

MAIA, M.C.A; GALVÃO, A.P.G.L.K; MODESTA, R.C.D; JÚNIOR, N.P. 2008. “*Avaliação sensorial de sorvetes à base de Xilitol*”. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 28 (1): 146-151.

MARTIN, C.A., MATSHUSHITA, M., SOUZA, N.E. 2004. *Ácidos graxos trans: implicações nutricionais e fontes na dieta*. Revista Nutrição, Rio de Janeiro, 17 (3), pp. 361-368.

MATOS, S.V.; SCHALCH, V. Alternativas de minimização de resíduos da indústria de fundição. In: 27º CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 2000, Porto Alegre. Relação de Trabalhos. Porto Alegre: ABES, CD-ROM. p. 1742-1753. 2000.1. Disponível em:<http://www.abesdn.org.br/publicacoes/engenharia/resaonline/v10n02/v10n02nt01.pdf>, acessado em 28 de abril de 2014.

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

MAMATHA,S.S, RAVI, R.,VENKASTESWARAN, G.,2008. *Medium optimization of gamma linolenic acid production in Mucor rouxii CFR-G15 using RSM*. Food Bioprocess Techo,p. 405-409.

MACHADO R. ET. AL,. *Resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato para produção de fungo entomopatogênico Lecanicillium Lecanii*. Gragantia revista de Ciências Agronômicas. 2009.

MENEGUETTI C. C, DOMINGUES J. L. *Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos*. Revista eletrônica Nutritime. 2008

MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. Renew Energy, v. 34, p. 1–5.2009.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F. *Redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos empregando lipases pancreáticas*. Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal, v. 5, n. 1, jun. 2004.

- MESICH, J. . *Decisions, Decisions, Decisions*. Candy Industry, New York, 171 (2): 32-33.2006.
- MOORE-LANDECKER, E. *Fundamentals of the Fungi*. 4.d. New Jersey: Prentice Hall, p.574, 1996
- MONYEM, A.; Van GERPEN, J. H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass and Bioenergy*, v. 20, n. 4, p. 317-325, 2001.
- OLIVEIRA, A.B.; RODRIGUEZ, P.M.; AGUIAR, C. J.; ANDRADE, V.V.V.; ARÊDES, A.; PEREZ, V.H. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. *Perspectivas Online*, v. 1 (1). p. 21 – 47.2012.
- O'BRIEN, J.S; SAMPSON, E.L. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter and myelin. *J. Lipid Res*. 6: 545–551.1965.
- PELIZER, L.H., PONTIERI, M. H., MORAES, I. O. *Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental*. *Journal of Technology Management & Innovation*. Vol. 2 . pp. 118 – 127.2007.
- PAPANIKOLAOU, S., KOMAITIS, M., AGGELIS, G. *Single cell oil (SCO) production by Mortierella isabellina grown on high-sugar content media*. *Bioresource Technology*, Essex, 95 (3), 287-291.2004.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A. e NIGAM, P. *Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. New Delhi. Asiatech. 2001.
- PITT, J.I. *The genus Penicillium and its Teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press Inc. Londres, 1979.
- POMPÉIA, C. *Essencialidade dos ácidos graxos*. In: Curi, R; Pompéia, C; Miyasaka, C.K; Procópio, J. editores. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. São Paulo: Manole.2002.
- PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos*, 2ª edição Edunisc, Santa Cruz do Sul. 2004.
- RATLEDGE, C. *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production*, *Biochimie* 86, pp. 807–815. 2004.
- RATLEDGE, C. *Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. *Biochemistry Society Transactions*, v. 30, p. 1047–1050.2002.
- RUEGGER, M. J. S. *Atividade enzimática e produção de ácido γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP*.2001. 82f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Universidade Júlio Mesquita Filho. Rio Claro, 2001.
- RATLEDGE, C. *Microbial production of γ -linolenic acid*, in: C. Akoh (Ed.), *CRC Handbook of Functional Lipids* CRC Press, Boca Raton, FL, USA.2005.

RATLEDGE, C; WYNN, J.P. *The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*, Adv. Appl. Microbiol. 51: 1–51.2002.

RUENWAI, R; CHEEVADHANARAK, S; LAOTENG, K. *Overexpression of acetyl-CoA carboxylase gene of Mucor rouxii enhanced fatty acid content in Hansenula polymorpha*. Molecular Biotechnology. 42: 327–332.2009.

ROSSI, M., AMARETTI, A., RAIMOND, S., LEONARD, A.. *Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi*, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies.Ed. Dr. MargaritaStoytcheva. 2011.

SAMSON, R.A; HOEKSTRA, E.S; FRISVAD, J.C; FILTENBORG, O. *Introduction to Food-and Airborne Fungi*. 6 editionn. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.2002.

SCHWARTZE, V.U; HOFFMANN K; NYILASI I; PAPP T; VAGVOLGYI C; de HOOG, S; VOIGT K; JACOBSEN, I.D. *Lichtheimia* species exhibit differences in virulence potential. PLoS ONE. 201

SANTIAGO, A.L.C.M.A; SOUZA-MOTTA, C.M. *Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase*. Acta Bot Bras. 20: 641-647.2006.

SANTOS, G.G. *Sorvete Processamento, tecnologia e substitutos da sacarose*, Ensaios de Ciências. 13 (2): 95-109.2009.

SANCHOLLE, M.; LÖSEL, D. *Lipids in Fungal Biotechnology*. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A., KÜCK, U. *The Mycota: Genetics and Biotechnology*. Vol. II. Springer-Verlag, Berlin, 1995.

SCHIPPER, M.A.A. *On certain species of Mucor with a key to all accepted species*. Studies in Mycology. 25: 1–53.1990.

SENA, A.R. *Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos*. Sitientibus, Feira de Santana, 35: 91-98.2006.

SHIOSAKI, R.K; OKADA, K; GUSMÃO, N.B; NIGAM, P; FALCÃO, P.S; SILVA, N.H; FUKUSHIMA, K; MIYAJI, M; TAKAKI, G.M.C. *Biochemical markers in taxonomy of the genus Cunninghamella*. Rev Iberoam Micol. 18: 123-127.2001.

SHAW, R. *The occurrence of γ -linolenic acid in fungi*. Biochimica et biophysica acta. 1965

SOMASHEKARA, D; VENKATESHWARAN, G; SAMBAIAH, K; LOKESH, B. R. *Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi*. Process Biochemistry. 38: 1719-1724.2002.

SORGER, D; DAUM, G. *Triacylglycerol biosynthesis in yeast*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 289–299.2003.

SOUZA, M.A. *Desmulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos*, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Brasil.2003.

SILVA, A. M. *Produção de quitosana Absidia corymbifera em meio de baixo custo e aplicação na descoloração de efluente industrial*. Tese de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco. 2010

SUN, F; HUO, X; ZHAI, Y; WANG, A; XU, J; SU, D; BARTLAM, M; RAO, Z. *Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II*. Cell, 121: 1043–1057.2005.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B; Química orgânica - Vol. 2; 8ª Edição;. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, Capítulo 23: Lipídios, pg 403 – 437 e Capítulo 24: Aminoácidos e Proteínas , pg 438 – 488.2006.

STCHIGEL, A.M., CANO, J.F., ABDULLAH S.K., GUARRO, J. 2004. New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology* 50: 299-306.

TIMOFIECSYK, F. R. AND PAWLOWSKY, U. *Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos*: Revisão. B. CEPPA, 18 (2), pp. 221-236, 2000.

UEQUIZA, AM. *Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain*. Science. 5: 294:1871.2000.

UPADHYAY, H.P. *Soil fungi from North-East and North Brazil*. VII. Nova Hedw. 17: 65-73.1969.

VAZ, J.S; DEBONI, F; AZEVEDO, M.J; GROSS, J.L; ZELMANOVITZ, T. 2006. *Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras*. Rev Nutr. 19 (4): 498-500.

VIRIATO, A; TRUFEM, S.F.B. *Mucorales do Estado de São Paulo*. 7. *Espécies Merosporangidas*. Rickia. 12:147-154.1985.

VIEIRA, A.C., VASCONCELOS, V. M., SILVA, P. C.G., OLIVEIRA, R. P. S., SILVA, G. F.. *Winterização do óleo de soja associado à degomagem para a produção de biodiesel*. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - SE, 2010.

WEBSTER, J; WEBER, R. *Introduction to Fungi*. 3º edition. Cambridge, Cambridge University Press. 2007.

WEETE J.D; SHEWMAKER, F; GANDHI, S.R. . *γ-Linolenic acid in zygomycetous fungi Synzygites megalocarpus* . J Am Oil Chem Soc. 72: 75:1367.1998.

WYNN, J.P; RATLEDGE, C. *Evidence that the ratelimiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in Mortierella alpina is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase*. Microbiology. 146: 2325-2331.2000.

WOIECHOWSKI, A. L. *Desenvolvimento de Bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca*. Curitiba, 153 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, UFPR.2001.

WU, S., HU, C., JIN, G., ZHAO, X., & ZHAO, Z.K. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Bioresource Technology. 2010

YANKOVSKAYA, V; HORSEFIELD, R; TORNROTH, S; LUNA-CHAVEZ, C; MIYOSHI, H; LEGER, C; BYRNE, B; CECCHINI, G; IWATA, S. *Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation*. Science. 299: 700–704. 2003.

ZHENG, RU-YONG., CHEN, GUI-QING., HUANG, HE.; LIU, XIAO-YONG. 2007. *A Monograph a Rhizopus*. Sydowia. 59 (2): 273-372.2007

ZYCHA, H; SIEPMANN, R; LINNEMANN, G. Mucorales. Lehre, Germany: J. Cramer.1969

Documentos Eletrônicos

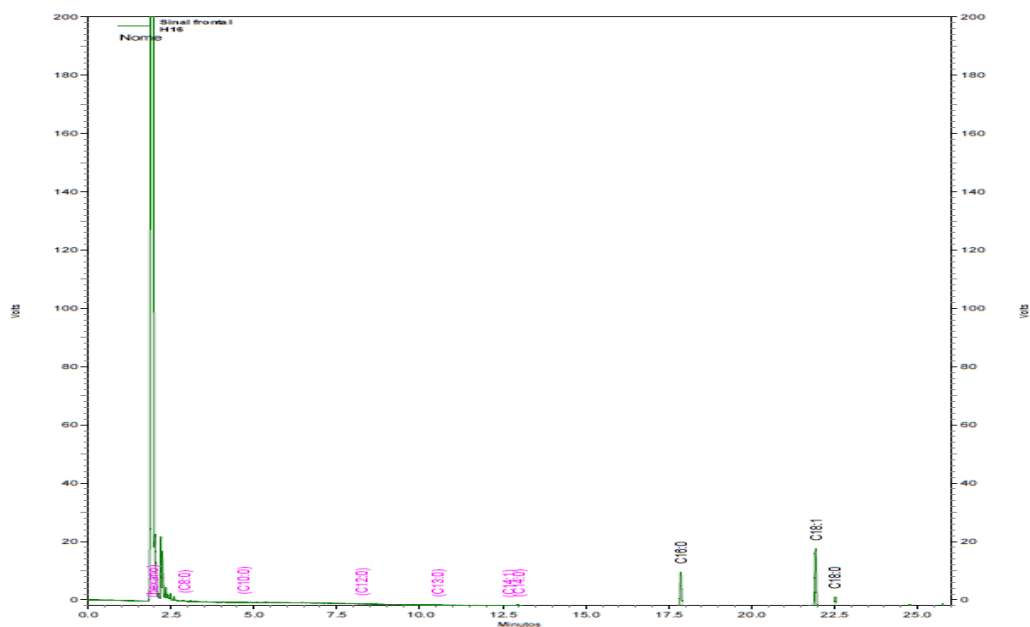
História do sorvete. Disponível em: http://www.abis.com.br/institucional_historia.html. Acesso em 12 de março de 2014.

SANTIAGO, A.L.C.M.A. Mucorales. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB120276>>. Acessado em: 07 Dezembro 2013.

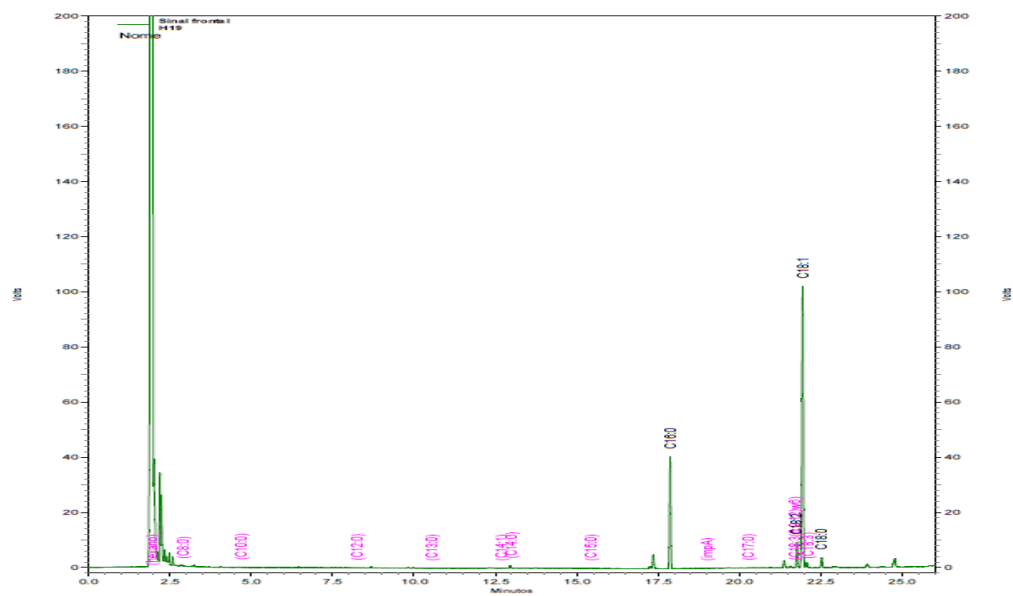
APÊNDICE A- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *RHIZOPUS ARRIZUS* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.



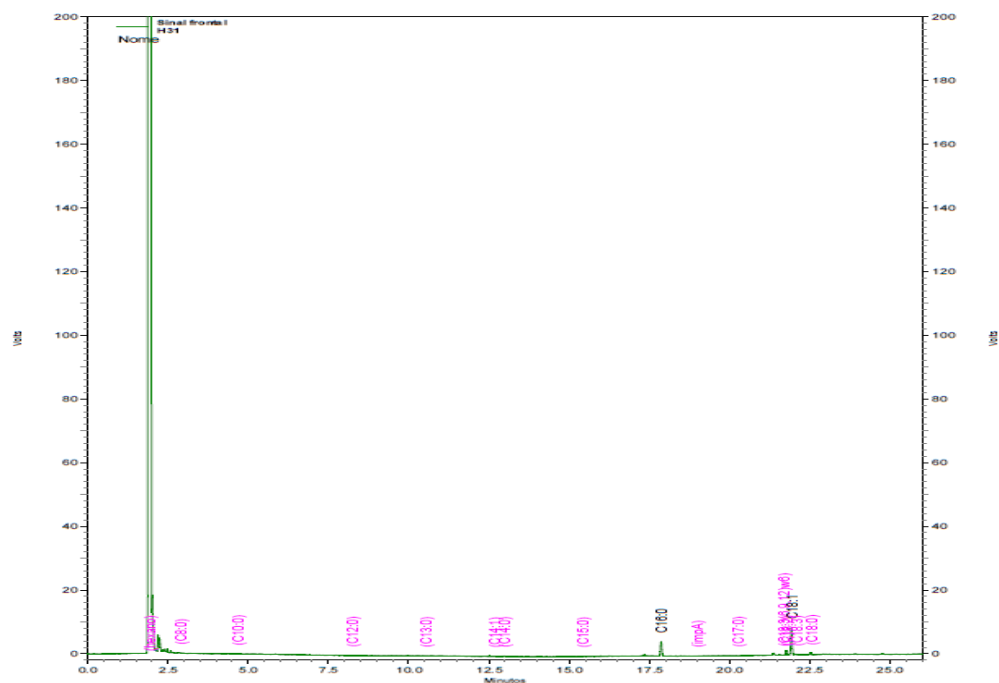
APÊNDICE B- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.



APÊNDICE C- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *RHIZOPUS STOLONIFER* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.



APÊNDICE D- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *CUNNINGHAMELLA PHACOSPORA* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.



APÊNDICE E- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.



APÊNDICE F- CROMATOGRAMA DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO LIPÍDEO EXTRAÍDO DA BIOMASSA SECA DE *MUCOR HIEMALIS* CULTIVADO EM MEIO HESSELTINE E ANDERSON POR 120H.

