

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA LINOLÊNICO  
POR NOVA LINHAGEM DE *Mucor sp* E ESTUDO  
DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.**

Pastore

*Este exemplar corresponde a redação  
final da tese defendida por Patrícia  
de Oliveira Carvalho e aprovada pela  
Comissão Julgadora em 09.11.94.*

Patrícia de Oliveira Carvalho T/353  
Farmacêutica-Bioquímica

*Obre*

Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore +  
Orientadora

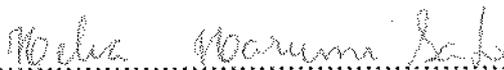
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciência de Alimentos.

1994

**BANCA EXAMINADORA**



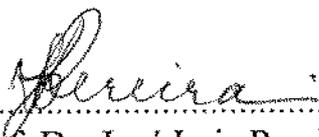
.....  
Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore  
(orientadora)



.....  
Prof. Dra. Hélia Harumi Sato  
(membro)



.....  
Prof. Dra. Maria Isabel Rodrigues  
(membro)



.....  
Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(membro)

Campinas, 09 de novembro de 1994.

***"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou o sino que tine.***

***E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria."***

***I Cor 13, 1-2.***

***À DEUS agradeço por tudo.***

*Ao Paulo pelo amor e compreensão...*

*À minha família pela confiança e apoio seguro,*

*dedico.*

## *AGRADECIMENTOS*

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. A constante luta me serviu de ensinamento profissional e de vida.

Aos Professores do Laboratório de Bioquímica, Dr. Yong Kun Park e Dra. Hélia Harumi Sato pela colaboração e valiosos ensinamentos prestados.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira e Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues pelas correções e sugestões oferecidas.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos, pelos bons momentos e convivência.

Ao Marcolino, Eliane e Massaharu, amigos além da convivência profissional.

Aos funcionários Paulo e Dora pela convivência e auxílio prestado durante a realização experimental deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Lípidos e Protéicos do ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Dr. João Shojiro Tango, Dra. Jane Menegaldo Turatti, Dra. Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel pela possibilidade de utilizar os equipamentos, e em especial ao Dr. Marco Túlio Coelho Silva pelo auxílio nas análises cromatográficas e atenção dispensada.

Ao CPQBA, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, particularmente ao Dr. Nelson Frighetto, Joaquim Gilberto de Oliveira e Adilson Sartoratto pela permissão e auxílio no uso do espectrômetro de massa.

Aos Professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos que me auxiliaram com seus conhecimentos.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e da Secretaria de Pós graduação, pela gentileza e atenção.

Ao Marcos Antônio da Secretaria de Ciência de Alimentos e a Fátima do Centro de Informática pelo auxílio na digitação e impressão desta dissertação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA.

## ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Ácido $\gamma$ -linolênico : Metabolismo e importância médica.....	4
2.2 - Lipídeos em fungos.....	15
2.3 - Produção de ácido $\gamma$ -linolênico por fungos.....	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 - Materiais.....	45
3.1.1 - Reagentes e Materiais específicos.....	45
3.1.2 - Equipamentos.....	45
3.2 - Métodos.....	46
3.2.1 - Isolamento e seleção de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico .....	46
3.2.1.1 - Coleta de amostras .....	46
3.2.1.2 - Isolamento de fungos .....	46
3.2.1.3 - Seleção preliminar de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico .....	46
3.2.2 - Preparação do inóculo .....	47
3.2.3 - Determinação do peso seco de biomassa .....	47

3.2.4 - Determinação da glicose residual no meio de cultura.....	48
3.2.5 - Extração e determinação do teor de lipídeos totais.....	48
3.2.6 - Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para cromatografia gasosa.....	49
3.2.7 - Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	50
3.2.8 - Análise dos ácidos graxos por espectrometria de massa.....	50
3.2.9 - Determinação da porcentagem de ácidos graxos e matéria insaponificável.....	51
3.2.10 - Identificação e conservação da linhagem produtora de ácido $\gamma$ -linolênico.....	52
3.2.11 - Estudo das condições de fermentação para produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	52
3.2.11.1 - Comparação entre linhagens selecionadas como produtoras de ácido $\gamma$ -linolênico.....	52
3.2.11.2 - Influência do tempo de cultivo na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	52
3.2.11.3 - Influência do pH inicial do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p ).....	53
3.2.11.4 - Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	53
3.2.11.5 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	53
3.2.11.6 - Efeito da taxa Carbono /Nitrogênio ( C/N ) na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e consumo de glicose.....	54
3.2.11.7 - Efeito da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	54
3.2.11.8 - Efeito da presença de ions metálicos no meio de cultura na obtenção de lipídeos totais e biomassa seca.....	55

3.2.11.9 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais e biomassa seca .....	55
3.2.11.10 - Efeito da ação simultânea da adição de glicose ao meio de cultura e variação da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	56
3.2.11.11 - Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	56
3.2.11.12 - Fracionamento dos lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> em cromatografia em coluna.....	56
3.2.11.13 - Análise da composição das frações de lipídeos por cromatografia em camada delgada (TLC).....	57
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
4.1 - Isolamento e seleção de microorganismos.....	59
4.1.1 - Seleção preliminar de microorganismos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico .....	59
4.2 - Identificação da linhagem LB-54 selecionada .....	60
4.3 - Obtenção de lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	60
4.4 - Comparação da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> com outras espécies de <i>Mucor</i> em relação ao teor de biomassa seca e conteúdo de lipídeos totais .....	62
4.5 - Composição de ácidos graxos das linhagens de <i>Mucor sp</i> produtoras de ácido $\gamma$ -linolênico obtidos por cromatografia gasosa .....	67
4.6 - Determinação da porcentagem de ácidos graxos totais e matéria insaponificável dos lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	69
4.7 - Efeito do tempo de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	70

4.8 - Efeito do pH inicial do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p ) pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	74
4.9 - Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	76
4.10 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	81
4.11 - Efeito da variação da taxa Carbono/Nitrogênio ( C/N ) no conteúdo de lipídeos totais, consumo de glicose e crescimento da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	86
4.12 - Efeito da temperatura de incubação na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p ) e na produção de ácido $\gamma$ -linolênico obtida da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	89
4.13 - Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e crescimento da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	97
4.14 - Efeito da composição do meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e crescimento da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	99
4.15 - Efeito da adição de glicose ao meio de cultura seguida da variação de temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico .....	101
4.16 - Estudo do efeito de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( % p/p ) pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	106

4.17 - Fracionamento dos lipídeos totais obtidos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação às temperaturas de 12 e 28°C e composição de ácidos graxos de cada fração .....	110
4.18 - Análise das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> por cromatografia em camada delgada (TLC).....	115
4.19 - Espectrometria de massa do ácido $\gamma$ -linolênico produzido pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	118
5 - CONCLUSÕES .....	120
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122

## INDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais contendo ácido $\gamma$ -linolênico.....	2
Tabela 2 - Metabolismo de ácidos graxos ômega 3 ( $\omega$ 3, $\eta$ -3) e ômega 6 ( $\omega$ 6, $\eta$ -6).....	4
Tabela 3 - Mecanismos propostos para os efeitos dos ácidos graxos ômega 6 e ácidos graxos saturados nos níveis dos lipídeos plasmáticos.....	13
Tabela 4 - Composição de ácidos graxos dos lipídeos de fungos selecionados como produtores de ácido $\gamma$ -linolênico pertencentes à coleção do Laboratório de Bioquímica (LB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.....	59
Tabela 5 - Efeito do tempo de incubação no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	72
Tabela 6 - Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação à 28°C por 5 dias.....	78
Tabela 7 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação à 28°C por 5 dias.....	83
Tabela 8 - Influência da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 e 10 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	92
Tabela 9 - Composição de ácidos graxos (% em relação aos ácidos graxos totais) dos lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 12°C e 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	95

Tabela 10 - Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e biomassa seca da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C.....	98
Tabela 11 - Influência da composição do meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e biomassa seca da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C.....	100
Tabela 12 - Efeito da adição de glicose à 2 % p/v ao meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguido da variação da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	103
Tabela 13 - Efeito de diferentes concentrações de glicose adicionadas no quarto dia de incubação à 28°C ao meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da incubação à 12°C por 3 dias, na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> .....	107
Tabela 14 - Composição de ácidos graxos das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	111
Tabela 15 - Composição de ácidos graxos das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	111

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Rota de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados de fungos do gênero <i>Mortierella</i> .....	21
Figura 2 - Caminho de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados em microorganismos.....	28
Figura 3 - Linhagem LB-54 identificada como <i>Mucor sp.</i> Aumento de 400× em microscopia ótica.....	61
Figura 4 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e biomassa seca das linhagens de <i>Mucor</i> após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	64
Figura 5 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e conteúdo de lipídeos totais das linhagens de <i>Mucor</i> após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	65
Figura 6 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e consumo de glicose pelas linhagens de <i>Mucor</i> após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	66
Figura 7 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 (A), linhagem LB-14 (B), e linhagem de <i>Mucor miehei</i> NRRL 3420 (C), obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	68
Figura 8 - Efeito do tempo de fermentação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	73
Figura 9 - Efeito do pH inicial na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p ) da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	75

Figura 10 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	79
Figura 11 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de amido, 22,3g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	79
Figura 12 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de ácido palmítico, 10,6g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	80
Figura 13 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de lactose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	80
Figura 14 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 3,5g/l.....	84
Figura 15 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e uréia 1,6g/l.....	84
Figura 16 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e autolisado de levedura, C/N 210...	85
Figura 17 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e polipeptona 4,5g/l.....	85
Figura 18 -	Efeito da variação da taxa Carbono/Nitrogênio (C/N) no crescimento e conteúdo de lipídeos totais da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	88

Figura 19 -	Efeito da variação da taxa Carbono/Nitrogênio (C/N) no conteúdo de lipídeos totais/biomassa seca (% p/p) e consumo de glicose pela linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	88
Figura 20 -	Efeito da temperatura de incubação na porcentagem de lipídeos totais totais em relação à biomassa seca ( %p/p ) da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após incubação em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	91
Figura 21 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias.(A) e 10 dias de incubação (B) à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	93
Figura 22 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias (A) e 10 dias de incubação (B) à 12°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	94
Figura 23 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2 % p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 3 dias.....	104
Figura 24 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2 % p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 6 dias.....	104
Figura 25 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2 % p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 10 dias.....	105

Figura 26 -	Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> , obtido por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (7 % p/v) no quarto dia e posterior incubação à 12°C por 3 dias.....	108
Figura 27 -	Efeito de diferentes condições de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.....	109
Figura 28 -	Composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	113
Figura 29 -	Composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	113
Figura 30 -	Composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	114
Figura 31 -	Composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.....	114
Figura 32 -	Lipídeos totais e lipídeos neutros da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> obtidos após 5 dias de incubação nas temperaturas de 28°C e 12°C.....	116
Figura 33 -	Lipídeos totais e fosfolipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> obtidos após 5 dias de incubação nas temperaturas de 28°C e 12°C.....	117
Figura 34 -	Espectro de massa do éster metílico de ácido $\gamma$ -linolênico presente nos lipídeos da linhagem LB-54 de <i>Mucor sp</i> (A) e do padrão autêntico de éster metílico de ácido $\gamma$ -linolênico (B).....	119

## RESUMO

Foram analisadas a composição de ácidos graxos de 384 linhagens de microorganismos e selecionados 4 fungos que apresentaram em sua composição o ácido  $\gamma$ -linolênico. A linhagem LB-54 identificada como *Mucor sp* foi selecionada por apresentar maior porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico entre os ácidos graxos totais de sua constituição ( 14,7 % ) e maior conteúdo de lipídeos totais ( 1,2 g/l ) após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l. Nas condições descritas, 24,8 % dos lipídeos totais extraídos se referem aos ácidos graxos totais e 7,2 % à matéria insaponificável presente no óleo da linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

O valor do pH inicial do meio de cultura e a presença de íons metálicos não alteraram significativamente o conteúdo de lipídeos totais produzidos pelo fungo.

Analisando-se diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, verificou-se que com o uso de glicose e extrato de levedura nas concentrações de 20 g/l e 10 g/l respectivamente obtém-se uma produção de 41,5 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico por litro de meio de cultura. A diminuição da concentração de nitrogênio, resultou em maior acúmulo de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

A temperatura ótima para produção de lipídeos totais nas condições descritas acima, pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi de 28°C. O aumento na biossíntese de ácidos graxos insaturados, em especial do ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico foi observado quando se utilizou a temperatura de incubação de 12°C.

Objetivando-se aumentar a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foram modificadas as condições de cultivo, o que levou à obtenção de 74,07 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico por litro de meio de cultura pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*. Este alto nível foi obtido quando o microorganismo foi incubado por 4 dias à temperatura de 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l; seguido de realimentação com glicose na concentração de 7 % p/v e reincubação por 3 dias na temperatura de 12°C.

O fracionamento dos lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp* através da cromatografia em coluna de Silicagel 60 mostrou que a linhagem é composta de 63% de lipídeos neutros e 19% de fosfolipídeos quando foi

cultivada por 4 dias à temperatura de 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l. Estes valores foram alterados para 48% e 36% respectivamente após 5 dias de incubação no mesmo meio na temperatura de 12°C

Os principais ácidos graxos encontrados na composição da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foram o ácido palmítico, oleico, linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico.

A separação dos lipídeos neutros por cromatografia em camada delgada mostrou a presença de triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e pequenas quantidades de ácidos graxos livres. Na fração de fosfolipídeos foram identificados a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina.

A presença de ácido  $\gamma$ -linolênico na linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi detectada por cromatografia gasosa e confirmada por espectrometria de massa.

## SUMMARY

Four fungal strains producers of  $\gamma$ -linolenic acid were selected out of three hundred eighty four strains of microorganisms. The LB-54 strain identified as *Mucor sp* showed the highest percentage of  $\gamma$ -linolenic acid among the total fatty acid of its constitution (14.7 %) and total lipids (1.2 g/l) content, after five days of incubation at 28°C, in a culture medium containing glucose (20 g/l) and yeast extract (10 g/l). Under the conditions of the experimental, 24.8% of the total lipids extracted from this strain were fatty acids, and 7.2% unsaponifiable material.

The inicial pH of the culture medium and the presence of metallic ions did not change greatly the total lipid content produced by the fungus.

Analyzing the effect of different carbon and nitrogen sources, it was verified that with the use of glucose and yeast extract at 20 and 10g/l , respectively, a production of 41,5 mg of  $\gamma$ -linolenic acid per liter of culture medium was obtained. The decrease of the nitrogen concentration resulted in higher accumulation of lipid by LB-54 strain of *Mucor sp*.

The temperature for maximal lipid production, under the conditions described above was of 28°C. The increase in the biosynthesis of unsaturated fatty acid, particularly of the linoleic acid and  $\gamma$ -linolenic acids was observed when the incubation temperature of 12°C was used.

Optimal production of  $\gamma$ -linolenic acid (74.07 mg of  $\gamma$ -linolenic acid per liter of culture medium) was obtained from the LB-54 strain by incubating first for four days at the temperature of 28°C in culture medium containing glucose (20 g/l) and yeast extract (10 g/l) and then supplementing with extra 7% (w/v) glucose followed by additional incubation for three days at the temperature of 12°C.

Fractionation of the total lipids of the LB-54 strain of *Mucor sp* by column chromatography, on Silicagel 60, showed that the cell is composed of 63% neutral lipids and 19% phospholipids when cultured for four days at the temperature of 28°C in medium containing glucose (20 g/l) and yeast extract (10 g/l). These values were modified to 48 and 36%, respectively, after five days of incubation in the same medium but at 12°C.

The main fatty acids in the LB-54 strain of *Mucor sp* composition were palmitic, oleic and  $\gamma$ -linolenic acids.

The separation of neutral lipids by thin layer chromatography showed the presence of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols and small amounts of free fatty acids. In the phospholipid fraction were identified the phosphatidylcholine and the phosphatidylethanolamine.

The identity of the  $\gamma$ -linolenic acid found in the LB-54 strain of *Mucor sp* was detected by gas chromatography and confirmed by mass spectrometry.

## 1 - INTRODUÇÃO

A importância de uma dieta em gorduras que possa trazer benefícios à saúde humana tem estimulado inúmeros estudos epidemiológicos e clínicos. É conhecido que a quantidade e o tipo de gordura da dieta (saturadas ou insaturadas) exercem profundo efeito sobre o funcionamento do organismo.

Numerosos estudos tem firmemente estabelecido os efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega 3 ( $\omega 3$ ) e ácidos graxos ômega 6 ( $\omega 6$ ).

Os ácidos graxos poliinsaturados  $\omega 3$ , principalmente os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, provenientes de peixes e óleos de peixes foram relacionados com a baixa incidência de doenças cardiovasculares nos esquimós pela diminuição nos níveis de triacilglicerol e, em menor extensão dos níveis de colesterol total no plasma. (BANG *et al*, 1976)

Ácidos graxos poliinsaturados  $\omega 6$  tem sido relatados pelo papel hipocolesterolêmico, capazes de diminuir VLDL (very low density lipoprotein) e LDL (low density lipoprotein) colesterol. (KRIS-ETHERTON *et al*, 1988)

O ácido gama-linolênico (18: 3  $\omega 6$ ), um ácido graxo triinsaturado da série ômega 6 tem recebido uma considerável atenção nos últimos anos. Indicações deste ácido em doenças cardiovasculares, diabetes, eczema atópico, alcoolismo, síndrome pré-menstrual e tratamento da hipertensão foram relatados por CARTER em 1988.

Preparações a base de óleo ou cápsulas contendo ácido  $\gamma$  linolênico, não são encontradas no Brasil, mas já estão disponíveis em outros países como Inglaterra, Estados Unidos e Japão. Estas preparações são originárias de quatro fontes : Óleo de primula (evening primrose oil - *Oenothera biennis* e/ou *Oenothera lamarckiana*); óleo da semente de borragem (borage seed oil - *Borago officinalis*); óleo da semente de groselha preta (blackcurrant seed oil - *Ribes nigrum*) e óleo obtido de fonte fúngica produzido comercialmente na Inglaterra originado de *Mucor javanicus*.

A fonte mais comum é o óleo de primula de diferentes variedades utilizada para obtenção de produtos comerciais, como "Efamol", "Epogam" e "Efamast".

A composição de ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais, causando moderadas modificações nos níveis de ácido  $\gamma$  linolênico. Este ácido

graxo geralmente é encontrado esterificado ao glicerol na forma de triacilglicerol.

A composição de ácidos graxos ( valores médios ) das principais sementes vegetais produtoras de ácido  $\gamma$ -linolênico está resumida na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais contendo ácido  $\gamma$ -linolênico.

Ácidos graxos	Prímula (%)	Borragem (%)	Groselha preta (%)
Saturados	7,3	13,5	7,4
Oleico	9,0	15,4	11,6
Linoleico	74,6	37,7	43,9
$\gamma$ - linolênico	9,1	18,7	18,7
$\alpha$ - linolênico	—	4,3	14,5
Estearidônico	—	—	2,9
Erúcido	—	3,5	—

Fonte : HORROBIN, 1992.

O fator mais importante a ser considerado é a correlação entre a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico presente no óleo e a quantidade de óleo obtida da fonte. As sementes citadas contém em média 23-30% de óleo. A principal desvantagem do uso destas fontes vegetais é devido as variações de porcentagem do ácido  $\gamma$  linolênico presente no óleo e a diminuição de seu nível com o aumento da produção da semente por unidade de área. (GUNSTONE, 1992 )

Por outro lado, é possível a obtenção de produtos biológicos usando-se microorganismos em condições controladas de processo, apresentando várias vantagens, dentre as quais :

1 - A taxa de crescimento é relativamente rápida. Os microorganismos são capazes de duplicar suas células em curto tempo : 0.3-2 horas para bactérias, 1-3 horas para levedura, 2-6 horas para algas e 4-12 horas para fungos filamentosos.

2 - Requerem pequena área para o seu crescimento. Utilizando-se fermentadores consegue-se grande quantidade de biomassa celular.

3 - Facilidade para controlar as condições de cultivo, e portanto a obtenção do produto final.

4 - Possibilitam o aumento da produtividade, selecionando-se as linhagens por mutação e recombinação e, por otimização das condições de crescimento.

Microorganismos com grande potencial para acúmulo de lipídeos são as algas, leveduras e fungos. O potencial comercial destes microorganismos, assim como o conteúdo de lipídeos e composição de ácidos graxos foi abordado por RATLEDGE em 1982. As leveduras e fungos são os microorganismos mais estudados devido à habilidade em produzir lipídeos em condições de laboratório. Algumas espécies de leveduras são capazes de produzir 30 à 70% de lipídeos, como, como por exemplo espécies de *Rhodotorula* e *Lipomyces*.

Os principais fungos capazes de produzir altas quantidades de lipídeos são espécies de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* e *Phycomyces*.

A associação de se obter fungos altamente produtores de lipídeos e que produzam óleos ricos em ácidos graxos desejáveis seria de considerável interesse para indústrias farmacêuticas e de alimentos.

Assim, o presente trabalho tem por objetivos :

1 - O isolamento e seleção de microorganismos produtores de ácido gama linolênico.

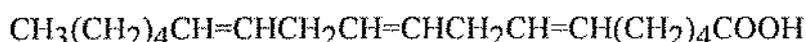
2 - Estudo das condições do processo fermentativo visando o aumento da produção de lipídeos e de ácido gama linolênico.

3 - Analisar qualitativamente e quantitativamente os componentes lipídicos da linhagem produtora de ácido gama linolênico.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Ácido Gama-Linolênico - Metabolismo e importância médica

O ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA; cis-cis-cis - 6,9,12 - ácido octadecatrienoico) é um ácido graxo de dezoito carbonos com três insaturações que pertence a série *n-6* (ou ômega-6) a qual é definida pela posição da primeira dupla ligação da molécula iniciando no átomo de carbono do final metílico da cadeia.



Ácido  $\gamma$ -linolênico (18 : 3;  $\Delta$  6,9,12 )

Os ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (18 : 2;  $\Delta$  9,12 ) da série *n-6* e ácido  $\alpha$ -linolênico (18 : 3;  $\Delta$  9,12,15) da série *n-3* quando ingeridos na dieta são metabolizados por uma série de enzimas desaturases (introdução de uma dupla ligação ) e elongases (introdução de dois átomos de carbono), originando diversos metabólitos como demonstrado na Tabela 2.

O ácido  $\gamma$ -linolênico é um metabólito do ácido linoleico e o primeiro intermediário na conversão do ácido linoleico para ácido araquidônico.

Tabela 2-Metabolismo de ácidos graxos ômega-3 ( $\omega$ 3, $\eta$ -3) e ômega-6 ( $\omega$ 6, $\eta$ -6)

Família $\eta$ - 6		Família $\eta$ - 3
Linoleico (18:2)		$\alpha$ -Linolênico (18:3)
↓	$\Delta$ 6 - desaturase	↓
$\gamma$ -Linolênico (18:3)		Octadecatetraenóico (18:4)
↓	Elongase	↓
Dihomo- $\gamma$ -linolênico(20:3)		Eicosatetraenóico (20:4)
↓	$\Delta$ 5 - desaturase	↓
Araquidônico ( 20:4 )		Eicosapentaenóico (20:5)
↓	Elongase	↓
Adrenico ( 22:4 )		Docosapentaenóico (22:5)
↓	$\Delta$ 4 - desaturase	↓
Docosapentaenóico (22:5)		Docosahexaenóico ( 22:6)

HEIDUSCHKA & LUFT citado por GUNSTONE, em 1992 foram os primeiros a reportar que o óleo obtido da semente de primula (*Oenothera biennis*) possuía além do ácido oleico e linoleico, o ácido linolênico. Este ácido em sua forma hexabromada possuía um ponto de fusão de 203°C, portanto diferente das formas de ácido linolênico até então detectadas no óleo de linhaça e outros óleos que continham dois pontos de fusão : o da forma sólida (180-181°C) e da forma líquida (isômero de baixa fusão), os quais eram denominados ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido  $\beta$ -linolênico respectivamente. O novo isômero descoberto foi denominado ácido  $\gamma$ -linolênico.

EIBNER *et al*, citado por GUNSTONE, em 1992, objetivando o estudo da estrutura do ácido  $\gamma$ -linolênico pelo processo de ozonólise identificou entre os produtos da reação, o hexanal e o ácido adípico, concluindo que o ácido possui insaturação no carbono 6, 9 e 12 da estrutura.

Em 1949, RILEY reexaminou a estrutura e as insaturações presentes no ácido  $\gamma$ -linolênico do óleo de primula (*Oenothera biennis* L) usando métodos mais modernos até então disponíveis, como isomerização com álcali associada à ozonólise, confirmando os estudos mais antigos.

A importância dos ácidos graxos essenciais na dieta humana foi assunto de grande interesse nas décadas passadas. Na atualidade, pesquisas tem enfatizado o papel de seus metabólitos tais como ácido  $\gamma$ -linolênico, ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). Estes componentes são requeridos por todas as membranas do corpo, conferindo a propriedade da fluidibilidade, flexibilidade e estabilidade estrutural. São importantes como precursores de substâncias biologicamente ativas tais como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, hidroxí e hidroperoxi-ácidos graxos, como é o caso do ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico precursor da prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) pela ação da enzima ciclooxigenase; e do ácido araquidônico que é precursor de tromboxana A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e prostaglandina da série 2 (PGE<sub>2</sub>). Os ácidos graxos essenciais são responsáveis pelo controle da impermeabilidade da pele à água e pela permeabilidade de outras membranas, tais como trato gastrointestinal e barreira cérebro-hematopoiética.

No organismo humano estes ácidos podem ser encontrados como ácidos graxos não esterificados ou como componentes de ésteres de colesterol,

triacilglicerol e fosfolípídeos tais como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol.

A presença dos ácidos graxos das séries *n-6* e *n-3* no corpo humano em especial nos tecidos em desenvolvimento é dependente da quantidade e do tipo de lipídeo da dieta, da atividade das enzimas desaturases responsáveis pela síntese dos metabólitos e ao processo de oxidação e acilação do 18:3 *n-3* e 18:3 *n-6*.

A essencialidade das duas séries de ácidos graxos foi reportada há 65 anos atrás por BURR & BURR como resultado da alimentação de ratos jovens por alguns meses em dieta livre de gordura. Os ratos apresentaram retardamento mental, dermatite escamativa, aumento da perda de água transpidermal e problemas reprodutivos.

Posteriores estudos relatados por INNIS, em 1991 confirmaram a importância dos ácidos graxos essenciais no crescimento e desenvolvimento em humanos. A recomendação diária, de acordo com Nutrition Recommendations for Canadians é de 1 - 3% Kcal de ácido linoleico para adultos e uma taxa maior (1 - 4,5% Kcal) para crianças devido a sua necessidade na síntese de lipídeos estruturais associada ao crescimento. A taxa de consumo do ácido  $\alpha$ -linolênico é dependente da ingestão de ácidos graxos polienóicos de cadeia longa, em especial, aqueles presentes em óleos de peixes (20:5, *n-3* e 22:6, *n-6*). Recomenda-se 1% Kcal de ácido  $\alpha$ -linolênico na dieta infantil que não contenha ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, enquanto que em adultos onde estes ácidos graxos são comumente ingeridos na dieta é recomendado uma taxa de 0,1 - 0,4% Kcal (100-400 mg/dia).

Com bases em evidências experimentais, HASSAN *et al*, em 1977 demonstraram que o ácido  $\gamma$ -linolênico foi capaz de reverter os sintomas de deficiência de ácidos graxos essenciais em ratos. Os animais foram alimentados em laboratório por 160 dias com uma dieta sem gordura para induzir os sintomas característicos da deficiência. Após este período, os animais foram testados por sete dias e divididos em cinco grupos dos quais o primeiro não recebeu suplementação na dieta, o segundo recebeu 0,25% do total da energia da dieta sobre a forma de ácido  $\gamma$ -linolênico, o terceiro recebeu 0,5%, o quarto recebeu 1,0% e o último tinha sua alimentação suplementada com a adição de 2% de fonte energética como ácido  $\gamma$ -linolênico. O aumento do nível de ácido  $\gamma$ -linolênico correspondeu a um aumento de peso corpóreo dos ratos, dos quais

os grupos suplementados com maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico obtiveram os resultados mais significativos, enquanto que o primeiro grupo, não suplementado, manteve o peso baixo. A composição de ácidos graxos dos fosfolípidos do fígado foram analisados antes e após os sete dias de tratamento. Com a adição de ácido  $\gamma$ -linolênico na dieta dos ratos deficientes foram relatados os seguintes resultados : 1- aumento no conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico na fração fosfolipídica do fígado; 2- aumento de ácidos graxos de cadeia longa com 20-22 carbonos da série *n-6*, em especial do ácido araquidônico presente nos fosfolípidos; 3- diminuição do ácido  $\alpha$ -linolênico (18:2  $\omega$ 3) e de seus metabólitos; 4- redução em cerca de 90% dos ácidos graxos monoenóicos, em especial do ácido oleico (18:1  $\omega$ 9) e seus metabólitos (18:2  $\omega$ 9 e 20:3  $\omega$ 9). A relação entre ácido trienóico /tetraenóico no valor de 0,4 tem sido usado como índice bioquímico para indicar que o mínimo requerimento de ácido graxo essencial está sendo consumido. Esta taxa considerada normal para a relação 20:3  $\omega$ 9/20:4  $\omega$ 6 indica o mínimo requerimento de ácido graxo essencial, a qual corresponde a 1% da energia da dieta como ácido linoleico. Baseado nestes dados os autores relataram que para a redução do nível de 20:3  $\omega$ 9 e aumento de 20:4  $\omega$ 6 da fração fosfolipídica do fígado dos ratos em quantidades adequadas, seria necessária uma taxa de 0,65% da energia total sobre a forma de ácido  $\gamma$ -linolênico para que o nível de 0,4 seja mantido e os sintomas da deficiência de ácidos graxos essenciais revertidos. Estes resultados demonstraram que a dieta de ácido  $\gamma$ -linolênico seria mais eficiente como precursora de ácido araquidônico do que a de ácido linoleico.

Como intermediário na bioconversão do ácido linoleico para ácido araquidônico o ácido  $\gamma$ -linolênico é encontrado em baixos níveis nos lípidos animais. A gordura de leite humano, a maior fonte de ácido  $\gamma$ -linolênico animal contém em média 100-400 mg/l de ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico. Enquanto que a gordura bruta de vaca, porco e galinha contém de acordo com HORROBIN, 1992; 60,4, 20,9 e 77,6 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico por 100g de fonte respectivamente. Em geral, as fontes alimentares convencionais que poderiam suprir este ácido graxo via direta apresentam escasso conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico.

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

como envelhecimento, diabete, alta ingestão de álcool, fatores nutricionais como deficiência de piridoxina, zinco, magnésio, biotina e cálcio, stress, infecção viral e também pelo colesterol (KINSELLA, 1991).

A administração de 30-40g por dia de ácido linoleico não foi capaz de alterar significativamente a concentração de ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico ou ácido araquidônico no sangue humano (LASSERRE *et al*, 1985), enquanto que a administração de menos de 500mg/dia de ácido  $\gamma$ -linolênico foi capaz de produzir uma significativa elevação no nível de ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico e um pequeno aumento do ácido araquidônico nos fosfolipídeos plasmáticos (MANKU *et al*, 1988).

Ao contrário do que se acreditava anos atrás, o ácido  $\gamma$ -linolênico e não o ácido linoleico pode elevar os níveis dos metabólitos da série *n-6* em humanos. Evidências indicam que somente 5-10% da ingestão diária de ácido linoleico pode ser convertida para ácido  $\gamma$ -linolênico.

A importância na administração de ácido  $\gamma$ -linolênico reside em seus próprios efeitos desejáveis e também pela formação de importantes metabólitos. Após a etapa limitante pela  $\Delta 6$  - desaturase o ácido  $\gamma$ -linolênico é metabolizado rapidamente por uma etapa não limitante de alongação para ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico, o qual é posteriormente convertido à ácido araquidônico.

A importância nutricional e médica do ácido  $\gamma$ -linolênico foi objeto de estudo para HASSAM (1985), CARTER (1988) e HORROBIN (1992). Diabetes, doenças cardiovasculares, eczema atópico, alcoolismo, síndrome pré-menstrual e tratamento da hipertensão foram relatados como possíveis indicações para o uso do ácido  $\gamma$ -linolênico.

A conversão *in vivo* do ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico para ácido araquidônico em humanos foi relatada por EL BOUSTANI *et al*, 1986. Foi observado que a incorporação do ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico nos lipídeos plasmáticos (triacilglicerol e fosfolipídeos) levaria no máximo 12 horas após a sua administração, e que este processo ocorre principalmente na fração fosfolipídica plasmática, sendo dificultada na fração triglicéridica.

WRIHT & BURTON, em 1982 realizaram um estudo cruzado duplo-cego envolvendo 60 adultos e 39 crianças com eczema atópico. Os pacientes adultos divididos em grupos recebiam de 4 à 12 cápsulas do óleo de semente de prímula ("Efamol") contendo 360 mg de ácido linoleico e 45mg de ácido  $\gamma$ -linolênico e cápsulas contendo 500mg de parafina como placebo. As

crianças recebiam uma dose diária de 2 à 4 cápsulas. Após 6 meses de tratamento, o estudo comprovou que os grupos tratados com óleo de primula mostraram uma melhora considerável, na faixa de 30 à 43%, nos sintomas do eczema atópico em adultos.

HORROBIN & MANKU, em 1983 analisaram a eficácia do tratamento com "Efamol" na diminuição do nível de colesterol plasmático de 84 pacientes. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o valor inicial de colesterol total. Grupos contendo um nível abaixo de 5 nmol / l, aceito como normal, não mostraram resposta ao tratamento com "Efamol". Em oposição, grupos de pacientes contendo nível de colesterol total acima de 5 nmol / l, o tratamento mostrou-se efetivo como agente redutor do colesterol plasmático. Isto sugere que os principais componentes do medicamento, ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico, possuem ação fisiológica de regulação do metabolismo de colesterol, entretanto sem efeito farmacológico. O tratamento não teve efeito a nível de HDL colesterol e no nível de triglicerídeos nos indivíduos testados. A diminuição no nível de colesterol total foi atribuída à falha na fração LDL colesterol.

MANKU *et al*, em 1984 reportaram que nos pacientes com eczema atópico, o nível de ácido linoleico nos fosfolipídeos do plasma estava acima da taxa normal, e que a ingestão deste ácido graxo pelos indivíduos eczematosos era absolutamente normal. Entretanto, o nível plasmático de seus metabólitos, ácido  $\gamma$ -linolênico, ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico e ácido araquidônico estava abaixo da taxa normal. A mesma relação foi observada para o ácido  $\alpha$ -linolênico e seus metabólitos. Os resultados sugeriram que o eczema atópico deveria estar associado com a dificuldade no metabolismo provavelmente envolvendo a enzima  $\Delta 6$ -desaturase e não com a ausência de ácidos graxos essenciais na dieta. Pacientes adultos com eczema atópico quando tratados com "Efamol" (obtido do óleo de semente de primula variedade *Oenothera biennis*) mostraram uma elevação significativa no nível plasmático de 20:3  $\omega 6$  e 20:4  $\omega 6$ , resultando em correção parcial da anormalidade no metabolismo de ácidos graxos da série  $\omega 6$ .

HUANG *et al*, em 1984 analisaram o efeito da adição de óleo de côco (contendo menos que 0,1% de ácido linoleico), óleo de açafoa (contendo 79,5% de ácido linoleico) ou óleo de primula (contendo 71% de ácido linoleico e 9% de ácido  $\gamma$ -linolênico) na alimentação de ratos machos após oito semanas

de dieta isenta de gordura. Metade dos ratos pertencentes a cada grupo continham também em sua dieta 1% de colesterol. Ao final do experimento, os sintomas de deficiência de ácidos graxos essenciais foram significativamente aliviados nos animais alimentados com óleo de primula e açafrão, mas não em animais alimentados com óleo de côco. Quando o colesterol estava ausente na dieta, nenhum dos óleos analisados foi capaz de alterar a taxa base de colesterol presente nos ratos. Entretanto, o colesterol adicionado na dieta de alguns ratos resultou numa elevação considerável do colesterol plasmático de ratos alimentados com óleo de côco e açafrão. O grupo tratado com óleo de primula, o colesterol foi detectado em altas quantidades no fígado e baixo nível plasmático. Estes resultados, de acordo com o autor, sugerem que o óleo de primula, contendo o ácido  $\gamma$ -linolênico, produto da  $\Delta 6$  desaturação do ácido linoleico, ou seus metabólitos, seriam os responsáveis pelo efeito de redução do colesterol plasmático atribuído aos ácidos graxos da série  $\omega 6$ .

PUOLAKKA *et al*, em 1985 analisaram os efeitos clínicos e bioquímicos obtidos após tratamento da síndrome pré-menstrual de 30 mulheres com 6 cápsulas diárias de "Efamol". O tratamento foi eficaz em aliviar a maioria dos sintomas da síndrome pré-menstrual, em especial as síndromes depressivas. O nível plasmático de  $PGI_2$  e  $TXA_2$ , originárias do ácido araquidônico, determinado através de seus metabólitos estáveis, 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$  e  $TXB_2$ , demonstraram diminuição na síntese de  $TXB_2$  durante a fase luteal do ciclo após tratamento com "Efamol" (  $141 \pm 59$ mg/ml ) quando comparado ao placebo (  $186 \pm 44$  mg/ml ) ou controle (  $176 \pm 40$  mg/ml ). Não foram observadas variações significativas no nível plasmático de 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$ , nos hormônios ovarianos e no nível de prolactina.

MIKAHALIDIS *et al*, em 1986 relataram o efeito de inibição da agregação plaquetária e aumento da produção de  $PGE_1$  pela administração direta de ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico em indivíduos saudáveis comparados a indivíduos diabéticos. Nestes, houve redução do nível de  $PGE_1$  originada das plaquetas, devido à hiperatividade plaquetária detectada em indivíduos diabéticos dependentes de insulina.

SUGANO *et al*, em 1986a compararam a eficácia dos ácidos graxos essenciais em reduzir o nível de colesterol plasmático de ratos. Os ratos foram testados com óleo de primula (contendo 72% de ácido linoleico e 9% de ácido  $\gamma$ -linolênico), óleo de açafrão (contendo 75% de ácido linoleico) e óleo

de soja (contendo 54% de ácido linoleico e 10% de ácido  $\alpha$ -linolênico) com dieta rica em colesterol. Os resultados demonstraram que o nível de colesterol sérico dos grupos que receberam óleo de prímula era consideravelmente menor que os demais grupos. O efeito de hipocolesterolemia foi associado ao próprio ácido  $\gamma$ -linolênico ou à sua conversão para ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico e/ou ácido araquidônico. Os grupos tratados com óleo de prímula possuíam um nível de PGI<sub>2</sub>, originária do ácido araquidônico, maior em comparação com os demais.

SUGANO *et al*, em 1986b compararam os efeitos farmacológicos da administração de óleo de fungo obtido da *Mortierella ramanniana* var *angustispora* IFO 8187 (contendo 6% de ácido  $\gamma$ -linolênico e 10% de ácido linoleico), óleo de açafrão (contendo 75% de ácido linoleico) e oleína de palma (contendo 16% de ácido linoleico), sobre o nível de colesterol plasmático e o nível de eicosanóides em ratos. O estudo foi realizado em três etapas, as quais variavam no peso dos ratos utilizados para os testes, na porcentagem de colesterol adicionada na dieta, no tempo de alimentação e no tipo de óleo administrado como fonte de gordura. No primeiro experimento, ratos com uma média de 95g eram alimentados por 24 horas com dieta contendo 0,5% do peso dos animais em colesterol e uso do óleo de fungo e óleo de açafrão como fonte de gordura da dieta (total de 10% do peso). Esta dieta, incapaz de alterar o peso corpóreo dos ratos, resultou um nível plasmático de colesterol comparável entre os dois óleos usados e um nível plasmático de triacilglicerol menor quando a fonte usada foi óleo de fungo. Nos ratos alimentados com óleo de fungo, a produção aórtica de PGE<sub>1</sub> foi significativamente maior, enquanto os níveis plasmáticos de TXB<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> se mostraram similares ao óleo de açafrão. No segundo experimento, ratos com média de 107g, foram alimentados por 3 semanas com uma dieta contendo 1% de colesterol e novamente por mais três semanas com dieta sem colesterol. A fonte de gordura da dieta era constituída de óleo de fungo refinado, óleo de açafrão e oleína de palma. Neste experimento houve aumento do peso corpóreo dos ratos, aumento da ingestão alimentar e diminuição significativa no nível de colesterol do plasma de ratos alimentados com óleo de fungo, comparado à dieta com oleína de palma. No terceiro experimento a dieta por 11 dias permaneceu rica em colesterol (1% do peso corpóreo de ratos de 135-140g). Foi utilizado o éster etílico do ácido  $\gamma$ -linolênico e éster etílico do ácido linoleico na dieta como substitutos parciais do óleo de palma. O nível de colesterol plasmático foi de  $140 \pm 4$  e  $143 \pm 13$  mg/dl para experimentação com éster etílico do ácido  $\gamma$ -linolênico e éster etílico do

ácido linoleico respectivamente. A atividade de hipocolesterolemia do óleo de fungo sendo comparável ao óleo de açafrão e significativamente maior que oleína de palma comprova a desaturação favorável a partir de ácido  $\gamma$ -linolênico para obtenção do ácido araquidônico.

HORROBIN & HUANG, em 1987 relataram que a prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ), originada do ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico possui potente ação desejável como agente antiinflamatório e na aterosclerose. Foram relatados diferentes efeitos terapêuticos tais como diminuição da pressão sanguínea, inibição da proliferação das células do músculo liso, inibição da agregação plaquetária, inibição da biossíntese do colesterol e estímulo à formação de AMP cíclico, um agente antiinflamatório e inibidor da biossíntese do colesterol.

SCHALIN-KARRILA *et al*, em 1987 utilizaram o óleo de prímula ( 45 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico na cápsula de "Efamol" ) em pacientes com eczema atópico observando a alteração do quadro clínico, a composição de ácidos graxos dos fosfolípidos do plasma e o nível de eicosanóides circulantes. Após 12 semanas de tratamento, com a ingestão de 4 cápsulas diárias, foi observado uma significativa redução na severidade e grau de inflamação, ressecamento da pele e coceira observados em pacientes eczematosos tratados com "Efamol" quando comparado ao grupo placebo. O tratamento causou elevação no nível de ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico nos fosfolípidos do plasma, enquanto que os níveis de ácido araquidônico , ácido eicosapentaenóico,  $PGE_1$  originária do ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico e  $TXB_2$  originária do ácido araquidônico não mostraram mudanças significativas após o tratamento.

Numerosos estudos epidemiológicos e clínicos tem estabelecido o papel hipercolesterolêmico dos ácidos graxos saturados e o papel hipocolesterolêmico dos ácidos graxos ômega 6 ( $\omega_6$ ).

KRIS-ETHERTON *et al*, em 1988 descreveram trabalhos de diversos pesquisadores sobre o efeito dos níveis de lipídeos no plasma, variando as quantidades de ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos da série  $\omega_6$  e colesterol nas dietas. A dieta controle foi a média da dieta americana que contém aproximadamente 40% de calorias provenientes da gordura, 13% de ácidos graxos saturados e 400-500mg de colesterol. Os mecanismos propostos pelos quais ácidos graxos  $\omega_6$  diminuíram e ácidos graxos saturados aumentaram o colesterol total do plasma estão apresentados na Tabela 3.

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

---

**Ácidos graxos ômega 6**

- aumentam os esteróis fecais e a excreção de sais biliares
- induzem troca na composição de LDL e outras lipoproteínas que alteram seu metabolismo
- diminuem VLDL hepático e síntese de HDL
- aumentam o catabolismo fracional das apolipoproteínas A-I e A-II
- decrecem a síntese e aumentam o catabolismo de apolipoproteína

**Ácidos graxos saturados**

- diminuem a síntese hepática e a atividade de LDL receptor

**Ácidos graxos saturados e colesterol**

- diminuem a síntese hepática e a atividade da LDL-receptor
  - induzem trocas na composição de VLDL e HDL
  - aumentam todas as lipoproteínas
  - diminuem o tamanho dos quilomicrons
- 

MILLER *et al* em 1988 analisou o processo de conversão endógeno do ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico para 15-hidroxi ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico. Este composto foi relatado como um inibidor endógeno do sistema 5 e 12 - lipoxigenase, enzimas responsáveis pela síntese de compostos potencialmente perigosos em doenças cardiovasculares, tromboxana A<sub>2</sub> e leucotrienos B<sub>4</sub>, originados do ácido araquidônico. O nível deste inibidor foi aumentado pela administração de ácido  $\gamma$ -linolênico ou ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico.

De acordo com HORROBIN, 1992, os efeitos desejáveis da administração de ácido  $\gamma$ -linolênico, podem ser resumidamente atribuídos a quatro mecanismos básicos :

1 - Ao aumento do nível dos ácidos graxos da série *n-6*, especialmente o ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico e ácido araquidônico como componentes estruturais das membranas celulares.

2 - Obtenção da PGE<sub>1</sub> originada do ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico.

3 - Conversão do ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico para 15-hidroxi - ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico.

4 - Efeitos bioquímicos dos próprios ácidos graxos da série *n-6*, independente da incorporação dentro de elementos estruturais ou da conversão para eicosanóides.

KEEN, *et al* em 1993 compararam o efeito de placebo e ácido  $\gamma$ -linolênico nos sintomas de neuropatia diabética em 111 pacientes durante o período de um ano. O tratamento consistiu da ingestão de cápsulas de "Epogam" (medicamento prescrito para tratamento de eczema atópico nos Estados Unidos e países europeus, obtido do óleo de prímula) resultando uma dose total de 480 mg/dia de ácido  $\gamma$ -linolênico. As cápsulas de placebo aparentemente idênticas continham parafina. Os parâmetros neurofisiológicos analisados tais como velocidade de condução do nervo motor, potencial de ação do nervo sensorial, potencial de ação do músculo, reflexo tendinoso e os sintomas neurológicos decorrentes da diabetes insulina-dependente e diabetes insulina-independente se mostraram significativamente superior ao placebo. A consistência entre todos os resultados obtidos, clínicos, térmicos e neurofisiológicos indicaram que o tratamento não foi afetado por parâmetros isolados. O ácido  $\gamma$ -linolênico foi capaz de prevenir diferentes sintomas e em alguns casos reverter as condições. Nenhum efeito bioquímico ou clínico indesejável foi atribuído ao tratamento com ácido  $\gamma$ -linolênico na quantidade especificada no experimento.

## 2.2 - Lipídeos em fungos

Ácidos graxos são produzidos por todos os organismos vivos e potencialmente representam a mais abundante classe de lipídeos na natureza. Entretanto, os ácidos graxos não ocorrem na forma livre, mas como componentes de lipídeos mais complexos, sendo encontrados esterificados ao acilglicerol (tri, di, e monoacilglicerol), fosfolipídeos, glicolipídeos, esfingolipídeos e ésteres de esteróides.

A maioria dos ácidos graxos presentes em fungos são de dezesseis ou dezoito átomos de carbono contendo variáveis graus de insaturação. O ácido palmítico (16:0) é o ácido graxo saturado predominante e o oleico (18:1) e linoleico (18:2) os insaturados predominantes. A proporção de linoleico é mais alta em fungos do que em leveduras, as quais geralmente possuem ácido oleico como sendo o principal dos ácidos graxos insaturados de sua constituição.

A grande diversidade de ácidos graxos detectados em fungos foi relatada por SHAW em 1966, mostrando que sob este aspecto a maior diferença entre procariontes e fungos filamentosos e outros eucariontes, está no fato de que bactérias e outras células procariontes não sintetizam ácidos graxos poliinsaturados (polienóicos), exceto algumas algas azuis e verdes, ao passo que esses ácidos podem ser encontrados em todas as células eucariotas.

A presença de ácidos graxos poliinsaturados em fungos tem recebido uma atenção especial nos últimos anos devido aos efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamação, artrite, psoríase e câncer atribuídos aos ácidos graxos  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 em especial o ácido eicosapentaenóico (20:5  $\omega$ 3), ácido docosahexaenóico (22:6  $\omega$ 6) e ácido  $\gamma$ -linolênico (18:3  $\omega$ 6). O interesse em incorporar ácidos graxos poliinsaturados na dieta humana tem levado à busca de fontes alternativas de produção, as quais foram relatadas por YONGMANITCHAI & WARD em 1989. Certas espécies de fungos são altamente promissoras por serem capazes de produzir altos níveis de 20:5  $\omega$ 3, 22:6  $\omega$ 3 e 18:3 $\omega$ 6, como *Mortierella* sp, *Conidiobulus nanodes*, *Entomorphthora exitalis*, *Saprolegnia parasitica*, *Cunninghamella japonica* e fungos marinhos do gênero *Traustochytrium* e *Schizochytrium* (KENDRICK & RATLEDGE, 1992b).

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

Lipídeos extraídos de organismos vivos, são normalmente misturas complexas de ésteres de alto peso molecular. Essas misturas podem ser separadas em frações lipídicas neutras ou polares. Lipídeos neutros comuns são os triacilgliceróis, esteróides e ésteres de esteróides. Lipídeos polares predominantes são os fosfolipídeos e glicolipídeos. A proporção de cada fração depende do organismo e das condições de cultura.

A classe acilgliceróis compreende os mais importantes lipídeos de armazenamento dos fungos filamentosos. As proporções entre tri, di e monoacilglicerol estão sujeitas às variações dependendo do ciclo de vida do fungo, das espécies e dos fatores ambientais.

Usualmente a mais abundante classe de lipídeos extraída de fungos é a de triacilglicerol, onde suas propriedades e importância são governadas principalmente pelos tipos de ácidos graxos em sua constituição, e em parte pelas três posições diferentes que ocupam os ácidos graxos na molécula de glicerol. A ocorrência de diacilglicerol e monoacilglicerol é mais rara entre os fungos, possuindo importância particular como precursores de triacilgliceróis e outros complexos lipídicos.

Existem fortes evidências da ocorrência de ácidos graxos livres em fungos em determinados estágios de desenvolvimento. A presença de ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos, assim como ácidos graxos livres foram reportados em micélio de *Rhizopus arrhizus* (WEETE *et al*, 1970).

Outros componentes lipídicos, considerados abundantes em fungos são os fosfolipídeos e os glicolipídeos que estão associados às membranas.

De maneira geral, a maioria dos fosfolipídeos encontrados em microorganismos são : fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol e cardioplipina. Nos fungos filamentosos a fosfatidilcolina é o componente mais abundante, seguida da fosfatidiletanolamina e menores quantidades de fosfatidilinositol.

As funções dos fosfolipídeos estão principalmente associadas com a membrana celular, tendo uma forte influência nas atividades celulares através do controle de permeabilidade da membrana e das atividades enzimáticas ligadas a esta membrana.

WEETE em 1970, relatou que o micélio de *Rhizopus arrhizus* possui 26% de fosfatidilcolina, 48,3% de lisofosfatidilcolina e 48% de fosfatidiletanolamina. Em 1985, o mesmo autor detectou quantidades apreciáveis de ácido fosfatídico no citossomo de *Mucor rouxii*, um possível local de biossíntese de fosfolipídeos e desenvolvimento de membranas.

MUMMA *et al* em 1971, relataram que os lipídeos polares de fungos termófilos são geralmente mais saturados que os lipídeos neutros e consideravelmente mais saturados que os lipídeos polares de espécies mesófilas. Espécies mesófilas contêm principalmente 16:1, 18:2 e 18:3, enquanto espécies termófilas incorporam 16:1 e 16:2 em seus lipídeos polares.

DEVEN & MANOCHA, em 1975 e 1976 encontraram diferenças no grau de insaturação de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e difosfatidilglicerol de *Choanephora curcubitarum* refletindo principalmente na porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico. O grau de insaturação de várias frações de lipídeos diminuía com aumento da temperatura, luz, pH e idade da cultura. A diminuição de ácido  $\gamma$ -linolênico, o principal componente dos fosfolipídeos, era acompanhada por um aumento de ácido palmítico e em menor extensão do ácido oleico com a elevação da temperatura.

CHAVANT *et al* em 1979 relataram a variação na proporção das classes de fosfolipídeos em adaptação às diferentes temperaturas do fungo psicrofílico *Mucor mucedo*. A biossíntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina aumentou com a incubação do fungo na temperatura de 12°C após um período de crescimento a 22°C.

Glicolipídeos são complexos lipídeos que não tem sido muito estudado em fungos, e é relativamente pequeno o conhecimento sobre sua ocorrência e funções nesses organismos.

Alguns glicolipídeos podem servir como reserva de ácidos graxos, outros aparecem como reservas endógenas nos esporos e seu metabolismo parece ser dependente da dormência reprodutiva dos esporos (BRENNAN *et al*, 1974).

Glicolipídeos contendo uma molécula de esterol são praticamente ausentes na maioria dos fungos filamentosos. Uma exceção foi relatada por DEVEN & MANOCHA, em 1975. Foi detectada a presença de glicosídeos-esteróis e de galactosildiacilglicerol em *Choanephora curcubitarum* constituídos principalmente por ácidos graxos 16:0, 18:0 e 18:3 após 16 horas de crescimento à 23°C. A comparação da composição de ácidos graxos da fração de lipídeos polares de culturas de *Choanephora curcubitarum* após crescimento a 15, 23 e 37°C por 48 horas demonstrou haver uma diminuição no grau de insaturação com elevação da temperatura. Os glicolipídeos, em especial, o galactolipídio mostraram-se mais sensíveis às alterações em resposta à mudança de temperatura do que os outros lipídeos polares.

Lipídeos pertencentes à classe dos esfingolipídeos, tais como ceramidas, cerebrosídeos, glicosilceramidas e glicofosfoesfingolipídeos foram detectados em quantidades muito pequenas em um reduzido número de fungos. A detecção é geralmente dificultada devido às diminutas quantidades presentes (0,2 - 0,7% do peso seco do fungo) e aos próprios riscos de alterações durante os procedimentos de extração (LÖSEL *et al*, 1988).

Os esfingolipídeos parecem ser componentes de membrana e parecem estar associados com plasmalema e desenvolvimento da parede celular.

Esteróis podem ocorrer em fungos sobre a forma livre, como ésteres de esterol ou como glicosídeos-esteróides. Estes compostos são importantes na arquitetura das membranas podendo também regular a permeabilidade através da viscosidade interna e movimentação molecular dos lipídeos presentes na membrana. Tais compostos são requeridos por algumas membranas para a reprodução sexual e podem estimular o crescimento em culturas aeradas. Alguns fungos requerem esteróis para uma atividade ótima de certas enzimas como a ATPase (WEETE, 1980).

Esteróis estão presentes na maioria dos microorganismos eucariotos exceto em condições anaeróbicas quando, em princípio, os esteróis não podem ser biossintetizados, uma vez que a introdução do grupo 3-hidroxil é uma reação que requer oxigênio (NES, 1977).

O ergosterol compõe a maioria dos esteróis de fungos e leveduras, vindo frequentemente acompanhado de alguns outros esteróis em baixas proporções. A composição de ácidos graxos nos ésteres de esterol de fungos apresentam cadeias de 14 a 18 carbonos, esterificados primariamente para ergosterol (WASSEF, 1977).

O conteúdo de esteróis de alguns microorganismos é altamente sensível a concentração de açúcar e carbono usados. Em geral, alto conteúdo de ergosterol está associado as condições anormais de crescimento ou à condições de "stress", como temperaturas muito baixas ou muito altas, exposição a fungicidas ou a outras substâncias tóxicas.

SAFE & CALDWELL em 1975 detectaram a presença de esteróis na parede celular do fungo filamentoso *Mucor rouxii*, tais como episterol, 22-dihidroergosterol e ergosterol.

Carotenóides ocorrem em aproximadamente 60% dos fungos, como revisto po WEETE, em 1980 sobre a estrutura, biossíntese e distribuição de carotenóides fúngicos. O principal carotenóide encontrado é o  $\beta$ -caroteno detectado em quantidades apreciáveis nos fungos.

A síntese de carotenóides em *Zygomycetes* tem sido de particular interesse com respeito à produção industrial de  $\beta$ -caroteno para uso como corante em alimentos ou como precursor da vitamina A. Os fungos *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* e *Mucor mucedo* tem sido relatados como ricas fontes produtoras destes compostos.

A presença de carotenóides em vários tipos de estruturas reprodutivas tem sido associadas com resposta à luz e fotomorfogênese dos fungos, assuntos que tem levado a muitos tipos de estudos fisiológicos.

A composição de ácidos graxos e o acúmulo de lipídeos totais pode, portanto, apresentar-se de forma variada, tanto qualitativamente como quantitativamente, em diferentes microorganismos. Esta variação pode estar na dependência de fatores genéticos e também de fatores ambientais. A influência de fatores ambientais, tais como idade da cultura, temperatura de incubação, oxigênio e condições nutricionais, sobre a composição de ácidos graxos foram relatados por vários autores (RATLEDGE, 1982; LÖSEL *et al*, 1988; YONGMANITCHAI & WARD, 1989).

Diferentes estudos tem evidenciado que os fungos podem responder às variações de temperatura de crescimento através da alteração na composição de seus ácidos graxos, particularmente no que se refere ao grau de insaturação.

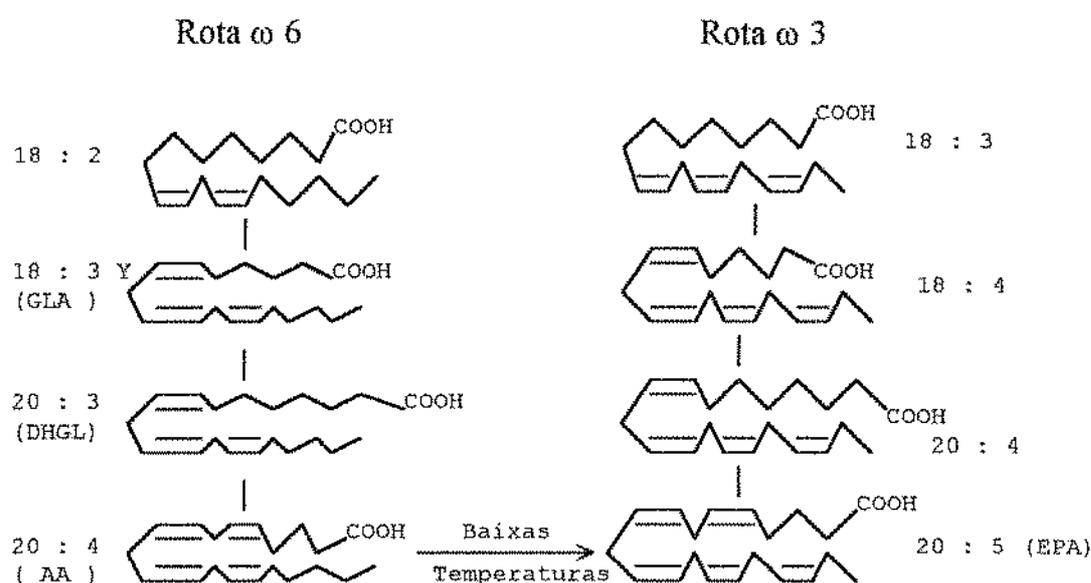
Estudos comparativos realizados por SUMNER *et al*, em 1969 com diferentes fungos da ordem Mucorales (*Zygomycetes*), mostraram que espécies psicrófilas (10-20°C), mesófilas (20-25°C) e termotolerantes (40-50°C) possuem grau de insaturação similar, enquanto lipídeos de espécies termófilas (40-50°C) eram significativamente menos insaturados.

Uma completa investigação da relação entre composição de ácidos graxos e temperatura de adaptação foi realizado por MUMMA *et al* em 1970, utilizando microorganismos das espécies mesófilas e termófilas de *Chaetonium*, *Humicola*, *Stilbella*, *Sporotrichum* e *Mucor* para comparação. Os fungos mesófilos que cresciam a 25°C mostraram um maior grau de insaturação nos lipídeos formados que as espécies termófilas correspondentes que cresciam a 45°C.

O aumento da síntese de ácidos graxos insaturados em temperaturas baixas foi relatado por SHIMIZU e seus colaboradores em 1989, que detectaram que algumas espécies de fungos *Mortierella* são capazes de produzir ácidos graxos poliinsaturados, em especial o ácido eicosapentaenóico (20:5  $\omega$ 3) somente em baixas temperaturas (12°C) Este fungo utiliza a rota ômega 6 ( $\omega$ 6) para a biossíntese de

ácidos graxos poliinsaturados, como ácido  $\gamma$ -linolênico (18:3  $\omega$ 6) e ácido araquidônico (20:4  $\omega$ 6); a detecção de um ácido graxo poliinsaturado da rota  $\omega$ 3 levou à suposição pelos autores da existência de uma enzima ( $\Delta$ 17-desaturase) que seria formada ou ativada em adaptação ao frio, para catalizar a desaturação do final metílico da cadeia do ácido araquidônico ( $\omega$ 6) para convertê-lo à ácido eicosapentaenóico ( $\omega$ 3), de acordo com a figura 1.

Figura 1 - Rota de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados de fungos do gênero *Mortierella*



Fonte : SHIMIZU *et al*, 1989.

Por outro lado, alguns autores (MUMMA *et al*, 1970 e 1971 e FEOFILOVA *et al*, 1989) tem sugerido que o aumento da insaturação dos lipídeos com a diminuição da temperatura de crescimento do microorganismo seja devido à necessidade de adaptação às variações das condições ambientais. Fosfolipídeos são componentes estruturais de membrana altamente especializados capazes de alterar estruturalmente com a função de manter a fluidibilidade da membrana em resposta às variações ambientais, principalmente a temperatura.

O grau de insaturação dos ácidos graxos das frações de fosfolipídeos, ácidos graxos livres e triacilgliceróis diminuí com o aumento da temperatura. Em todos os microorganismos relatados os fosfolipídeos são mais insaturados que os ácidos graxos livres, os quais por sua vez são mais insaturados que os triacilgliceróis.

Embora o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados tenda a aumentar em temperaturas menores, a taxa de crescimento e a biomassa são usualmente reduzidas, o que resulta na diminuição de produtividade dos ácidos graxos poliinsaturados requeridos.

A presença de oxigênio é essencial para as reações de desaturação na síntese de ácidos graxos poliinsaturados. As alterações que ocorrem no grau de insaturação dos lipídeos em resposta às mudanças de temperatura foram interpretadas por SUMNER *et al*, em 1969 em termos de disponibilidade e solubilidade do oxigênio no meio de cultura em diferentes temperaturas. Devido ao aumento da solubilidade do oxigênio à baixas temperaturas, uma maior quantidade de oxigênio estaria disponível para ser utilizado pelas enzimas dependentes de oxigênio que catalisam a desaturação dos ácidos graxos de cadeia longa.

Os fungos *Mucor genevensis* e *Mucor rouxii* quando submetidos às condições anaeróbicas de crescimento, produziram baixas quantidades de ácidos monoenóicos e aproximadamente 70% dos ácidos graxos totais tinham o comprimento da cadeia menor que dezesseis átomos de carbono (SAFE, 1973).

A idade da cultura também é um fator que pode alterar a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados, já que estes microorganismos assim como outros organismos vivos tendem a estocar sua fonte de energia na forma de lipídeos. Estes sofrem gradativa diminuição em função do tempo da cultura e com a escassez nutricional (LÖSEL *et al*, 1988).

Os componentes do meio de cultura são fatores essenciais que determinam a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados em fungos e outros microorganismos. Variações das fontes de carbono no meio de cultura foram capazes de alterar de 14,0 para 7,1 a porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca de *Mucor ramanniana* quando era utilizado glicose ou maltose, respectivamente (SAJBIDOR *et al*, 1988).

LINDBERG & HANSSON em 1991 detectaram uma produtividade maior de ácido  $\gamma$ -linolênico em culturas de *Mucor sp* quando no meio de cultura estava presente o amido ou amido hidrolizado comparado à glicose.

Carboidratos são relatados como os melhores substratos para crescimento e produção de lipídeos pela maioria dos fungos.

Tipos diferentes de fontes de nitrogênio são também capazes de alterar a produção de lipídeos dos microorganismos, embora o principal fator de controle seja a relação Carbono/Nitrogênio (C/N). Altas taxas de C/N foram relatadas por TORNALOVA *et al* em 1992 como um importante fator para aumentar a produção de lipídeos totais. A análise do micélio de *Mucor sp* após 72 horas de crescimento em

meio de cultura líquido resultou em 22,4 e 37,2g de ésteres metílicos de ácido  $\gamma$ -linolênico por 100g de lipídeos totais para as taxas C/N de 20:1 e 40:1 respectivamente.

A adição de ácidos graxos livres, como palmítico e esteárico ao meio de cultura foram relatados por RADWAN & SOLIMAN, em 1988 como um estímulo à produção do ácidos graxos poliinsaturados por fungos. Algumas espécies de fungos do solo, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Stachybotrys* foram analisados, e não apresentaram o ácido araquidônico em sua composição quando crescem em meios de cultura sem ácidos graxos livres.

A adição de íons metálicos ao meio de cultura aumentou o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em *Mortierella ramanniana* var *angulispora*. Este fungo foi capaz de acumular mais lipídeos quando o meio foi suplementado com os íons cobre e zinco (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988).

Algumas pesquisas tem sido feitas com o intuito de comparar a composição de ácidos graxos dos estágios vegetativos e reprodutivos no desenvolvimento de fungos. Lipídeos dos esporos de espécies de *Mucor* e *Rhizopus* se mostraram mais saturados que lipídeos obtidos do micélio (SUMMER & MORGAN, 1969). Os dados sobre mudanças qualitativas na composição de ácidos graxos acompanhadas da morfogênese e produção de esporos são bastantes raras, provavelmente devido ao número limitado de investigações neste aspecto.

Algumas contribuições sobre a correlação, composição de ácidos graxos e taxonomia de fungos foram feitas por WEETE em 1980 e TYRREL em 1967 e 1971.

Estudos com Ascomycetes, Basidiomycetes e fungos imperfeitos comprovaram anteriormente que nos membros destas classes inexistente o ácido  $\gamma$ -linolênico; ou outro poliinsaturado qualquer pertencente a rota ômega 6. Os ácidos graxos saturados mais comumente encontrados são : mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0) e os insaturados , oleico (18:1) e linoleico (18:2). Dos ácidos graxos triinsaturados detectados, o mais comum foi o ácido  $\alpha$ -linolênico. Em contrapartida, fungos pertencentes à classe Phycomycetes seriam capazes de biossintetizar ácido  $\gamma$ -linolênico e outros ácidos graxos pertencentes a rota ômega 6 (SHAW, 1965).

A presença dos ácidos  $\gamma$  e  $\alpha$ -linolênico nos diferentes grupos de fungos não pode ser considerada uma diferença bioquímica fundamental entre as classes de

Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes e fungos imperfeitos. SAFE & BREWER em 1973 analisaram a composição de ácidos graxos de *Chatomium cochiliodes* (Ascomycetes) e identificaram a presença de ácido  $\gamma$ -linolênico entre os ácidos graxos de sua constituição.

O fungo imperfeito *Dactylaria* sp também mostrou possuir o ácido  $\gamma$ -linolênico, em sua constituição (SUMNER & EVANS, 1971), colocando em dúvida a interpretação filogenética proposta por SHAW em 1965.

Outros fungos pertencentes à classe Phycomycetes (*Zygomycetes*), em especial de ordem Mucorales tem sido relatados como produtores de ácido  $\gamma$ -linolênico, indicando a possibilidade de somente desaturar junto ao final metílico do ácido linoléico (entrada rota ômega 6) e impossibilidade de alongar este ácido graxo.

O fungo *Pythium ultimum* (ordem *Peronosporales*, subclasse *Oomycetes*), foi descrito como bom produtor de ácidos graxos poliinsaturados do tipo ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico, embora não ultrapasse os níveis obtidos por SHIMIZU *et al*, em 1988 com *Mortierella alpina*. Outros poliinsaturados como ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido dihomog $\gamma$ -linolênico e ácido  $\gamma$ -linolênico apareceram em quantidades expressivas. A presença destes ácidos indicam que este fungo contém enzimas tanto da rota ômega 6 como da rota ômega 3 (BOWMAN & MUMMA, 1967 e GANDHI & WEETE, 1991).

A análise de fungos marinhos, como *Thraustochytridium roseum*, *T. aureum*, (ordem *Lagenidiales*, subclasse *Oomycetes*) e *Schizochytridium aggregatum* comprovam que estes fungos são também capazes de sintetizar ácidos graxos pertencentes as duas rotas. Quantidades apreciáveis do ácido eicosapentaenóico (4,1 - 6,1% em relação ao total) e em especial do ácido docosaheptaenóico (10,8 - 34,1%) foram obtidos (ELLENBOGEN & ARONSON, 1969).

*Saprolegnia parasítica* (ordem *Saprolegniales*, subclasse *Oomycetes*), um parasita do peixe, da mesma maneira que *Mortierella alpina* produzem o ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido araquidônico como principais intermediários no caminho biossintético para ácido eicosapentaenóico. A desaturação do final metílico de ômega 6 para ômega 3 não ocorre em ácidos graxos com C18, mas é específico para poliinsaturados C20. O ácido araquidônico é o precursor direto do ácido eicosapentaenóico via  $\Delta$ 17-desaturase (GELLERMAN & SCHLENK, 1979).

O acúmulo lipídico pode, portanto apresentar-se de uma forma variada, tanto qualitativamente como quantitativamente, em diferentes microorganismos. A eficiência e a porcentagem de lipídeos que um microorganismo é capaz de produzir sobre o ponto de vista industrial foram analisados por RATLEDGE, em 1982 com uma especial atenção aos fungos filamentosos. Foram citados cerca de 50 espécies

ditas "oleoginosas", contendo acima de 25% de conteúdo lipídico em seu micélio. O autor postulou que a chave da oleogenicidade parece residir na presença de uma enzima : ATP - citrato liase detectada em alguns fungos que cresceram em condições limitadas de nitrogênio ou outros nutrientes. Disto resulta uma elevação de ATP, redução de AMP e obtenção de ácidos graxos à partir de Acetil-Coenzima A originada da clivagem do citrato por esta enzima. Quando a carga energética é muito alta, ( alta concentração de ATP ) o citrato não pode ser oxidado pelo Ciclo de Krebs, em virtude da inibição da enzima Isocitrato desidrogenase, e será cindido à custa de ATP numa reação catalizada pela Citrato liase à Oxaloacetato e Acetil-CoA precursora dos ácidos graxos.

A análise enzimática de alguns fungos determinaram que *Entomophthora exitalis*, *Conidiobolus nanones* e *Mortierella alpina-peyron* possuem a enzima ATP- citrato liase. Estes três fungos são oleoginosos devido ao acúmulo de alta porcentagem de lipídeos (25%, 26% e 38% p/p lipídeos por biomassa seca respectivamente). Nenhuma atividade enzimática foi encontrada nos fungos marinhos *Thraustochytridium roseum*, *T. aureum*, e *Saprolegnia parasitica*, espécies não oleoginosas (KENDRICK & RATLEDGE, 1992b).

### 2.3 - Produção de ácido $\gamma$ -linolênico por fungos

ERWIN & BLOCH, em 1964 iniciaram estudos sobre as diferenças de estrutura e biossíntese dos ácidos graxos insaturados de diferentes grupos de microorganismos. A biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados por desaturação oxidativa, na qual ésteres de ácido cis- $\Delta^9$ -monoenoico de Coenzima-A são desaturados por enzimas que requerem  $O_2$ , num processo aeróbico, ocorre numa grande variedade de microorganismos, como leveduras, fungos, algas primitivas, certas bactérias e em tecidos animais. O caminho biossintético onde o sistema de sintetase de ácidos graxos procede anaerobicamente originando ácidos monoenoicos por uma  $\beta$  e  $\gamma$ -dehidratação de  $\beta$ -hidroxi ácidos de cadeia média e subsequente alongação da cadeia dos resultantes 3-enoatos, parece mais raro, sendo encontrado em certas Eubactérias, como *Pseudomonas* e *Escherichia coli*. Plantas e certos protistas fotossintéticos, como algas verdes utilizam um outro caminho biossintético que até o momento é obscuro. A biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados foi classificada pelos autores em duas categorias principais : Via biossintética presente em plantas, representado pelo ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, os quais são os principais constituintes poliinsaturados de tecidos verdes e plantas superiores e Via biossintética presente em animais representado pelo ácidos  $\gamma$ -linolênico e poliinsaturados C20 e C22, como o ácido araquidônico. Os diferentes grupos de microorganismos podem se encaixar em ambos os caminhos. De maneira geral, fungos, leveduras e algas verdes utilizam a via biossintética presente em plantas, enquanto protozoários, amebas e ciliados sintetizam ácidos poliinsaturados pela via biossintética presente em animais.

SHAW, em 1965 analisou a composição de ácidos graxos por cromatografia gás-líquido de trinta e uma espécies de fungos cultivados em meio de cultura sem lipídeos. Dezesete fungos pertenciam à classe Ascomycetes, cinco pertenciam aos Basidiomycetes e nove eram Phycomycetes. Todas as espécies de fungos Phycomycetes estudadas apresentavam em sua composição o ácido  $\gamma$ -linolênico em concentrações variáveis como 5,4% em relação aos ácidos graxos totais encontrado em *Phycomyces blakesleeanus*, 15,6% e 13,7% em *Rhizopus stolonifer* e *Mucor javanicus* respectivamente. Nenhuma das espécies apresentou ácido  $\alpha$ -linolênico. Contrário aos Phycomycetes, o ácido  $\gamma$ -linolênico não fazia parte da constituição de ácidos graxos dos Ascomycetes e Basidiomycetes, nos quais

houve predominância do ácido  $\alpha$ -linolênico. No fungo *Botrytus cinerea*, pertencente a classe Ascomycetes, foi detectado 41,7% de ácido  $\alpha$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais, enquanto que em poucos casos a quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico excedeu a 10% entre os Phycomycetes. Esta diferença estaria relacionada com a própria habilidade genética das diferentes classes de fungos quanto a biossíntese de determinados ácidos graxos em sua composição.

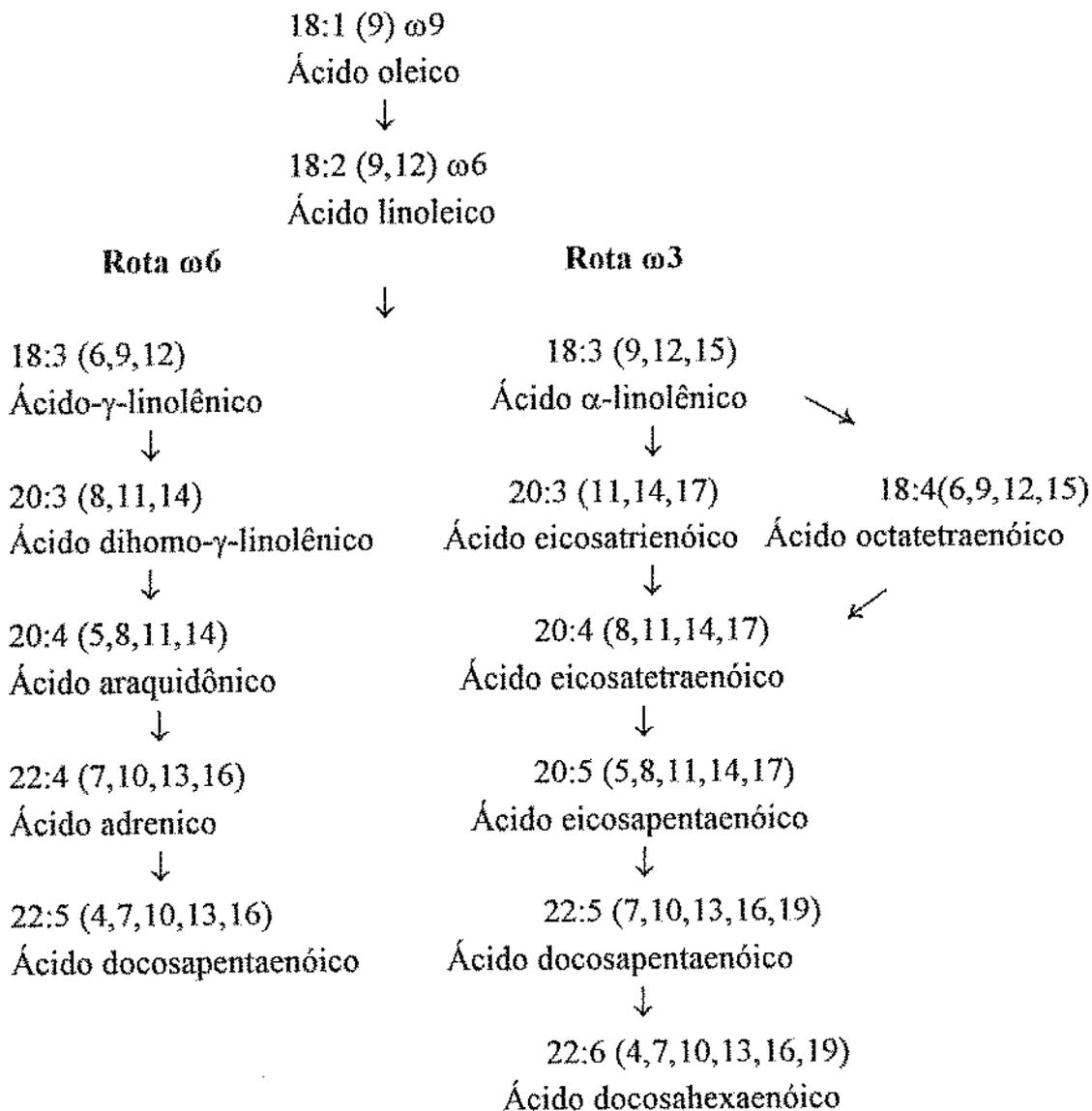
SHAW, em 1966 investigou a presença do ácido  $\gamma$ -linolênico nos fungos Phycomycete *Cunninghamella blakesleeana* e *Rhizopus arrhizus*. A composição qualitativa de ácidos graxos dos fungos foi muito similar, diferindo na porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico. *Cunninghamella blakesleeana* apresentou 13,9% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais; o dobro da porcentagem presente em *Rhizopus arrhizus*, quando incubados à temperatura de 30°C por 7 dias. A temperatura de incubação causou significativas mudanças nestas porcentagens, resultando numa diminuição para 8,5% de ácido  $\gamma$ -linolênico em *C. blakesleeana* quando a temperatura de incubação foi de 37°C. O tempo de incubação causou pequenas flutuações na composição de ácidos graxos, caracterizado por um pequeno aumento do ácido linoleico e diminuição do ácido oleico. Entretanto este fator foi o responsável pela variação da quantidade de lipídeos totais do micélio de *Rhizopus arrhizus*, obtendo um conteúdo máximo ( média de 190 mg de lipídeos/g de biomassa seca ) entre o quinto e o sétimo dia de incubação.

TYRREL, em 1967, objetivando correlacionar a taxonomia de fungos do gênero *Entomophthora* com a presença do ácido  $\gamma$ -linolênico realizou um estudo comparativo envolvendo dezessete espécies diferentes de *Entomophthora* e outras espécies de *Conidiobolus*, *Basidiobolus*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Rhizopus*. O ácido  $\gamma$ -linolênico e o ácido araquidônico estavam presentes nas espécies de *Entomophthora*, *Conidiobolus* e *Phytophthora injestans*, entretanto, nas espécies de *Basidiobolus* e *Rhizopus nigricans* ácidos graxos poliinsaturados de C20 estavam ausentes, o que refletia no maior índice de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrado nestes gêneros. Estes dados, de acordo com o autor, poderiam ser aplicados na taxonomia da família Entomophthoraceae envolvendo a similaridade na composição de ácidos graxos dos gêneros *Entomophthora* e *Conidiobolus* e na separação dos *Basidiobolus* devido a ausência de ácidos graxos poliinsaturados com vinte carbonos.

ELLENBOGEN & ARONSON, em 1969 analisaram a composição de ácidos graxos dos fungos marinhos, *Traustochytrium roseum*, *Traustochytrium aureum*, *Schizochytrium aggregatum* e *Dermocystidium sp* e do phytoflagelado *Phlyctochytrium punctatum* de água fresca. Estes microorganismos apresentaram uma característica diferente dos demais fungos até então analisados. Mostraram-se capazes de sintetizar ácidos graxos das rotas  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . A presença de enzimas desaturases e elongases referentes às duas rotas, resultaram em quantidades significativas de ácido docosahexaenóico (22:6  $\omega 3$ ), ácido eicosapentaenóico (20:5  $\omega 3$ ) e presença de ácido araquidônico (20:4  $\omega 6$ ) na constituição dos fungos marinhos. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico foi de ~1,4% em relação aos ácidos graxos totais encontrados em *Phlyctochytrium punctatum*. Nos fungos marinhos os ácidos octadecatrienóico ( $\alpha$  e  $\gamma$ -linolênico) foram detectados em quantidades traço. As rotas para biossíntese de ácidos graxos insaturados utilizadas pelos fungos estão representadas na figura 2.

SUMNER *et al*, em 1969 estudaram a composição de ácidos graxos de diferentes espécies de fungos da ordem Mucorales. Fungos termotolerantes e termófilos (40 - 50°C), mesófilos (20 - 25°C) e psicrofilos (10 - 20°C), foram cultivados em meio sintético contendo (g/l) : Glicose 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2, Succinato de sódio 5,0 e suplementado com extrato de levedura 5,0, para as espécies de *Mucor*. Os fungos psicrofilos (*M. strictus* e *M. oblongisporus*) apresentaram uma faixa de 20% de lipídeos totais (% p/p) e a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico em *M.strictus* foi duplicada quando o fungo foi incubado à temperatura de 10°C por 10 dias (~ 21%). Os fungos termófilos (*Mucor miehei*) apresentaram grandes quantidades de ácido oleico (~ 50% em relação aos ácidos graxos totais) e pequenas quantidades de ácido linoleico (~ 15%) e ácido  $\gamma$ -linolênico (3-5%), enquanto os termotolerantes (*Rhizopus*), mesófilos (*M. ramannianas*, *M.racemosus*, *M.mucedo* e *M. hiemalis*) e psicrofilos mostraram em sua composição maiores porcentagens de ácido linoleico (15-24%) e ácido  $\gamma$ -linolênico (8-19%). A maior porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico foi de 30% em relação aos ácidos graxos totais da composição de *Mucor ramannianus* na temperatura de incubação 25°C por 14 dias. Os fungos termófilos também sofreram variações significativas na porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico quando cultivados em temperaturas mais baixas.

Figura 2 - Caminho de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados em microorganismos.



Fonte: ELLENBOGEM, B.B. & ARONSON, S. A., 1969.

SUMNER & MORGAN em 1969, deram continuidade ao estudo anterior sobre o efeito da temperatura na composição de ácidos graxos do micélio vegetativo e esporangiosporos de fungos mesófilos, termotolerantes e termófilos da ordem Mucorales. Em todas as espécies analisadas o conteúdo de lipídeos totais era menor na cultura de esporos comparada à cultura de micélio. As espécies termófilas e termotolerantes foram submetidas às temperaturas de incubação de 25° e 48°C. A temperatura de 25°C resultou num conteúdo de lipídeos totais de 24,3% (% p/p) para o micélio de *Mucor miehei*, e 4,1% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais, enquanto que na temperatura de 48°C estes valores diminuíram para 11,9% e 2,0% respectivamente. Nas outras espécies de *Mucor* analisadas também foi observado um aumento na síntese de ácidos graxos insaturados quando a temperatura de incubação foi de 25°C. Os fungos mesófilos analisados embora apresentassem um menor conteúdo de lipídeos totais foram capazes de sintetizar maiores proporções de ácidos graxos poliinsaturados (linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico) comparados aos termófilos e termotolerantes.

MUMMA *et al*, em 1970 deram início a investigação sobre a relação entre a composição de ácidos graxos de fungos termófilos e mesófilos de espécies de *Chaetomium*, *Humicola*, *Malbranchea*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum* e *Stilbella* e temperatura de incubação. O ácido oleico foi encontrado como ácido graxo predominante das espécies termófilas, enquanto ácido linoleico e ácido linolênico ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) foram os mais abundantes em mesófilos. O ácido  $\alpha$ -linolênico estava ausente em todas as espécies termófilas analisadas, enquanto nas espécies mesófilas este ácido graxo foi detectado no nível máximo de 18,5% em relação aos ácidos graxos totais encontrados em *Humicola grisea*. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico em *Mucor globosus* (mesófilo) foi de 15,6% enquanto que em *Mucor pusillus* (termófilo) este valor foi de somente 1,1%. A presença de ácido  $\gamma$ -linolênico foi relatado somente para as espécies de *Mucor*.

SUMNER, em 1970 estudou a composição de ácidos graxos de *Blastocladiella emersonii*, um Phycomycetes aquático que possui além do ácido  $\gamma$ -linolênico, outros poliinsaturados C19 e C20. A fração dos lipídeos polares (24,4%) se mostrou mais insaturada que a fração neutra (75,6%) devido às altas porcentagens de ácido linoleico (9,4%), ácido  $\gamma$ -linolênico (17%), ácido  $\alpha$ -linolênico (3,1%) e principalmente ácido

araquidônico (36,6%). Na fração de lipídeos neutros, o ácido palmítico (13,2%) e o ácido oleico (53%) foram os principais constituintes. A presença dos dois isômeros do ácido linolênico no mesmo fungo foi pela primeira vez reportada, indicando que a biossíntese de ácidos graxos em *B. emersonii* possa se dar pelas rotas  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6. De acordo com o autor, a separação dos Phycomycetes dos Basidiomycetes e Ascomycetes baseado na habilidade de sintetizar ácidos graxos das rotas  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 respectivamente seria inválido, sendo necessário uma melhor análise dos lipídeos de fungos marinhos, em especial Phycomycetes uniflagelados que tem demonstrado uma composição de ácidos graxos diferente dos fungos da mesma ordem até o presente relatado.

WEETE *et al*, em 1970 analisaram as classes de lipídeos encontrados em *Rhizopus arrhizus*. Dos componentes lipídicos separados em cromatografia em camada delgada (TLC), as maiores porcentagens detectadas foram de lipídeos polares (44,4%) e triacilglicerol (22,1%), seguido dos esteróis (16,7%), ácidos graxos livres (11,7%), ésteres metílicos de ácidos graxos (4,1%) e hidrocarbonetos (1,0%). O principal hidrocarboneto identificado no extrato lipídico do micélio de *Rhizopus arrhizus* foi o esqualeno, o qual estava ausente nos esporangiosporos do fungo sobre as mesmas condições de cultivo. A distribuição dos ácidos graxos totais no micélio e esporangiosporos mostraram grandes similaridades. Os ácidos graxos predominantes foram o ácido oleico e linoleico e também foi encontrado quantidades consideráveis do ácido lignocérico (C24).

TYRREL, em 1971 para comprovar a correlação dos gêneros *Entomophthora* e *Conidiobolus* realizou um estudo envolvendo treze espécies diferentes de *Conidiobolus*. A composição de ácidos graxos das espécies de *Conidiobolus* estudadas continuaram similares em complexidade e constituição com os outros membros da família Entomophthoraceae relatados anteriormente pelo autor (TYRREL, 1967). Nas espécies de *Conidiobolus heterosporus* e *Conidiobolus denaeosporos* foram relatados ácidos graxos de cadeia ramificada da série *iso* e *anteiso* de ácidos graxos. De acordo com o autor, o significado da composição de ácidos graxos na taxonomia de fungos pode ser considerado desde que fatores como meio de cultura, tempo e temperatura de incubação e idade fisiológica da cultura sejam controlados para obtenção de resultados reprodutivos que possam ser usados em associação com outros dados disponíveis para taxonomia de fungos.

SUMNER & EVANS, em 1971 analisaram a composição de ácidos graxos de algumas espécies mesófilas e termotolerantes de fungos imperfeitos. Os ácidos graxos detectados nas espécies de *Dactylaria* e *Scolecobasidium* se mostraram similares na composição, contendo principalmente ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e linoleico, enquanto ácido láurico, mirístico, palmitoleico e araquídico ocorreram em pequenas quantidades. Quantitativamente a diferença se deu devido ao maior grau de insaturação dos lipídeos dos mesófilos caracterizados pelos altos níveis de ácido linoleico. A composição de ácidos graxos do fungo *Dactylaria ampulliforme* mostrou a presença de um ácido trienóico ausente nas espécies do mesmo gênero e nas espécies de *Scolecobasidium* examinadas. A detecção do ácido  $\gamma$ -linolênico confirmado por CG-MS, foi relatado como importante fator de questionamento taxonômico da ocorrência deste ácido graxos em fungos imperfeitos, colocando em dúvida a afirmativa de SHAW (1965). Seriam necessários maiores estudos com outros gêneros para confirmar a composição de ácidos graxos, ou de acordo com o autor a ocorrência do ácido  $\gamma$ -linolênico neste fungo poderia ser em decorrência de uma idiosincrasia filogenética.

ANEKWE & DUBAL, em 1971 analisaram a composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis e fosfoglicerídeos de *Glomerella cingulata* após 1,5, 2, 3, 4 e 6 dias de incubação à 22°C. Por quantificação das classes de lipídeos separados em cromatografia em coluna de ácido silícico foi possível observar que o máximo conteúdo de glicerídeos se deu entre o segundo e terceiro dia de incubação (1,8 mg/ml de triacilglicerol e 2,0 mg/ml de fosfoglicerídeo). A composição de ácidos graxos mostrou significativas diferenças em relação ao tempo de incubação, onde o máximo obtido se deu entre o segundo e o terceiro dia, apesar do crescimento do fungo ser maior no sexto dia de incubação. Os ácidos graxos do tipo C14, C16 e C18 saturados e insaturados estavam presentes no fungo, diferindo quantitativamente em cada dia de incubação.

Em 1971, MUMMA *et al* compararam o grau de insaturação dos lipídeos neutros e polares de fungos termófilos e mesófilos de espécies de *Chaetomium*, *Humicola*, *Malbranchea*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum* e *Stilbella* mantendo a temperatura de incubação de 25°C para mesófilos e 45°C para termófilos. Os lipídeos totais obtidos de cada microorganismo após extração com clorofórmio e metanol foram fracionados em lipídeos neutros e polares por cromatografia em coluna de ácido silícico. As

frações foram esterificadas com BF<sub>3</sub>-Metanol e analisadas por cromatografia gasosa. Os autores relataram que os lipídeos polares de algumas espécies termófilas eram mais saturados que a classe de lipídeos neutros, com exceção de *Mucor pusillus* o qual mostrou um índice de insaturação ( USI-duplas ligações/mol de ácido graxo) de 0,94 para a fração polar e 0,88 para a fração neutra. Nas espécies mesófilas os lipídeos polares (1,32USI) eram mais insaturados que os lipídeos neutros (1,14 USI). Entre as espécies analisadas , os lipídeos polares dos termófilos eram mais saturados que os correspondentes lipídeos dos mesófilos. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico detectado em *Mucor globosus* (espécie mesófila) foi de 12,3% em relação aos ácidos graxos totais da fração de lipídeos neutros e 25,7% nos lipídeos polares e em *Mucor pusillus* foi de 1,5% e 1,4% respectivamente. Os ácidos graxos insaturados como  $\gamma$ -18:3,  $\alpha$ -18:3, 18:2 e 16:1 foram detectados na fração polar, enquanto ácidos graxos saturados, como 16:0 e 18:0 foram detectados em maior porcentagem na fração neutra das espécies mesófilas. Algumas espécies termófilas incorporaram preferencialmente ácidos graxos saturados em seus lipídeos polares.

BRUSZEWSKI, *et al*, em 1972 obtiveram dados consistentes com os anteriores numa posterior análise da composição de ácidos graxos de fungos termófilos. Quando *Myriococcum albomyces*, *Mucor miehei*, *Papulaspora thermophila*, *Rhizopus sp*, *Thielavia thermophila* e *Torula thermophila* foram incubados em cultura estacionária à 45°C durante 4 dias apresentaram uma predominância de ácidos graxos saturados do tipo 16:0 e 18:0 em todas as classes de lipídeos analisadas. O grau de insaturação foi calculado pelo número de duplas ligações por mol de ácido graxo (Índice de insaturação-USI). Os lipídeos totais continham uma média de 0,96 USI, enquanto os lipídeos neutros e polares era de 0,86 USI e 0,84 USI para as espécies termófilas analisadas. A presença de ácido  $\gamma$ -linolênico foi detectada nas frações polares e neutras de *Mucor miehei* e *Rhizopus sp*.

SAFE & BREWER, em 1973 analisaram a composição de ácidos graxos do fungo *Chaetomium cochiliodes* (Ascomycetes) quando cultivado em três diferentes meios de cultura. O interesse no estudo deste fungo estava relacionado a produção de antibióticos, o qual não foi afetado drasticamente com a variação do meio de cultura. A análise das frações de lipídeos presentes, detectaram a presença de triacilglicerol, diacilglicerol, esteróis (ergosterol e dehidroergosterol) e ácidos graxos livres. Os principais

ácidos graxos presentes nas frações foram palmítico, oleico e linoleico, com menores quantidades de ácido láurico, mirístico, palmitoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico. A porcentagem das frações de lipídeos e dos ácidos graxos da constituição do fungo sofreram alterações frente a composição variável dos meios de cultura. O meio de cultura contendo em sua composição sacarose, nitrato de sódio, água de maceração de milho e íons metálicos favoreceram a obtenção de quantidades significativas de triacilglicerol, diacilglicerol, esteróis livres e ésteres metílicos de ácidos graxos. A presença do ácido  $\gamma$ -linolênico (0,1-0,9%), confirmada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-MS) foi pela primeira vez identificado em fungo da ordem Ascomycetes, colocando novamente em dúvida o significado filogenético adotado por SHAW (1965).

SAFE, em 1974 analisou as variações no conteúdo de lipídeos e composição de ácidos graxos exibidos pelo fungo *Mucor rouxii* frente às mudanças de temperatura e tempo de incubação. O crescimento máximo do fungo foi obtido à 25°C num período de incubação de 72-96 horas, referentes a fase log de crescimento, enquanto o maior conteúdo de lipídeos foi obtido quando temperaturas maiores (35°C) foram utilizadas para crescimento do fungo. O conteúdo de ácidos graxos exibiu consideráveis variações em relação aos dois parâmetros analisados. Foi observado um aumento no nível de ácidos graxos com o tempo de incubação nas temperaturas de 15, 25 e 35°C. Temperaturas maiores resultaram em maiores níveis de ácidos graxos embora o grau de insaturação destes tenha diminuído.

MANOCHA & DEVEN, em 1975 relataram a existência de uma relação entre o nível de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrado no hospedeiro *Choanephora cucurbitarum* e o desenvolvimento de seu parasita, *Piptocephalis virginiana*. Uma relação direta entre o nível de ácido  $\gamma$ -linolênico e o grau de parasitismo pôde ser observado quando as temperaturas de incubação de 15, 23, 30 e 37°C foram usadas para verificar a composição de ácidos graxos do fungo *C. cucurbitarum*. O nível máximo de ácido  $\gamma$ -linolênico foi observado nas temperaturas de 23 e 15°C, nas quais ocorreram também os maiores graus de parasitismo. A maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico ( 67,5% em relação aos ácidos graxos totais) foi obtida após 16 horas de incubação, a qual coincidiu com o maior grau de susceptibilidade ao parasitismo. O ácido  $\gamma$ -linolênico estava presente no micélio do fungo e não foi identificado no filtrado da cultura. A escolha das melhores condições para obtenção de altos níveis de

ácido  $\gamma$ -linolênico mostraram-se favoráveis ao parasitismo, sugerindo que o ácido  $\gamma$ -linolênico seja usado nutricionalmente para o crescimento de *Piptocephalis virginiana*, baseado no fato que este fungo infecta somente membros da família Mucorales.

DEVEN & MANOCHA, em 1975 investigaram a composição de ácidos graxos das frações de lipídeos neutras e polares de *Choanephora curcubitarum* quando cultivados em meio de cultura contendo extrato de malte, 2,0% e extrato de levedura, 0,1%, pH 6,5 e incubado à 23°C por 30 horas. Todas as classes de lipídeos analisadas; neutros, polares, esteróis e ácidos graxos livres, apresentaram em sua composição o ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico como principais constituintes detectados por cromatografia gasosa. A variação do grau de insaturação entre as classes foi devido à maior proporção de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrado nos lipídeos polares (47,62%) e nos ácidos graxos livres (42,31%). Quando foi adicionado ao meio de cultura o ácido glutâmico (0,2%) foi observado um estímulo à biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente ácido erúico (22:1), ácido lignocérico (24:0) e ácido cerótico (26:0) resultando 6% dos ácidos graxos totais da constituição. Este fator causou pequena diminuição na porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico de 28,41% para 26,72% em relação aos ácidos graxos totais após adição do ácido glutâmico ao meio de cultura. O aumento de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados pela adição de ácido glutâmico, foi interpretado como um mecanismo envolvendo a indução ou formação de enzimas que catalisam a elongação da cadeia dos ácidos graxos. Uma outra possibilidade seria o aumento da produção de acetato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos o que resultaria o aumento na síntese de ácidos graxos.

DEVEN & MANOCHA, em 1976 em continuidade ao estudo anterior, investigaram a composição de ácidos graxos das frações de lipídeos de *Choanephora curcubitarum* em diferentes condições de cultivo. Variações da temperatura de incubação, tempo de cultivo, pH e luz foram capazes de provocar alterações quantitativas dos ácidos graxos do fungo, mantendo a mesma composição de ácidos graxos da constituição. O grau de insaturação dos lipídeos diminuíram significativamente com o aumento da temperatura, intensidade da luz, pH e idade da cultura, mostrando estar relacionados diretamente com o conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico presente nas frações. O alto conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico obtido após incubação por 48 horas na temperatura de 15°C (46,8% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos

ácidos graxos totais) comparado à 37°C (9,2%) refletiu diretamente na diminuição do conteúdo de ácido palmítico e oleico obtendo 8% de ácido palmítico e 17,3% de ácido oleico à 15°C e 38,6% e 23,7% respectivamente na temperatura de incubação de 37°C. O aumento de pH mostrou efeito negativo na produção de lipídeos totais, capaz de diminuir de 212 mg à pH 6,5 para 86 mg de lipídeos totais após 48 horas de incubação à pH 8,5. As condições de intensidade de luz não tiveram efeito significativo na produção de lipídeos totais. A influência das condições de cultivo sobre o grau de insaturação foram observadas principalmente em relação aos lipídeos polares, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e difosfatidilglicerol, que tiveram aumentos apreciáveis no conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico frente à diminuição da temperatura de incubação. O conteúdo de 8% de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrado na fosfatidilcolina após incubação à 37°C foi elevado para 41,3% e 69,3% quando o fungo foi submetido à temperatura de incubação de 23°C e 15°C respectivamente.

LETOURNEAU *et al*, em 1976 analisaram qualitativamente e quantitativamente a composição de ácidos graxos da parede celular de *Choanephora curcubitarum* utilizando métodos microquímicos, espectrofotometria infra-vermelho e difração em raio X. As análises químicas da parede celular revelaram a presença de quitina (17%), quitosana (polímeros de glicosamina, 28,4%), açúcares neutros (7,2%), ácido urônico (2,4%), proteínas (8,2%) e lipídeos (13,8%). A extração dos lipídeos da parede celular do fungo liofilizado com os solventes clorofórmio-metanol resultou 12,8% de lipídeos totais, no qual contém 6,6% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais da constituição. Uma posterior extração foi realizada com hidróxido de potássio metanólico resultando 1% de peso em lipídeos e quantidades traços de ácido  $\gamma$ -linolênico. Os principais carboidratos identificados foram o ácido glicurônico, galactose, manose e fucose, enquanto que o teor de glicosamina obtido foi de 67,7% em relação aos aminoácidos totais presentes. Estruturalmente a parede celular de *Choanephora curcubitarum* era constituída por uma região microfibrilar, formada por microfibrilas paralelas e orientadas ao acaso e outra região amorfa.

MANOCHA & CAMPBELL, em 1978 estudaram a variação da composição de ácidos graxos de *Thamnidium elegans*; um fungo psicrófilo pertencente à ordem Mucorales, frente à diferentes temperaturas de incubação. Uma característica incomum na biossíntese de ácidos graxos de

fungos ocorreu quando o fungo foi submetido à temperaturas mais baixas de crescimento (10°C). Foi observado um aumento da quantidade de ácido octadecatetraenóico (18:4  $\Delta$  6,9,12,15), um ácido graxo raramente encontrado na constituição de fungos, de 0,9% à temperatura de incubação de 25°C para 10,3% à 10°C. Este acréscimo foi acompanhado da diminuição do nível de ácido  $\gamma$ -linolênico (18:3  $\Delta$  6,9,12) de 18,7% para 11,3% em relação aos ácidos graxos totais nas temperaturas de incubação de 25° e 10°C, respectivamente. Foi também observado o aparecimento do ácido  $\alpha$ -linolênico nas temperaturas de incubação de 10°C e 18°C. Estes dados levaram os autores a sugerir que as enzimas desaturases da rota  $\omega$ 6 de *Thamnidium elegans* seriam ativas em todas as temperaturas de incubação, enquanto que as enzimas desaturases da rota  $\omega$ 3 seriam sensíveis à temperatura, tornando-se ativas em temperaturas mais baixas de incubação, o que explicaria o aparecimento do ácido  $\alpha$ -linolênico e o aumento do nível do ácido octadecatetraenóico à 10°C.

MANOCHA, em 1981 observou que *Choanephora curcubitarum*, fungo susceptível ao micoparasita *Piptocephalis virginiana* continha em sua composição o ácido  $\gamma$ -linolênico, enquanto que em fungos resistentes ao parasitismo como *Linderina pennispora* e *Chaetomium cochlioides* o ácido  $\gamma$ -linolênico não estava presente. Uma exceção foi verificada em *Phascomyces articulosis*, o qual embora possuísse o ácido  $\gamma$ -linolênico em sua constituição se mostrou resistente ao micoparasita. A presença do ácido  $\gamma$ -linolênico não seria o único fator determinante do parasitismo. A composição e/ou estrutura da parede celular do hospedeiro, a primeira barreira que o parasita deve vencer para obtenção dos nutrientes necessários, determinará o sucesso ou falha do parasitismo. Estruturalmente, foi observado que a parede celular do fungo resistente ao parasitismo era formada de duas camadas, uma com orientação ao acaso microfibrilar e outra com arranjo microfibrilar paralelo. A presença de papilas formadas em reação defensiva ao ataque do parasita seriam capazes de prevenir o contato direto do micoparasita com o protoplasma do hospedeiro, tornando alguns fungos resistentes ao parasitismo.

FUKUDA & MORIKAWA, em 1987 testaram a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por *Mucor ambiguus* IFO 6742 em fermentador, com emulsificante não iônico e utilizando técnica de imobilização das células em BSP (Biomass Support Particles). Os novos métodos adotados de adição de emulsificantes não iônico ao meio de cultura numa concentração de 2,0 % p/v e

imobilização celular resultaram uma produção de ácido  $\gamma$ -linolênico de 14-18 mg/dl de meio de cultura para os emulsificantes do tipo ésteres de ácidos graxos de Sorbitan polioxietileno (Rheodol e Tween) comparados à 12mg/dl na ausência de emulsificantes. O aumento da produtividade foi atribuído ao aumento da secreção de ácido  $\gamma$ -linolênico para o meio de cultura devido ao efeito do emulsificante no aumento da permeabilidade da membrana celular aos lipídeos de *Mucor ambigua*s. Após crescimento do microorganismo na presença de emulsificantes foram extraídos do sobrenadante 0,5 à 0,6% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais com o uso de Rheodol TW-0320 e Tween 20 respectivamente. A presença dos emulsificantes não iônicos não causaram alterações significativas na crescimento celular, enquanto os aniônicos, catiônicos e anfotéricos não deram resultados satisfatórios devido à inibição do crescimento do microorganismo. O uso de fermentador em cultivo contínuo repetido por 7 ciclos utilizando as células imobilizadas em BSP(s) e emulsificante não iônico, foram as melhores condições adotadas, resultando uma produtividade de 17,1 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico/ litro.hora. O uso de cultivo contínuo sem emulsificante e sem imobilização resultou numa produtividade de 6,4 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico / litro.hora.

SHIN & SHIN, em 1988 estudaram a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico em 15 linhagens de fungos Mucorales com o objetivo de isolar aquele que melhor apresentasse crescimento celular e conteúdo lipídico. O fungo FB-354, isolado do solo da Coréia e identificado como *Mucor sp* produziu 29,9% de lipídeos totais por peso seco de biomassa e um conteúdo de 16,8% de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais da composição quando incubado em agitador rotativo em frascos Erlenmeyer contendo por litro de meio de cultura : Glicose 25g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3g, NaCl 0,1g, extrato de malte 0,2g, peptona 0,1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mg e  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em pH 4,6 à temperatura de incubação de 25°C durante 7 dias. O óleo de *Mucor sp* foi fracionado por cromatografia em coluna de ácido silícico resultando 81,1% de lipídeos neutros, 7,2% de glicolipídeos e 11,8% de fosfolipídeos. A maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico foi detectado nos lipídeos neutros como componente de reserva do fungo.

SAJBIDOR *et al*, em 1988 estudaram a produção de lipídeos e composição de ácidos graxos de *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Mortierella ramanniana* e *Rhizopus arrhizus* em meios de cultura contendo maltose,

lactose, glicose, amido solúvel ou acetato de sódio como fonte de carbono e autolisado de levedura como fonte de nitrogênio. O pH foi ajustado para 6,1 e os frascos Erlenmeyer contendo 200ml de meio de cultura foram inoculados com suspensão de esporos contendo uma concentração final de  $2,5 \times 10^3$  esporos por mililitro de meio de cultura, incubados por 7 dias à temperatura de 28°C. As linhagens estudadas mostraram diversidade na utilização de cada substrato. *Mucor mucedo* apresentou em sua composição de ácidos graxos, 8,5% de ácido  $\gamma$ -linolênico quando crescia em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e 14,3% de ácido  $\gamma$ -linolênico quando a glicose foi substituída por glicerol. Este substrato resultou uma produtividade de 0,58g de ácido  $\gamma$ -linolênico/100g de glicerol e 18,6% de lipídeos por biomassa seca (% p/p). Solução de amido foi a melhor fonte de carbono para os fungos *Mortierella* e *Rhizopus* resultando produtividade de 0,61 e 0,34g por 100g de substrato respectivamente. Os substratos glicose e maltose se mostraram mais eficientes para produção de lipídeos para *Mucor plumbeus* resultando aproximadamente 23% de lipídeos totais por biomassa seca (%p/p). O substrato lactose quando testado nestas linhagens de Mucorales se mostrou de baixa eficiência, enquanto acetato de sódio foi capaz de resultar em alto teor de lipídeos totais na maioria das linhagens. Porém a produtividade de ácido  $\gamma$ -linolênico obtida com este substrato não foi capaz de superar a produtividade obtida com o uso de glicose, devido à baixa quantidade de biomassa resultante.

HANSSON & DOSTÁLEK, em 1988, investigaram o acúmulo de lipídeos e a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por quatro linhagens de *Mortierella* em diferentes condições de cultivo, utilizando crescimento em agitador rotativo em frascos e em fermentador. Procedendo-se modificações da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, íons metálicos, tempo e temperatura de incubação obteve-se uma produtividade média de 4 mg/l.h de ácido  $\gamma$ -linolênico para *Mortierella ramanniana* e uma média de 3 mg/l.h para *Mortierella isabellina* quando cultivada em agitador rotativo. A maior quantidade de biomassa seca (11-12g/l) e conteúdo de lipídeos em biomassa (~24% p/p) foi observado quando glicose ou frutose foram utilizadas como fonte de carbono, enquanto que o maior conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico (~ 24%) foi obtido durante o crescimento com solução de amido como substrato. Extrato de levedura e KNO<sub>3</sub> se mostraram mais eficientes para produção de lipídeos pelos fungos que NH<sub>4</sub>Cl e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Altas taxas de Carbono/Nitrogênio (C/N) também se mostraram favoráveis à produção de lipídeos. Pequenas quantidades de íons cobre e zinco tiveram efeito positivo no acúmulo de lipídeos, conteúdo

de ácido  $\gamma$ -linolênico e no consumo de glicose pelas linhagens analisadas. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos lipídeos totais (% p/p) foi de 21,9% e de 15,1% após 3 dias de incubação nas temperaturas de 20 e 30°C respectivamente. Temperaturas menores favoreceram a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico, mas desfavoravelmente diminuíram a taxa de crescimento do fungo. Quando cultivados em fermentadores, as linhagens de *Mortierella ramanniana* não cresceram da maneira satisfatória e o consumo de glicose foi incompleto, resultando diminuição da produtividade de ácido  $\gamma$ -linolênico.

HUN-SEUNG & SHIN, em 1989 reportaram a descoberta de uma promissora linhagem de *Mucor sp* (KCTC 8407P) produtora de ácido  $\gamma$ -linolênico. Estudos das condições de cultivo, como fontes de carbono e nitrogênio, pH inicial e taxa C/N do meio de cultura sobre o crescimento do fungo, conteúdo lipídico total e de ácido  $\gamma$ -linolênico foram realizados visando o aumento da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico. O meio de cultura contendo 3% de glicose como fonte de carbono e 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio, correspondente a uma taxa de C/N de 56.6 mostrou alto crescimento celular (550mg de biomassa seca/100ml de meio de cultura) e maior conteúdo de lipídeos totais (132 mg/100ml), resultando 13,72% de ácido  $\gamma$ -linolênico nos lipídeos totais. As fontes de nitrogênio também afetaram a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico em especial quanto ao conteúdo de lipídeos, como é o caso do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (136mg/ml), comparado ao  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (média de 50mg/ml). Das fontes de nitrogênio orgânicas testadas (uréia, peptona, soytona e casaminoácido), uréia se mostrou mais eficiente, em especial para o crescimento do fungo, embora não afetasse o conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico presente nos lipídeos totais. A biomassa não sofreu alterações significativas na faixa de pH de 4 à 9, enquanto o conteúdo de lipídeos sofreu duplicação (~ 240mg/100ml) quando o pH do meio foi ajustado para condições mais alcalinas (8-9). A suplementação do meio de cultura com acetato de sódio, um substrato para Acetil-SCoA, precursora de ácidos graxos, resultou em aumento dos lipídeos totais por volume de meio de cultura (~ 340mg lipídeos/100ml de meio de cultura), e uma porcentagem de 63,6% de lipídeos por biomassa seca, embora não alterasse o conteúdo final de ácido  $\gamma$ -linolênico nos lipídeos totais.

FEOFILOVA *et al* em 1989 baseando na hipótese de termoadaptação de fungos frente às baixas temperaturas, submeteram *Cunninghamella japonica* às temperaturas de incubação de 33°C, 17°C e

associação das duas temperaturas através da mudança de uma para outra. A temperatura de 33°C levou à obtenção de alto conteúdo de ácido oleico (50-55%) nos lipídeos polares, em contraste à temperatura de incubação de 17°C que resultou em aumento na porcentagem de ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico, num teor de 35,45% dos ácidos graxos totais. A transferência do micélio após 24 horas de crescimento à 33°C para a temperatura de 17°C provocou uma paralização do acúmulo de biomassa e conteúdo de lipídeos por 3 horas devido ao estágio de "aclimação" às novas condições de crescimento por *Cunningamella japonica*. Entretanto a mudança mais significativa ocorrida nos lipídeos do fungo foi em relação à composição de ácidos graxos dos lipídeos polares. No período de "aclimação", ou seja o estágio inicial originado do estado de choque com a mudança de temperatura, foi observado um aumento na insaturação dos lipídeos em decorrência do aumento do conteúdo de 18:2 e 18:3 $\gamma$  e diminuição de 16:0, 16:1, 18:0 e 18:1. Estas mudanças na composição de ácidos graxos, de acordo com o autor, seria um mecanismo controle de crioadaptação para manter rapidamente a fluidibilidade dos lipídeos da membrana e preservar o estado de homeostase.

SHIMIZU *et al*, em 1989 pesquisou intensivamente a biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados de várias espécies de *Mortierella*. Estudos confirmaram que a rota biossintética utilizada por este fungo é a  $\omega$ 6. Aparentemente este fungo é incapaz de produzir o precursor da rota  $\omega$ 3, o ácido  $\alpha$ -linolênico pela inexistência da enzima responsável por sua síntese a partir do ácido linoleico. Os principais ácidos graxos poliinsaturados produzidos por este fungo são o ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido dihomo  $\gamma$ -linolênico encontrados em espécies de *Mortierella*, como *M. hydrophila*, *M. elongata*, *M. parvispora*, *M. alpina* e *M. zychae*.

KAMISAKA *et al*, em 1990 confirmaram a conversão do ácido linoleico [1-14C] à ácido  $\gamma$ -linolênico pela enzima  $\Delta$ 6 desaturase de *Mortierella ramanniana* var *angulispora*. O uso do ácido linoleico marcado também foi utilizado para verificar qual classe de lipídeos participava do processo de  $\Delta$ 6 desaturação. A incorporação deste ácido graxo pelas células do fungo com posterior desaturação à ácido  $\gamma$ -linolênico ocorreu principalmente no triacilglicerol e fosfatidilcolina durante a fase de crescimento exponencial, mostrando significativa mudança na fase de crescimento estacionária. O ácido  $\gamma$ -linolênico foi incorporado rapidamente nas primeiras horas de incubação na fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina com diminuição de seu

nível após 4 horas de incubação, enquanto nos triacilglicerol e diacilglicerol o conteúdo máximo foi obtido após 4 horas de reação. A possibilidade de uma transferência do ácido  $\gamma$ -linolênico entre as classes de lipídeos justificaria a variação no conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico observado nas classes individualmente durante o tempo de incubação.

LINDBERG & HANSSON, em 1991 com o intuito de reduzir o custo do meio de cultura para produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por fungos, testaram fontes mais econômicas de carbono e de nitrogênio para o crescimento de *Mucor rouxii* CBS 416.77 em frascos e fermentadores. As fontes de carbono testadas foram amido, amido hidrolisado, melação de beterraba e resíduo de côco após extração em concentrações correspondentes à 30g/l de glicose. As fontes de nitrogênio, torta de colza, resíduo de côco e dois tipos de extrato de levedura foram comparados. Como padrão de referência, extrato de levedura Difco e glicose foram usados na preparação do meio de cultura contendo íons metálicos, em pH de 5,5 e incubados à temperatura de 25 °C por 43 horas. A produtividade máxima de ácido  $\gamma$ -linolênico obtida em frascos foi de 4,9 mg/l.h quando foi utilizado amido hidrolisado, embora o conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico em lipídeos tenha sido menor (17% p/p) que obtido com glicose (25% p/p). O uso de resíduo de côco aumentou a biomassa de 6,8 g/l obtido com o padrão de referência para 8,0g/l e o conteúdo de lipídeos totais por biomassa de 25% p/p para 35% p/p. A produtividade de ácido  $\gamma$ -linolênico não variou significativamente entre os extratos de leveduras utilizados para crescimento do fungo em agitador rotativo. Quando foram utilizados fermentadores, o extrato de levedura de maior custo (Difco) resultou em maior produtividade de ácido  $\gamma$ -linolênico (14 mg/l.h).

GANDHI & WEETE, em 1991 objetivando aumentar a produção de ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico por *Pythium ultimum* cultivaram o fungo em agitador rotatório (120 rpm) por 6 dias à 25°C, seguido da adição de glicose ao meio de cultura (2% p/v) e posteriormente nova incubação à 13°C. Após esta etapa, a cultura permanece estacionária por 10 dias. Nestas condições, foi observado um aumento de 253% e de 236% no conteúdo de ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico respectivamente, comparado à linha de base. A variação da temperatura de incubação não alterou a porcentagem de ácido eicosapentaenóico, enquanto que os valores encontrados para o ácido araquidônico e ácido  $\gamma$ -linolênico sofreram mudanças significativas em cada temperatura. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico

detectada foi de 1,1% e 6,7% em relação aos ácidos graxos totais detectados nas temperaturas de incubação de 25°C e 13°C respectivamente. Foi encontrado um teor máximo de ácido araquidônico de 14,6% na temperatura de 25°C. A presença destes ácidos graxos indicam que *Pythium ultimum* utiliza as rotas  $\omega 3$  e  $\omega 6$  para a biossíntese de seus ácidos graxos.

TORNALOVA *et al*, em 1992 analisaram diferentes condições de cultivo para o fungo *Mucor* INMI em relação ao teor de nitrogênio do meio e a extração dos lipídeos originada da biomassa do fungo. O cultivo do fungo foi realizado em fermentadores por 72 horas à 27°C, em meio de cultura contendo 6% de glicose, 0,05% de extrato de levedura e 0,2 e 0,1% de uréia para as taxas de Carbono/Nitrogênio de 20:1 e 40:1, onde o conteúdo de ésteres metílicos do ácido  $\gamma$ -linolênico era de 22,4 e 37,2g por 100g de lipídeos, respectivamente. Embora o peso da biomassa seca tenha se tornado menor para a taxa de C/N de 40:1 (~ 3,5g/l) comparada à taxa de 20:1 (~ 4,8 g/l), a produção de lipídeos totais aumentou consideravelmente (~ 20g por 100g de biomassa seca). Quando o nível de nitrogênio do meio foi mantido ao redor de 50mg por 100ml de meio de cultura, durante o período de crescimento, o conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico depois de 72 e 96 horas foi acrescido ao redor de 30%. Diferentes processos e reagentes foram testados para extração de lipídeos da biomassa seca em acetona ou liofilizada. O processo mais eficiente para extração ocorreu com o uso de etanol a 95% logo após a liofilização da biomassa. Após a separação e quantificação dos lipídeos por cromatografia em camada delgada (TLC) e densitometria verificou-se que o etanol sendo um solvente mais polar que o hexano é capaz de extrair lipídeos polares com maior eficiência, enquanto o hexano era mais eficiente em retirar triacilgliceróis e carotenóides presentes no extrato do fungo. A mistura clorofórmio- metanol foi capaz de extrair todas as classes de lipídeos eficientemente.

FUNTNIKOVA *et al*, em 1992 analisaram culturas de *Mucor sp* quando submetidas à irradiação UV por 1 minuto. Os diferentes mutantes foram selecionados com base na taxa de acúmulo de biomassa quando cresciam em frascos com 50ml de meio de cultura mineral contendo 3% de glicose, durante 3 dias à 28°C. A linhagem mutante denominada de *Mucor* 12M produziu um acúmulo duas vezes maior de biomassa (~ 8,5g/l) que a linhagem original (~ 3g/l). A composição de ácidos graxos dos lipídeos totais da nova linhagem de *Mucor* determinado por cromatografia gasosa em coluna capilar e confirmados por espectrometria de massa com pirrolidina revelou a presença de

14,2% de ácido  $\gamma$ -linolênico e 30,26% de ácido oleico em relação aos ácidos graxos totais, e a completa ausência do  $\alpha$ -isômero deste ácido graxo, o que o torna uma promissora fonte para uso medicinal.

KENDRICK & RATLEDGE, em 1992a estudaram o fungo oleoginoso *Entomophthora exitalis* objetivando aumentar a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua constituição. Foi utilizado cultura contínua em fermentador com taxa de diluição constante (0,04 /h) e variação na temperatura de incubação e na tensão de oxigênio dissolvido. Este último parâmetro quando analisado individualmente se mostrou ineficiente para aumentar a insaturação dos lipídeos de *Entomophthora exitalis*, enquanto a temperatura foi o principal fator de regulação do grau de insaturação. Os ácidos graxos identificados eram pertencentes às rotas  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6. As porcentagens de ácidos graxos poliinsaturados da rota  $\omega$ 6, como ácido araquidônico e ácido  $\gamma$ -linolênico se mostraram superiores aos valores encontrados de ácidos graxos da rota  $\omega$ 3. A porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico foi de 1,5% em relação aos ácidos graxos totais da constituição dos lipídeos neutros e 4,8% dos ácidos graxos totais presentes nos lipídeos polares quando incubado à temperatura de 24°C. O aumento da insaturação dos lipídeos à temperatura de 24°C quando comparado à 30°C ocorreu principalmente devido ao aumento no nível de ácido araquidônico, ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido linoleico.

KENDRICK & RATLEDGE, em 1992b realizaram a quantificação dos lipídeos e análise da composição de ácidos graxos dos fungos, *Traustochytrium aggregatum*, *Traustochytrium roseum*, *Schizochytrium aggregatum*, *Mortierella alpina-peyron*, *Conidiobolus nanodes*, *Entomophthora exitalis* e *Saprolegnia parasitica*. Os fungos analisados apresentaram pequenas quantidades de ácido  $\gamma$ -linolênico, porém altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, em especial ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico. Espécies não oleaginosas, *Traustochytrium* e *Schizochytrium* possuíam menos que 10% de lipídeos totais em sua constituição. *Conidiobolus nanodes* e *Entomophthora exitalis*, linhagens conhecidas como espécies oleaginosas devido à alta porcentagem de lipídeos (26% e 25% respectivamente) apresentaram ácidos graxos das rotas  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6, em especial o ácido araquidônico, o qual aparece numa média de 17% em relação aos ácidos graxos totais da constituição. *Mortierella alpina-peyron* apresentou 38% de lipídeos, onde foram detectados 11% de ácido araquidônico, 5% de ácido  $\gamma$ -linolênico e 9% de ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico. Nos fungos

analisados, com exceção do *T. aureum*, a fração de fosfolípidos se mostrou mais insaturada que os lípidos neutros, esfingolípidos e glicolípidos.

JAREONKITMONGKOL *et al*, em 1992 estudaram um mutante de *Mortierella alpina* 1S-4 produtora de ácido araquidônico que exibiu baixa atividade da enzima  $\Delta 5$ -desaturase. A incubação do microorganismo em fermentador durante 6 dias à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, resultou um alto teor de ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico, no valor de 23,4% em relação aos ácidos graxos totais e um baixo teor de ácido araquidônico de 3,7%. A produção de ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico foi de 3,2g/l de meio de cultura e de ácido araquidônico foi de 0,5g/l. Os outros ácidos graxos de sua constituição foram o ácido palmítico (11%), esteárico (12,8%), oleico (22,7%), linoleico (8,9%), ácido  $\gamma$ -linolênico (6,5%) e lignocérico (7,8%).

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS :

#### 3.1 - MATERIAIS :

##### 3.1.1 - Reagentes e Materiais específicos :

- Reagentes químicos : Ácidos, bases, sais minerais, solventes (grau P.A. de marcas Merck, Carlo Erba, Riedel ou equivalentes)
- Meios de cultura : Potato dextrose ágar (PDA), Extrato de levedura microbiológico, Peptona bacteriológica, Bacto-Tryptona, Extrato de malte (marcas Difco e Biobrás)
- Padrões para cromatografia gasosa : Ésteres metílicos de ácidos graxos : ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido  $\gamma$ -linolênico, marca Sigma.
- Padrões para cromatografia em camada delgada : 1(3)-monoleína, 1,2(1,3)-dioleína, trioleína, ácido oleico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina da marca Sigma e lecitina de soja purificada (Lucas Meyer).
- Sílicagel 60 G, Art. 7731.1000, Merck, para cromatografia em camada delgada.
- Sílicagel 60, Art. 7734, Merck. Tamanho da partícula 0,063 - 0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM ) para cromatografia em coluna.

##### 3.1.2 - Equipamentos :

- Balança analítica Mettler, mod. H-10
- Agitador rotatório New Brunswick Scientific
- Estufas bacteriológicas, Fanem
- Estufa à vácuo, Fanem, Mod.099EV
- Evaporador rotativo, Tecnal, TE 130
- Câmara climática Fanem Modelo 346
- Incubador tipo Shaker rotatório, New Brunswick Scientific INC. Série G-24
- Espectrofotômetro Beckman DU - 70
- Banhos-maria termostaticado, Fanem
- Potenciômetro Digimed TE-902
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod. J-2183
- Cromatógrafo marca PHILIPS modelo Pye Unicam PU 4550 com detector de ionização em chama.
- Espectrômetro de massa marca HP modelo HP 5890 com detector de massa MSD 5979.

## 3.2 - MÉTODOS :

### 3.2.1 - Isolamento e seleção de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico

#### 3.2.1.1 - Coleta de amostras

Amostras de solo, frutas, água, resíduos industriais e vísceras de peixe de água doce e salgada foram coletadas de diferentes regiões de estados brasileiros, como São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Rondônia e Amazonas. As amostras de solo foram coletadas numa profundidade média de 15cm, acondicionadas em sacos plásticos e utilizadas imediatamente após a coleta.

#### 3.2.1.2 - Isolamento de fungos

Cerca de 1 g de amostra foi adicionada em tubos de ensaio contendo 5ml de água destilada previamente esterilizada. O líquido sobrenadante foi inoculado em placas contendo o meio ágar batata dextrosado (PDA), composto de 10 g de batata, 4g de glicose e 3 g de ágar em 100 ml de água destilada. As placas foram incubadas a 30°C por 72 a 96 horas. As colônias de fungos isoladas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio e incubadas a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas.

#### 3.2.1.3 - Seleção preliminar de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico

Os fungos isolados de acordo com o item 3.2.1.2 foram inoculados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 50ml contendo 25 ml de meio de cultura líquido, previamente esterilizado composto de 20g/l glicose, e 10g/l de extrato de levedura em pH 6,5. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C com agitação de 150 rpm durante 4 dias. Após o tempo de incubação a biomassa foi centrifugada, lavada por duas vezes com água destilada, lavada com acetona e seca até peso constante em estufa à vácuo a 40°C. As células foram rompidas por trituração em almofariz utilizando-se areia como abrasivo.

Os lipídeos totais foram extraídos com a mistura dos solventes clorofórmio, metanol e água na proporção de 2:1:0,8, de acordo com o método

de BLIGH & DYER (1959), descrito no item 3.2.5 e posteriormente secos em atmosfera de nitrogênio.

Os lipídeos totais foram metilados com reagente esterificante composto de cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol ( $\text{NH}_4\text{Cl} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{MeOH}$ ) de acordo com o item 3.2.6. A análise da composição de ácidos graxos dos lipídeos obtidos dos fungos foi realizada por cromatografia gasosa e em coluna capilar Chrompack (CP-Sil - 88 Fused Sílica WCOT 0,25 mm x 50m ). A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos de ésteres de ácidos graxos.

### 3.2.2 - Preparação do inóculo

O fungos isolados e mantidos em tubos de ensaio contendo o meio ágar batata dextrosado (PDA) foram suspensos em 10ml de água estéril. O tubo foi raspado na superfície a fim de resultar numa suspensão homogênea de esporos. Um mililitro desta suspensão, contendo  $7 \times 10^7$  esporos foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 50ml contendo 25ml do meio de cultura líquido a ser utilizado em cada experimento.

### 3.2.3 - Determinação do peso seco de biomassa

Os frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido previamente esterilizados, foram inoculados com a suspensão de esporos e incubados em agitador rotatório com agitação constante de 150 rpm, à temperaturas e períodos variados, de acordo com cada experimento.

Para determinar a produção de biomassa após o tempo de incubação, os meios de cultura foram centrifugados à 15.000 rpm por 15 minutos a  $10^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi lavada duas vezes com 10 ml de água destilada e em seguida novamente centrifugada. Após a lavagem as células foram filtradas em papel de filtro previamente tarado, secas em acetona e levadas para estufa à vácuo à  $40^\circ\text{C}$  até completa secagem. O peso seco de biomassa foi determinado gravimetricamente, em balança analítica.

### 3.2.4 - Determinação da Glicose residual no meio de cultura

O método utilizado baseia-se na oxidação enzimática da glicose pela glicose - oxidase (Oxidoreductase; EC 1.1.3.4 ) à ácido glucônico e peróxido de hidrogênio.

Foram retiradas amostras de 20µl do mesmo meio de cultura cultivado com o microorganismo selecionado, contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, após diferentes tempos de incubação e colocadas em tubos de ensaio. Adicionou-se 2,0ml do reativo de trabalho, preparado pela dissolução de 50ml de solução de 4-aminofenazona 25mmol/l em tampão TRIS 0,92mol/l, 50 ml do reativos fenol 55 mmol/l e 3ml de solução enzimática, composta de glicose-oxidase (>1000U/ml) e peroxidase (>120U/ml) em 1 litro de água destilada. A mistura foi incubada em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Após este tempo a reação foi paralizada pela introdução dos tubos de ensaio em banho de gelo. A Absorbância foi medida em espectrofotômetro a 505 nm, utilizando-se como padrão uma solução de glicose na concentração de 100mg/dl.

$$\text{Cálculo : Glicose mg/dl} = \text{A amostra} \times \frac{100\text{mg/dl}}{\text{A padrão}}$$

### 3.2.5 - Extração e determinação do teor de lipídeos totais :

Empregou-se o método de BLIGH & DYER modificado para a extração dos lipídeos totais dos microorganismos, levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes metanol, clorofórmio e água destilada (2 : 1 : 0,8 )

Os lipídeos da biomassa seca (média de 50 à 150mg), foram extraídos após secagem e trituração em almofariz com abrasivo (areia tratada com ácido clorídrico diluído ).

A biomassa quantificada e triturada foi transferida para tubo de ensaio com rêsca de capacidade 30ml e foram adicionados exatamente 2ml de água, 5ml de metanol e 2,5ml de clorofórmio. A mistura foi agitada em agitador rotativo durante duas horas, e uma nova diluição foi feita com auxílio de 2,5ml de clorofórmio e 2,5ml de solução de sulfato de sódio 1,5%, resultando em um sistema bifásico após agitação vigorosa por 2 minutos. Após a separação das camadas por centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos a camada metanólica superior contendo água e compostos não lipídicos foi descartada, e a camada

clorofórmica inferior filtrada em papel de filtro contendo 1g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e recolhida em outro tubo de ensaio com rosca de capacidade de 30ml, previamente tarado.

A quantidade de lipídeos presentes na biomassa foi determinada por método gravimétrico a partir do extrato total de clorofórmio, evaporando-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e posteriormente em estufa à vácuo até peso constante. Os tubos foram pesados em balança analítica após resfriamento em dessecador sob vácuo.

$$\text{Cálculo : } \% \text{ de lipídeos totais} = \frac{\text{peso dos lipídeos (g)} \times 100}{\text{peso da amostra (g)}}$$

### 3.2.6 - Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para cromatografia gasosa :

O procedimento adotado neste trabalho para a metilação de ácidos graxos teve como método o descrito por HARTMAN .& LAGO (1973) adaptado por MAIA (1992).

As amostras de lipídeos ( 30 à 100 mg ) foram saponificadas pela adição de 4ml de solução de NaOH 0,5N em metanol. Os tubos de ensaio fechados foram colocados em banho de água fervente por 3 a 5 minutos, até dissolução dos glóbulos de gordura e em seguida resfriados imediatamente em água corrente.

A esterificação das amostras foi realizada pela adição de 5ml do reagente esterificante no tubo de ensaio contendo a amostra saponificada. O reagente esterificante foi preparado pela mistura de NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e metanol: 10g de cloreto de amônio foram adicionadas a 300ml de metanol, seguido por 15ml de ácido sulfúrico concentrado, em balão de fundo redondo e boca esmerilhada, com agitação manual. Adaptou-se o balão a um condensador e a mistura foi submetida ao refluxo até dissolução total do cloreto de amônio com aquecimento em manta e temperatura controlada.

O tubo foi aquecido fechado em banho de água fervente por 5 minutos e resfriado em água corrente. Aos tubos foram acrescentados 4ml de solução saturada de cloreto de sódio para eliminação da água residual.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram extraídos pela adição de 5ml do solvente (hexano, éter de petróleo, etc.), seguido de agitação vigorosa por 30 segundos. O sobrenadante contendo os ésteres metílicos foram acondicionados em frascos escuros e guardados à 4°C até serem analisados por cromatografia gasosa.

### 3.2.7 - Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Após a metilação das amostras de lipídeos totais do microorganismo e das frações de lipídeos neutros e fosfolipídeos, os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa.

A cromatografia foi realizada com a temperatura do detector de 280°C, temperatura do injetor, 250°C e a temperatura da coluna de 180°C por 7 minutos com programação de 5°C/min até a temperatura máxima de 220°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (H<sub>2</sub>) com fluxo de 2,0 ml/min na coluna. O volume da amostra injetado foi de 0,4 µl.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os de padrões autênticos de ésteres de ácidos graxos e pela técnica de co-eluição ("spiking") de padrões junto com a amostra..

A quantificação dos ácidos graxos foi dada pela porcentagem em relação aos ácidos graxos totais, utilizando-se o integrador PHILIPS PU 4811.

### 3.2.8 - Análise dos ácidos graxos por espectrometria de massa

O cromatógrafo gasoso - espectrômetro de massa de marca HP 5890, detector de massa MSD 5979 foi usado para obtenção do espectro de massa do ácido  $\gamma$ -linolênico. O éster metílico do ácido graxo foi separado em coluna capilar do tipo HP 5 (25 m  $\times$  0,2mm) após fragmentação por um impacto eletrônico de 70eV.

A cromatografia foi realizada com a temperatura do detector de 280°C, temperatura do injetor, 250°C e a temperatura da coluna de 180°C por 7 minutos, programada para aumento de 6°C/min. até a temperatura máxima de 250°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,0 ml/min. O volume da amostra injetado foi de 2,0 µl.

O padrão de éster metílico de ácido  $\gamma$ -linolênico e os lipídeos após esterificação obtidos do microorganismo tiveram seus espectros de massa registrados e comparados.

### 3.2.9 - Determinação da porcentagem de ácidos graxos e matéria insaponificável :

O procedimento utilizado neste trabalho segue o método de KATES (1972), permitindo a determinação por um mesmo procedimento da porcentagem de ácidos graxos presentes na amostra e a porcentagem de matéria insaponificável.

Amostras de peso conhecido de lipídeos ( 15-30 mg ) colocadas em balão de fundo redondo e boca esmerilhada foram saponificadas pela adição de 5ml de NaOH 0,3N metanólico com aquecimento e refluxo por cerca de 1-2 horas até completa saponificação.

Após o resfriamento, a solução foi retirada do refluxo e foram adicionadas gotas de fenolftaleína a 1% em etanol 90% e 10ml de metanol 90% em água, seguida da extração da matéria insaponificável com 3 a 4 porções de 5ml de éter de petróleo em funil de separação. A solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos e deixada em repouso até a separação das camadas. A camada superior, contendo a fração insaponificável foi recolhida em béquer previamente tarado.

O solvente foi evaporado em atmosfera de nitrogênio e estufa à vácuo até peso constante. O peso da matéria insaponificável foi determinado gravimetricamente, de acordo com o seguinte cálculo :

$$\% \text{ matéria não - saponificável} = \frac{\text{peso não saponificável (mg)}}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

O volume total da fase metanólica recolhida na etapa anterior foi acidificado com 0,3ml de HCl 6N.

Os ácidos graxos foram extraídos com 3 a 4 porções de éter de petróleo, no mesmo procedimento descrito anteriormente. A camada superior contendo os ácidos graxos da amostra foram recolhidas em bequer tarado. A quantidade de ácidos graxos foi determinada gravimetricamente, de acordo com o seguinte cálculo :

$$\% \text{ ácidos graxos} = \frac{\text{peso ácidos graxos (mg)}}{\text{peso amostra (mg)}} \times 100$$

### 3.2.10 - Identificação e conservação da linhagem produtora de ácido $\gamma$ -linolênico

O microorganismo produtor de ácido  $\gamma$ -linolênico foi identificado através das características taxonômicas, de acordo com DOMSCH *et al* (1980).

Para manutenção da cultura, o microorganismo foi cultivado em ágar batata dextrosado. Após incubação por 96 horas à 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de cultivo. A cultura foi conservada à 5°C.

### 3.2.11 - Estudo das condições de fermentação para produção de ácido $\gamma$ -linolênico

#### 3.2.11.1 - Comparação entre linhagens selecionadas como produtoras de ácido $\gamma$ -linolênico

Duas linhagens previamente selecionadas como produtoras de ácido  $\gamma$ -linolênico isoladas no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos (LB-54 e LB-14) foram comparadas com a linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 em relação a alguns parâmetros, como produção de biomassa (item 3.2.3), produção de lipídeos totais (item 3.2.5), consumo de glicose (item 3.2.4) e teor de ácido  $\gamma$ -linolênico (item 3.2.7).

As linhagens foram submetidas às mesmas condições de crescimento para efeito de comparação. Foram utilizados 25ml do meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, pH de 6,5-7,0, com temperatura de incubação de 28°C num período de 2 a 10 dias de crescimento com agitação constante a 150 rotações por minuto.

Amostras do mesmo meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de crescimento para determinação da porcentagem de glicose consumida.

#### 3.2.11.2 - Influência do tempo de cultivo na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

A linhagem LB-54 de *Mucor sp* selecionada para os estudos de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foi analisada quanto ao crescimento em diferentes tempos de incubação. Foram utilizados 25ml do meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, pH de 6,5-7,0, com

temperatura de incubação de 28<sup>0</sup>C num período de 2 a 10 dias de crescimento com agitação constante de 150 rotações por minuto.

Foram analisados a produção de biomassa, produção de lipídeos e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico num período de 1 à 14 dias de incubação.

### 3.2.11.3 - Influência do pH inicial do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p )

Para o estudo da influência do pH inicial do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca ( %p/p ) foi utilizada uma faixa de pH de 4,5 a 8,5 obtida pela adição de HCl 0,1N ou NaOH 0,1N ao meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l. Os meios foram colocados em frascos Erlenmeyer de capacidade 50ml contendo 25ml do meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, incubados a 28<sup>0</sup>C com agitação constante de 150 rpm, num período de incubação de 2 à 7 dias.

### 3.2.11.4 - Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

Foram testadas as seguintes fontes de carbono : glicose, frutose, xilose, galactose, sacarose, maltose, glicerol, sorbitol, lactose, amido, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico. As diversas fontes foram adicionadas ao meio de cultura em quantidade suficiente para resultar em 0,67 moles de carbono / litro de meio de cultura, correspondente a 20 g/l de glicose. O extrato de levedura foi usado como fonte de nitrogênio, numa concentração de 10g/l, o que resulta uma taxa constante de C/N de 10,81 para todas as fontes de carbono adicionadas. Os meios foram colocados em Erlenmeyer de capacidade 50ml contendo 25ml do meio de cultura em pH 6,5-7,0, incubados a 28<sup>0</sup>C em agitação constante a 150 rpm por um período de 5 dias.

### 3.2.11.5 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

Foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio : extrato de levedura, autolisado de levedura, polipeptona, extrato de malte, uréia, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e NaNO<sub>3</sub>. Tais fontes foram adicionadas ao meio

de cultura em quantidade suficiente para resultar em 0,0053 moles de nitrogênio / litro de meio de cultura, o que corresponde a 10g/l de extrato de levedura contendo 7,4% de nitrogênio total. A glicose foi usada como fonte de carbono numa concentração de 20g/l, numa taxa constante de C/N de 10,81 para todas as fontes de nitrogênio adicionadas.

O autolisado de levedura (0,076 % de nitrogênio total) foi adicionado ao meio de cultura para taxas de C/N de 105 e 210. Foram utilizados Erlenmeyer de 50ml contendo 25ml do meio de cultura em pH 6,5-7,0, incubados a 28°C em agitação constante à 150 rpm por um período de 5 dias.

#### 3.2.11.6 - Efeito da taxa Carbono /Nitrogênio ( C/N ) na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e consumo de glicose.

O meio selecionado para os ensaios foi composto de 20g/l de glicose e 10g/l de extrato de levedura equivalendo a uma quantidade de 8g de carbono / l e 0,74g de nitrogênio / l respectivamente, correspondente a uma taxa de C/N de 10,81.

Para verificar a influência da taxa de C/N na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico a concentração do extrato de levedura foi modificada de tal modo a resultar em valores de 5,40, 10,8, 21,6, 43,2, 54,0, 108,1 e 162,2 na taxa C/N. Os meios foram colocados em Erlenmeyer de capacidade 50ml contendo 25ml do meio de cultura em pH 6,5-7,0, incubados a 28°C em agitação constante de 150 rpm por 5 dias.

#### 3.2.11.7 - Efeito da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

Foi testado o efeito de diferentes temperaturas de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico. A linhagem selecionada foi incubada nas temperaturas de 12°C, 18°C, 28°C e 38°C em 50 ml de meio do cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, pH 6,5-7,0. Os meios foram colocados em Erlenmeyer de capacidade 250ml, incubados com agitação constante a 150 rpm por um período de 5 dias.

### 3.2.11.8 - Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na obtenção de lipídeos totais e biomassa seca

Foi testada a influência de íons metálicos, magnésio, ferro, cálcio, cobre, zinco e manganês na produção de lipídeos totais/biomassa seca (% p/p) pela linhagem selecionada como produtora de ácido  $\gamma$ -linolênico. Foram utilizados 25 ml de meio de cultura em Erlenmeyer de capacidade 50ml., incubados à 28°C com agitação constante a 150 rpm por um período de 5 dias.

O meio estudado continha a seguinte composição por litro de meio de cultura : Glicose, 20g; extrato de levedura, 10g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3g;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2mg.

### 3.2.11.9 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais e biomassa seca

A linhagem selecionada como produtora de ácido  $\gamma$ -linolênico foi cultivada em diferentes meios de cultura. Aliquotas de 1ml de suspensão de esporos do microorganismo foram inoculadas nos frascos Erlenmeyer de 50ml contendo 25ml dos meios de cultura, e incubados a 28°C em agitação constante de 150 rotações por minuto por 5 dias. A composição por litro de meio de cultura foram as seguintes :

Meio 1 ( SHIN & SHIN, 1988 ) : Glicose, 25g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3g; extrato de malte, 0,2g; peptona, 0,1g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3g;  $\text{NaCl}$ , 0,1g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1mg.

Meio 2 ( FUKUDA & MORIKAWA, 1987 ) : Glicose, 30g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2g; uréia, 1g; extrato de levedura, 0,4g; extrato de malte, 0,4g; polipeptona, 0,2g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3g;  $\text{NaCl}$ , 0,1g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,5mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1mg.

Meio 3 ( TORNALOVA *et al*, 1992 ) : Glicose, 60g; uréia, 1g; extrato de levedura, 0,5g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g;  $\text{NaCl}$ , 0,5g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg.

Meio 4 ( LINDEBERG & HANSSON, 1991 ) : Glicose, 30g; extrato de levedura, 5g;  $\text{KNO}_3$ , 1g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g;

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 15mg; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,1g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,5mg;  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 7,5mg; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1mg.

Meio 5 ( SHIMIZU *et al* ,1988 ) : Glicose, 20g e extrato de levedura, 10g.

### 3.2.11.10 - Efeito da ação simultânea de adição de glicose ao meio de cultura e variação da temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

O microorganismo foi cultivado por 4 dias a 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l em Erlenmeyer de capacidade 250ml contendo 50ml do meio em pH 6,5-7,0.

Após este período foi feita uma nova adição de glicose previamente esterilizada em autoclave, de tal modo a restaurar a concentração de 2% p/v de glicose no meio de cultura. Os frascos foram submetidos a uma nova incubação na temperatura de 12°C, por um período de três, seis e dez dias. A incubação foi feita em agitação constante a 150 rpm.

### 3.2.11.11 - Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura na produção de ácido $\gamma$ -linolênico

O microorganismo foi cultivado por 4 dias a 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l em Erlenmeyer de capacidade 250ml contendo 50ml do meio em pH 6,5-7,0.

Após este período foi feita uma nova adição de glicose previamente esterilizada em autoclave, de tal modo a resultar em concentrações de 1, 2, 5, 7 e 10% p/v de glicose. Os frascos foram submetidos a uma nova incubação à temperatura de 12°C por um período de três dias. A incubação foi feita em agitação constante a 150 rpm.

### 3.2.11.12 - Fracionamento dos lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* em cromatografia de coluna.

Os lipídeos totais extraídos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foram fracionadas em lipídeos neutros, glicolipídeos e fosfolipídeos por cromatografia em coluna de Silicagel. Foi utilizado uma coluna de vidro de 50cm de comprimento por 2,5cm de diâmetro interno, contendo 25g de Silicagel 60 (70-230 mesh, Merck). O adsorvente foi misturado com 60ml de

clorofórmio e adicionado à coluna. Uma camada de 1cm de sulfato de sódio anidro foi adicionada ao topo da coluna e a altura total do leito foi de 15cm.

Um peso conhecido (aproximadamente 500mg) de lipídeos foram dissolvidos em 1ml de clorofórmio e adicionados ao topo da coluna cuidadosamente.

Para a separação das classes de lipídeos na coluna cromatográfica foram utilizados 400 ml de clorofórmio para eluir a fração de lipídeos neutras (denominada fração 1). A fração 2 composta de glicolipídeos e esfingolipídeos foi eluída com 400ml de acetona e a fração 3 composta de fosfolipídeos foi eluída com 400ml de metanol.

O teor de lipídeos de cada fração eluída foi determinado gravimetricamente. O solvente de eluição foi evaporado em evaporador rotatório e o conteúdo das frações foi transferido para um tubo de ensaio previamente tarado. O solvente foi parcialmente evaporado com nitrogênio (N<sub>2</sub>) e a secagem total completada em estufa à vácuo, até atingir peso constante. As porcentagens de cada classe foram calculadas em relação ao peso total dos lipídeos adicionados na coluna. As determinações foram realizadas em triplicatas.

#### 3.2.11.13 - Análise da composição das frações de lipídeos por cromatografia em camada delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada foi realizada misturando-se 45g de Sílica gel G-60 (Merck) com 90ml de solução de ácido bórico 0,3M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20×20cm com 2mm de espessura, com aplicador Desaga. As placas foram aquecidas a 120°C por 1 - 2 horas para ativação antes de serem utilizadas.

Foram aplicados 20 µl de cada amostra na placa. O desenvolvimento do cromatograma foi realizado à temperatura de 25°C e a fase móvel foi usada de acordo com a classe de lipídeos a ser separada.

Para identificação dos lipídeos neutros foi utilizado a mistura hexano : éter dietílico : ácido acético, na proporção de 80 : 20 : 1 (v/v). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 30 minutos. Foram utilizados como padrões trioleína, 1,2(1,3)-dioleína, 1(3)-monoleína na concentração de 1% em solução acetona : etanol 1:1. A revelação de cromatograma foi feita através da colocação da placa de cromatografia em câmara de Iodo sublimado, aquecendo-se a 110°C por 45 minutos.

O sistema de solventes utilizado para a separação dos lipídeos polares (fosfolipídeos) foi clorofórmio : metanol : água, na proporção de 65 : 25 : 4 (v/v). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 40 minutos. Foram utilizados como padrões fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e lecitina de soja purificada na concentração de 1% em solução clorofórmio : metanol 1:1. A revelação de cromatograma foi através da colocação da placa de cromatografia em câmara de Iodo sublimado, aquecendo-se a 110°C por 45 minutos.

## 4 - RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1 - Isolamento e seleção de microorganismos

#### 4.1.1 - Seleção preliminar de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico

Após a análise da composição de ácidos graxos das 384 linhagens de microorganismos isoladas, através de cromatografia gasosa, foram selecionados preliminarmente 4 fungos que apresentaram na sua composição de ácidos graxos o ácido  $\gamma$ -linolênico.

A tabela 4 indica a composição de ácidos graxos das linhagens selecionadas de acordo com o item 3.2.1.3.

Tabela 4 - Composição de ácidos graxos dos lipídeos de fungos selecionados como produtores de ácido  $\gamma$ -linolênico pertencentes à coleção do Laboratório de Bioquímica (LB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

Linhagem LB n°	Ácidos graxos (%)								
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 $\alpha$	18:3 $\gamma$	outros
14	2,5	18,1	1,9	5,6	42,4	21,4	—	7,3	0,8
54	0,8	18,6	0,3	4,4	46,3	12,6	—	14,7	2,3
509	6,2	11,2	1,5	5,6	21,4	12,7	2,9	1,9	36,6
780	1,7	9,7	5,3	2,5	25,3	35,6	5,9	4,5	9,5

A linhagem LB-54 obtida de amostras de solo da região de Campinas, São Paulo foi selecionada como a melhor produtora de ácido  $\gamma$ -linolênico dentre as 4 linhagens preliminarmente selecionadas por apresentar maior conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico dentre os ácidos graxos totais de sua constituição.

#### 4.2 - Identificação da linhagem LB-54 selecionada

A linhagem de nº 54 da coleção do Laboratório de Bioquímica foi identificada como *Mucor sp*, apresentando columellae bem desenvolvido e ápices não ramificados, de acordo com as características taxonômicas descritas por DOMSCH *et al*, em 1980.

As colônias de *Mucor sp* apresentaram rápido crescimento em PDA (Potato Dextrose Agar) quando incubados à 30°C. A pigmentação característica é esbranquiçada no início do crescimento, transformando-se em cinza escuro ao longo de sua maturação. Os sporangiophores formam uma massa densa distribuídos ao longo do crescimento.

A figura 3 ilustra a linhagem selecionada.

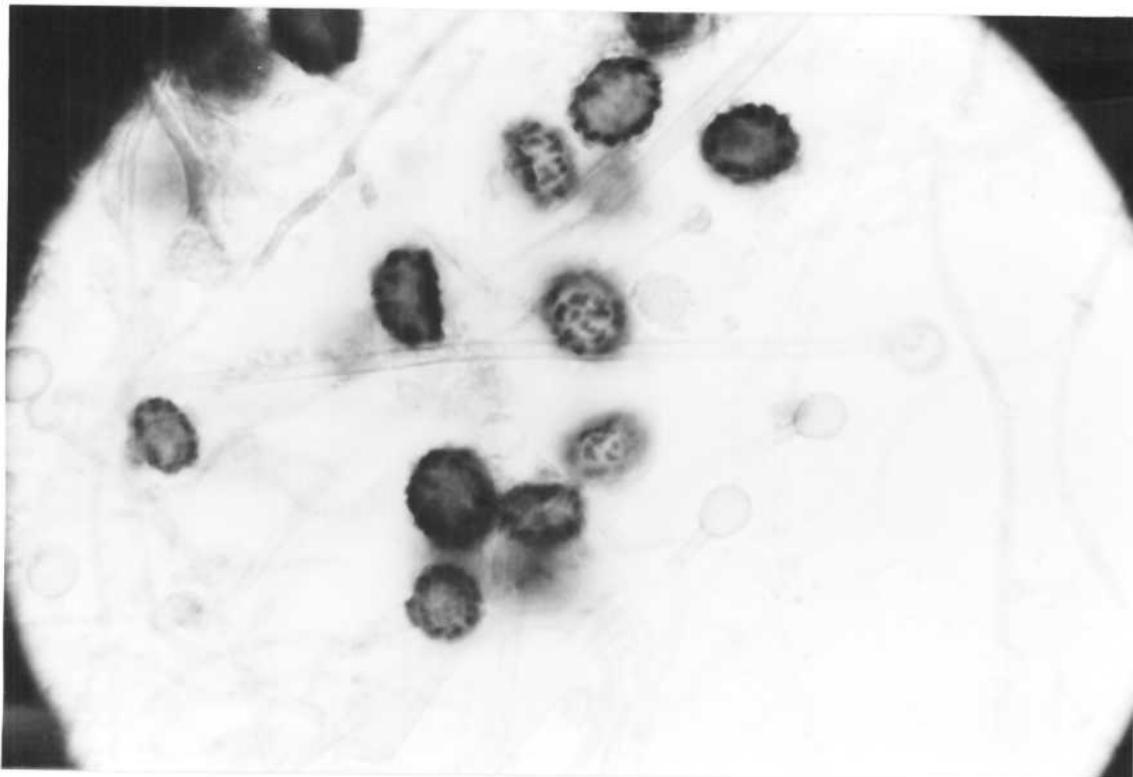
#### 4.3 - Obtenção de lipídeos da linhagem selecionada LB-54 de *Mucor sp*

Foi realizada fermentação líquida em frascos Erlenmeyer de capacidade 250ml contendo 50 ml de meio de cultura composto de 20g/l de glicose e 10g/l de extrato de levedura com pH 6,5 durante 5 dias à 28°C.

Após extração dos lipídeos totais (item 3.2.5) do micélio de *Mucor sp*, obteve-se aproximadamente 2,5g de óleo de *Mucor sp* a partir de 2 (dois) litros de meio de cultura.

Este óleo foi acondicionado em frascos escuros e guardados à temperatura de 4°C.

Figura 3 -Linhagem LB-54 identificada como *Mucor sp.* Aumento de 400 × em microscopia ótica.

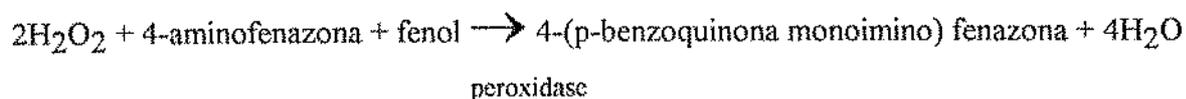
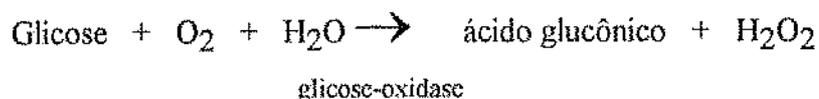


#### 4.4 - Comparação da linhagem LB-54 de *Mucor sp* com outras espécies de *Mucor* em relação ao teor de biomassa seca e conteúdo de lipídeos totais.

As linhagens LB-54 e LB-14 que apresentaram os maiores teores de ácido  $\gamma$ -linolênico foram comparadas entre si e com a linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 produtora de ácido  $\gamma$ -linolênico quanto à obtenção de biomassa, conteúdo de lipídeos totais e consumo de glicose em relação ao tempo de incubação ( item 3.2.11.1).

As figuras 4, 5 e 6 ilustram os resultados.

A determinação do consumo de glicose medindo-se a glicose residual no meio de cultura foi realizada de acordo com o item 3.2.4. O método utilizado baseia-se na oxidação enzimática da glicose pela glicose - oxidase (Oxidoreductase; EC 1.1.3.4 ) à ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. A  $H_2O_2$  em presença da peroxidase produz o acoplamento oxidativo do fenol com a 4-aminofenazona dando lugar a formação de um cromógeno de cor vermelho-cereja, com um máximo de absorção a 505 nm, segundo o esquema :



As linhagens produziram maior teor de biomassa seca após o quinto dia de incubação. Os valores máximos obtidos foram de 6,5, 5,8 e 5,7g de biomassa seca por litro de meio de cultura para as linhagens LB-14, LB-54 e linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 respectivamente, após 5 dias de incubação a 28°C. (Figura 4)

Embora o maior valor de biomassa tenha sido obtido com a linhagem LB-14, um valor significativamente maior de lipídeos totais foi obtido com a linhagem LB-54 no quinto dia de incubação (1,2g/l). A quantidade foi correspondente ao dobro dos lipídeos totais obtidos da linhagens LB-14 e ao triplo que os obtidos da linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 sobre as mesmas condições de incubação.(Figura 5)

Verificou-se que com 5 dias de incubação, onde se obteve o conteúdo máximo de lipídeos totais e de biomassa foi consumido 100% da glicose presente no meio de cultura pelas três linhagens analisadas (Figura 6). Na ausência deste nutriente cessou o crescimento do fungo e a biossíntese de lipídeos foi diminuída.

O acúmulo de lipídeos durante a fase de crescimento ativa do fungo e posterior diminuição deste conteúdo foi encontrado também para outros fungos da ordem Mucorales demonstrando um padrão similar de resposta em função do tempo de incubação. O teor de lipídeos do micélio de *Rhizopus arrhizus* relatado por SHAW (1966) apresentou um conteúdo máximo entre quinto e sétimo dia de incubação no valor de 185 mg de lipídeos/g de biomassa seca. Após o vigésimo primeiro dia de incubação o conteúdo de lipídeos diminuiu para 27mg/g.

A relação lipídeos/biomassa foi utilizada neste estudo para comparação quanto a produção de lipídeos pelas linhagens de *Mucor* analisadas. A linhagem selecionada LB-54 apresentou um valor de 20,73g de lipídeos totais/100g de biomassa seca (%p/p). Foram encontrados os valores de 11,20 %p/p e 8,18 %p/p para as linhagens LB-14 e de *Mucor miehei* NRRL 3420 respectivamente após 5 dias de incubação.

FUNTIKOVA *et al* (1992) selecionaram diferentes linhagens de *Mucor sp* após submetê-los à irradiação UV visando aumentar a produção de biomassa. A linhagem inicial que produziu 3g de biomassa seca/l resultou, após irradiação num mutante, a linhagem denominada *Mucor* 12M que produziu 8,5g/l de biomassa seca após 3 dias de fermentação.

Uma linhagem de *Mucor sp* relatada por KANG & SHIN (1989) apresentou 5,5 g/l de biomassa seca e 1,32g/l de lipídeos totais após incubação por 5 dias em meio de cultura composto de 3% de glicose e 0,1% de extrato de levedura.

HANSSON & DOSTÁLEK, (1988) analisaram a obtenção de biomassa e o acúmulo de lipídeos por quatro espécies de *Mortierella*. O crescimento do fungo foi alterado significativamente frente às mudanças das condições de cultivo. A maior quantidade de biomassa seca (11-12g/l) e conteúdo de lipídeos/biomassa seca (24%p/p) foi obtido após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo 30g/l de glicose, 5,0g/l de extrato de levedura, 1,0g/l de KNO<sub>3</sub> e íons ferro, cobre, zinco, magnésio e cálcio.

SHIN & SHIN, (1988) obtiveram altos níveis de lipídeos/biomassa nos fungos *Mortierella isabellina* IFO 7884 (32,2%) e *Choanephora cucurbitarum* IFO 5985 ( 39,8%) da ordem Mucorales.

Figura 4 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e biomassa seca das linhagens de *Mucor* após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

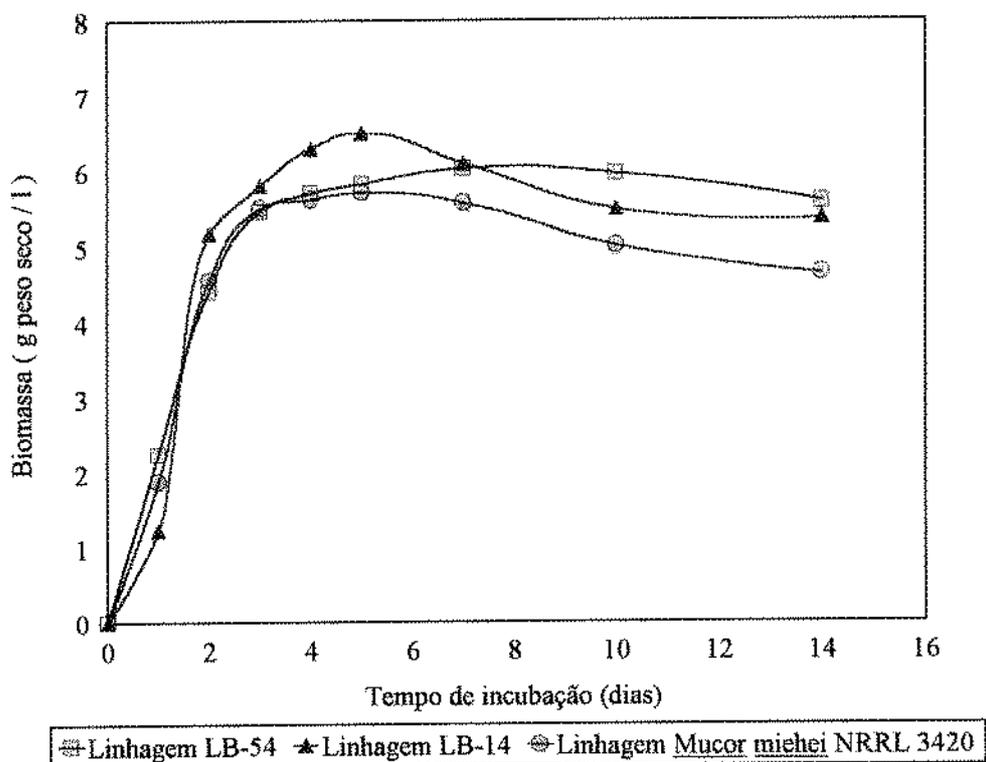


Figura 5 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e conteúdo de lipídeos totais das linhagens de *Mucor* após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l

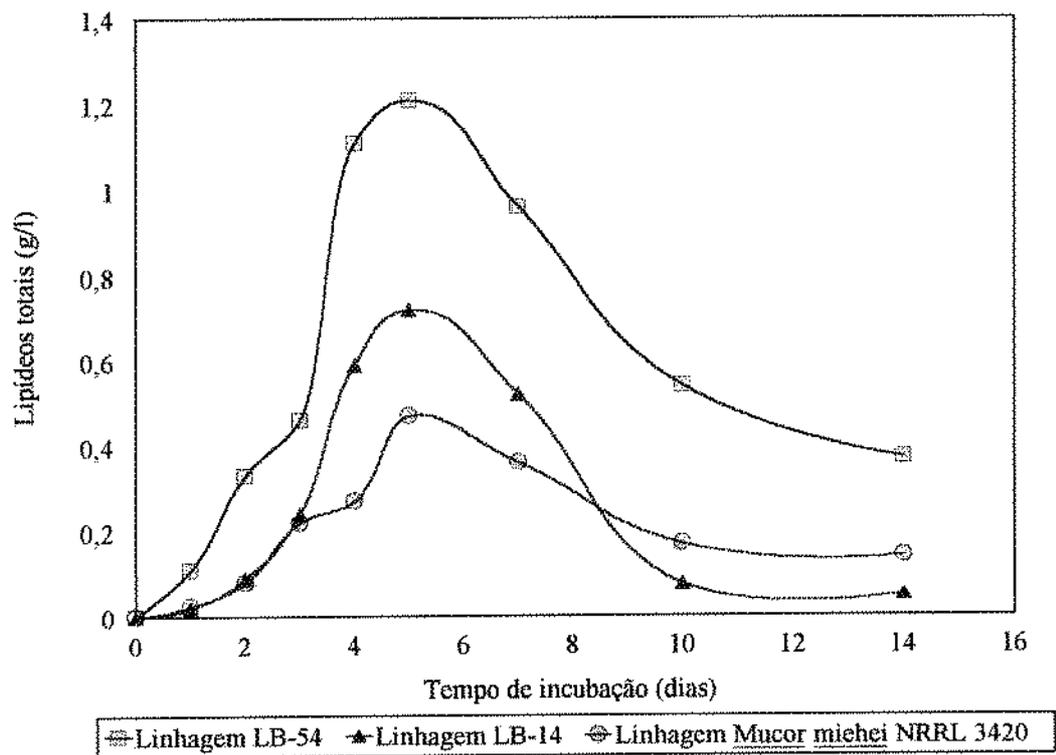
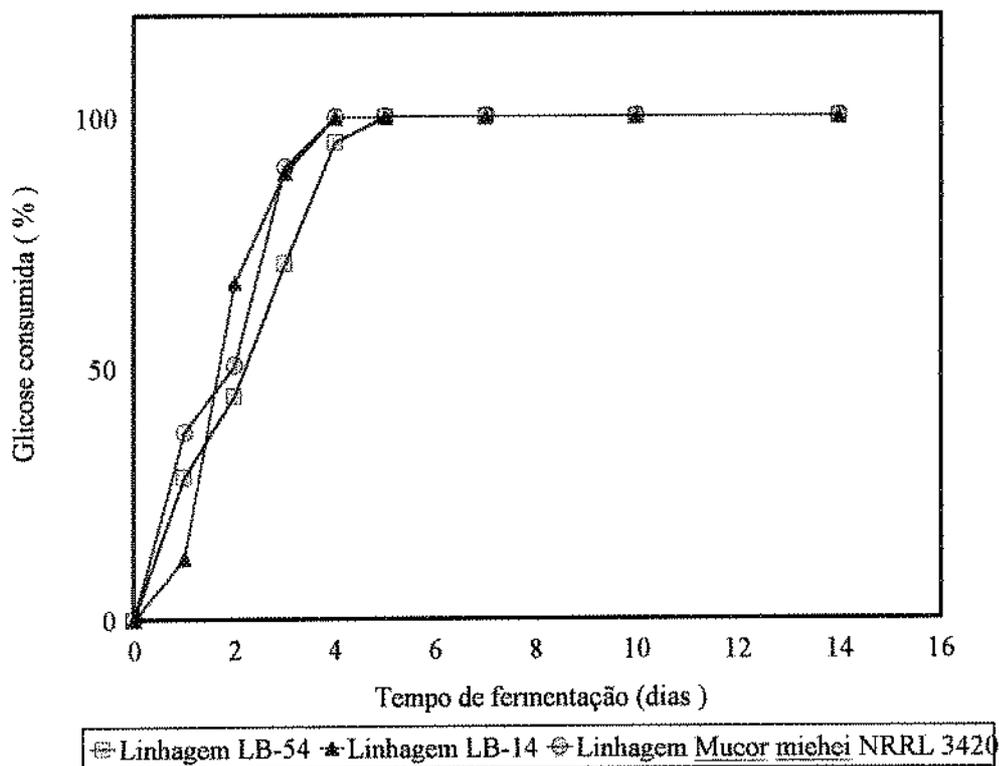


Figura 6 - Estudo da relação entre o tempo de fermentação e consumo de glicose pelas linhagens de *Mucor* após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l



#### 4.5 - Composição de ácidos graxos das linhagens de *Mucor sp* produtoras de ácido $\gamma$ -linolênico obtidos por cromatografia gasosa

A figura 7 ilustra o perfil da composição de ácidos graxos das linhagens LB-54, LB-14 e de *Mucor miehei* NRRL 3420 quando submetidas às mesmas condições de cultivo e incubação. A cromatografia foi realizada de acordo com o item 3.2.7.

Os dados demonstrados indicam que a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais da linhagem LB-54, LB-14 e *Mucor miehei* NRRL 3420 foram de 14,68 %, 7,74 % e 6,12 % respectivamente. A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico obtida com a linhagem LB-54 de *Mucor sp* se mostrou superior aos dados relatados por SAJBIDOR *et al* (1988) para *Mucor mucedo* 1384 (8,0 %), *Mucor plumbeus* CCM 474 (11,4 %), *Mortierella ramanniana* 1022 (9,4 %) e para *Rhizopus arrhizus* VUPL 23 (10,8 %) após incubação por 7 dias em meio de cultura contendo glicose.

As maiores porcentagens de ácido  $\gamma$ -linolênico / ácidos graxos totais na constituição de lipídeos de alguns Mucorales foram relatadas por SHIN & SHIN, (1988) presentes em *Mucor ambigus* IFO 6742 (16,0%) e em *Choanephora cucurbitarum* IFO 5985 (15,5%).

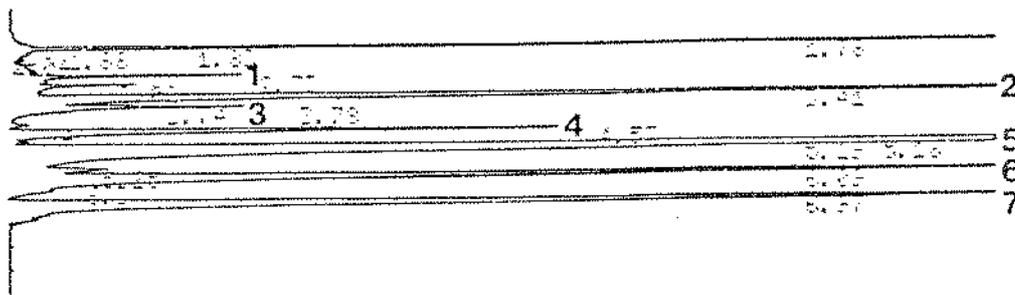
A composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* mostrou-se similar à linhagem mutante, *Mucor* 12M relatado por FUNTNIKOVA *et al* (1992) como promissora fonte de ácido  $\gamma$ -linolênico.

Os principais ácidos graxos da composição da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foram o ácido palmítico, oleico, linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico. Nas três linhagens analisadas o isômero ácido  $\alpha$ -linolênico estava ausente.

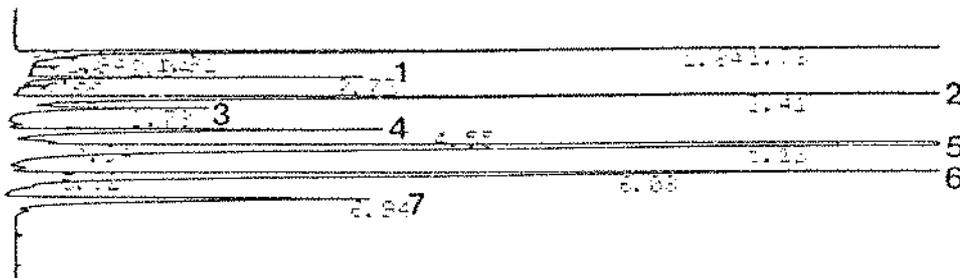
Figura 7 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 (A), linhagem LB-14 (B), e linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 (C) obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

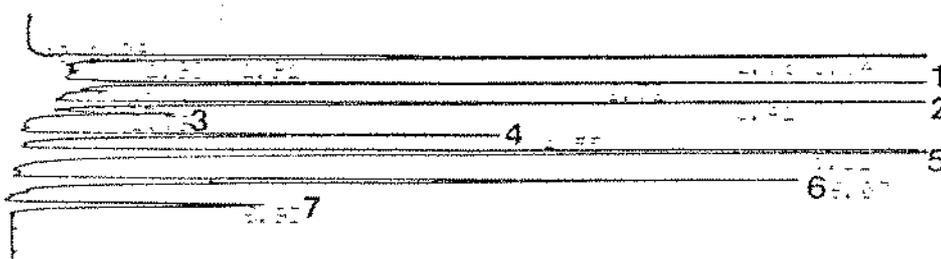
A



B



C



#### 4.6 - Determinação da porcentagem de ácidos graxos totais e matéria insaponificável dos lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O método empregado, descrito no item 3.2.9, permite a determinação por um mesmo procedimento da porcentagem de ácidos graxos totais presentes na amostra e a porcentagem de matéria insaponificável.

O óleo da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtido no item 4.3 foi verificado conter 24,8 % de ácidos graxos totais na constituição, incluindo os ácidos graxos livres e esterificados presentes.

As matérias insaponificáveis incluem aquelas substâncias frequentemente dissolvidas nos óleos e gorduras, as quais não se saponificam com álcalis cáusticos, mas são solúveis em solventes orgânicos. Estão incluídos álcoois alifáticos, esteróis, pigmentos e hidrocarbonetos encontrados frequentemente na maioria dos fungos, como relatados por LÖSEL *et al* em 1988.

A porcentagem de matéria insaponificável presente no óleo da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi de 7,2%.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média das determinações.

A porcentagem de ácidos graxos totais presentes no óleo do fungo foi utilizada como um importante parâmetro para os cálculos de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

#### 4.7 - Efeito do tempo de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O efeito do tempo de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.2. Os parâmetros analisados estão expressos na tabela 5.

A produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi expressa em relação ao teor de biomassa seca e volume de meio de cultura.

Verificou-se que a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico em relação aos ácidos graxos totais, obtidos por cromatografia gasosa em diferentes tempos de incubação não exibiram consideráveis variações. Em contrapartida, a relação ácido  $\gamma$ -linolênico/biomassa seca (mg/g) e ácido  $\gamma$ -linolênico/litro de meio de cultura (mg/l) sofreram grandes alterações no decorrer do tempo de incubação. O máximo de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* ocorreu no quinto dia de incubação resultando em 7,55 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico/g de biomassa seca, ou expresso como 43,97mg de ácido  $\gamma$ -linolênico/litro de meio de cultura.

A figura 8 ilustra o resultado da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico/litro de meio de cultura em diferentes tempos de incubação.

As alterações nos valores de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico são decorrentes das variações de biomassa e conteúdo de lipídeos totais exibido pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* em diferentes tempos de incubação.

A porcentagem de lipídeos totais/biomassa seca obtida da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação (20,8%p/p) estão próximos aos valores obtidos por TORNALOVA, *et al* (1992) com o fungo *Mucor* INMI após extração dos lipídeos em biomassa liofilizada (19,31%p/p).

KENDRICK & RATLEDGE (1992b) relataram que os fungos *Traustochytridium aureum* e *Saprolegnia parasitica* contém em média 10% p/p de lipídeos totais/biomassa seca, enquanto os fungos ditos oleoginosos, *Conidiobolus nanodes*, *Entomorphora exitalis* contém ~25% p/p e *Mortierella alpia-peyron* apresentou em sua composição 38% de lipídeos/biomassa seca.

SHAW (1966) analisou a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pelos fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Rhizopus arrhizus*. Foi verificado que o tempo de incubação do fungo no meio de cultura não foi capaz de alterar significativamente a composição de ácidos graxos dos fungos. As alterações na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foram em decorrência da variação do conteúdo de lipídeos totais do

micélio. A produção de ácidos graxos por *Cunninghamella blakesleeana* foi de 41mg/g de biomassa seca, onde 5,69mg se referim ao ácido  $\gamma$ -linolênico obtido após 7 dias de incubação à 30°C.

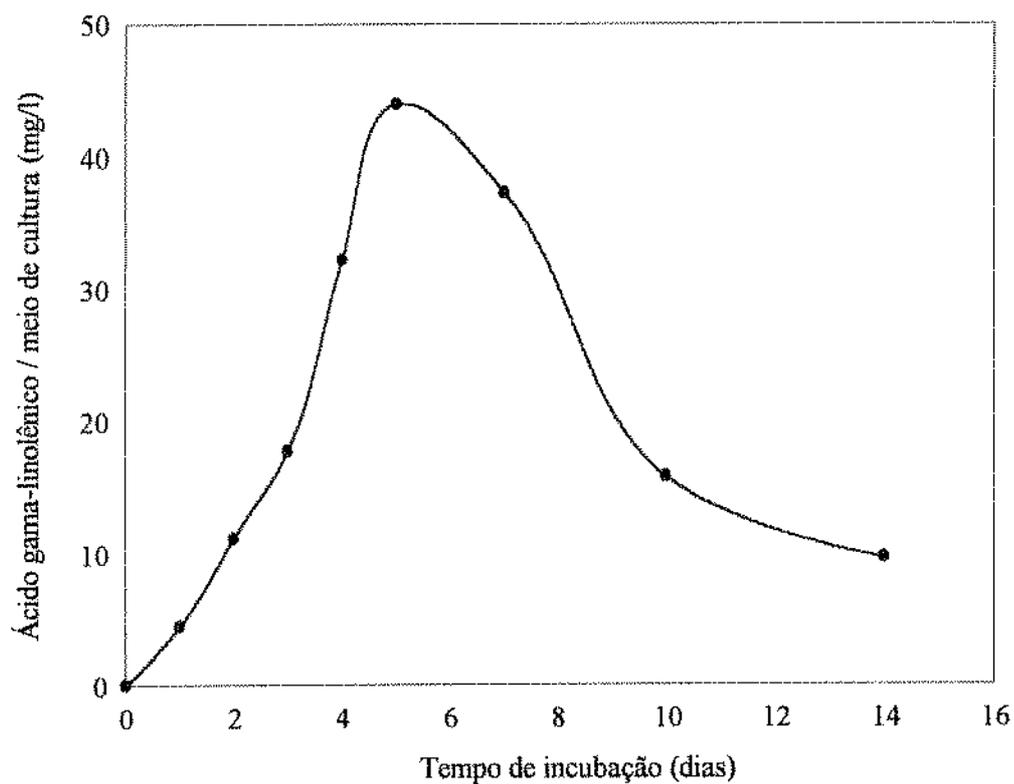
SAFE (1974) relatou que os teores de lipídeos obtidos de *Mucor rouxii* foram altamente afetados pelo tempo de incubação. Após 24 horas de incubação o conteúdo obtido foi de 10% p/p. Nos intervalos de tempos de 72 horas e 120 horas de incubação os níveis diminuíram para 7,2 e 9,0 %p/p respectivamente.

Um aumento na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por *Mucor ambiguus* foi realizado por FUKUDA & MORIKAWA (1987). O novo método utilizou fermentadores em cultivo contínuo, células imobilizadas em BSP ( Biomass Support Particles ) em associação com emulsificantes não iônicos no meio de cultura, o que resultou numa produção de de 14-18 mg de ácido  $\gamma$ -linolênico/dl de meio de cultura, o dobro da quantidade obtida pelos métodos tradicionais.

Tabela 5 - Efeito do tempo de incubação no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

Tempo de incubação (dias)	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	%relativa ác. $\gamma$ -linolên./ ác. graxos totais	Lip. totais/ Biomassa seca (% p/p)	Ác. $\gamma$ -linolên./ Biomassa seca (mg/g)	Ác $\gamma$ -linolên./ Meio de cultura (mg/l)
1	2,25	0,11	16,12	4,97	1,98	4,47
2	4,42	0,33	13,72	7,41	2,02	11,15
3	5,48	0,46	15,39	8,46	3,23	17,72
4	5,71	1,11	11,74	19,39	5,65	32,24
5	5,83	1,21	14,68	20,73	7,55	43,97
7	6,03	0,96	15,71	15,90	6,19	37,34
10	5,97	0,54	11,66	9,11	2,63	15,73
14	5,60	0,37	10,55	7,23	1,89	9,63

Figura 8 - Efeito do tempo de fermentação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de de *Mucor* sp após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l



#### 4.8 - Efeito do pH inicial do meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O efeito de pH inicial do meio de cultura na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.3.

A incubação da linhagem LB-54 de *Mucor sp* em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l com valores de pH na faixa de 4,5 à 8,5 não alterou significativamente a porcentagem de lipídeos totais obtidos do fungo.

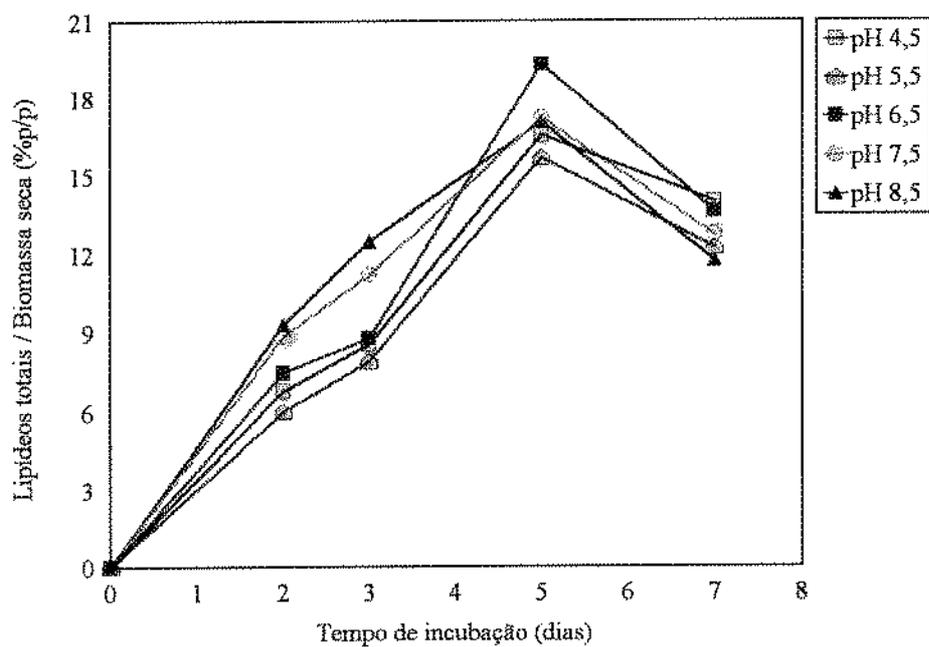
A figura 9 ilustra os resultados obtidos.

O valor do pH inicial do meio de cultura tem sido usado numa faixa de 6,0-7,0 para produção de lipídeos por diferentes espécies de *Mucor* (SAJBIDOR *et al*, 1988), *Choanephora cucurbitarum* (DEVEN & MANOCHA, 1976) e espécies de *Mortierella* (SHIMIZU *et al*, 1988).

KANG & SHIN, (1989) relataram que o conteúdo de lipídeos totais de *Mucor sp* KCTC 8405P aumentou significativamente com o aumento do pH inicial do meio de cultura. Os valores obtidos de lipídeos totais/biomassa seca (%p/p) foram de 25,9, 30,6 e 47,1 % p/p para os valores de pH de 3, 6 e 9 respectivamente. Estes dados foram relacionados pelos autores com as variações morfológicas do fungo quando submetidos ao crescimento em condições ácidas ou básicas. Em condições mais alcalinas (pH 8 e 9) o crescimento do fungo seria acompanhado pela formação de extensa área micelar. Baseando-se nos resultados reportados por SUMNER & MORGAN (1969) que o conteúdo de lipídeos é maior no micélio vegetativo do que sobre a forma de esporos, os autores concluíram que o alto conteúdo de lipídeos obtido em condições mais alcalinas seria devido à grande quantidade de micélio formado por unidade de biomassa seca.

Em contrapartida, a biossíntese de lipídeos por *Choanephora cucurbitarum* relatado por DEVEN & MANOCHA (1976) foi inibida em valores mais altos de pH. O pH inicial de 5,5 resultou num conteúdo de 26% p/p e no pH 8,5 este valor foi de 8,1% p/p após 72 horas de incubação.

Figura 9 - Efeito do pH inicial na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) da linhagem LB-54 de *Mucor* sp após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l



#### 4.9 - Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O estudo referente ao efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.4.

A tabela 6 ilustra os resultados.

A utilização dos substratos frutose e ácidos graxos insaturados (ácido oleico e linoleico) resultou em níveis satisfatórios de ácido  $\gamma$ -linolênico/litro de meio de cultura, embora não sejam comparáveis ao valor obtido quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono.

A biossíntese de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi fortemente inibida quando sacarose ou lactose foram utilizadas como fonte de carbono, enquanto a adição de ácidos graxos saturados como palmítico e esteárico resultou em aumento no teor de lipídeos totais, mas com efeito negativo na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico.

O conteúdo relativo de ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais obtido por cromatografia gasosa mostrou que a utilização do ácido linoleico, sorbitol, glicerol, frutose e glicose resultou em lipídeos mais insaturados com alto conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico na composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* quando estes substratos foram usados como fonte de carbono.

SAJBIDOR *et al* (1988) relataram que a glicose foi o melhor substrato para obtenção de lipídeos por fungos da ordem Mucorales analisados. *Mortierella ramanniana* e *Rhizopus arrhizus* apresentaram alto conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico quando foi utilizado solução de amido como fonte de carbono.

KANG & SHIN (1989) obtiveram os valores de 24, 20, 12,8, 12,3 e 11,7% p/p quando foram utilizadas como fontes de carbono, glicose, acetato de sódio, solução de amido, maltose e xilose respectivamente. Baixos valores de lipídeos por biomassa foram obtidos com o uso de sacarose (6,4%p/p) e lactose (10,4%) pela linhagem de *Mucor sp* KCTC 8405.

LINDBERG & HANSSON, (1991) com o intuito de reduzir o custo dos nutrientes do meio de cultura para produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por *Mucor rouxii* testaram o uso de fontes de carbono de baixo custo. A utilização de amido e melão

de beterraba resultou em 11 e 8,5% de lipídeos totais por biomassa seca, valores superiores aos obtidos com glicose ( 7,1 %p/p ) nas mesmas condições de incubação.

As figuras 10, 11, 12 e 13 demonstram a composição em porcentagem relativa de ácidos graxos, obtido pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* em meio de cultura contendo como fonte de carbono glicose, amido, ácido palmítico ou lactose. A fonte de nitrogênio utilizada foi o extrato de levedura na concentração de 10g/l.

Tabela 6 - Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* após incubação à 28°C por 5 dias

Fontes de Carbono	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais/ Biomassa seca (%p/p)	% relativa ác. $\gamma$ -linolên./ ácido graxos totais	Produção ác $\gamma$ linolênico (mg/l)
Glicose	5,97	1,14	19,08	14,68	41,49
Frutose	5,01	0,87	17,39	12,38	26,77
Xilose	5,06	0,42	8,38	8,63	9,07
Galactose	6,47	0,24	3,65	6,10	3,56
Sacarose	1,27	0,072	5,68	9,52	1,69
Maltose	6,25	0,31	6,25	6,37	4,83
Glicerol	3,44	0,22	6,39	12,17	6,64
Sorbitol	5,55	0,31	5,66	11,58	9,01
Lactose	1,02	0,11	10,74	4,61	1,25
Amido	5,70	0,27	4,74	8,41	5,62
Ác.palmítico	3,87	1,59	35,11	0,14	0,56
Ác.esteárico	8,04	1,38	17,21	1,12	3,87
Ác. oleico	6,60	0,98	14,90	6,08	14,86
Ác. linoleico	3,92	0,44	11,11	15,62	16,87

Figura 10 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

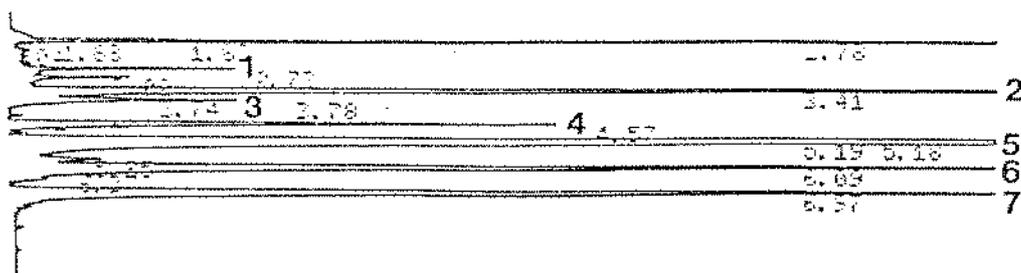


Figura 11 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de amido, 22,3g/l e extrato de levedura, 10g/l.

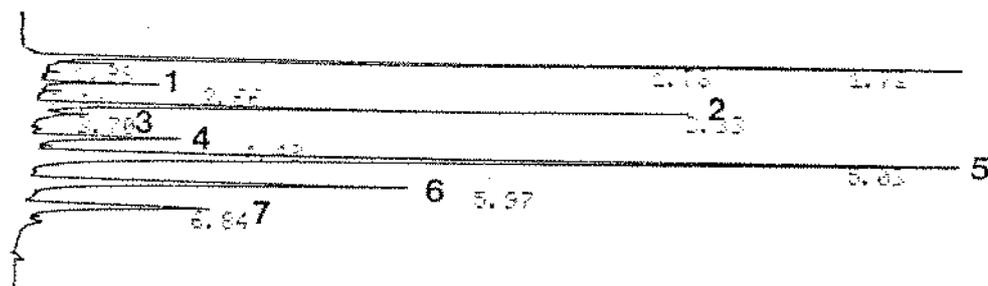


Figura 12 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de ácido palmítico 10,6g/l e extrato de levedura, 10g/l.

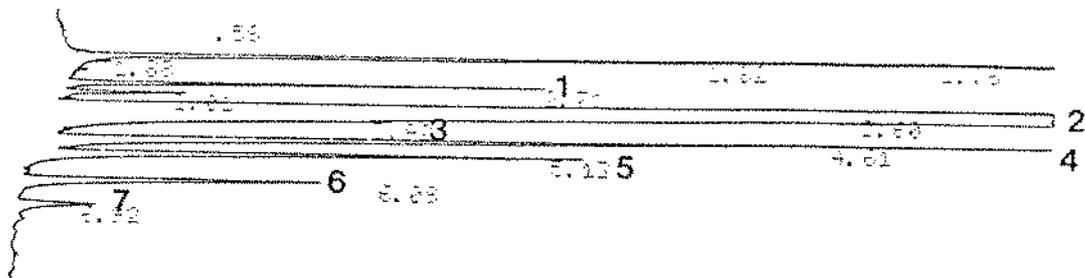
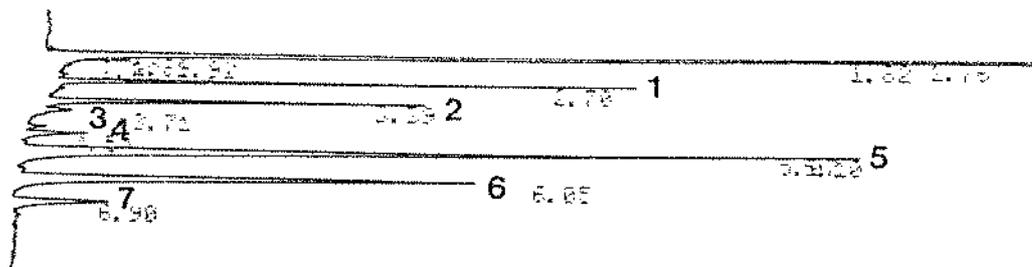


Figura 13 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de lactose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.



#### 4.10 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O estudo referente ao efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.5. A tabela 7 ilustra os resultados.

Entre as fontes de nitrogênio testadas, o extrato de levedura resultou em maior crescimento do microorganismo e maior conteúdo de lipídeos totais, produzindo a maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

As fontes de nitrogênio inorgânicas, como nitrato de potássio, cloreto de amônio e nitrato de sódio causaram inibição do crescimento celular e da biossíntese de lipídeos resultando em baixa produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por litro de meio de cultura. Dentre estas excetua-se o sulfato de amônio, cuja presença no meio de cultura resultou em um significativo valor da relação lipídeos/biomassa (16,3g de lipídeos/100g de biomassa).

Dentre as fontes orgânicas testadas, polipeptona e extrato de malte também resultaram em maiores níveis de lipídeos, embora não tenham favorecido a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico. Em contrapartida, a uréia causou uma significativa inibição da biossíntese de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

O autolisado de levedura quando utilizado na taxa C/N de 210 mostrou ser a segunda fonte mais eficiente na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico (14,87mg/l). Quando usado em taxa C/N de 110 o valor encontrado foi significativamente menor (5,43 mg/l).

A facilidade de obtenção deste autolisado associada ao baixo custo, torna esta fonte de nitrogênio de grande interesse comercial.

SAJBIDOR *et al*, (1988) objetivando estudar a produção de lipídeos e composição de ácidos graxos de *Mucor mucedo*, *M plumbeus*, *Mortierella ramanniana* e *Rhizopus arrhizus* em diferentes fontes de carbono, utilizou como fonte de nitrogênio o extrato de levedura numa concentração de 5,0g/l, obtendo um conteúdo máximo de lipídeos totais por biomassa seca ( %p/p ) de 23,7 para *Mucor mucedo*.

Verificou-se que a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais mostrou grandes variações frente às diferentes fontes de nitrogênio. Os valores maiores foram obtidos com extrato de levedura, autolisado de levedura ( taxa

carbono/nitrogênio de 210 ) e sulfato de amônio. As demais fontes de nitrogênio resultaram valores significativamente inferiores.

KANG & SHIN, (1989) relataram que o sulfato de amônio foi a melhor fonte de nitrogênio para produção de lipídeos totais (25,9%p/p) pela linhagem de *Mucor* sp KCTC 8405P. As fontes de nitrogênio inorgânicas se mostraram ineficientes na produção de lipídeos totais, enquanto as fontes orgânicas, em especial a uréia se mostraram mais eficientes. As fontes de nitrogênio testadas não foram capazes de aumentar em valor significativo a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem estudada.

Fontes de nitrogênio de baixo custo foram relatadas por LINDBERG & HANSSON (1991) no estudo com *Mucor rouxii*. O uso de torta de colza e torta de côco após extração de lipídeos resultaram num conteúdo de lipídeos de 1,16g/l e 2,8g/l respectivamente, correspondente à 2 e 5 vezes mais lipídeos que o obtido com extrato de levedura. O aumento no conteúdo de lipídeos refletiu diretamente no aumento da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico que foi de 0,15g/l obtido com o extrato de levedura e 0,33g/l quando a torta de côco foi utilizado como fonte de nitrogênio.

HANSSON & DOSTÁLEK, (1988) analisaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio inorgânicas para produção de lipídeos por *Mortierella ramanniana*. O uso de nitrato de potássio se mostrou favorável ao crescimento do microorganismo e ao conteúdo de lipídeos por biomassa quando comparado com cloreto de amônio ou sulfato de amônio. Foi obtido 22,6g de biomassa seca e uma relação de 15,7% de lipídeos/biomassa após incubação em meio de cultura contendo nitrato de potássio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

As figuras 14, 15, 16 e 17 demonstram a composição de ácidos graxos (% relativa/ácidos graxos totais ) pela linhagem LB-54 de *Mucor* sp quando sulfato de amônio, uréia, autolisado de levedura e polipeptona foram usados como fonte de nitrogênio. O cromatograma dos ácidos graxos da linhagem de *Mucor* sp cultivada em meio com extrato de levedura como fonte de nitrogênio está ilustrado na figura 10.

Verificou-se que o uso da uréia como fonte de nitrogênio pela linhagem LB-54 de *Mucor* sp resultou em pobre crescimento do microorganismo e insuficiente produção de ácido  $\gamma$ -linolênico (2,55% ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais). Foi detectado a presença do ácido  $\alpha$ -linolênico.

Tabela 7 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento, conteúdo de lipídeos totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* após incubação à 28°C por 5 dias

Fontes de Nitrogênio	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais/ Biomassa seca (%p/p)	% relativa ác. $\gamma$ -linolênico / ácidos graxos totais	Produção ác. $\gamma$ -linolênico (mg/l)
Autolisado levedura 1	2,67	0,42	7,56	14,28	14,87
Autolisado levedura 2	4,96	0,28	5,64	7,84	5,43
Extrato de levedura	5,97	1,14	19,08	14,68	41,49
Polipeptona	2,69	0,29	14,63	7,04	5,13
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,98	0,16	16,33	11,74	4,66
KNO <sub>3</sub>	0,49	0,012	2,44	5,65	0,17
NH <sub>4</sub> Cl	0,19	0,005	2,53	8,78	1,05
NaNO <sub>3</sub>	0,18	0,004	2,0	2,41	0,21
Uréia	0,12	0,002	1,58	2,55	0,07
Extrato de malte	0,80	0,09	12,31	4,73	1,15

Autolisado de levedura 1 - Foram usados 25ml de autolisado de levedura (0,074% nitrogênio) e 10g/l de glicose (C/N 210)

Autolisado de levedura 2 - Foram usados 25ml de autolisado de levedura (0,074% nitrogênio) e 5g/l de glicose (C/N 110)

Figura 14 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e , (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,5 g/l

- |                               |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)       |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)    |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido γ-linolênico(18:3γ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    | 8 - Ácido α-linolênico(18:3α) |

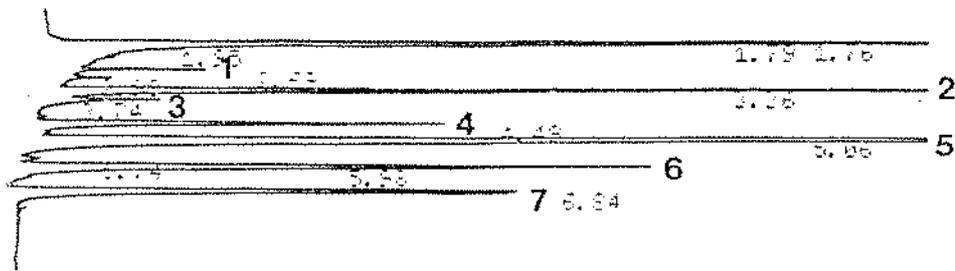


Figura 15 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e uréia, 1,6g/l

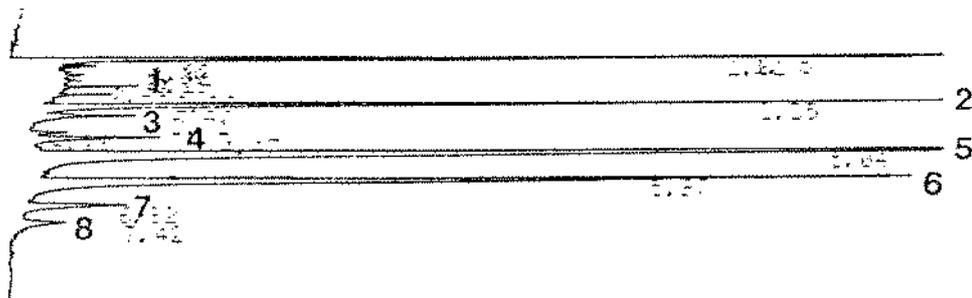


Figura 16 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e autolisado de levedura C/N 210.

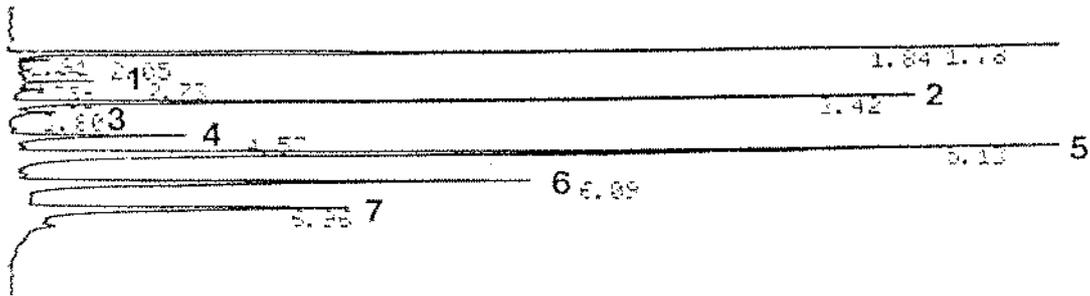
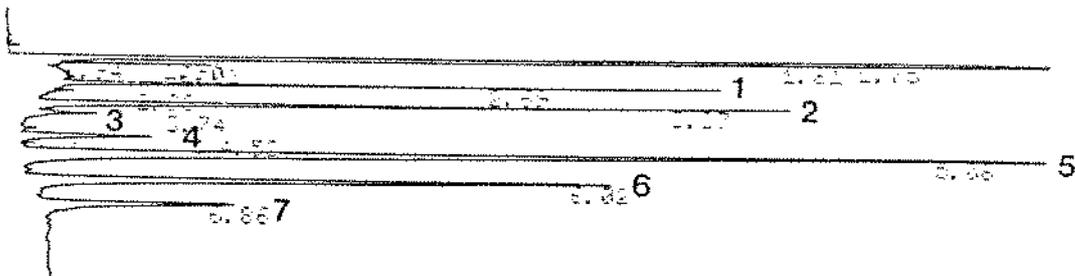


Figura 17 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp, obtido por cromatografia gasosa, após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e polipeptona, 4,5g/l



#### 4.11 - Efeito da variação da taxa Carbono /Nitrogênio ( C/N ) no conteúdo de lipídeos totais, consumo de glicose e crescimento da linhagem LB - 54 de *Mucor sp*

O estudo referente à variação da taxa C/N foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.6.

Os resultados ilustrados na figura 18 demonstram que o maior crescimento do fungo ocorreu em meio de cultura com a taxa C/N de 5,4. Aumentando-se a taxa C/N verificou-se um decréscimo no crescimento da linhagem LB-54 de *Mucor sp*. O conteúdo de lipídeos totais se manteve praticamente constante em taxas acima de 21,6.

A medida que a taxa C/N foi aumentada, obtiveram-se altos níveis da relação lipídeos totais/biomassa seca (%p/p), como pode ser observado pela figura 19. Verificou-se que a linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi capaz de consumir toda a glicose do meio de cultura após 5 dias de incubação quando as taxas de 5,4, 10,8 e 21,6 foram usadas. Em contrapartida, foi detectado uma quantidade residual de glicose de 1,07, 1,25, 1,34, 1,76 g/l no meio de cultura após 5 dias de incubação para as taxas C/N de 43,2, 54,0, 108,1 e 162,2 respectivamente.

TORNALOVA *et al*, (1992) demonstraram as alterações no conteúdo de lipídeos e biomassa que o fungo *Mucor* INMI produtor de ácido  $\gamma$ -linolênico apresentou frente às variações da taxa C/N. Foram utilizadas taxas C/N de 20:1 e 40:1, as quais resultaram num teor de biomassa seca de aproximadamente 5,0g/l e 3,5 g/l e um conteúdo de lipídeos de 0,8g/l e 0,95 g/l respectivamente. A relação lipídeos totais/biomassa seca resultante foi de 16 %p/p para a taxa C/N de 20:1 e de 27 %p/p para a taxa C/N de 40:1.

KANG & SHIN, (1989) observaram um significativo aumento na produção de lipídeos por *Mucor sp* KCTC 8405P quando submetido ao crescimento em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio com fonte de nitrogênio em uma taxa C/N de 56,6. O conteúdo de lipídeos obtido foi de 2,4g/l, duas vezes maior ao valor encontrado para a taxa C/N de 18,9.

O conteúdo de lipídeos totais por biomassa seca obtido do fungo *Mortierella ramanniana* CBS 112.08 foi relatado por HANSSON & DOSTÁLEK (1988). Para as taxas C/N de 20, 86 e 173 foram obtidos 15,7, 23 e 28,9 %p/p respectivamente, quando foi utilizado glicose como fonte de carbono e nitrato de

potássio como fonte de nitrogênio. Após 9 dias de incubação foi observado uma quantidade residual de glicose quando foi utilizada a taxa C/N de 173.

Estes resultados sugerem que o acúmulo de lipídeos em altas taxas C/N, onde pequenas concentrações de nitrogênio estão presentes, ocorre quando a fonte de nitrogênio é totalmente consumida, cessando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos necessários ao crescimento do microorganismo. O excesso da fonte de carbono presente no meio de cultura continuaria a ser utilizada para a biossíntese de lipídeos (RATLEDGE, 1982).

A associação do aumento do conteúdo de lipídeos com a diminuição no teor de biomassa seca observado em altas taxas C/N resulta em altos níveis da relação lipídeos totais/biomassa seca (%p/p) como relatado por KANG & SHIN (1989).

Figura 18 - Efeito da variação da taxa Carbono/Nitrogênio (C/N) no crescimento e conteúdo de lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor* sp após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l

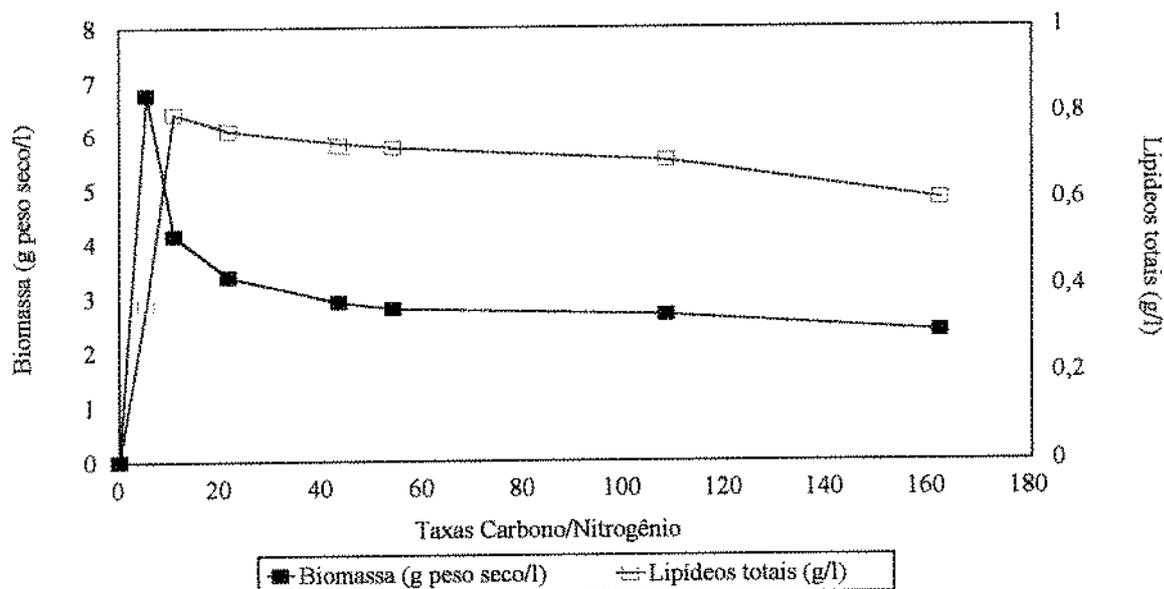
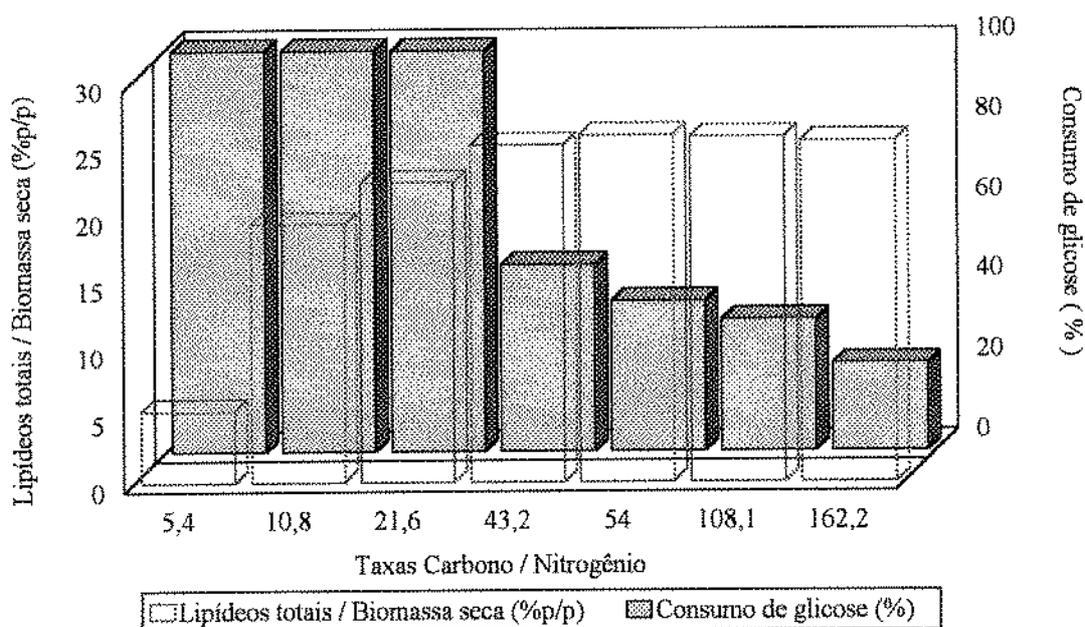


Figura 19 - Efeito da variação da taxa Carbono/Nitrogênio (C/N) no conteúdo de lipídeos totais/biomassa seca (%p/p) e consumo de glicose pela linhagem LB-54 de *Mucor* sp após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l



#### 4.12 - Efeito da temperatura de incubação na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) e na produção de ácido $\gamma$ -linolênico obtida da linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

O efeito da temperatura de incubação na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (% p/p) foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.7.

Os maiores valores encontrados para a relação lipídeos totais / biomassa seca foram obtidos após 5 dias de incubação à 28°C (19 % p/p) e 10 dias de incubação à 12°C (16 % p/p). Verificou-se que na temperatura de incubação de 38°C foi inibida a biossíntese de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

A figura 20 ilustra os resultados.

Esta linhagem mostrou crescimento favorável à temperatura de 28°C seguidas das temperaturas de 38°, 18° e 12°C. No entanto, a quantidade de lipídeos obtida obedeceu a seguinte ordem : 28 > 18 > 12 > 38°C.

Estes dados estão de acordo com os relatos de SUMNER & MORGAN (1969). A linhagem de *Mucor miehei* quando incubada por 14 dias à 25°C apresentou em seu micélio 24,3 % p/p de lipídeos totais / biomassa seca, este valor decresceu pra 11,9 %p/p quando a temperatura de incubação foi de 48°C.

DEVEN & MANOCHA, (1976) estudaram os lipídeos de *Choanephora cucurbitarum* em diferentes condições de cultivo. Os diferentes valores de lipídeos obtidos do micélio frente às variações de temperatura foram de 219, 265, 235 e 198 mg de lipídeos por grama de biomassa seca após 72 horas de incubação às temperaturas de 15, 23, 30 e 37°C respectivamente.

Os dados da tabela 8 referem-se a comparação das temperaturas de incubação de 12°C e 28°C quanto à produção de ácido  $\gamma$ -linolênico.

Verificou-se que em 10 dias de incubação à temperatura de 12°C resultou em maior conteúdo de lipídeos totais por biomassa seca e maior porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico nos ácidos graxos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp* quando comparada com o mesmo período de incubação à temperatura de 28°C. No entanto, a produção máxima de ácido  $\gamma$ -linolênico foi obtida à 28°C após 5 dias de incubação em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

A quantidade de lipídeos totais ( g/l ) e de biomassa seca ( g/l ) obtida à 12°C são significativamente inferiores aos valores encontrados para a temperatura de incubação de 28°C.

A linhagem LB-54 de *Mucor sp* iniciou sua fase de crescimento após 4 dias de incubação à temperatura de 12°C. Porém, na temperatura de 28°C o crescimento iniciou-se após algumas horas de incubação.

As figuras 21 (A e B) e 22 (A e B) ilustram o perfil da composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 e 10 dias de incubação às temperaturas de 12 e 28°C.

Os dados obtidos através de cromatografia gasosa estão na tabelas 9, expressando as porcentagens de cada ácido graxo em relação aos ácidos graxos totais obtidos após 5 dias de incubação às temperaturas de 12 e 28°C.

Verificou-se que as porcentagens relativas dos ácidos palmítico, oleico, linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico mostraram variações significativas frente às diferentes temperaturas de incubação. A porcentagem relativa de ácido palmítico (16:0) obtida após 5 dias de incubação à temperatura de 28°C se mostrou duas vezes superior a porcentagem obtida na temperatura de 12°C. Em contrapartida, houve um direcionamento no sentido da biossíntese de ácidos graxos insaturados (18:2 e 18:3 $\gamma$ ) na temperatura de incubação de 12°C. Este aumento no nível de ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico refletiu diretamente na diminuição do nível de ácido oleico quando comparado à temperatura de 28°C.

Figura 20 - Efeito da temperatura de incubação na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) da linhagem LB-54 de *Mucor* sp após incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l

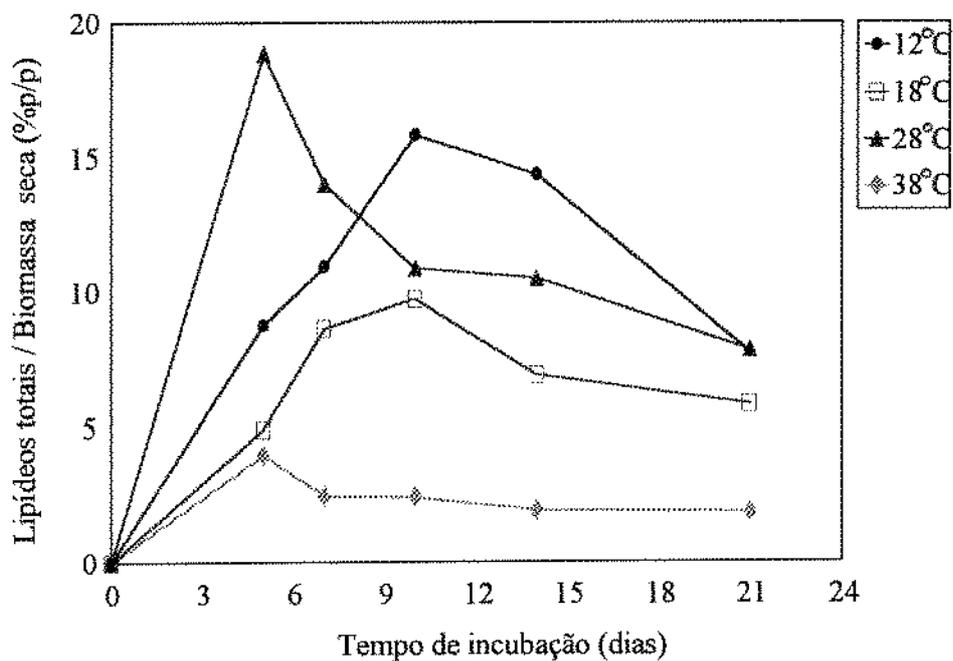


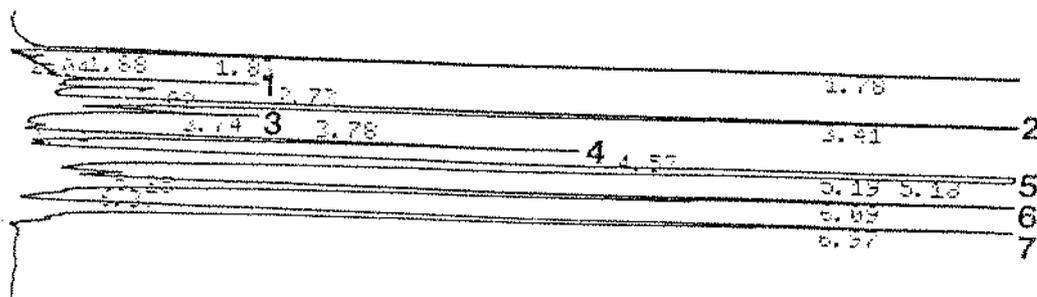
Tabela 8 - Influência da temperatura de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem de LB-54 de *Mucor sp* após 5 e 10 dias de incubação em meio de cultura composto de glicose, 20g/l, e extrato de levedura, 10g/l

	Tempo de incubação	12°C	28°C
Biomassa seca (g/l)	5dias	1,16	6,17
	10dias	2,47	7,29
Lipídeos totais (g/l)	5dias	0,08	1,16
	10dias	0,39	0,79
Lipídeos totais/ Biomassa seca (%p/p)	5dias	7,04	18,85
	10dias	15,84	10,87
Ácido $\gamma$ -linolênico/ Ácidos graxos totais (% relativa)	5dias	19,00	14,68
	10dias	24,02	11,66
Produção ác. $\gamma$ - linolênico (mg/l de meio de cultura )	5dias	4,80	42,35
	10dias	23,4	22,9

Figura 21 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp obtido por cromatografia gasosa após 5 dias (A) e 10 dias de incubação (B) à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    | 8 - Ácido $\alpha$ -linolênico(18:3 $\alpha$ ) |

A



B

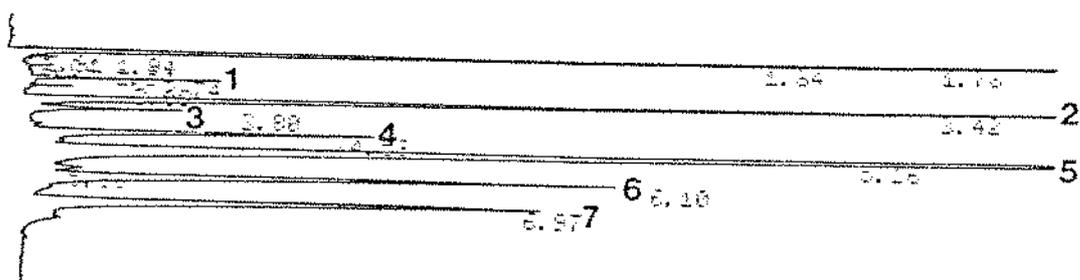
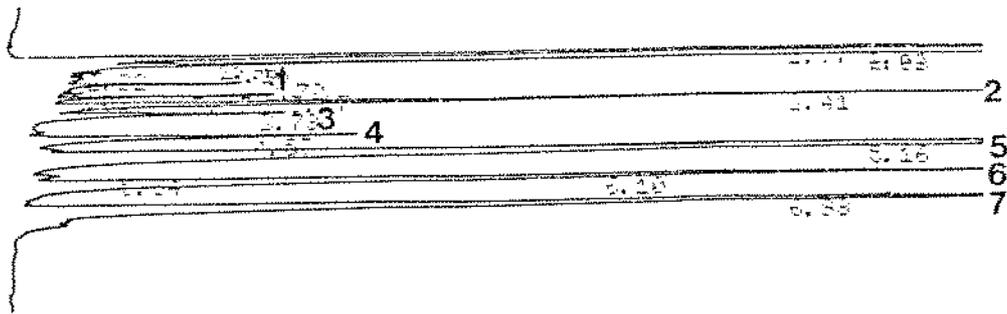


Figura 22 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp obtido por cromatografia gasosa após 5 dias (A) e 10 dias de incubação (B) à 12°C em meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

A



B

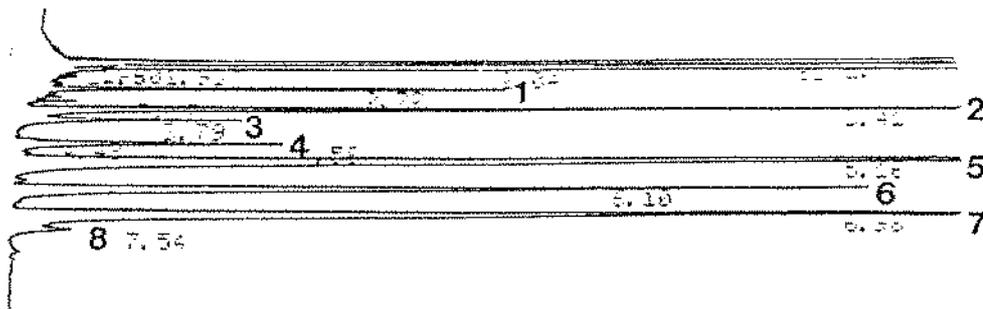


Tabela 9 - Composição relativa de ácidos graxos ( % em relação aos ácidos graxos totais ) dos lipídeos da linhagem LB - 54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 12°C e 28°C em meio de cultura composto de glicose,20g/l e extrato de levedura,10g/l

Ácidos graxos	% de ácidos graxos em relação aos ácidos graxos totais	
	12°C	28°C
10:0	9,105	0,065
14:0	0,704	0,715
15:0	0,079	0,389
16:0	8,766	18,613
16:1	1,955	0,214
17:0	traços	1,159
17:1	traços	0,129
18:0	3,753	4,429
18:1	39,446	46,356
19:0	traços	0,483
18:2	16,036	12,634
20:0	1,132	0,136
18:3 $\gamma$	19,005	14,679

O estudo da influência da temperatura na biossíntese de lipídeos totais e composição de ácidos graxos de fungos da ordem Mucorales iniciou-se com os relatos de SUMNER *et al* (1969). As diferenças na composição de ácidos graxos encontrados em fungos termófilos, termotolerantes, mesófilos e psicrófilos examinados estão relacionados ao grau de insaturação dos lipídeos. Espécies psicrófilas (10-20°C), mesófilas (20-25°C) e termotolerantes sintetizam preferencialmente ácido linoleico (15-24%) e ácido  $\gamma$ -linolênico (8-19%). Baixas quantidades de ácido oleico (30-38%) foram detectadas. Nas espécies termófilas (40-45°C), foram relatadas altos níveis de ácido oleico (~50%), baixos níveis de ácido linoleico (3-5%) e de ácido  $\gamma$ -linolênico (~15%).

MUMMA *et al*, (1970) relataram uma porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico de 15,6% em relação aos ácidos graxos totais de *Mucor globosus* (espécie mesófila) após incubação à 25°C. Na espécie termófila do fungo este valor foi de somente 1,1% após incubação na temperatura de 45°C.

SAFE, (1974) observou que o uso da temperatura de incubação de 15°C para *Mucor rouxii* resultou num conteúdo máximo de 17,6% de ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais após 48 horas de incubação. Este valor decresceu para 5,3 % e 3,1 % nas temperaturas de 25 e 35°C respectivamente.

SHAW, (1966) relatou que o conteúdo de 17,7 % de ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais presentes na constituição de *Cunninghamella blakesleeana* após 7 dias de incubação à 25°C decresceu para 13,9 e 8,5 % após incubação à 30 e 37°C.

FEOFILOVA *et al*, (1989) relataram que o aumento no conteúdo de ácidos graxos insaturados, em especial do ácido linoleico, ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido araquidônico da constituição de *Cunninghamella japonica*, após abaixamento brusco da temperatura seria um mecanismo controle de crioadaptação com a finalidade de manter a fluidibilidade da membrana celular e preservar o estado de homeostase.

A composição de ácidos graxos de *Choanephora curcubitarum* frente às variações de temperatura de incubação mostrou significativas mudanças qualitativas caracterizadas pelo aumento do conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico com correspondente diminuição no conteúdo de ácido palmítico e oleico frente às temperaturas mais baixas de crescimento. (DEVEN & MANOCHA, 1976 )

#### 4.13 - Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e crescimento da linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O efeito de íons metálicos no crescimento do fungo e conteúdo de lipídeos totais foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.8.

Verificou-se que a presença de íons magnésio, cálcio, ferro, zinco, manganês e cobre no meio de cultura nas concentrações de 0,3g, 10mg, 10mg, 1mg, 1mg e 2mg por litro de meio de cultura respectivamente, não afetaram significativamente a relação lipídeos totais por biomassa seca obtida da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C.

Os resultados estão expressos na tabela 10.

A redução no conteúdo de lipídeos e no teor de biomassa foi observada quando o microorganismo foi cultivado em meio de cultura onde o íon magnésio não estava presente.

A influência de íons metálicos no crescimento e na produção de lipídeos por *Mortierella ramanniana* foi estudado por HANSON & DOSTÁLEK (1988). O meio de cultura utilizado pelo autor continha glicose como fonte de carbono, extrato de levedura e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio e os íons metálicos, cálcio, magnésio, ferro, zinco e cobre. O cultivo do microorganismo por 95 horas à temperatura de incubação de 25°C resultou em 23 % de lipídeos em relação à biomassa seca. O cultivo do microorganismo neste meio de cultura, sem os íons cobre e zinco, levou à diminuição da relação para 20,2 % p/p. Quando uma quantidade adicional de íons magnésio foi suplementada no meio de cultura, houve diminuição da relação lipídeos/biomassa. A adição do íon manganês também causou efeito negativo na biossíntese de lipídeos por *Mortierella ramanniana*. De acordo com o autor, pequenas quantidades de íons metálicos são geralmente necessárias para o crescimento da célula e atividade enzimática.

Tabela 10 - Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e biomassa seca da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C

Meios de cultura	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais / Biomassa seca (%p/p)
A	5,24	1,02	19,48
B	5,99	1,20	20,03
C	5,02	0,99	19,79
D	5,14	1,01	19,68

A - Meio de cultura contendo Glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l

B - Meio de cultura contendo Glicose, 20g/l; extrato de levedura, 10g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3g;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10,0mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10,0mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,0mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2,0mg.

C - Meio de cultura de composição igual a B, porém sem magnésio .

D - Meio de cultura de composição igual a B, porém sem cobre e zinco.

#### 4.14 - Efeito da composição do meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e crescimento da linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

O efeito da composição do meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e crescimento da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.9.

A tabela 11 ilustra os resultados.

Em todos os meios de cultura utilizados no experimento, a fonte de carbono usada foi a glicose. Diferentes fontes de nitrogênio foram usadas em cada meio de cultura. O meio 5 que utiliza exclusivamente o extrato de levedura (5,0 g/l) resultou em maior conteúdo de lipídeos totais e de biomassa seca. Entretanto, a relação lipídeos/biomassa mostrou um valor superior no meio 1 de composição mais complexa, com a presença de extrato de malte, sulfato de amônio, peptona e íons metálicos.

A presença de uréia no meio de cultura 3 e de nitrato de potássio no meio 4 causaram diminuição significativa na biossíntese de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C.

No meio de cultura 2, a associação de cinco fontes de nitrogênio diferentes, extrato de levedura, extrato de malte, sulfato de amônio, polipeptona e uréia não causou aumento da biossíntese de lipídeos comparado ao meio 5 que continha somente extrato de levedura.

Tabela 11 - Influência da composição do meio de cultura no conteúdo de lipídeos totais e biomassa seca da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C.

Meios de cultura	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais/ Biomassa seca (% p/p)
Meio 1	3,90	1,04	26,73
Meio 2	4,85	0,91	18,76
Meio 3	4,82	0,76	15,73
Meio 4	5,09	0,85	16,77
Meio 5	5,54	1,16	20,92

#### 4.15 - Efeito da adição de glicose ao meio de cultura seguida da variação de temperatura de incubação na produção de ácido $\gamma$ -linolênico.

O estudo referente à adição de glicose ao meio de cultura seguida da variação de temperatura de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.10.

A tabela 12 demonstra que a maior produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por litro de meio de cultura foi observada após 4 dias de incubação à 28°C, seguida da adição de glicose ao meio de cultura para resultar numa concentração final de 2% p/v. A incubação foi mantida por mais 6 dias à temperatura de 12°C. Um valor aproximado de ácido  $\gamma$ -linolênico (mg/l) foi obtido quando utilizado 3 dias à temperatura de 12°C.

Uma nova adição de glicose ao meio de cultura resultando numa concentração final de glicose de 2 % p/v foi realizada no quarto dia de incubação para restabelecer o teor original para os três experimentos. Os frascos foram posteriormente incubados à temperatura de 12°C.

Verificou-se que a porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico/ ácidos graxos totais nas condições de incubação do experimento foram gradativamente aumentando à medida que o microorganismo foi mantido por mais tempo na temperatura de incubação de 12°C.

A composição de ácidos graxos dos lipídeos obtidos nas condições descritas estão ilustrados nas figuras 23, 24 e 25. No tempo de incubação de 10 dias à 12°C, obteve-se a maior porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico, comparado aos tempos de 3 e 6 dias, porém nota-se a presença do ácido  $\alpha$ -linolênico.

Verificou-se que a diferença dos valores de biomassa e lipídeos totais obtidos quando somente a temperatura de incubação de 28°C foi utilizada por 5 dias ou quando o microorganismo foi levado para uma posterior incubação à 12° é praticamente insignificante. Em oposição, a porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico/ácidos graxos totais sofreu um significativo aumento. Este parâmetro foi determinante no aumento da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* quando submetido à incubação sucessiva nas temperaturas de 28 e 12°C.

FEOFILOVA *et al*, (1989) submeteram o fungo *Cunninghamella japonica* às temperaturas de incubação de 33°C e 17°C, bem como a mudança de uma temperatura para outra. A transferência do micélio após 24 horas de crescimento à 33°C para a temperatura de 17°C provocou uma paralização na produção de biomassa e conteúdo de lipídeos totais por 3 horas, característico do estado inicial de "aclimatização". A continuidade da incubação à temperatura de 17°C levou a um insignificante aumento no conteúdo de lipídeos e no teor de biomassa. Foi observado um aumento na insaturação dos ácidos graxos presentes nos lipídeos caracterizado pelo aumento nos níveis de ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico.

GANDHI & WEETE, (1991) objetivando aumentar a produção de ácidos graxos poliinsaturados, em especial ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico por *Pythium ultimum* realizaram a incubação do fungo na temperatura de 25°C durante 6 dias de incubação, seguida da adição de glicose (2 % p/p), nova incubação à 13°C por 6 dias e um período estacionário de 10 dias. Nestas condições foi observado um aumento de 253 % no nível de ácido araquidônico e 236% de ácido eicosapentaenóico comparado à linha de base.

Tabela 12 - Efeito da adição de glicose a 2 % p/v ao meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10 g/l, seguida da variação da temperatura de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

Condições de incubação	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais/ Biomassa seca (% p/p)	% relativa ác. $\gamma$ -linolênico/ ac. graxos totais	Produção (mg ác. gama linolênico/l)
5dias à 28 <sup>0</sup> C	6,17	1,16	18,85	14,68	42,35
4dias à 28 <sup>0</sup> C + 3dias à 12 <sup>0</sup> C	5,47	1,28	23,47	17,17	54,69
4dias à 28 <sup>0</sup> C + 6dias à 12 <sup>0</sup> C	6,35	1,22	19,15	18,35	55,33
4dias à 28 <sup>0</sup> C + 10dias à 12 <sup>0</sup> C	6,40	1,06	16,53	19,27	50,56

Figura 23 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtida por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2% p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 3 dias.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

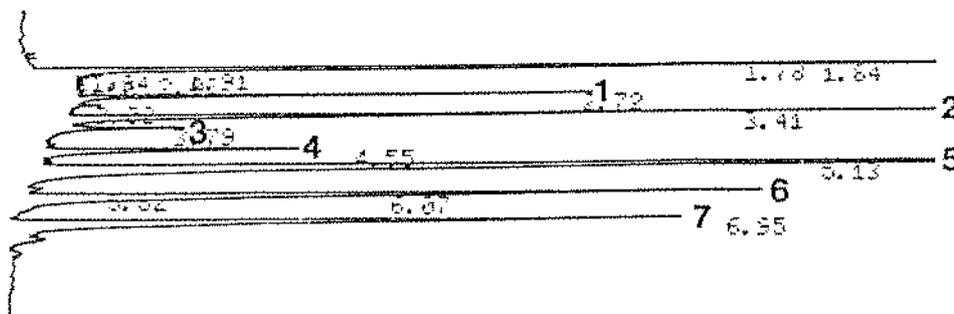


Figura 24 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtida por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2%p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 6 dias.

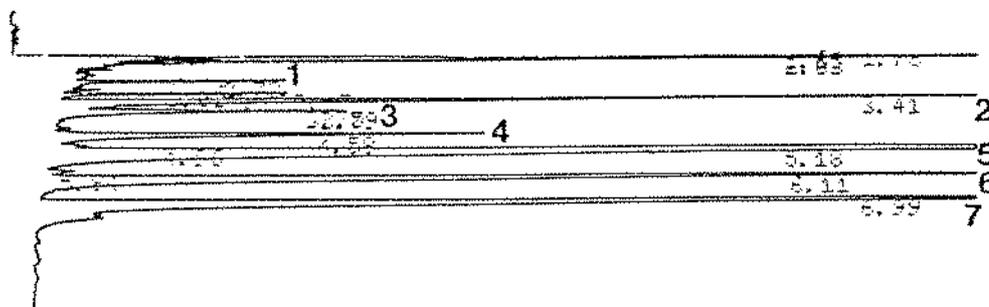
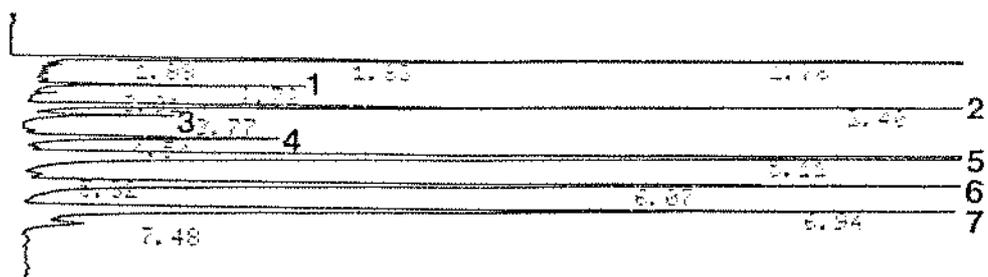


Figura 25 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtida por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose (2% p/v) para restabelecimento do teor inicial do meio e posterior incubação à 12°C por 10dias.



#### 4.16 - Estudo do efeito de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura na obtenção de lipídeos totais em relação à biomassa seca (%p/p) pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

O estudo referente ao efeito da adição de diferentes concentrações de glicose no meio de cultura após 4 dias de incubação à 28°C na porcentagem de lipídeos totais/biomassa seca obtido da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.11.11

Verificou-se um aumento gradativo na biossíntese de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp* nas concentrações de 1%, 2%, 5% e 7% p/v de glicose no meio de cultura. A concentração de 10% p/v de glicose adicionada no quarto dia de incubação à 28°C causou uma significativa inibição na biossíntese de lipídeos totais. A tabela 13 ilustra os resultados.

Observou-se que o conteúdo máximo da relação lipídeos/biomassa foi obtida utilizando as seguintes condições : Período de 4 dias de incubação à 28°C, adição de 7 %p/v de glicose ao meio de cultura no quarto dia de incubação onde não há glicose residual e em seguida um período de 3 dias de incubação à 12°C. Nestas condições a porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico obtida (Figura 26) foi de 19,00% em relação aos ácidos graxos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp* e a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico atingiu o nível máximo de 74,07mg/l.

A figura 27 ilustra os resultados comparativos da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico em diferentes condições de cultivo utilizadas neste experimento e nos descritos anteriormente.

Este valor máximo obtido corresponde a um acréscimo de 35,5% na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico comparado aos valores obtidos quando a adição de glicose foi feita na concentração de 2 % p/v (condição 3). Comparando-se com a produtividade de ácido  $\gamma$ -linolênico obtido na condição 1 onde a linhagem foi incubada a 28°C por 5 dias no meio contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l sem adição de glicose, foi verificado um acréscimo de 75% quando a linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi incubada por 4 dias a 28°C seguida da adição de 7 % de glicose e posterior incubação por 6 dias à 12°C.

Tabela 13 - Efeito de diferentes concentrações de glicose adicionadas no quarto dia de incubação à 28°C ao meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l seguida da incubação à 12°C por 3 dias, na porcentagem de lipídeos totais em relação à biomassa seca (% p/p) da linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

Concentração de glicose adicionada ao meio de cultura (% p/v)	Biomassa seca (g/l)	Lipídeos totais (g/l)	Lipídeos totais/ Biomassa seca (%p/p)
0	5,45	1,25	22,93
1	5,42	1,24	22,88
2	5,47	1,28	23,47
5	6,13	1,49	24,34
7	6,27	1,57	25,07
10	7,17	1,41	19,60

Figura 26 - Composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp obtida por cromatografia gasosa após 4 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10g/l, seguida da adição de glicose ao meio de cultura (7%p/v) no quarto dia e posterior incubação à 12°C por 3 dias.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

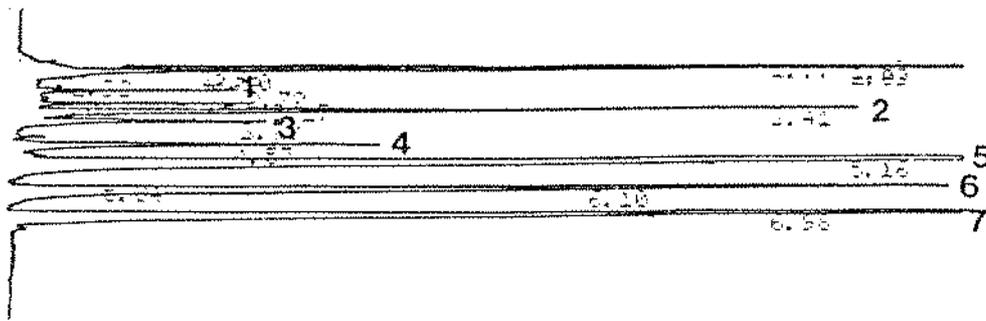
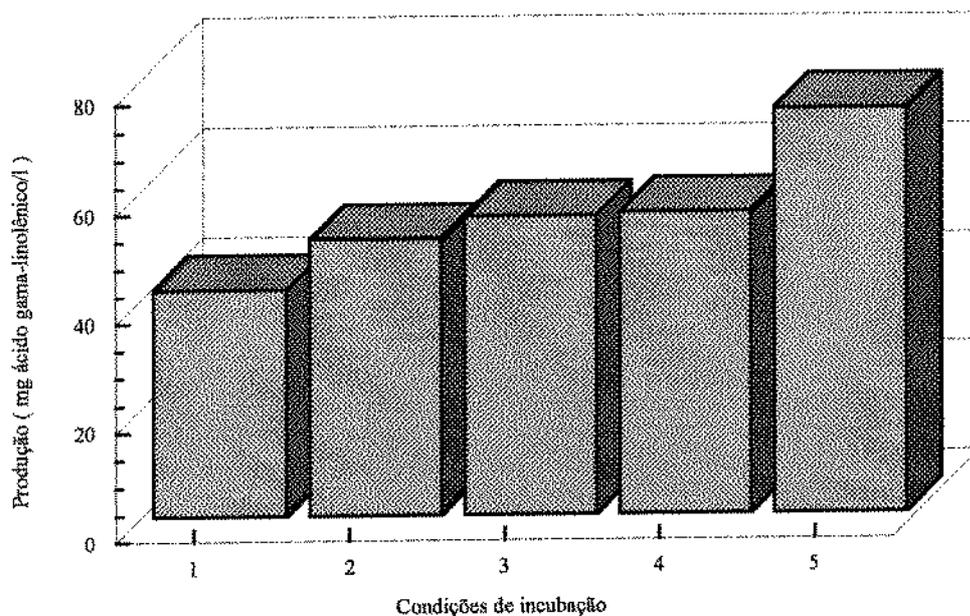


Figura 27 - Efeito de diferentes condições de incubação na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico



Condições de incubação :

1 - Meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l incubado por 5 dias à 28°C.

2 - Meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l incubado por 4 dias à 28°C seguido da adição de 2% p/v de glicose e posterior incubação por 10 dias à 12°C

3 - Meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l incubado por 4 dias à 28°C seguido da adição de 2% p/v de glicose e posterior incubação por 3 dias à 12°C

4 - Meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l incubado por 4 dias à 28°C seguido da adição de 2% p/v de glicose e posterior incubação por 6 dias à 12°C

5 - Meio de cultura composto de glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l incubado por 4 dias à 28°C seguido da adição de 7% p/v de glicose e posterior incubação por 3 dias à 12°C

#### 4.17 - Fracionamento dos lipídeos totais obtidos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após incubação às temperaturas de 12 e 28°C e composição de ácidos graxos de cada fração.

O fracionamento dos lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.12. A composição de ácidos graxos das frações obtidas foram analisadas por cromatografia gasosa de acordo com o método descrito no item 3.2.7.

A quantificação dos lipídeos totais, lipídeos neutros e fosfolipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtidos após 5 dias de incubação à 28°C e 12°C e a composição de ácidos graxos de cada fração estão ilustrados nas tabelas 14 e 15.

Verificou-se que os lipídeos neutros constituem a fração encontrada em maior quantidade nos lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, responsáveis por 63% e 48% dos lipídeos totais nas temperaturas de 28 e 12°C respectivamente. A diminuição na porcentagem de lipídeos neutros observado à temperatura de incubação de 12°C foi acompanhado por um aumento na porcentagem de fosfolipídeos. A quantidade de fosfolipídeos foi duplicada à 12°C quando comparada à temperatura de 28°C.

As principais diferenças observadas entre as duas temperaturas de incubação estão relacionadas à maior porcentagem de ácidos graxos insaturados obtidas na temperatura de 12°C. Verificou-se um aumento significativo no conteúdo do ácido  $\gamma$ -linolênico nos lipídeos totais, lipídeos neutros e fosfolipídeos quando o microorganismo foi incubado à 12°C, comparado aos valores obtidos na temperatura de incubação de 28°C. Em contrapartida, a porcentagem de ácido oleico, ácido esteárico e ácido palmítico foram significativamente superiores na temperatura de incubação de 28°C.

Tabela 14 - Composição de ácidos graxos das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

	Peso (mg)	Ácidos graxos (%)								
		<14:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Outros
Lipídeos totais	549	0,10	0,71	18,61	0,22	4,43	46,39	12,64	14,68	2,25
Lipídeos neutros	345	—	0,69	17,95	1,89	4,70	49,88	11,29	13,33	0,27
Fosfolipídeos	104	0,27	5,09	11,45	1,84	3,18	37,02	21,03	18,94	6,14

Tabela 15 - Composição de ácidos graxos das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

	Peso (mg)	Ácidos graxos (%)								
		<14:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	Outros
Lipídeos totais	583	3,47	0,71	8,78	1,96	3,76	39,46	16,04	19,01	6,79
Lipídeos neutros	282	0,26	5,54	10,92	1,17	2,36	39,82	21,52	18,36	0,01
Fosfolipídeos	210	0,07	4,47	11,80	1,82	2,45	42,07	13,13	24,15	0,04

As figuras 28 e 29 ilustram o perfil da composição de ácidos graxos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* dos lipídeos neutros e fosfolipídeos obtidos após 5 dias de incubação à 28°C. E as figuras 29 e 30 ilustram o perfil da composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros e fosfolipídeos obtidos após 5 dias de incubação à 12°C.

Verificou-se que a porcentagem relativa de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrada na fração de fosfolipídeos nas temperaturas de incubação de 12 e 28°C se mostrou superior à porcentagem encontrada nos lipídeos neutros. Entretanto, a maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico foi encontrada nos lipídeos neutros, provavelmente como componente de reserva da linhagem LB-54 de *Mucor sp*.

Considera-se que o aumento de fosfolipídeos e de ácido  $\gamma$ -linolênico desta fração ocorrida na temperatura de incubação de 12°C provavelmente seja um mecanismo utilizado pelo microorganismo para manter a fluidibilidade da membrana em defesa da homeostase.

Os dados obtidos estão de acordo com os relatos de MUMMA *et al*(1970). A porcentagem de ácido  $\gamma$ -linolênico encontrada em *Mucor globosus* (espécie mesófila ) foi de 12,3% em relação aos ácidos graxos totais da constituição na fração de lipídeos neutros e 25,7% nos lipídeos polares, após incubação à temperatura de 25°C. Os ácidos graxos insaturados, em especial ácido linoleico e ácido  $\gamma$ -linolênico foram os predominantes nos lipídeos polares, enquanto os ácidos graxos saturados, como palmítico e esteárico foram detectados em maior quantidade na fração neutra dos fungos mesófilos.

A análise da composição de ácidos graxos de *Blastocladiella emersonii* realizada por SUMNER (1970), demonstrou que os lipídeos polares se mostraram mais insaturados que os lipídeos neutros devido às altas quantidades de ácidos graxos com duas três e quatro insaturações ( 18:2, 18:3 $\alpha$ , 18:3 $\gamma$  e 20:4 ) na fração polar e ácidos graxos saturados ou monoinsaturados ( 16:0 e 18:1 ) na fração neutra.

SHIN & SHIN,(1988) analisaram as frações do óleo de *Mucor sp* FB-354 obtidas por cromatografia em coluna de ácido silícico. Foram encontrados 81,1% de lipídeos neutros, 7,2% de glicolipídeos e 11,8% de fosfolipídeos. A maior quantidade de ácido  $\gamma$ -linolênico foi encontrada na fração de lipídeos neutros.

Figura 28- Composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB -54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

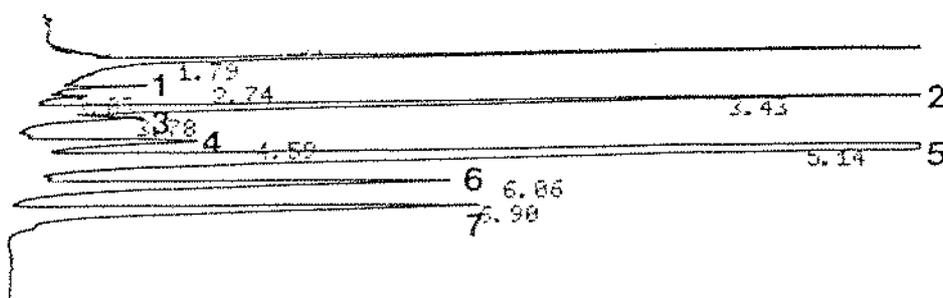


Figura 29 - Composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB -54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

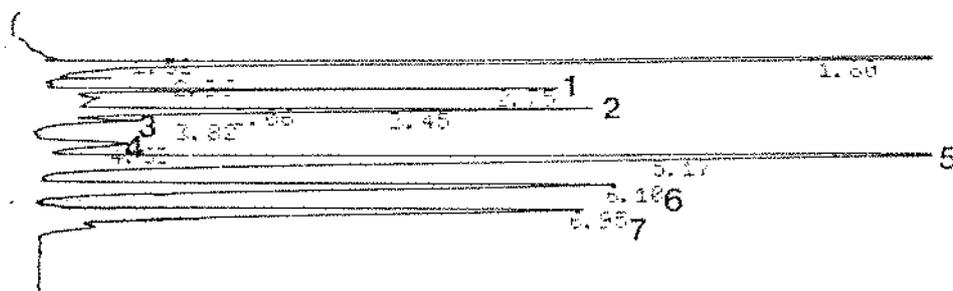


Figura 30 - Composição de ácidos graxos dos lipídeos neutros obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB -54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1 - Ácido mirístico (14:0)    | 5 - Ácido oleico (18:1)                        |
| 2 - Ácido palmítico (16:0)    | 6 - Ácido linoleico (18:2)                     |
| 3 - Ácido palmitoleico (16:1) | 7 - Ácido $\gamma$ -linolênico(18:3 $\gamma$ ) |
| 4 - Ácido esteárico (18:0)    |  |

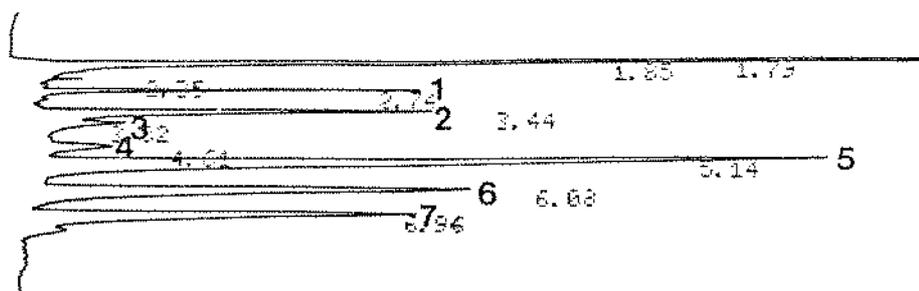
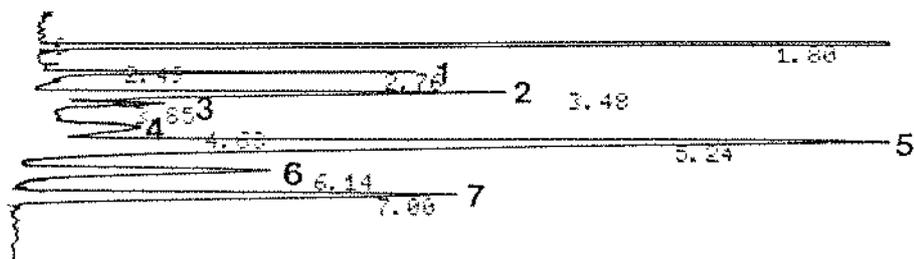


Figura 31 - Composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos obtidos por cromatografia gasosa da linhagem LB -54 de *Mucor sp* após 5 dias de incubação à 12°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.



#### 4.18 - Análise das frações de lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* por cromatografia em camada delgada ( TLC )

Após fracionamento dos lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp*, as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de acordo com o método descrito no item 3.2.11.13.

As figuras 32 e 33 ilustram os resultados.

Verificou-se que os lipídeos totais antes do fracionamento e a fração de lipídeos neutros da linhagem LB-54 de *Mucor sp* contém triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e pequenas quantidades de ácidos graxos livres, identificados por comparação com padrões idênticos das classes analisadas. Estes constituintes foram detectados após incubação do microorganismo as temperaturas de 12 e 28°C.

A figura 33 demonstra a presença de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina nos lipídeos totais antes do fracionamento e na fração de fosfolipídeos obtidos após incubação do microorganismo nas temperaturas de 12 e 28°C.

Figura 32 - Lipídeos totais e lipídeos neutros da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtidos após 5 dias de incubação nas temperaturas de 12 e 28°C

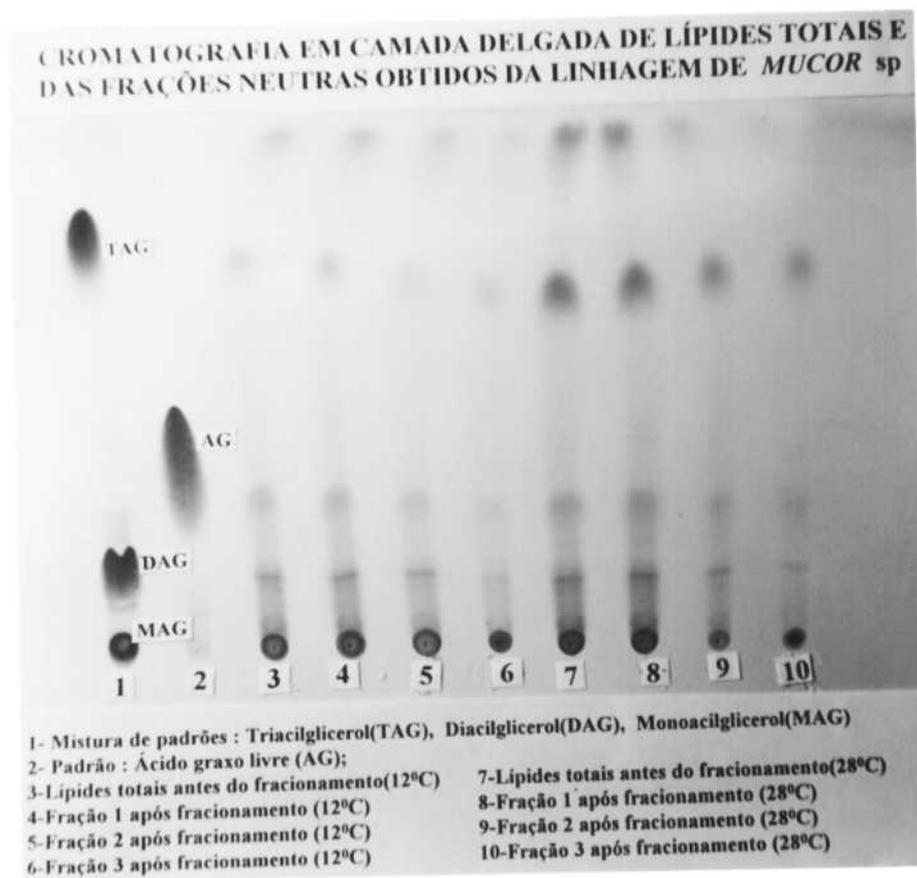
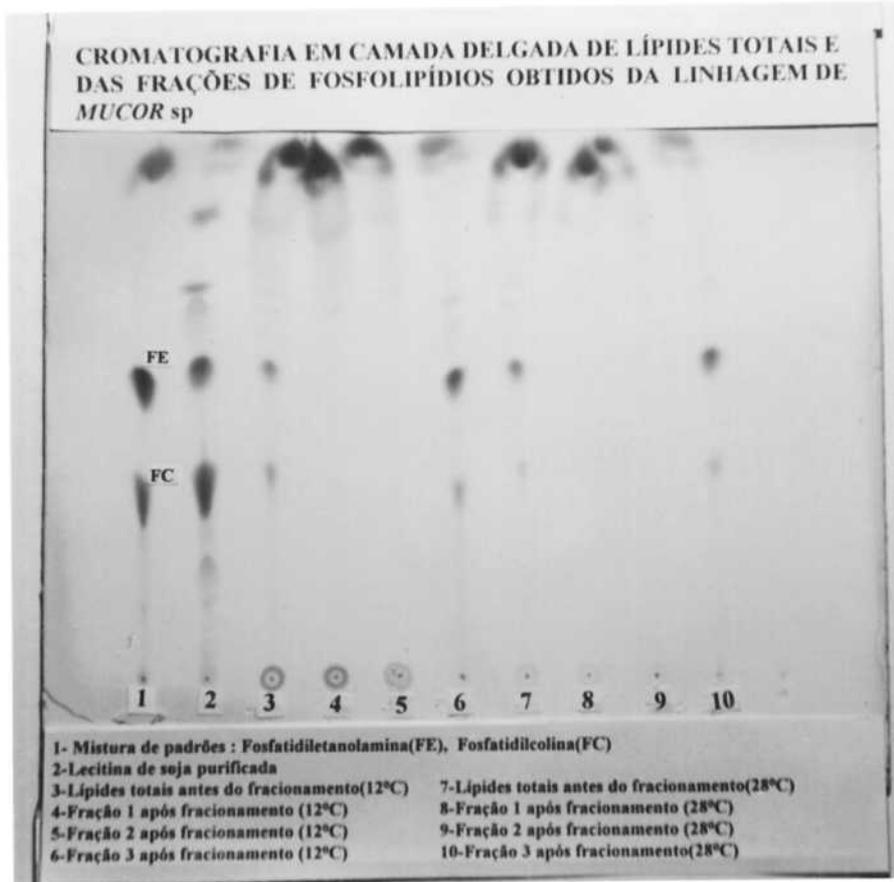


Figura 33 - Lipídeos totais e fosfolipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* obtidos após 5 dias de incubação nas temperaturas de 12 e 28°C



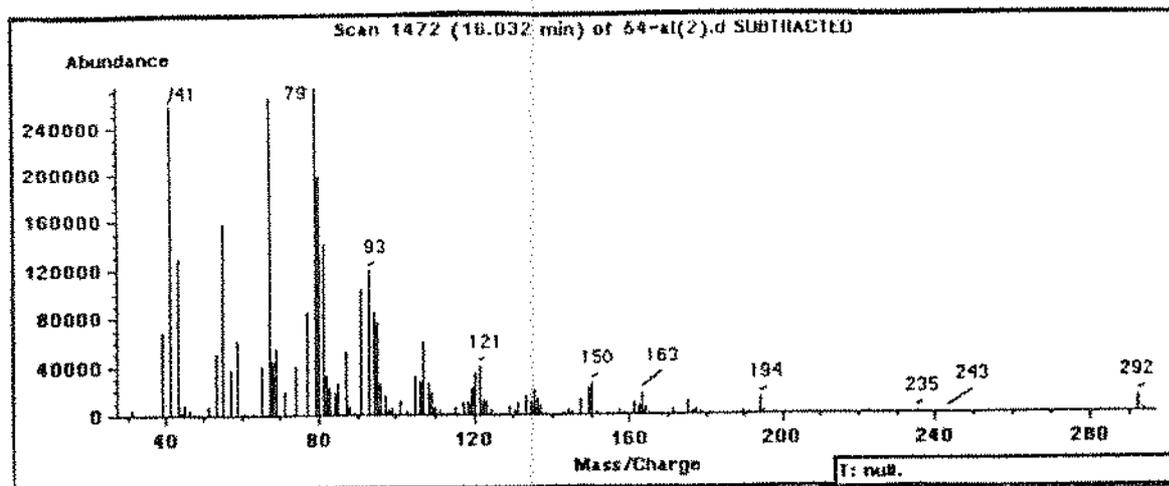
#### 4.19 - Espectrometria de massa do ácido $\gamma$ -linolênico produzido pela linhagem LB-54 de *Mucor sp*

A comprovação da presença do ácido  $\gamma$ -linolênico nos lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi realizada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa de acordo com o método descrito no item 3.2.8.

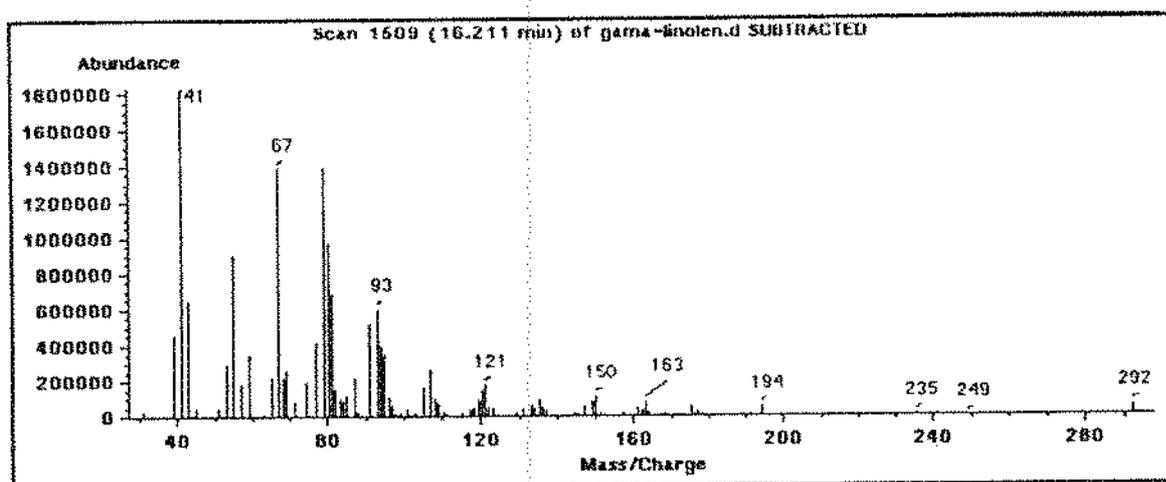
A figura 34 ilustra o espectro do éster metílico de ácido  $\gamma$ -linolênico da linhagem LB-54 de *Mucor sp*. O pico do íon molecular (  $m/e$  292 ) e os picos obtidos da fragmentação (  $m/e$  93, 79, 67 e 41 ) estão de acordo com os picos correspondentes obtidos na análise do padrão autêntico de éster metílico de ácido  $\gamma$ -linolênico.

Figura 34 - Espectro de massa do éster metílico de ácido  $\gamma$ -linolênico presente nos lipídeos da linhagem LB-54 de *Mucor* sp ( A ) e do padrão autêntico de éster metílico de ácido  $\gamma$ -linolênico ( B ).

A



B



## CONCLUSÕES

1 - A linhagem LB-54 identificada como *Mucor sp* foi selecionada devido a alto teor de lipídeos totais ( 1,2 g/l ) e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico ( 43,97 mg/l ). O teor encontrado foi correspondente ao dobro dos lipídeos totais obtidos da linhagem LB-14 e ao triplo que os obtidos da linhagem de *Mucor miehei* NRRL 3420 após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l.

2 - Nas condições descritas acima, os lipídeos totais obtido da linhagem LB-54 de *Mucor sp* apresentaram 24,8 % de ácidos graxos totais, 7,2 % de matéria insaponificável, 63 % de lipídeos neutros e 19 % de fosfolipídeos. Os principais ácidos graxos da composição do fungo, determinados por cromatografia gasosa, foram o ácido palmítico ( 18,6 % ), oleico ( 46,3 % ), linoleico ( 12,6 % ) e ácido  $\gamma$ -linolênico ( 14,7 % ). Pequenas quantidades de ácido esteárico ( 4,4 % ) foram detectadas.

3 - A produção de lipídeos totais por biomassa seca (% p/p ) da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foi de aproximadamente 20 % quando o pH inicial do meio de cultura contendo glicose, 20g/l e extrato de levedura, 10g/l foi de 6,5. Condições mais ácidas ou alcalinas inibiram a biossíntese de lipídeos totais pelo fungo.

4 - As fontes de carbono glicose e frutose resultaram em maior produção de ácido  $\gamma$ -linolênico. A fonte de nitrogênio fornecida como extrato de levedura resultou num aumento significativo da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico comparado às fontes inorgânicas testadas.

5 - A temperatura de incubação de 28°C se mostrou mais eficiente para produção de lipídeos totais após 5 dias de incubação. Temperaturas mais baixas estimularam a biossíntese de ácidos graxos insaturados, em especial de ácido linoleico ( 16,04 % ) e ácido  $\gamma$ -linolênico ( 19 % ). A fração de fosfolipídeos aumentou para 36 % e lipídeos neutros decresceu para 48 % na temperatura de incubação de 12°C

6 - A presença de íons metálicos, magnésio, cálcio, ferro, zinco, manganês e cobre nas concentrações de 0,3g/l, 10mg/l, 10mg/l, 1mg/l, 1mg/l e 2mg respectivamente não mostraram efeito significativo na produção de lipídeos pela linhagem LB-54 de *Mucor sp.*

7 - A adição simultânea de glicose ao meio de cultura seguida da variação da temperatura de incubação resultou num aumento considerável da produção de ácido  $\gamma$ -linolênico pela linhagem LB-54 de *Mucor sp.* A produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foi de 54,69 mg por litro de meio de cultura quando a linhagem foi incubada por 4 dias à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l, seguida da adição de 2 % p/v de glicose e nova incubação à 12°C por 3 dias.

8 - O máximo de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foi de 74,07 mg por litro de meio de cultura, obtido quando a linhagem foi incubada por 4 dias à 28°C em meio de cultura contendo glicose, 20 g/l e extrato de levedura, 10 g/l, seguida da adição de 7 % p/v de glicose e nova incubação à 12°C por 3 dias. Este valor corresponde à um acréscimo de 75 % na produção de ácido  $\gamma$ -linolênico comparado ao valor obtido após 5 dias de incubação à 28°C em meio de cultura composto de glicose, 20 g/l e extrato de levedura, sem adição de glicose.

9 - Os lipídeos totais da linhagem LB-54 de *Mucor sp* foram fracionados por cromatografia em coluna de Silicagel e posteriormente as frações foram identificadas por cromatografia em camada delgada. As frações neutras mostraram conter triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres. Nos fosfolipídeos foram identificados a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANEKWE, G. E. & DUBAL, B.C. Fatty acid composition of triglycerides and phosphoglycerides during growth in *Glomerella cingulata*. *Lipids*, 6 (11): 856-857, 1971.
- 2 - BANG, H. D.; DYERBERG, J.; HJORNE, N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinava* 200 : 69-76, 1976.
- 3 - BLIGH, E.G. & DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 : 911-917, 1959.
- 4 - BOWMAN, R.D. & MUMMA, R.O. The lipids of *Pythium ultimum*. *Biochimica Biophysica Acta* 144 : 501-510, 1967.
- 5 - BRENNAN, P.J.; GRIFFIN, P.F.S.; LIOSEL, D.M.; TYRREL, D. The lipids of fungi. *Progress in Chemistry of Fats and other Lipids* 14 : 51-89, 1974.
- 6 - BRUSZEWSKI, T. E.; FERGUS, C. L.; MUMMA, R. O. Thermophilic fungi : IV. The lipid composition of six species. *Lipids*, 7 (11) : 695-698, 1972.
- 7 - BURR, G.O. & BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry* 82 : 345-367, 1929.
- 8 - CARTER, J.P. Gamma-linolenic acid as a nutrient. Nutritional supplements containing gamma-linolenic acid may safely ameliorate certain health problems. *Food Technology* 72-83, 1988.
- 9 - CHAVANT, L.; SANCHOLLE, M.; MONTANT, C. Influence de la température sur la biosynthèse des acides de deux champignons filamenteux, *Aspergillus ochraceus* et *Mucor mucedo*. *Phytochemistry* 18 : 1471-1474, 1979.

- 10 - DEVEN, J. M. & MANOCHA, M.S. Effect of glutamic acid on the fatty acid and lipid composition of *Choanephora cucurbitarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 21 : 1827-1833, 1975.
- 11 - DEVEN, J. M. & MANOCHA, M.S. Effect of various cultural conditions on the fatty acid and lipid composition of *Choanephora cucurbitarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 22 (4) : 443-449, 1976.
- 12 - DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. *Compendium of soil fungi*. New York, Academic Press, 1980. p. 461-480.
- 13 - EL BOUSTANI, S.; DESCOMPS, B.; MONNIER, L.; WARNANT, J.; MENDY, F.; PAULET, A.C. In vivo conversion of dihomogamma linolenic acid into arachidonic acid in man. *Progress in Lipid Research* 25 : 67-71, 1986.
- 14 - ELLENBOGEN, B.B. & ARONSON, S.A. Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi : possible phylogenetic significance. *Comparative Biochemistry and Physiology* 29 : 805-811, 1969.
- 15 - ERWIN, J. & BLOCH, K. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in microorganisms. *Science* 143 : 1006-1012, 1964.
- 16 - FEOFILOVA, E. P.; KUZNETSOVA, L.S.; KOGTEV, L.S.; SHIROKOVA, E.A. Temperature shock and lipid composition of the *Mucor* fungus *Cunninghamella japonica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 25 (3) : 314-325, 1989.
- 17 - FUKUDA, H. & MORIKAWA, H. Enhancement of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor ambiguus* with nonionic surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27 : 15-20, 1987.
- 18 - FUNTNIKOVA, N.S.; KULAKOVA, S.N.; MEDVEDEV, F.A.; KONOVA, I.V.; LEVACHEV, M.M. *Mucor* 12M - A prospective source of  $\gamma$ -Linolenic Acid. *Applied Biochemistry and Microbiology* 28(1) : 110-113, 1992.
- 19 - GANDHI, S.R. & WEETE, J.D. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *Journal of General Microbiology* 137 : 1825-1830, 1991.

- 20 - GELLERMAN, J. L. & SCHLENK, H. Methyl-directed desaturation of arachidonic to eicosapentaenoic acid in the fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Biochimica Biophysica Acta* 573 : 23-30, 1979.
- 21 - GUNSTONE, F.D. Gamma linolenic acid - occurrence and physical chemical properties. *Progress in Lipid Research* 31(2) : 145-161, 1992.
- 22 - HANSSON, L. & DOSTÁLEK, M. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of  $\gamma$ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28 : 240-246, 1988.
- 23 - HASSAN, A.G.; RIVERS, J.P.W.; CRAWFORD, M.A. Metabolism of gamma-linolenic acid in essential fatty acid-deficient rats. *Journal of Nutrition* 107 : 519-524, 1977.
- 24 - HASSAM, A. G. The role of evening primrose oil in nutrition and disease. PADLEY, F. B. & PODMORE, J. ed. *The role of fats in human nutrition*. Chichester, Ellis Horwood, 1985. p. 85-100.
- 25 - HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22(8) : 475-476, 1973.
- 26 - HORROBIN, D.F. & MANKU, M.S. How do polyunsaturated fatty acids lower plasma cholesterol levels ? *Lipids* 18(8) : 558-562, 1983.
- 27 - HORROBIN, D.F. & HUANG, Y.S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*, 17 : 241-255, 1987.
- 28 - HORROBIN, D.F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research* 31(2) : 163-194, 1992.
- 29 - HUANG, Y.S.; MANKU, M.S.; HORROBIN, D.F. The effects of dietary cholesterol on blood and liver polyunsaturated fatty acid and on plasma cholesterol in rats fed various types fatty acid diet. *Lipid* 19(9) : 664-672, 1984.
- 30 - INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. *Progress in Lipid Research* 30(1) : 39-103, 1991.
- 31 - JAREONKITMONGKOL, S.; KAWASHIMA, H.; SHIRASAKA, N.; SHIMIZU, S.; YAMADA, H. Production of dihomogamma-linolenic

acid by a  $\Delta 5$ -desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* IS-4. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (7) : 2196-2200, 1992.

- 32 - KAMISAKA, Y.; YOKOCHI, T.; NAKAKARA, T.; SUZUKI, O. Incorporation of linoleic acid and its conversion to  $\gamma$ -linolenic acid in fungi. *Lipids*, 25(1) : 54-60, 1990.
- 33 - KANG, H.S. & SHIN, H.D. Influence of medium composition on the production of  $\gamma$ -linolenic acid by *Mucor* sp KCTC 8405P. *Korean Journal Applied of Microbiology and Bioengineering*, 17 (6): 568-573, 1989.
- 34 - KATES, M. General analytical procedures. WORK, T. S. & WORK, E. *Techniques in Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids*. London, North Holland, 1972. p. 363-364.
- 35 - KEEN, H.; PAYAN, J.; ALLAWI, J.; WALKER, J.; JAMAL, G.A.; WEIR, A.I.; HENDERSON, L.M.; BISSESSAR, E.A.; WATKINS, P.J.; SAMPSON, M.; GALE, E.A.M.; SCARPELLO, J.; BODDIE, H.G.; HARDY, K.J.; THOMAS, P.K.; MISRA, P.; HALONEN, J.P. Treatment of diabetic neuropathy with  $\gamma$ -Linolenic acid. *Diabetes Care* 16(1) : 8-15, 1993.
- 36 - KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. Lipid formation in the oleaginous mould *Entomophthora exitalis* grown in continuous culture : effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on PUFA. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 : 18-22, 1992a.
- 37 - KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. Lipids of selected molds grown for production of *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 27(1) : 15-20, 1992b.
- 38 - KINSELLA, J.E.  $\alpha$ -Linolenic acid : function and effects on linoleic acid metabolism and eicosanoid - mediated reactions. *Advances in Food and Nutritional Research* 35 : 1-184, 1991.
- 39 - KRIS-ETHERTON, P.M.; KRUMMEL, D.; RUSSEL, M.E.; DREON, D.; MACKEY, S.; BORCHERS, J.; WOOD, P.D. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins and coronary heart disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 88 : 1373-1400, 1988.
- 40 - LASSERRE, M.; MENDY, F.; SPIELMANN, D.; JACOTOT, B. Effect of different dietary intakes of essential fatty acids on 20:3 *n*-6 and 20:4 *n*-6 serum levels of human adults. *Lipids* 20(4) : 227-233, 1985.

- 41 - LETOURNEAU, D.R.; DEVEN, J.M.; MANOCHA, M.S. Structure and composition of the cell wall of *Choanephora cucurbitarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 22 : 486-494, 1976.
- 42 - LINDBERG, A.M. & HANSSON, L. Production of  $\gamma$ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36 : 26-28, 1991.
- 43 - LÖSEL, D.M. Fungal lipids. RATLEDGE, C. & WILKINSON, S. G. ed *Microbial lipids*. Londres, Academic Press, 1988 p.699-806.
- 44 - MAIA, E. L. Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição de ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1992.
- 45 - MANKU, M.S.; HORROBIN, D.F.; MORSE, N.L.; WRIGHT, S.; BURTON, J.L. Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. *British Journal of Dermatology*, 110 : 643-648, 1984.
- 46 - MANKU, M.S.; MORSE-FISHER, N.; HORROBIN, D.F. Changes in human plasma essential fatty acid levels as a result of administration of linoleic acid and gamma-linolenic acid. *European Journal of Clinical Nutrition* 42 : 55-62, 1988.
- 47 - MANOCHA, M.S. & DEVEN, J.M. Host-parasite relations in a mycoparasite IV. A correlation between the levels of  $\gamma$ -linolenic acid and parasitism of *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia* 67 : 1148-1157, 1975.
- 48 - MANOCHA, M.S. & CAMPBELL, C.D. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Thamnidium elegans* Link. *Canadian Journal of Microbiology* 24 : 670-674, 1978.
- 49 - MANOCHA, M.S. Host specificity and mechanism of resistance in a mycoparasitic system. *Physiological Plant Pathology*, 18 : 257-263, 1981.
- 50 - MIKAHAILIDIS, D.P.; KIRTLAND, S.; BARRADAS, M.A.; DANDONA, P. Dihomogammalinolenic acid inhibits platelet aggregation and stimulates platelet prostaglandin E1 production in healthy subjects but not in insulin dependent diabetics. *Progress in Lipid Research* 25 : 303-304, 1986.

- 51 - MILLER, C.C.; MCCREEDY, C.A.; JONES, A.D. & ZIBOH, V.A. Oxidative metabolism of dihomogammalinolenic acid by guinea pig epidermis : evidence of generation of antiinflammatory products. *Prostaglandins* 35 (6) : 917-938, 1988.
- 52 - MUMMA, R.O.; FERGUS, C.L.; SEKURA, R.D. The lipids of thermophilic fungi : Lipid composition comparisons between thermophilic and mesophilic fungi. *Lipids* 5(1) : 100-103, 1970.
- 53 - MUMMA, R.O.; SEKURA, R.D.; FERGUS, C.L. Thermophilic fungi : II. Fatty acid composition of polar and neutral lipids of thermophilic and mesophilic fungi. *Lipids* 6 (8) : 584-588, 1971.
- 54 - NES, W.R. The biochemistry of plant sterols. *Advances in Lipid Research* 15 : 233-324, 1977.
- 55 - PUOLAKKA, J.; MÄKÄRÄINEN, L.; VIINIKKA, L.; YLIKORKKALA, O. Biochemical and clinical effects of treating the premenstrual syndrome with prostaglandin synthesis precursors. *The Journal of Reproductive Medicine*, 30(3) : 149-153, 1985.
- 56 - RADWAN, S.S. & SOLIMAN, H. A. Arachidonic acid from fungi utilizing fatty acids with shorter chains as sole sources of carbon and energy. *Journal of General Microbiology* 134 : 387-393, 1988.
- 57 - RATLEDGE, C. Microbial oil and fats : An assessment of their commercial potential. *Progress in Industrial Microbiology*, 16 : 119-206, 1982.
- 58 - RILEY, J.P. The seed fat of *Oenothera biennis* L. *Journal of Chemistry Society* 4 : 2728-2731, 1949.
- 59 - SAFE, S. The effect of environment on the free hydrosoluble sterols of *Mucor rouxii*. *Biochimica Biophysica Acta* 326 : 471-475, 1973.
- 60 - SAFE, S. & BREWER, D. Lipid composition of *Chaetomium cochliodes*: Effect of media. *Lipids*, 8(5) : 311-314, 1973.
- 61 - SAFE, S. Lipid and alkali extractable fatty acids from *Mucor rouxii* : effect of thermal changes in growth environment and age of cells. *Lipids*, 9(12) : 952-956, 1974.
- 62 - SAFE, S. & CALDWELL, J. The effect of growth environment on the chloroform-methanol and alkali-extractable cell wall and cytoplasm lipid levels. *Canadian Journal of Microbiology* 21 : 79-84, 1975.

- 63 - SAJBIDOR, J.; CERTÍK, M.; DOBRŇOVÁ, S. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. *Biotechnology Letters*, 10(5) : 347-350, 1988.
- 64 - SCHALIN-KARRILA, M.; MATTILA, L.; JANSEN, C.T.; UOTILA, P. Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema : effect on clinical status, plasma phospholipid fatty acid and circulating blood prostaglandins. *British Journal of Dermatology*, 117 : 11-19, 1987.
- 65 - SHAW, R. The occurrence of  $\gamma$ -linolenic acid in fungi. *Biochimica Acta* 98 : 230-237, 1965.
- 66 - SHAW, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the  $\gamma$ -linolenic acid component. *Comparative Biochemistry and Physiology* 18 : 325-331, 1966.
- 67 - SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; AKIMOTO, K.; SHINMEN, Y.; YAMADA, H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *Journal American Oil Chemistry Society* 65 (9) : 1455-1459, 1988.
- 68 - SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; AKIMOTO, K.; SHINMEN, Y.; YAMADA, H. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid containing oil by *Mortierella alpina* 1S-4 at low temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 : 1-4, 1989.
- 69 - SHIN, Y.C. & SHIN, H.K. Screening of  $\gamma$ -linolenic acid-producing fungi. *Korean Journal Food Science and Technology*, 20(5) : 724-731, 1988.
- 70 - SUGANO, M.; ISHIDA, T.; IDE, T. Effect of various polyunsaturated fatty acids on blood cholesterol and eicosanoids in rats. *Agricultural and Biological Chemistry* 50(9) : 2335-2340, 1986a.
- 71 - SUGANO, M.; ISHIDA, T.; YOSHIDA, K.; TANAKA, K.; NIWA, M.; ARIMA, M.; MORITA, A. Effects of mold oil containing  $\gamma$ -linolenic acid on the blood cholesterol and eicosanoid levels in rats. *Agricultural and Biological Chemistry* 50(10) : 2483-2491, 1986b.
- 72 - SUMNER, J. L. & MORGAN, E.D. The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi in the order Mucorales. *Journal of General Microbiology* 59 : 215-221, 1969.